

ВЛИЯНИЕ ПЕПТИДА НЕМИФИТИДА НА УРОВЕНЬ ТРЕВОЖНОСТИ ЛАБОРАТОРНЫХ КРЫС

Захарушкина Анастасия Александровна, студент магистратуры кафедры физиологии человека и животных Самарского национального исследовательского университета имени академика С.П. Королёва;

Исакова Татьяна Сергеевна, аспирант кафедры физиологии человека и животных Самарского национального исследовательского университета имени академика С.П. Королёва;

Конашенкова Анастасия Тарасовна, студент бакалавриата кафедры физиологии человека и животных Самарского национального исследовательского университета имени академика С.П. Королёва;

Саяпин Валерий Владиславович, студент магистратуры кафедры физиологии человека и животных Самарского национального исследовательского университета имени академика С.П. Королёва;

Инюшкин Алексей Николаевич, заведующий кафедрой физиологии человека и животных Самарского национального исследовательского университета имени академика С.П. Королёва.

В работе описаны результаты экспериментов, выполненных на лабораторных крысах, о влиянии интраназального введения пептида немифитида на показатели уровня тревожности в стандартных поведенческих тестах «Открытое поле», «Приподнятый крестообразный лабиринт» и «Черно-белая камера». Установлено, что немифитид повышает уровень тревожности, что свидетельствует об анксиогенной активности этого вещества.

Ключевые слова: немифитид, крысы, поведение, поведенческие тесты, уровень тревожности.

THE EFFECT OF PEPTIDE NEMIFITIDE ON THE ANXIETY LEVEL IN THE LABORATORY RATS

Zakharushkina Anastasiya Alexandrovna, student of magistrature, Department of Human and Animal Physiology, Samara National Research University;

Isakova Tatiana Sergeevna, PhD student, Department of Human and Animal Physiology, Samara National Research University;

Konashenkova Anastasiya Tarasovna, undergraduate student, Department of Human and Animal Physiology, Samara National Research University;

Sayapin Valery Bladislavovich, student of magistrature, Department of Human and Animal Physiology, Samara National Research University;

Inyushkin Alexey Nikolaevich, Head of Department of Human and Animal Physiology, Samara National Research University.

In the paper, the results of experiments conducted on laboratory rats on the effects of intranasal administration of peptide nemifitide on the parameters of anxiety level in conventional behavioural tests “Open field”, “Elevated cross maze” and “Black-white chamber” are presented. We found that nemifitide increases the anxiety level suggesting an anxiogenic activity of the peptide.

Key words: nemifitide, behavior, behavioral tests, anxiety level.

Одной из актуальных проблем современной биологии и медицины является проблема регуляции поведения и адаптационных процессов с помощью природных нейропептидов и их аналогов. Нейропептиды привлекают особое внимание исследователей, поскольку вещества данного класса являются наиболее перспективными в плане целенаправленного воздействия на физиологические процессы, происходящие в центральной нервной системе. При изучении поведенческих реакций лабораторных крыс на экспериментальные воздействия в настоящее время преобладает подход, заключающийся в исследовании индивидуальной реактивности животных, основанный на оценке определенных эмоциональных состояний (склонность к тревоге, ориентировочно-исследовательской активности, страху, ярости, депрессии). В настоящей работе представлены результаты исследований индивидуальных особенностей тревожного

поведения крыс в тестах «Приподнятый крестообразный лабиринт», «Черно-белая камера» и «Открытое поле» при воздействии немифитида. Немифитид является аналогом меланостатина, имеющим химическую формулу $\text{H-Phe(4-F)-Hyp-Arg-Gly-Trp-NH}_2$ (4-фтор-L-фенилаланил-транс-4-гидрокси-L-пролил-L-аргинилглицил-L-триптофанамида дитрифторацетат). Данное вещество представляет собой «соединение-лидер» в серии родственных новых высокоэффективных пептидов с короткой цепью, синтезированных в США компанией Tetragenex (ранее – Innapharma, Inc.) в процессе скрининга пептидных молекул на основе гормона MIF-1 (меланостатин-1).

Исследования выполнены на 12 беспородных белых крысах-самцах массой 200-250 г. в течение 5 последовательных дней. Животные содержались в стандартных условиях вивария со свободным доступом к воде и пищи. При выполнении работы соблюдены этические принципы экспериментов в соответствии с Европейской конвенцией о защите позвоночных животных, используемых для экспериментов или в научных целях (Страсбург, 18 марта 1986 г.), и приказу МЗ РФ от 19.06.2003 № 267. Протокол экспериментов одобрен комиссией по биоэтике Самарского национального исследовательского университета им. академика С.П. Королева.

Животным экспериментальной группы ($n = 6$) интраназально вводили водный раствор немифитида в объеме 20 мкл, и в концентрации 10^{-5} М. Контрольной группе животных ($n = 6$) интраназально вводили дистиллированную воду в таком же объеме. Тестирование начиналось через 30 минут после введения. Каждое отдельное тестирование длилось 3 минуты. С целью оценки уровня тревожности в тесте «Приподнятый крестообразный лабиринт» регистрировали время нахождения животного в закрытых и открытых рукавах лабиринта, в тесте «Черно-белая камера» – время нахождения крысы в темном и светлом отсеках, в тесте «Открытое поле» – количество вертикальных стоек.

Статистическую обработку результатов проводили при помощи компьютерной программы «SigmaPlot 12.5». Данные представлены как средние арифметические \pm стандартное отклонение. Нормальность распределения данных в выборках проверяли с помощью теста Шапиро-Уилка, однородность дисперсий – с помощью теста Левена. Различия между группами признавались статистически значимыми при $P < 0,05$ (непарный t-тест).

Исследование влияния немифотида на поведение крыс в тесте «Приподнятый крестообразный лабиринт» позволило получить следующие результаты. В первые 2 дня эксперимента введение немифотида привело к статистически значимому уменьшению времени пребывания животных в открытом рукаве лабиринта по сравнению с животными контрольной группы. В первый день эксперимента время пребывания в открытом рукаве у крыс контрольной группы составляло 104 ± 21 сек, а у животных, получавших немифотид, оно оказалось равным 27 ± 12 сек (различия статистически значимы, $P < 0,001$: непарный t-тест). Аналогичные различия данного показателя были обнаружены и во второй день эксперимента, когда время пребывания крыс, получавших немифотид, в открытых рукавах по-прежнему было значительно меньше, чем у крыс контрольной группы ($P < 0,01$: непарный t-тест). Такие данные свидетельствуют о том, что интраназальное введение немифотида вызвало повышение уровня тревожности в первые 2 дня исследования. Однако, в последующем (с 3 по 5 день исследования) наблюдалось уменьшение продолжительности нахождения крыс контрольной группы в открытых рукавах, тогда как у животных, получавших немифотид, значение этого показателя, наоборот, увеличилось. Это привело к тому, что с 3 по 5 день эксперимента продолжительность пребывания крыс контрольной и опытной группы в открытых рукавах лабиринта не имела статистически значимых различий ($P > 0,05$: непарный t-тест). Противоположная тенденция прослеживалась в отношении времени пребывания животных в закрытых рукавах теста.

Исследование поведения животных в установке «Черно-белая камера», выполненное в ходе настоящей работы, показало, что животные, которым интраназально вводили немифитид, большую часть времени проводили в закрытом отсеке камеры, и меньшую часть времени - в светлом отсеке. Это свидетельствует о повышенном уровне тревожности и сниженном исследовательском интересе к новой обстановке по сравнению с крысами контрольной группы. Статистически значимые различия времени пребывания в светлом отсеке животных, получавших немифитид, с животными контрольной группы обнаружены в 1, 2, 3 и 5 день эксперимента, при этом во всех случаях пептид вызывал уменьшение времени нахождения животных в светлом отсеке. Наиболее значительными эти различия оказались в первый день тестирования, когда время нахождения в светлом отсеке у животных контрольной группы составляло 54 ± 19 сек, а у крыс, получавших немифитид, – 11 ± 4 сек (различия статистически значимы, $P < 0,01$: непарный t-тест). Во второй день время пребывания животных контрольной группы в светлом отсеке оказалось максимально продолжительным (80 ± 29 сек), тогда как крысы, получавшие немифитид, провели в светлом отсеке лишь 25 ± 18 сек (различия статистически значимы, $P < 0,05$: непарный t-тест). В дальнейшем, несмотря на уменьшение длительности нахождения крыс контрольной группы в светлом отсеке, значение этого показателя на третий и пятый день наблюдения по-прежнему статистически значимо (соответственно, $P < 0,05$ и $P < 0,01$: непарный t-тест) превышало таковое у животных, получавших немифитид. Лишь на 4 день эксперимента не было обнаружено статистически значимых различий в продолжительности пребывания крыс контрольной и опытной групп в светлом отсеке ($P > 0,05$: непарный t-тест). В целом снижение длительности пребывания крыс в светлом отсеке указывает на повышение уровня тревожности животных под влиянием немифитида. Изменения продолжительности пребывания животных в темном отсеке теста были противоположными.

В первый день исследования наблюдалось увеличение количества вертикальных стоек в группе животных, получавших немифитид, по сравнению с животными контрольной группы. В этот день у крыс контрольной группы количество вертикальных стоек составило $1 \pm 0,6$, тогда как у животных, получавших немифитид, значение данного показателя в первый день наблюдения равнялось $2 \pm 0,5$ (различия статистически значимы, $P < 0,05$: непарный t-тест). Однако, в последующем статистически значимых различий в количестве стоек у крыс контрольной и опытной групп обнаружено не было ($P > 0,05$: непарный t-тест), несмотря на сохраняющуюся с 3 по 5 день наблюдения тенденцию к увеличению количества вертикальных стоек у крыс, получавших немифитид.

В настоящем исследовании, выполненном на лабораторных крысах, использовался интраназальный путь введения немифитида. Интраназальный путь введения пептидов в последнее время становится всё более популярным, что можно объяснить рядом важных преимуществ, в особенности, при необходимости изучения центральных эффектов исследуемого вещества. Так, установлено, что при интраназальном введении полипептиды быстро проникают в головной мозг в значительной концентрации, следуя вдоль обонятельных и тройничных нервов, минуя гематоэнцефалический барьер [1]. В исследованиях на крысах показано, что интраназальное введение пептидов приводит к росту их концентрации в ряде отделов головного мозга и в цереброспинальной жидкости с максимумом около 30 минут после введения; в то же время, существенного изменения концентрации пептидов в системном кровотоке не обнаружено [2-3]. Ранее в специальном исследовании на человеке на примере нейропептида Y было установлено, что после интраназального введения в плазму крови проникает лишь 0.0007 часть введённой дозы вещества [4]. Таким образом, интраназальный способ введения пептидов даёт возможность изучать их центральные эффекты «в чистом виде»,

изолированно от его периферических эффектов, возникающих при системном введении.

Тестирование крыс в установке «Приподнятый крестообразный лабиринт» показало, что интраназальное введение немифида приводит к увеличению продолжительности нахождения крыс в закрытых рукавах и к снижению продолжительности пребывания в открытых рукавах. Такие реакции расцениваются как повышение уровня тревожности. Эти результаты подтверждаются данными экспериментов в «Черно-белой камере», где немифид вызвал увеличение времени нахождения животных в темном отсеке и снижение времени нахождения в светлом отсеке. Разница заключалась лишь в том, что статистически значимые результаты в «Приподнятом крестообразном лабиринте» были получены лишь в первые два дня наблюдений, тогда как в тесте «Черно-белая камера» такие результаты наблюдались практически на протяжении всего эксперимента. Причина этого явления, по всей видимости, заключается в различии конструкции этих двух установок. Действительно, открытые рукава теста «Приподнятый крестообразный лабиринт» не имеют боковых бортиков, таким образом крысы имеют возможность, находясь в открытых рукавах, свободно обозревать окружающее пространство. В противоположность этому, светлый отсек «Черно-белой камеры» открыт лишь сверху, что не дает животным возможности наблюдать за окружающей обстановкой. Как следствие, в тесте «Приподнятый крестообразный лабиринт» крысы, имея возможность убедиться в отсутствии стрессогенных факторов в окружающем пространстве, быстрее адаптировались к тесту и уже с третьего дня наблюдения уровень тревожности животных не отличался от контрольного, а использование немифида стало неэффективным. В то же время, во время пребывания в светлом отсеке «Черно-белой камеры» крысы до конца исследования не могли судить о наличии или отсутствии стрессогенных факторов в окружающем пространстве, что привело к практически полному

отсутствию адаптации и повышенному уровню тревожности у животных, получавших немифитид, вплоть до последнего дня тестирования. Способность немифитида повышать уровень тревожности подтверждается также результатами исследований в тесте «Открытое поле», где введение пептида привело к увеличению количества вертикальных стоек в первый день наблюдения. Таким образом, результаты настоящего исследования позволяют причислить исследуемый пептид немифитид к анксиогенным пептидам, повышающим тревогу и чувство страха.

ЛИТЕРАТУРА:

1. Dhuria S.V., Hanson L.R., Frey W.H. Intranasal delivery to the central nervous system: mechanisms and experimental considerations // *J. Pharm. Sci.* 2010. Vol. 99. P. 1654–1673.
2. Serova L.I., Tillinger A., Alaluf L.G., Laukova M., Keegan K., Sabban E.L. Single intranasal neuropeptide Y infusion attenuates development of PTSD-like symptoms to traumatic stress in rats // *Neuroscience*. 2013. Vol. 236. P. 298–312.
3. Laukova M., Alaluf L.G., Serova L.I., Arango V., Sabban E.L. Early intervention with intranasal peptide prevents single prolonged stress-triggered impairments in hypothalamus and ventral hippocampus in male rats // *Endocrinology*. 2014. Vol. 155. № 10. P. 3920–3933.
4. Lacroix J.S., Ricchetti A.P., Morel D., Mossimann B., Waeber B., Grouzmann E. Intranasal administration of neuropeptide Y in man: systemic absorption and functional effects // *Brit. J. Pharmacol.* 1996. Vol. 118. P. 2079–2084.