

УДК 577.15+612.8.04

DOI: 10.25688/2076-9091.2023.51.3.02

Сергей Викторович Клыченков¹,
Анастасия Дмитриевна Кручинина²,
Сергей Сергеевич Гамзин³,
Ольга Анатольевна Левашова⁴

^{1,2,3} Пензенский государственный университет,
Пенза, Россия

⁴ Пензенский институт усовершенствования врачей —
филиал РМАНПО Минздрава РФ,
Пенза, Россия

Оценка изменения активности карбоксипептидаз под действием пептидов продуктов пчеловодства при хроническом стрессе¹

Аннотация. За последние несколько лет резко выросла частота заболеваемости тревожными и депрессивным расстройствами, поэтому исследование анксиолитической активности пептидов различного происхождения является актуальной проблемой. Цель данной статьи — изучить влияние пептидов маточного молочка, трутневого расплода и пчелиного меда массой до 5 кДа на активность карбоксипептидаз E и D в нервной ткани и надпочечниках крыс в условиях хронического стресса. Для этого самцы крыс линии Wistar в течение 16 суток подвергались случайному умеренному стрессу и параллельно с этим раз в сутки интраназально получали водные растворы перечисленных пептидов в концентрации 300 мкг/кг массы тела. На 17-е сутки животные были выведены из эксперимента и образцы их тканей были использованы для измерения активности карбоксипептидаз и уровня гормонов стресса в сыворотке крови. Было установлено, что ферментативная активность в гипофизе, амигдале и продолговатом мозге под действием пептидов трутневого расплода и маточного молочка ниже на 61 % / 70 %, 53 % / 44 % и 37 % / 44 % соответственно, а в гипоталамусе, стриатуме, гиппокампе и четверохолмии — выше на 94 % / 172 %, 86 % / 114 %, 116 % / 189 %, 96 % / 54 % соответственно, по сравнению с животными контрольной группы. Влияния пептидов пчелиного меда на ферментативную активность установлено не было, равно как и влияния всех исследованных пептидов на активность карбоксипептидаз в надпочечниках и уровня кортикостерона и АКТГ в сыворотке крови.

Таким образом, в результате данного эксперимента было показано, что пептиды продуктов пчеловодства влияют на активность карбоксипептидаз E и D в нервной ткани крыс, но не во всех отделах, и не оказывают влияния на работу гипоталамо-гипофизарно-надпочечниковой оси. Полученные данные можно использовать как экспериментальную основу для создания биологически активной добавки с анксиолитическим действием.

Ключевые слова: пептиды маточного молочка, пептиды трутневого расплода, анксиолитический эффект, карбоксипептидаза E, хронический стресс

¹ Исследование выполнено при финансовой поддержке РФФИ в рамках научного проекта № 20-34-9005.

UDC 577.15+612.8.04

DOI: 10.25688/2076-9091.2023.51.3.02

Sergey Viktorovich Klychenkov¹,
Anastasia Dmitrievna Kruchinina²,
Sergey Sergeevich Gamzin³,
Olga Anatolyevna Levashova⁴

^{1,2,3} Penza State University,
Penza, Russia

⁴ Penza Institute of Advanced Training of Doctors — branch of the Russian Medical Academy of Continuing Professional Education of the Ministry of Health of the Russian Federation,
Penza, Russia

Evaluation of changes in the activity of carboxypeptidases under the action of peptides of bee products under chronic stress²

Abstract. Over the past few years, the incidence of anxiety and depressive disorders has increased dramatically, so the study of the anxiolytic activity of peptides of various origins is an urgent problem. The purpose of this article is to study the effect of peptides of royal jelly, drone brood and bee honey weighing up to 5 kDa on the activity of carboxypeptidases E and D in the nervous tissue and adrenal glands of rats under chronic stress. For this purpose, male rats of the Wistar line were subjected to random moderate stress for 16 days and at the same time, once a day, intranasally received aqueous solutions of the listed peptides at a concentration of 300 micrograms / kg of body weight. On day 17, the animals were removed from the experiment and their tissue samples were used to measure the activity of carboxypeptidases and the level of stress hormones in the blood serum. It was found that the enzymatic activity in the pituitary gland, amygdala and medulla oblongata under the action of peptides of drone brood and royal jelly is lower by 61 % / 70 %, 53 % / 44 %, and 37% / 44%, respectively, and in the hypothalamus, striatum, hippocampus and quadriplegia — higher by 94% / 172 %, 86 % / 114 %, 116 % / 189 %, 96 % / 54 % accordingly, compared with the animals of the control group. The effect of bee honey peptides on enzymatic activity was not established, as well as the effect of all the peptides studied on the activity of carboxypeptidases in the adrenal glands and the level of corticosterone and ACTH in the blood serum.

Thus, as a result of this experiment, it was shown that peptides of bee products affect the activity of carboxypeptidases E and D in the nervous tissue of rats, but not in all departments, and do not affect the work of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis. The obtained data can be used as an experimental basis for the creation of a biologically active additive with anxiolytic action.

Keywords: royal jelly peptides, drone brood peptides, anxiolytic effect, carboxypeptidase E, chronic stress

² The research was carried out with the financial support of the RFBR in the framework of scientific project No. 20-34-9005.

Введение

Хронический стресс является одной из ключевых причин формирования депрессивных состояний [7]. Постоянное воздействие стрессовых факторов за счет существования нейропластичности вызывает изменения в работе нейромедиаторных и пептидергических систем в попытке адаптации к неблагоприятным условиям среды. Такие изменения могут быть опосредованы как за счет изменения количества рецепторов, так и за счет изменения активности ферментов процессинга нейроактивных молекул [17]. Экспериментально доказано, что при депрессивных состояниях изменяется не только концентрация АКТГ, кортикотропина, холецистокинина, нейропептида Y, вещества P, галанина, вазопрессина, пептида, активирующего аденилатциклазу гипофиза, окситоцина [14] и ангиотензина II [8], которые участвуют в регуляции работы нейромедиаторных систем, но и активность ферментов их процессинга — различных пептидгидролаз (например, пептидил-дипептидаза А, карбоксипептидаза В, карбоксипептидаза Е и т. д.) [18], а ввод антидепрессантов приводит к изменению их активности в нервной ткани [3]. Установлено, что карбоксипептидаза Е участвует в процессинге таких нейропептидов, вовлеченных в развитие тревожности, как инсулин, проопиомеланокортин, нейротензин, меланин-концентрирующий гормон, адренокортикотропный гормон, холецистокинин, энкефалин, дополнительно участвует в работе глутаминергической и ацетилхолиновой систем через регуляцию созревания секреторных везикул в терминалях нейронов [9]. Критическая значимость работы карбоксипептидазы Е в поддержании нормального функционирования систем организма установлена через эксперименты с нокаутными по соответствующему гену мышами и относительно недавно открытым BDV-синдромом (Blakemore-Durmaz-Vasileiou syndrome) [4].

Таким образом, со временем находится все больше и больше доказательств того, что при депрессии нарушается не только работа дофаминовой системы, но также и другие нейрохимические механизмы регуляции работы нервной системы, а причинами депрессии могут стать не только внешние факторы, но и генетическая предрасположенность (например, мутация в гене карбоксипептидазы Е у больных синдромом Альцгеймера ведет к развитию депрессии и деменции [6]).

В настоящее время в рамках поиска новых типов антидепрессантов активно исследуются на наличие анксиолитической и антидепрессивной активности пептиды и пептидные гидролизаты белков различного происхождения. Способность уменьшать проявления тревоги экспериментально показана для широкого спектра пептидов, полученных из растительного и животного сырья [13], в том числе пептидов из продуктов пчеловодства [1]. Целью данной статьи является изучение способности пептидов маточного молочка, трутневого расплода и пчелиного меда при интраназальном введении оказывать

воздействие на карбоксипептидазную активность в нервной ткани и надпочечниках крыс в условиях хронического стресса как один из механизмов обеспечения их анксиолитического действия.

Материалы и методы исследования

Экспериментальные животные и формирование хронического стресса

В качестве экспериментальных животных использовались самцы крыс линии Wistar массой 190–210 гр ($n = 8$), содержащиеся в стандартных условиях вивария со свободным доступом к пище и воде, с периодами день/ночь по 12 часов, если экспериментом не было предусмотрено иное. Для формирования стрессового состояния использовался метод случайного непредсказуемого мягкого стресса: на животных воздействовали в течение 16 суток случайными стрессовыми факторами (по 2 фактора в сутки), такими как оставление без воды на 24 часа, нарушение режима день/ночь (свет 24 часа), содержание в темноте в течение 5 часов в период дня, иммобилизация на 50 минут, помещение клетки на 1D-шейкер (300 грм), содержание при 4 °С в течение 60 минут, плавание без возможности выбраться из сосуда с водой в течение 5 минут. Параллельно с воздействием стрессовых факторов животные опытных групп каждый день интраназально получали водные растворы пептидов маточного молочка, трутневого расплода и пчелиного меда в концентрации 300 мкг/кг массы тела объемом 8 мкл, животные контрольной группы получали 0,9-процентный р-р NaCl в том же объеме.

Для оценки сформированности стрессового состояния на 1, 5, 10 и 15-е сутки животные контрольной группы прошли тест «Приподнятый крестообразный лабиринт»: в течение 8 минут измерялось время, проведенное каждой крысой в открытых и закрытых рукавах установки.

На 17-е сутки после очередного введения образцов пептидов животные всех групп были выведены из эксперимента, а гипофиз, гипоталамус, стриатум, гиппокамп, миндаля, четверохолмие, продолговатый мозг, надпочечники и сыворотка крови были изъяты для дальнейшего изучения в них активности ферментов обмена нейропептидов и концентрации гормонов стресса.

Получение пептидов

Вводимые водные растворы пептидов были получены методом, описанным ранее [2]. Если кратко, то водные растворы маточного молочка, пчелиного меда и водный гомогенат личинок трутневого расплода были профильтрованы через ультрафильтрационную мембрану с порогом молекулярной массы 5 кДа.

Полученный фильтрат был очищен от примесей ионообменной хроматографией на DEAE-целлюлозе и обессолен на сефадексе G-25.

Определение карбоксипептидазной активности, концентрации стрессовых гормонов и статистическая обработка данных

Для определения общей активности карбоксипептидаз E и D в образцах, полученных от экспериментальных животных, был использован метод, основанный на измерении интенсивности флюоресценции продукта реакции [15]. В качестве субстрата был использован модифицированный трипептид дансил-фен-ала-арг. Для проведения реакции к 50 мкл гомогената изучаемой ткани добавляли либо 150 мкл 50 мМ натрий-ацетатного буфера с 50 мМ NaCl (pH = 5,6) — опытная проба, либо 140 мкл того же буферного раствора и 10 мкл 25 мкМ водного раствора GEMSA (ингибитор) — контрольная. Пробы инкубировали при 37 °С в течение 60 минут, после чего добавляли 50 мкл 1 М р-ра HCl для остановки реакции. Для экстракции продукта — дансил-фен-ала — к пробам приливали 1,5 мл хлороформа и интенсивно встряхивали в течение 1 минуты, после чего центрифугировали при скорости 1000 об/мин в течение 10 минут. Флюоресценцию хлороформенной фазы измеряли при $\lambda_{\text{ex}} = 360$ нм и $\lambda_{\text{em}} = 530$ нм в кювете с длиной оптического пути 1 см против холостой пробы. Концентрацию белка в пробах определяли методом Лоури. Активность фермента определяли по разнице флюоресценции между опытными и контрольными пробами и выражали в нмоль дансил-фен-ала, образовавшегося за 1 минуту в пересчете на 1 мг белка.

Концентрацию кортикостерона и адренкортикотропного гормона в образцах сыворотки крови измеряли с помощью коммерческих наборов методом ИФА.

Статистическую обработку полученных данных проводили с использованием ПО LibreOffice Calc: рассчитывали средние значения в повторностях, коэффициенты стандартного отклонения и *t*-критерий Стьюдента в качестве показателя достоверности различий между сравниваемыми параметрами.

Результаты исследования

Оценка сформированности хронического стресса

Результаты по измерению поведения опытных животных в тесте «Приподнятый крестообразный лабиринт» для оценки уровня сформированности хронического стресса и тревоги представлены на рисунке 1. Анализ полученных данных позволяет заключить, что за время моделирования хронического

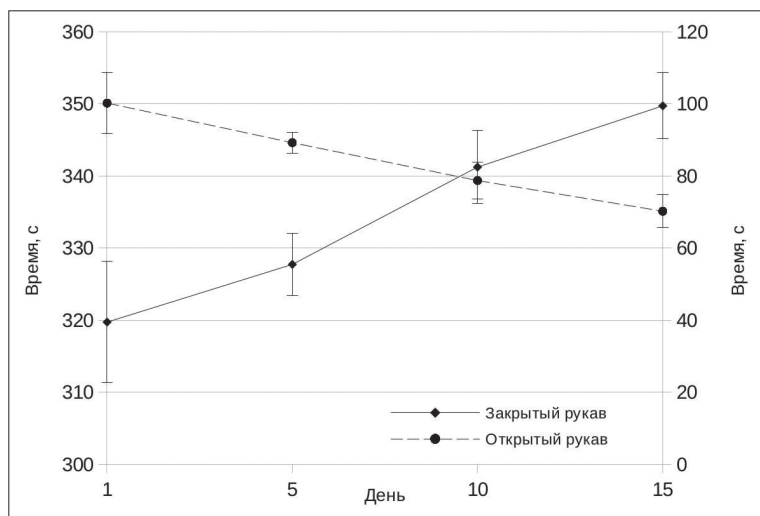
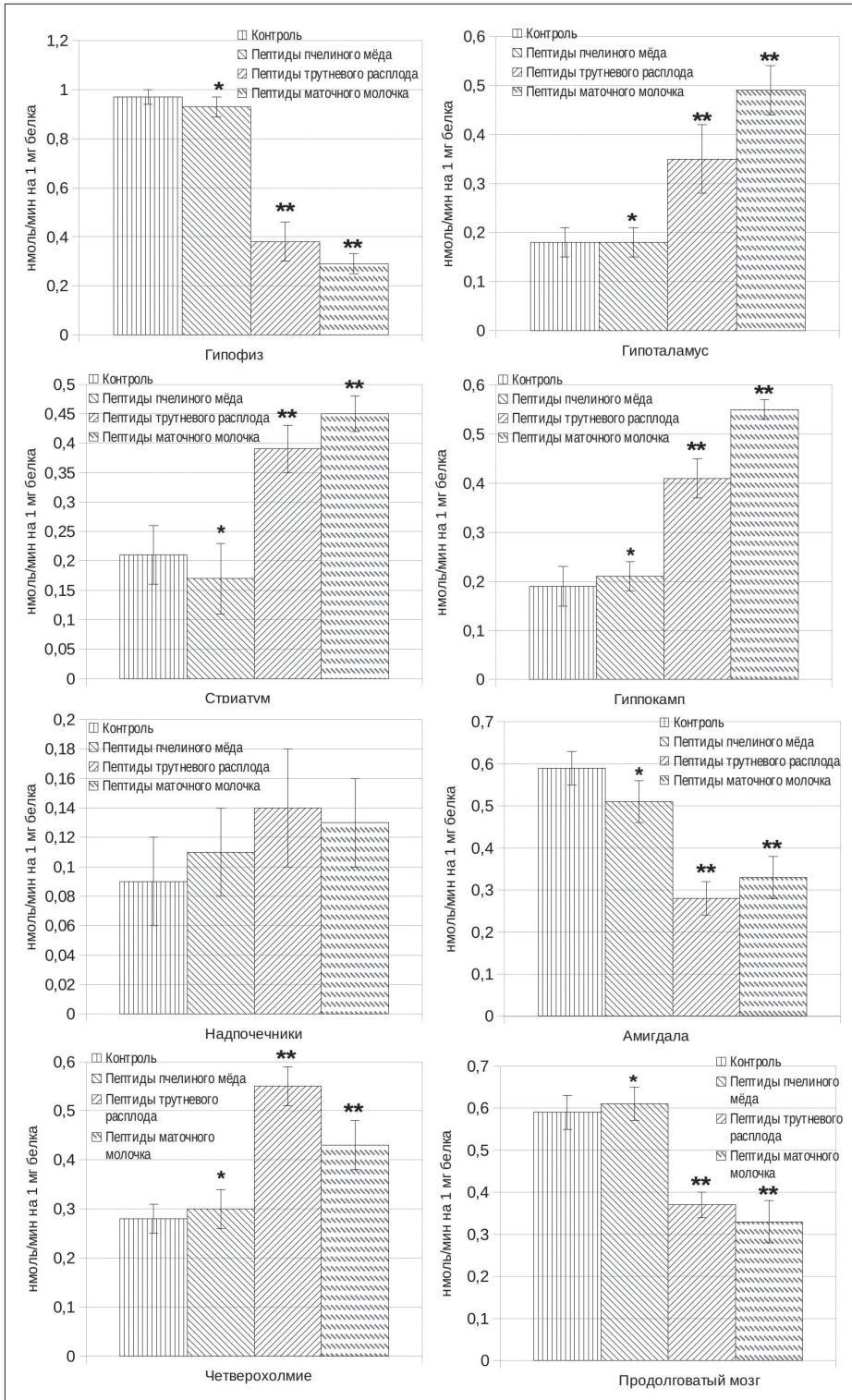


Рис. 1. Динамика изменения нахождения опытных животных контрольной группы (левая шкала — для времени, проведенном в закрытых рукавах; правая — для времени в открытых рукавах)

стресса у животных контрольной группы статистически достоверно снизилось на 30 % время нахождения в открытых рукавах установки, что подтверждает успешное формирование состояния тревоги и стресса, так как животные с повышенным уровнем тревоги больше остаются в закрытых рукавах, тем самым проявляя тигмотаксис как поведенческую реакцию на стресс.

Карбоксипептидазная активность и концентрация гормонов стресса

Результаты по измерению активности карбоксипептидаз E и D в гипофизе, гипоталамусе, стриатуме, гиппокампе, надпочечниках, амигдале, четверохолмии и продолговатом мозге представлены на рисунке 2. Было установлено, что активность ферментов в исследованных образцах гипофиза, амигдалы и продолговатого мозга, полученных от животных, которым вводили пептиды трутневого расплода и маточного молочка, по сравнению с группой контроля статистически достоверно снизилась на 61 % / 70 %, 53 % / 44 %, и 37 % / 44 % соответственно, а в образцах гипоталамуса, стриатума, гиппокампа и четверохолмия — повысилась на 94 % / 172 %, 86 % / 114 %, 116 % / 189 %, 96 % / 54 % соответственно. Также не было установлено статистически значимого влияния пептидов пчелиного меда на карбоксипептидазную активность во всех исследованных образцах. Отсутствие изменения ферментативной активности в образцах надпочечников свидетельствует, что пептиды не оказывают системного действия, потому что не всасываются в кровоток через слизистый эпителий носовой полости, но оказывают действие напрямую в головном мозге



Примечание: * — или отсутствие символа $p > 0,05$, ** — $p < 0,05$.

Рис. 2. Показатели карбоксипептидазной активности

либо воздействуя на обонятельные нейроны, либо попадая в ткани головного мозга через обонятельные пути. Подобное действие зафиксировано в ряде похожих экспериментов по изучению биологической активности пептидных препаратов, вводимых интраназально [12], однако в зависимости от механизма работы пептидов их действие может быть системным и опосредованным через различные сигнальные пути, активируемые ими в ЦНС.

Определение активности обеих карбоксипептидаз вместо активности конкретного фермента связано с тем, что в нервной ткани экспрессируется сразу несколько металлозависимых карбоксипептидаз с аналогичной субстратной специфичностью: карбоксипептидаза В (3.4.17.2), карбоксипептидаза Е (3.4.17.10), карбоксипептидаза М (3.4.17.12), карбоксипептидаза U (3.4.17.20), карбоксипептидаза D (3.4.17.22) и карбоксипептидаза Z (3.4.17), которые отщепляют С-концевые лизин или аргинин, активируются двухзарядными ионами металлов (цинк, кобальт, магний, кальций), ингибируются либо хелаторами, либо другими традиционно применяемыми ингибиторами карбоксипептидаз (например, GEMSA). Подбор pH реакционной среды позволяет дифференцировать активности этих ферментов, однако карбоксипептидазы Е и D имеют общий оптимум — 5,5–6,0, поэтому раздельное определение их активностей невозможно осуществить традиционными методами [15]. В научной литературе недостаточно данных о роли карбоксипептидазы D в процессах синтеза и созревания нейропептидов. В настоящий момент существуют лишь предположения о роли этого фермента в транспорте нейропептидов из комплекса Гольджи в формирующиеся секреторные везикулы; данные об этом были получены на культурах клеток гипофиза AtT-20 [11], поэтому далее мы сконцентрируемся только на роли карбоксипептидазы Е в формировании тревожности, так как роль этого фермента в функционировании пептидергических систем изучена более подробно.

Полученные данные позволяют определить биохимическую основу наблюдаемого ранее анксиолитического эффекта изученных пептидных фракций в условиях хронического стресса [1]. Снижение ферментативной активности в гипофизе, но повышение активности в гипоталамусе, на наш взгляд, позволяет заключить, что пептиды трутневого расплода и маточного молочка не оказывают анксиолитического действия через снижение активности гипофизарной части гипоталамо-гипофизарно-надпочечниковой оси — одного из главных биохимических механизмов реализации стрессовых реакций организма. Это предположение также подтверждается отсутствием статистически достоверного изменения в уровне кортикостерона и кортикотропина плазмы крови у экспериментальных животных (см. рис. 3). Повышение карбоксипептидной активности в гипоталамусе означает усиление процессов синтеза регуляторных пептидов нейронами данного отдела, однако в случае пептидов маточного молочка и трутневого расплода не наблюдается подобного повышения активности в гипофизе, что свидетельствовало бы об активации подобных процессов в этом отделе мозга.

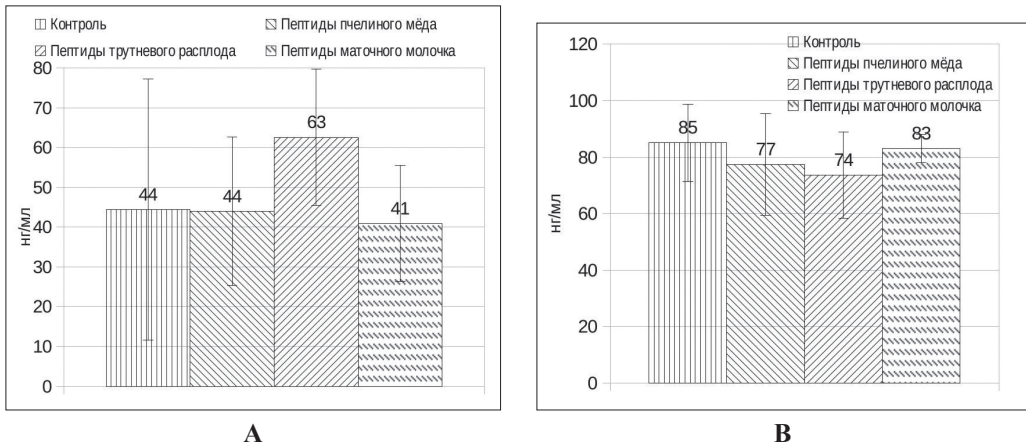


Рис. 3. Концентрации АКТГ (А) и кортикостерона (В) в сыворотке крови экспериментальных животных

Снижение карбоксипептидазной активности в амигдале и продолговатом мозге говорит об уменьшении активности пептидергических систем данных отделов мозга, в работу которых вовлечены карбоксипептидазы E и D, что объясняет наблюдаемый анксиолитический эффект. Амигдала, являясь ключевым центром мозга, регулирующим реакции страха и тревоги, имеет большое количество ГАМК-ергических нейронов, которые экспрессируют рецепторы к различным нейропептидам, таким как окситоцин, вазопрессин, бомбезин-подобный пептид, кортиколиберин, соматостатин, кальцитонин-ген родственный пептид, пептид, активирующий аденилатциклазу гипофиза, нейрокинин В и нейрокинин 3, часть из которых процессируется с участием карбоксипептидазы E [5]. Снижение ферментативной активности в амигдале, наблюдаемое в данном эксперименте под действием пептидов маточного молочка и трутневого расплода, может свидетельствовать о снижении уровня хронического стресса и страха. Продолговатый мозг участвует в регуляции работы симпатической нервной системы, влияя на тонус скелетной мускулатуры и работу сердца. В экспериментальных исследованиях показано, что в продолговатом мозге находятся пресимпатические нейроны, содержащие везикулы с нейропептидами, в процессинге которых участвует карбоксипептидаза E: вазоактивный интестинальный пептид, нейропептид Y, холецистокинин, октапептид, нейротензин и энкефалин [16]. Так как продолговатый мозг через регуляцию работы симпатической нервной системы задействован в регуляции ответа организма на стрессовые воздействия, что особенно важно при хроническом стрессе и состоянии хронической тревоги, когда процессы возбуждения симпатической нервной системы доминируют над процессами торможения, можно заключить, что наблюдаемое снижение активности карбоксипептидазы E обосновывает анксиолитический эффект пептидов маточного молочка и трутневого расплода. Возможно, что в нашем эксперименте

пониженный уровень ферментативной активности физиологически находит отражение в снижении тревожности, вызванное понижением концентрации нейропептидов в данном регионе мозга, что приводит к понижению тонуса симпатической нервной системы.

Повышение изученной ферментативной активности в гиппокампе и четверохолмии может быть связано с активацией этих структур за счет новизны обстановки; известно, что поведенческие тесты приводят к активации нейронных путей в гиппокампе с целью закрепления памяти о навигации в новом месте [10]. Активация нейронных структур приводит и к активации ферментов процессинга нейропептидов. Например, карбоксипептидаза E участвует в процессинге нейропептида Y, играющего важную роль в формировании памяти, в том числе памяти места в гиппокампе. Повышение изученной ферментативной активности в стриатуме также может свидетельствовать об анксиолитическом влиянии пептидов маточного молочка и трутневого расплода, так как стриатум обладает тормозной активностью по отношению к напряжённой мышечной мускулатуре. Состояние хронического стресса на физиологическом уровне характеризуется в том числе и повышенным тонусом мускулатуры, и снижение этого напряжения опосредованно через активацию стриатума. Повышение карбоксипептидазной активности может свидетельствовать об активации процессов синтеза и созревания нейропептида Y, энкефалина, нейротензина и динорфина, то есть активации тормозного действия стриатума.

Заключение

В научной литературе накопилось достаточно эмпирических данных, доказывающих, что при развитии хронической тревоги и депрессивных состояний в головном мозге изменяется характер работы различных пептидергических систем. Одним из механизмов модуляции работы таких систем является влияние на активность ферментов процессинга нейропептидов, в том числе карбоксипептидаз E и D, участвующих в их созревании и упаковке в секреторные везикулы. Одним из актуальных направлений в исследовании проблем возникновения тревоги и депрессивных состояний как патологии является изучение биологической активности пептидов природного происхождения. В ходе данного эксперимента были полученные данные, свидетельствующие о наличии влияния пептидов маточного молочка и трутневого расплода массой до 5 кДа на активность карбоксипептидаз E и D в различных регионах мозга экспериментальных животных в условиях хронического стресса. Полученные результаты можно использовать для создания перспективной биологически активной добавки, имеющей анксиолитический эффект.

Список источников

1. Клыченков С. В., Кручинина А. Д. Влияние пептидов продуктов пчеловодства на степень развития ангедонии у крыс в условиях хронического стресса // Научный аспект. 2022. Т. 5. № 5. С. 601–607. URL: <https://elibrary.ru/item.asp?id=49848131>
2. Клыченков С. В., Кручинина А. Д. Способ выделения и очистки низкомолекулярных пептидов из продуктов пчеловодства с использованием хроматографических методов // Сорбционные и хроматографические процессы. 2023. Т. 23. № 1. С. 107–115. DOI: 10.17308/sorpchrom.2023.23/10998
3. Кручинина А. Д., Генгин М. Т. Влияние однократного введения флуоксетина на активность карбоксипептидазы E в нервной ткани крыс // Нейрохимия. 2015. Т. 32. № 4. С. 307–311. DOI: 10.7868/S102781331504010X
4. Bosch E. BDV Syndrome: An Emerging Syndrome with Profound Obesity and Neurodevelopmental Delay Resembling Prader — Willi Syndrome / E. Bosch, M. Hebebrand, B. Popp et al. // Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism. 2021. Vol. 106. Issue 12. P. 3413–3427. DOI: 10.1210/clinem/dgab592
5. Burg van den E. H., Stoop R. Neuropeptide signalling in the central nucleus of the amygdala // Cell and Tissue Research. 2019. Vol. 375. Issue 1. P. 93–101. DOI: 10.1007/s00441-018-2862-6
6. Cheng Y. A human carboxypeptidase E/NF- α 1 gene mutation in an Alzheimer's disease patient leads to dementia and depression in mice / Y. Cheng, N. X. Cawley, T. Yanik et al. // Translational Psychiatry. 2016. Vol. 6. Art. e973. DOI: 10.3389/fnmol.2022.918852
7. Cruz-Pereira J. S. Depression's Unholy Trinity: Dysregulated Stress, Immunity, and the Microbiome / J. S. Cruz-Pereira, K. Rea, Y. M. Nolan et al. // Annual Review of Psychology. 2020. Vol. 71. P. 49–78. DOI: 10.1146/annurev-psych-122216-011613
8. Han W. Angiotensin-II and angiotensin-(1-7) imbalance affects comorbidity of depression and coronary heart disease / W. Han, Z. Wei, R. Dang et al. // Peptides. 2020. Vol. 131. Art. 170353. DOI: 10.1016/j.peptides.2020.170353
9. Ji L. Dissecting carboxypeptidase E: properties, functions and pathophysiological roles in disease / L. Ji, H.-T. Wu, X.-Y. Qin et al. // Endocrine Connections. 2017. Vol. 6. Issue 4. P. 18–38. DOI: 10.1530/EC-17-0020
10. Joëls M. Effects of chronic stress on structure and cell function in rat hippocampus and hypothalamus / M. Joëls, H. Karst, D. Alfarez et al. // Stress. 2004. Vol. 7. Issue 4. P. 221–231. DOI: 10.1080/10253890500070005
11. Kalinina E., Varlamov O., Fricker L. D. Analysis of the carboxypeptidase D cytoplasmic domain: Implications in intracellular trafficking // Journal of Cellular Biochemistry. 2002. Vol. 85. Issue 1. P. 101–111. DOI: 10.1002/jcb.10112
12. Malyshev A. V. Peptide LCGA-17 Attenuates Behavioral and Neurochemical Deficits in Rodent Models of PTSD and Depression / A. V. Malyshev, I. A. Sukhanova, V. M. Ushakova et al. // Pharmaceuticals. 2022. Vol. 15. Issue 4. Art. 462. DOI: 10.3390/ph15040462
13. Mizushige T. Neuromodulatory peptides: Orally active anxiolytic-like and antidepressant-like peptides derived from dietary plant proteins // Peptides. 2021. Vol. 142. Art. 170569. DOI: 10.1016/j.peptides.2021.170569
14. Rana T. Exploring the role of neuropeptides in depression and anxiety / T. Rana, T. Behl, A. Sehgal et al. // Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry. 2022. Vol. 114. Art. 110478. DOI: 10.1016/j.pnpbp.2021.110478

15. Song L., Fricker L. D. Purification and characterization of carboxypeptidase D, a novel carboxypeptidase E-like enzyme, from bovine pituitary // *Journal of Biological Chemistry*. 1995. Vol. 270. Issue 42. P. 25007–25013. DOI: 10.1074/jbc.270.42.25007
16. Stornetta R. L. Neurochemistry of bulbospinal presympathetic neurons of the medulla oblongata // *Journal of Chemical Neuroanatomy*. 2009. Vol. 38. Issue 3. P. 222–230. DOI: 10.1016/j.jchemneu.2009.07.005
17. Tartt A. N. Dysregulation of adult hippocampal neuroplasticity in major depression: pathogenesis and therapeutic implications / A. N. Tartt, M. B. Mariani, R. Hen et al. // *Molecular Psychiatry*. 2022. Vol. 27. P. 2689–2699. DOI: 10.1038/s41380-022-01520-y
18. Xiao L., Loh Y. P. Neurotrophic Factor- α 1/Carboxypeptidase E Functions in Neuroprotection and Alleviates Depression // *Frontiers in Molecular Neuroscience*. 2022. Vol. 15. Art. 918852. DOI: 10.3389/fnmol.2022.918852

References

1. Klychenkov S. V., Kruchinina A. D. Vliianie peptidov produktov pchelovodstva na stepen' razvitiia angedonii u krysv v usloviakh khronicheskogo stressa // *Scientific Aspect*. 2022. T. 5. № 5. 601–601. (In Russ.). URL: <https://elibrary.ru/item.asp?id=49848131>
2. Klychenkov S. V., Kruchinina A. D. Sposob vydeleniia i ochistki nizkomolekuliarnykh peptidov iz produktov pchelovodstva s ispol'zovaniem khromatograficheskikh metodov // *Sorbtsionnye i Khromatograficheskie Protsessy*, 2023. T. 23. № 1. S. 107–115. (In Russ.). DOI: /10.17308/sorpchrom.2023.23/10998
3. Kruchinina A. D., Gengin M. T. The effect of a single administration of fluoxetine on the activity of carboxypeptidase E in the nervous tissue of rats // *Neurochemical Journal*. 2015. T. 32. № 4. S. 307–311. (In Russ.). DOI: 10.7868/S102781331504010X
4. Bosch E. BDV Syndrome: An Emerging Syndrome with Profound Obesity and Neurodevelopmental Delay Resembling Prader — Willi Syndrome / E. Bosch, M. Hebebrand, B. Popp et al. // *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*. 2021. Vol. 106. Issue 12. P. 3413–3427. DOI: 10.1210/clinem/dgab592
5. Burg van den E. H., Stoop R. Neuropeptide signalling in the central nucleus of the amygdala // *Cell and Tissue Research*. 2019. Vol. 375. Issue 1. P. 93–101. DOI: 10.1007/s00441-018-2862-6
6. Cheng Y. A human carboxypeptidase E/NF- α 1 gene mutation in an Alzheimer's disease patient leads to dementia and depression in mice / Y. Cheng, N. X. Cawley, T. Yanik et al. // *Translational Psychiatry*. 2016. Vol. 6. Art. e973. DOI: 10.3389/fnmol.2022.918852
7. Cruz-Pereira J. S. Depression's Unholy Trinity: Dysregulated Stress, Immunity, and the Microbiome / J. S. Cruz-Pereira, K. Rea, Y. M. Nolan et al. // *Annual Review of Psychology*. 2020. Vol. 71. P. 49–78. DOI: 10.1146/annurev-psych-122216-011613
8. Han W. Angiotensin-II and angiotensin-(1-7) imbalance affects comorbidity of depression and coronary heart disease / W. Han, Z. Wei, R. Dang et al. // *Peptides*. 2020. Vol. 131. Art. 170353. DOI: 10.1016/j.peptides.2020.170353
9. Ji L. Dissecting carboxypeptidase E: properties, functions and pathophysiological roles in disease / L. Ji, H.-T. Wu, X.-Y. Qin et al. // *Endocrine Connections*. 2017. Vol. 6. Issue 4. P. 18–38. DOI: 10.1530/EC-17-0020
10. Joëls M. Effects of chronic stress on structure and cell function in rat hippocampus and hypothalamus / M. Joëls, H. Karst, D. Alfarez et al. // *Stress*. 2004. Vol. 7. Issue 4. P. 221–231. DOI: 10.1080/10253890500070005

11. Kalinina E., Varlamov O., Fricker L. D. Analysis of the carboxypeptidase D cytoplasmic domain: Implications in intracellular trafficking // *Journal of Cellular Biochemistry*. 2002. Vol. 85. Issue 1. P. 101–111. DOI: 10.1002/jcb.10112
12. Malyshev A. V. Peptide LCGA-17 Attenuates Behavioral and Neurochemical Deficits in Rodent Models of PTSD and Depression / A. V. Malyshev, I. A. Sukhanova, V. M. Ushakova et al. // *Pharmaceuticals*. 2022. Vol. 15. Issue 4. Art. 462. DOI: 10.3390/ph15040462
13. Mizushige T. Neuromodulatory peptides: Orally active anxiolytic-like and antidepressant-like peptides derived from dietary plant proteins // *Peptides*. 2021. Vol. 142. Art. 170569. DOI: 10.1016/j.peptides.2021.170569
14. Rana T. Exploring the role of neuropeptides in depression and anxiety / T. Rana, T. Behl, A. Sehgal et al. // *Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry*. 2022. Vol. 114. Art. 110478. DOI: 10.1016/j.pnpbp.2021.110478
15. Song L., Fricker L. D. Purification and characterization of carboxypeptidase D, a novel carboxypeptidase E-like enzyme, from bovine pituitary // *Journal of Biological Chemistry*. 1995. Vol. 270. Issue 42. P. 25007–25013. DOI: 10.1074/jbc.270.42.25007
16. Stornetta R. L. Neurochemistry of bulbospinal presympathetic neurons of the medulla oblongata // *Journal of Chemical Neuroanatomy*. 2009. Vol. 38. Issue 3. P. 222–230. DOI: 10.1016/j.jchemneu.2009.07.005
17. Tartt A. N. Dysregulation of adult hippocampal neuroplasticity in major depression: pathogenesis and therapeutic implications / A. N. Tartt, M. B. Mariani, R. Hen et al. // *Molecular Psychiatry*. 2022. Vol. 27. P. 2689–2699. DOI: 10.1038/s41380-022-01520-y
18. Xiao L., Loh Y. P. Neurotrophic Factor- α 1/Carboxypeptidase E Functions in Neuroprotection and Alleviates Depression // *Frontiers in Molecular Neuroscience*. 2022. Vol. 15. Art. 918852. DOI: 10.3389/fnmol.2022.918852