

**ВЛИЯНИЕ ПЕПТИДОВ АКТГ_{6–9}-PGR И АКТГ_{4–7}-PGR НА УРОВЕНЬ
ТРЕВОЖНОСТИ У КРЫС ПРИ НАКАЗУЕМОМ
И НЕНАКАЗУЕМОМ ПОВЕДЕНИИ**

© 2020 г. С. А. Додонова^{1, *}, И. И. Бобынцев¹, А. Е. Бельх¹, И. А. Телегина¹,
Ю. А. Музалева¹, Л. А. Андреева², Н. Ф. Мясоедов²

¹Курский государственный медицинский университет, Курск, Россия

²Институт молекулярной генетики РАН, Москва, Россия

*E-mail: dodonovasveta@mail.ru

Поступила в редакцию 17.12.2019 г.

После доработки 11.01.2020 г.

Принята к публикации 13.01.2020 г.

Одним из активно исследуемых в настоящее время классов регуляторных пептидов являются меланокортины, включающие в себя такие биологически-активные вещества, как адренкортикотропный гормон (АКТГ), α -, β - и γ -меланокортимстимулирующие гормоны (МСГ). Фрагменты АКТГ, как и другие пептиды семейства меланокортинов, обладают выраженными нейротропными эффектами, направленными, в частности, на стимуляцию процессов обучения, памяти и внимания. При этом активным центром АКТГ, необходимым для активации всех видов меланокортиновых рецепторов, является последовательность His-Phe-Arg-Trp, соответствующая фрагменту АКТГ_{6–9}. В настоящей работе нами были исследован синтетический пептид – АКТГ_{6–9}-PGR, содержащей в своей структуре природный фрагмент АКТГ_{6–9}, стабилизированный с С-конца последовательностью аминокислот пролил-глицил-пролин (PGR) с целью повышения устойчивости к действию карбоксипептидаз. Изучены эффекты внутрибрюшинного введения АКТГ_{6–9}-PGR в дозах 0.5; 5; 50; 150 и 450 мкг/кг однократно за 15 мин до начала опыта по изучению уровня тревожности у крыс с использованием теста конфликтной ситуации по Вогелю (наказуемое поведение) и теста “приподнятый крестообразный лабиринт” (ненаказуемое поведение). Проведено сравнение эффектов АКТГ_{6–9}-PGR и его структурного аналога – АКТГ_{4–7}-PGR в дозах 50; 150 и 450 мкг/кг с использованием указанных тестов. Установлено, что АКТГ_{6–9}-PGR в тесте конфликтной ситуации по Вогелю вызывал повышение уровня тревожности у крыс, которое проявлялось в сокращении времени питья (во всех дозах) и в уменьшении количества облизываний (в дозах 0.5 и 150 мкг/кг ($p < 0.01$)). В тесте “приподнятый крестообразный лабиринт” АКТГ_{6–9}-PGR не оказывал существенного влияния на поведение крыс. В моделях наказуемого и ненаказуемого поведения эффектов АКТГ_{4–7}-PGR выявлено не было. Таким образом, установлено, что АКТГ_{6–9}-PGR, в отличие от АКТГ_{4–7}-PGR, влияет на уровень тревожности у крыс в зависимости от дозы пептида и исследуемой модели поведения.

Ключевые слова: регуляторные пептиды, АКТГ, тревожность, тест Вогеля, приподнятый крестообразный лабиринт, крысы

DOI: 10.31857/S0869813920030048

В настоящее время меланокортины являются одними из наиболее интенсивно изучаемых классов регуляторных пептидов. Широкий спектр их физиологических

эффектов, открытие семейства меланокортиновых рецепторов (MC1R–MC5R) [1, 2] в различных структурах головного мозга, а также возможность прохождения коротких пептидных последовательностей через гематоэнцефалический барьер, позволяет рассматривать фрагменты аденокортикотропного гормона (АКТГ) как перспективные молекулы для дальнейшего изучения и клинического применения в виде фармакологических препаратов [2–4].

Известно, что N-концевые фрагменты АКТГ обладают нейротрофическим, анальгетическим и ноотропным эффектами [3]. Доказано влияние меланокортинов на регуляцию эмоционального состояния и реакции организма при стрессе [5]. При этом известно, что последовательность His-Phe-Arg-Trp (HFRW), соответствующая фрагменту АКТГ_{6–9}, является активным центром молекулы АКТГ, необходимым для активации всех видов MCR [6–9]. Показано, что His-Phe-Arg-Trp служит критическим фармакофором [10–12] всех эндогенных агонистов MCR, т.е. проявляет себя как структура, необходимая для обеспечения оптимальных супрамолекулярных взаимодействий с определенной биологической мишенью. При этом последовательность His-Phe-Arg-Trp является абсолютно необходимой и достаточной для активации всех типов MCR за исключением MC2R, включение которых опосредовано наличием двух связывающих доменов: His-Phe-Arg-Trp и Lys-Lys-Arg-Arg (АКТГ_{15–18}) [7, 9].

Модификация данного фрагмента в виде присоединения к C-концу последовательности трипептида Pro-Gly-Pro (PGP) с целью повышения устойчивости к действию карбоксипептидаз также оказывает нейротропное действие [12]. Показано, что структурно близкий ему синтетический фрагмент АКТГ_{4–7}-PGP (активная субстанция фармакологического препарата “семакс”), обладает ноотропной, анксиолитической, нейротрофической и анальгетической активностями [13]. При этом известно, что N-концевые фрагменты АКТГ лишены гормональной активности, что позволяет отделить свойства исходной пептидной последовательности от эффектов, обусловленных действием гормонов надпочечников [3]. Важным вопросом при изучении пептидных соединений с нейротропной активностью является возможность их проникновения через гематоэнцефалический барьер (ГЭБ) – для АКТГ_{4–7}-PGP, как и для АКТГ_{6–9}-PGP, установлена способность проникать через ГЭБ и взаимодействовать со структурами головного мозга [14, 15].

Учитывая наличие широкого спектра нейротропных эффектов у меланокортинов, их фрагментов и синтетических аналогов, а также перспективы их применения для коррекции различных патологических состояний, представляется целесообразным изучение влияния АКТГ_{6–9}-PGP, включающего в себя аминокислотную последовательность His-Phe-Arg-Trp (активный центр молекулы АКТГ), на такие поведенческие реакции животных, как страх и тревога.

Целью данной работы являлось изучение влияния АКТГ_{6–9}-PGP на уровень тревожности у крыс при наказуемом и ненаказуемом поведении в сравнении с эффектами с АКТГ_{4–7}-PGP.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Эксперименты выполнены на 180 крысах-самцах Вистар массой 250–300 г. Животные содержались в клетках по 10 особей в стандартных условиях вивария и получали стандартный гранулированный корм и воду в свободном доступе при 12-часовом световом режиме (12 ч – свет, 12 ч – темнота) и контролируемой температуре ($22 \pm 2^\circ\text{C}$). Исследования проводили в промежуток времени с 9 до 15 ч. С целью предотвращения стрессорной реакции на взятие в руки экспериментатора животных ежедневно подвергали процедуре хэндинга. Все процедуры проводили в соот-

ветствии с Директивой ЕС о защите животных, используемых в научных целях – EU Directive 2010/63/EU, принятой 22 сентября 2010 г., “Правилами лабораторной практики в Российской Федерации”, утвержденными приказом Министерства здравоохранения РФ № 708н от 23.08.2010 г., и под контролем Этического комитета ФГБОУ ВО “Курский государственный медицинский университет” Минздрава России (Протокол заседания № 3 от 27 октября 2015 г.).

В работе применяли физиологический раствор 0.9% натрия хлорида, а также пептиды АКТГ₆₋₉-PGR и АКТГ₄₋₇-PGR, синтезированные в Институте молекулярной генетики РАН. Пептиды растворяли в физиологическом растворе и вводили внутривентриально однократно за 15 мин до начала опыта. АКТГ₆₋₉-PGR применялся в той или иной опытной группе в дозах 0.5; 5; 50; 150 и 450 мкг/кг, АКТГ₄₋₇-PGR – в дозах 50; 150 и 450 мкг/кг. Выбор доз был основан на данных литературы об эффективном диапазоне доз для структурно схожей молекулы АКТГ₄₋₇-PGR [12, 13]. Контрольным животным вводили эквивалентные объемы физиологического раствора из расчета 1 мл на 1 кг массы.

Тестирование животных в каждой серии экспериментов проводили в несколько последовательных дней, исходя из дизайна исследования: **1 день:** 1 группа (АКТГ₆₋₉-PGR – 0.5 мкг/кг); 2 группа (АКТГ₆₋₉-PGR – 50 мкг/кг); 3 группа (АКТГ₆₋₉-PGR – 450 мкг/кг). **2 день:** 4 группа (АКТГ₆₋₉-PGR – 5 мкг/кг); 5 группа (контроль – физиологический раствор); 6 группа (АКТГ₆₋₉-PGR – 150 мкг/кг). **3 день:** 7 группа (АКТГ₄₋₇-PGR – 50 мкг/кг); 8 группа (АКТГ₄₋₇-PGR – 150 мкг/кг); 9 группа (АКТГ₄₋₇-PGR – 450 мкг/кг).

Уровень тревожности оценивали в двух сериях экспериментов: 1 серия с использованием теста “приподнятый крестообразный лабиринт” (ПКЛ) (1 контрольная и 8 опытных групп по 10 животных в каждой ($n = 90$)); 2 серия – тест конфликтной ситуации по Вогелю (аналогично: 1 контрольная и 8 опытных групп по 10 крыс ($n = 90$)) [16].

Тест конфликтной ситуации по Вогелю. Установка конфликтной ситуации включала в себя три части: экспериментальную камеру, шокер и счетное устройство (PanLab Harvard Apparatus, Испания). Экспериментальная камера представляла собой клетку размерами 180 × 220 × 420 мм с решетчатым полом и поилкой, наполненной водой. Пол в экспериментальной камере и сосок поилки присоединяли к шокеру. Эксперимент проводился в течение 3 дней. Первые 24 ч животные полностью лишались воды. На следующий день, т.е. после 24-часовой депривации, проводили выработку навыка взятия воды из поилки: животных помещали в экспериментальную камеру на 5 мин. В течение этого времени крысы обследовали установку, находили поилку. По истечении 5 мин обучения животных сажали в клетки со свободным доступом к воде в течение 20 мин. На третий день эксперимента крыс снова на 5 мин помещали в экспериментальную установку. В ходе эксперимента после первых 20 свободных облизываний соска поилки крыса получала удар током силой 0.3 мА и продолжительностью 5 с. В последующем после каждых 20 облизываний животные наказывались аналогичным электрическим раздражителем [17]. Критериями для оценки тревожности служили следующие параметры: количество наказуемых взятий воды из поилки (количество облизываний соска поилки во время электрической стимуляции); количество электрических шоков; время (продолжительность) питья.

Тест приподнятый крестообразный лабиринт (ПКЛ). Исследование уровня тревожности у крыс в тесте ПКЛ проводили с использованием экспериментальной установки (PanLab Harvard Apparatus, Испания), состоящей из 4 рукавов (два противоположных открытых без стенок и два закрытых со стенками высотой 300 мм) длиной 500 мм и шириной 140 мм, крестообразно расходящихся от центральной площадки под прямым углом. Крестообразный лабиринт был приподнят на высоту

500 мм от уровня пола. Эксперименты проводились при искусственном освещении: 300 люкс — для открытых рукавов, 240 люкс — для центральной площадки, 45 люкс — для закрытых рукавов. В отличие от теста конфликтной ситуации по Вогелю, указанные условия характеризуются низким стрессорным воздействием на животных. Непосредственно перед началом эксперимента крыс выдерживали по 5 мин в темных боксах. Затем животное помещали в ПКЛ на центральную площадку, головой к открытому рукаву и в течение 5-минутного интервала регистрировали: время пребывания животных в открытых, закрытых рукавах, а также на центральной площадке; количество заходов в открытые и закрытые рукава, центральную площадку; груминг и свешивания в открытых рукавах. Регистрацию и анализ параметров осуществляли с помощью системы видео-трекинга “SMART Video Tracking System” (PanLab Harvard Apparatus, Испания).

Статистическую обработку проводили с использованием программного обеспечения “MS Excel 2016”, программы “Statistica 13.3” и программной среды вычислений R. Характер распределения признаков в статистической выборке определяли с помощью критерия Шапиро–Уилка, оценку равенства дисперсий — с помощью критерия Левене. Значимость полученных результатов оценивали с применением непараметрического однофакторного дисперсионного анализа с помощью критерия Краскела–Уоллиса, для выявления межгрупповых различий в качестве *post-hoc* анализа использовали критерий Манна–Уитни (U-test) с поправкой Бенджамини–Хохберга. В связи с неправильным распределением признаков полученные результаты выражали в виде медианы (Me), нижнего (25) и верхнего (75) перцентилей (Q1 и Q3). Результаты считали достоверными при $p \leq 0.05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Тест конфликтной ситуации по Вогелю

Как видно из табл. 1, введение АКТГ₆₋₉-PGR оказывало выраженное дозозависимое влияние на показатели, регистрируемые в тесте Вогеля. Во всех опытных группах отмечено достоверное снижение продолжительности питья: в дозе 0.5 мг/кг — на 72% ($p = 0.02$), в дозе 5 мг/кг — на 62% ($p = 0.03$), 50 мг/кг — на 54% ($p = 0.04$), 150 мг/кг — на 75% ($p = 0.01$) и в дозе 450 мг/кг — на 59% ($p = 0.03$). Данные факты свидетельствуют о наличии у пептида анксиогенного эффекта.

В пользу анксиогенного эффекта АКТГ₆₋₉-PGR также свидетельствует снижение количества облизываний. Так, при использовании пептида в дозе 0.5 мг/кг наблюдалось сокращение количества наказуемых взятий воды из поилки в 6 раз ($p < 0.01$), а в дозе 150 мг/кг — в 1.5 раза ($p < 0.01$). Кроме того, имело место достоверное снижение количества полученных электрических шоков в указанных дозах соответственно на 200% ($p = 0.02$) и 50% ($p = 0.03$). Необходимо отметить, что при введении АКТГ₆₋₉-PGR в дозе 5 мг/кг статистически значимых различий в количестве указанных поведенческих актов по сравнению с контрольной группой обнаружено не было, однако наблюдалась тенденция к сокращению количества облизываний (на 50%, $p = 0.09$) и числа полученных электрических шоков (на 50%, $p = 0.1$).

При этом АКТГ₄₋₇-PGR во всех использованных дозах по сравнению с контрольной группой не оказывал статистически значимых влияний ни на один из показателей, исследуемых в тесте Вогеля.

Приподнятый крестообразный лабиринт

Введение АКТГ₆₋₉-PGR не оказывало существенного воздействия на уровень тревожности крыс в тесте ПКЛ (табл. 2), в отличие от теста конфликтной ситуации по Вогелю. Так, только в дозе 150 мг/кг отмечено достоверное увеличение коли-

Таблица 1. Показатели тревожности в тесте Вогеля после внутрибрюшинного введения АКТГ₆₋₉-PGP и АКТГ₄₋₇-PGP ($n = 90$, Me [Q1; Q3])
Table 1. Anxiety indicators in the Vogel test after intraperitoneal administration of ACTH₆₋₉-PGP and ACTH₄₋₇-PGP ($n = 90$, Me [Q1; Q3])

Показатель Index Доза Dose	Число облизываний Number of licks	Число шоков Number of shocks	Время питья, с Drinking time, s
Контроль Control ($n = 10$)	40 [39; 41]	2 [1; 2]	7.62 [4.82; 28.87]
АКТГ ₆₋₉ -PGP (ACTH ₆₋₉ -PGP)			
0.5 мкг/кг (mcg/kg) ($n = 10$)	3.0 [0.0; 20.0]*	0.0 [0.0; 1.0]*	2.1 [0.0; 4.9]*
5 мкг/кг (mcg/kg) ($n = 10$)	20.0 [20.0; 23.0]	1.0 [1.0; 1.0]	2.9 [1.7; 5.8]*
50 мкг/кг (mcg/kg) ($n = 10$)	40.0 [0.0; 60.0]	2.0 [0.0; 3.0]	3.5 [0.0; 5.1]*
150 мкг/кг (mcg/kg) ($n = 10$)	15.0 [0.0; 20.0]*	1.0 [0.0; 1.0]*	1.9 [0.2; 3.6]*
450 мкг/кг (mcg/kg) ($n = 10$)	40.0 [20.0; 40.0]	2.0 [1.0; 2.0]	3.2 [1.4; 10.1]*
АКТГ ₄₋₇ -PGP (ACTH ₄₋₇ -PGP)			
50 мкг/кг (mcg/kg) ($n = 10$)	40.0 [20.0; 44.0]	2.0 [1.0; 2.0]	4.1 [2.0; 8.8]
150 мкг/кг (mcg/kg) ($n = 10$)	50.0 [15.0; 31.0]	2.0 [2.0; 3.0]	4.6 [3.3; 24.8]
450 мкг/кг (mcg/kg) ($n = 10$)	40.0 [40.0; 60.0]	2.0 [2.0; 3.0]	7.2 [3.3; 21.8]

Примечание: * – достоверные различия ($p \leq 0.05$) с использованием критерия Манна–Уитни с поправкой Бенджамини–Хохберга по сравнению с контрольной группой.

чество заходов в открытые рукава ($p = 0.04$), а в дозах 50 и 450 мкг/кг наблюдалась лишь тенденция к возрастанию указанного параметра ($p = 0.09$). На остальные исследуемые показатели (время пребывания животных в открытых и закрытых рукавах, а также на центральной площадке; на количество заходов в закрытые рукава, центральную площадку; груминг и свешивания в открытых рукавах) АКТГ₆₋₉-PGP во всех использованных дозах не оказывал статистически значимого влияния.

Аналогично, введение АКТГ₄₋₇-PGP во всех использованных дозах также не оказывало по сравнению с контрольной группой статистически значимых влияний на показатели, характеризующие поведение животных в ПКЛ (табл. 3).

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Исследование уровня тревожности в тесте конфликтной ситуации по Вогелю характеризуется значительной степенью стрессорного воздействия на организм экспериментальных животных за счет продолжительной (на протяжении двух суток) питьевой депривации, а также эмоционально-болевого фактора. Известно, что под действием разного рода стрессоров в головном мозге наблюдается усиление экспрессии ряда меланокортиновых рецепторов, в частности, мРНК MC4R в миндалине и гипоталамусе [5, 18], играющих, в свою очередь, важную роль в формирова-

Таблица 2. Показатели тревожности в тесте ПКЛ после внутрибрюшинного введения АКТГ₆₋₉-PGP ($n = 90$, Me [Q1; Q3])
Table 2. Anxiety indicators in EPM after intraperitoneal administration of ACTH₆₋₉-PGP ($n = 90$, Me [Q1; Q3])

Доза Dose Показатель Index	Контроль Control ($n = 10$)	0.5 мкг/кг mcg/kg ($n = 10$)	5 мкг/кг mcg/kg ($n = 10$)	50 мкг/кг mcg/kg ($n = 10$)	150 мкг/кг mcg/kg ($n = 10$)	450 мкг/кг mcg/kg ($n = 10$)
Время в открытых рукавах, с Time in open arms, s	56.1 [41.7; 140.6]	57.6 [25.2; 77.0]	88.8 [53.9; 112.4]	28.3 [15.5; 51.12]	63.9 [39.9; 150.9]	67.5 [35.7; 113.1]
Время в закрытых рукавах, с Time in closed arms, s	173.2 [95.4; 246.2]	212.9 [189.6; 243.3]	138.4 [109.5; 203.1]	226.3 [205.0; 271.7]	151.7 [88.7; 232.1]	194.52 [139.6; 240.4]
Время на центральной площадке, с Time in central platform, s	30.61 [7.6; 60.6]	25.64 [18.6; 35.5]	53.8 [34.3; 75.6]	27.9 [23.0; 43.6]	46.1 [33.5; 64.8]	37.8 [19.1; 54.2]
Заходы в открытые рукава Entries in open arms	3.0 [3.0; 5.0]	5.5 [4.0; 8.0]	7.0 [5.0; 9.0]	1.0 [0.0; 2.0]	7.0 [1.0; 10.0]*	9.0 [7.0; 15.0]
Заходы в закрытые рукава Entries in closed arms	6.0 [3.0; 12.0]	5.0 [4.0; 6.0]	5.0 [3.0; 10.0]	7.0 [3.0; 8.0]	5.0 [3.0; 18.0]	9.0 [5.0; 15.0]
Заходы на центральную площадку Entries in central platform	9.5 [6.0; 16.0]	10.0 [5.0; 13.0]	13.0 [8.0; 18.0]	7.0 [5.0; 11.0]	13.0 [5.0; 25.0]	19.5 [9.0; 26.0]
Количество свешиваний Number of head dips	11.0 [6.0; 15.0]	8.50 [6.0; 11.0]	9.0 [9.0; 17.0]	6.0 [5.0; 8.0]	7.0 [6.0; 17.0]	11.5 [9.0; 13.0]
Груминг Grooming	0.5 [0; 1.0]	1.0 [0; 2.0]	1.0 [0; 1.0]	1.0 [0; 2.0]	0.0 [0; 1.0]	0.0 [0; 1.0]

Примечание: * – достоверные различия ($p \leq 0.05$) с использованием критерия Манна–Уитни с поправкой Бенджамини–Хохберга по сравнению с контрольной группой.

нии реакций страха и тревоги [19]. В связи с этим, агонисты указанного рецептора способны обладать анксиогенными эффектами [18], повышая уровень цАМФ в клетках, экспрессирующих MC4R [5, 18]. Учитывая, что АКТГ₆₋₉-PGP является минимальной требуемой последовательностью для проявления биологической активности эндогенных агонистов меланокортиновых рецепторов [6–10], можно предположить, что повышение уровня тревожности в условиях наказуемого поведения при внутрибрюшинном введении исследуемого гептапептида (проявляющееся во всех используемых дозах снижением общей продолжительности питья у крыс в тесте Вогеля) является отражением взаимодействия последовательности His-Phe-Arg-Trp-Pro-Gly-Pro с MC4R и, соответственно, их активацией [20].

Напротив, внутрибрюшинное введение АКТГ₆₋₉-PGP в условиях ненаказуемого поведения не оказывало влияния на поведенческие реакции, отражающие уровень тревожности экспериментальных животных. Вероятно, это связано с минимальной степенью стрессорного воздействия при проведении теста ПКЛ, в отличие от теста конфликтной ситуации по Вогелю. В связи с этим можно предположить, что уровень стресс-индуцированной экспрессии меланокортиновых рецепторов в соответствующих структурах головного мозга был недостаточным для реализации анксиогенных эффектов АКТГ₆₋₉-PGP, установленных нами в условиях наказуемого поведения [20–22].

Таблица 3. Показатели тревожности в тесте ПКЛ после внутрибрюшинного введения АКТГ₄₋₇-PGR ($n = 90$, Me [Q1; Q3])**Table 3.** Anxiety indicators in EPM after intraperitoneal administration of ACTH₄₋₇-PGR ($n = 90$, Me [Q1; Q3])

Доза Dose Показатель Index	Контроль Control ($n = 10$)	50 мкг/кг mcg/kg ($n = 10$)	150 мкг/кг mcg/kg ($n = 10$)	450 мкг/кг mcg/kg ($n = 10$)
Время в открытых рукавах, с Time in open arms, s	56.1 [41.7; 140.6]	61.6 [18.3; 119.2]	36.24 [32.6; 103.4]	29.8 [13.4; 100.7]
Время в закрытых рукавах, с Time in closed arms, s	173.2 [95.4; 246.2]	220.7 [108.6; 250.4]	228.7 [164.3; 259.8]	252.9 [181.9; 268.9]
Время на центральной площадке, с Time in central platform, s	30.6 [7.6; 60.6]	21.4 [16.8; 59.9]	24.4 [9.6; 39.1]	16.2 [4.1; 25.2]
Заходы в открытые рукава Entries in open arms	3.0 [3.0; 5.0]	4.0 [2.0; 7.0]	4.0 [2.0; 6.0]	4.5 [1.0; 6.0]
Заходы в закрытые рукава Entries in closed arms	6.0 [3.0; 12.0]	6.0 [2.0; 11.0]	4.0 [3.0; 11.0]	4.0 [2.0; 9.0]
Заходы на центральную площадку Entries in central platform	9.5 [6.0; 16.0]	8.0 [4.0; 18.0]	5.0 [4.0; 18.0]	7.0 [3.0; 11.0]
Количество свешиваний Number of head dips	11.0 [6.0; 15.0]	8.0 [4.0; 13.0]	7.0 [4.0; 18.0]	6.0 [4.0; 13.0]
Груминг Grooming	0.5 [0; 1.0]	1.0 [0.0; 1.0]	1.0 [1.0; 1.0]	1.0 [0.0; 1.0]

Примечание: * – достоверные различия ($p \leq 0.05$) с использованием критерия Манна–Уитни с поправкой Бенджамини–Хохберга по сравнению с контрольной группой.

Учитывая сложность и множественность механизмов, как участвующих в формировании собственно поведенческих актов, так и запускающихся в ходе стресс-реакции, можно предположить, что неоднозначные эффекты АКТГ₆₋₉-PGR при наказуемом и ненаказуемом поведении так же потенциально могут быть связаны с аллостерическим взаимодействием между пептидом и рецепторами других медиаторных систем, например, ГАМК-ергической, серотонергической, дофаминергической, как это было показано для АКТГ₄₋₇-PGR. Известно, что последний способен индуцировать и изменять сигналы широкого спектра рецепторов, вызывая их конформационные изменения и функциональную реконструкцию [3]. Кроме того, существуют и свои собственные связывающие сайты пептидов, через взаимодействие с которыми имеется возможность тонкой настройки информационного сигнала [3] в случае адаптации к внешним условиям, механизмы которой активируются особенно явно при проведении теста Вогеля по сравнению с тестом ПКЛ. Можно предположить, что так как животные в проведенном тесте ПКЛ не получали интенсивного стрессорного воздействия, то они, соответственно, и не нуждались в активном включении адаптационных процессов, сопровождающихся активацией различных медиаторных систем.

Отмеченный выше нелинейный дозозависимый характер эффектов (например, отсутствие влияния АКТГ₆₋₉-PGR на “число облизываний” в дозах 5, 50 и 450 мкг/кг, на фоне его наличия в дозах 0.5 и 150 мкг/кг) может быть связан с характерными биологическими особенностями реализации эффектов регуляторных пептидов. Известно, что кинетические закономерности химических и биологических про-

цессов, возникающих в результате действия данного класса физиологически активных веществ, часто имеют “колоколообразный” или “U-образный” тип кривой “доза–эффект”. Указанное явление подразумевает под собой наличие выраженного эффекта в очень малых концентрациях пептида и отсутствие или извращение действия в больших или средних [23]. Направленность эффектов регуляторных пептидов в той или иной дозе во многом зависит от активации той или иной системы внутриклеточных вторичных мессенджеров. Так, высокие концентрации АКТГ активируют синтез ц-АМФ для передачи клеточного сигнала, а низкие – диацилглицеролинозитолфосфатный путь, что в последующем будет определять вид полученного эффекта [23].

В то же время необходимо отметить, что ранее в работах других авторов были описаны анксиолитические эффекты АКТГ₆₋₉-PGR в тесте ПКЛ [12], не подтвержденные настоящим исследованием. Одной из причин указанных различий может являться путь введения изучаемой субстанции. В нашей работе животные получали пептид внутрибрюшинно, тогда как отмеченный анксиолитический эффект был зафиксирован при интраназальном введении АКТГ₆₋₉-PGR. Известно, что способ введения определяет время доставки пептида, а также механизмы его распределения в тканях, пути метаболизма, уровень биодоступности, что в значительной мере влияет на конечную концентрацию пептида в структурах мозга [24, 25]. Например, при введении в желудочки мозга пептидные препараты кортексин и церебролизин оказывают умеренное анксиолитическое, а при системном введении – анксиогенное действие [26]. Различная выраженность и направленность нейротропных эффектов, определяемая способом введения, также показана для структурно близкого аналога АКТГ₆₋₉-PGR – АКТГ₄₋₇-PGR [3, 13].

Учитывая дозозависимый характер эффектов нейропептидов, использование нами внутрибрюшинного пути введения было связано с возможностью более точного дозирования исследуемого вещества, так как при интраназальном способе могут происходить потери препарата, связанные с неадекватной техникой введения, неправильным выбором буфера, а также в результате рефлекторной активации актов глотания и чихания [27]. Указанный факт является достаточно критичным, учитывая, что изменение концентрации АКТГ и его фрагментов определяет путь внутриклеточной передачи сигнала, что, в свою очередь, влияет на направленность и выраженность реализуемых эффектов [23].

Отсутствие влияния АКТГ₄₋₇-PGR на уровень тревожности животных в обоих используемых в исследовании тестах согласуется с данными литературы. Например, показано, что при однократном введении АКТГ₄₋₇-PGR за 15 мин до начала воздействия пептид не влияет на уровень тревожности животных [5]. Несмотря на структурную близость изучаемых в настоящем исследовании гептапептидов, различия в аминокислотной последовательности, а именно отсутствие в молекуле АКТГ₄₋₇-PGR активного центра АКТГ (в отличие от АКТГ₆₋₉-PGR), обуславливают лишение семакса анксиогенной активности, свойственной природным меланокортинам. Более того, АКТГ₄₋₇-PGR способен проявлять свойства антагониста MC4R, индуцируя анксиолитический и антидепрессантный эффекты [3, 5]. При этом указанные свойства отсутствуют в нормальных условиях и проявляются на фоне повышенного уровня тревожности и депрессивности за счет влияния АКТГ₄₋₇-PGR на функциональную активность серотонинергической системы [5]. Важно отметить, что пептид оказывает именно “восстанавливающее” воздействие в условиях повышенного уровня тревожности.

Подобные особенности регуляторных влияний, проявляющиеся в дифференцированной реализации эффектов в зависимости от уровня напряжения адаптивных систем организма, “сближают” АКТГ₄₋₇-PGR и АКТГ₆₋₉-PGR. Интересно, что

указанные свойства характерны и для других регуляторных пептидов, проявляющих свои эффекты тем ярче, чем интенсивнее влияет разного рода раздражитель на организм, и чем больше изменений претерпевает тот или иной показатель [28].

Таким образом, выраженность и направленность влияния изучаемых N-концевых фрагментов АКТГ на тревожность у крыс при наказуемом и ненаказуемом поведении зависят от использованной дозы пептидов и исследуемой модели поведения. При этом эффекты АКТГ₆₋₉-PGP носят анксиогенный характер в тесте конфликтной ситуации по Вогелю и отсутствуют в тесте ПКЛ, тогда как влияния АКТГ₄₋₇-PGP на уровень тревожности в обоих используемых тестах обнаружено не было.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Catania A., Gatti S., Colombo G., Lipton J.M.* Targeting melanocortin receptors as a novel strategy to control inflammation. *Pharmacol. Rev.* 56(1): 1–29. 2004.
2. *Catania A.* Neuroprotective actions of melanocortins: a therapeutic opportunity. *Trends Neurosci.* 31(7): 353–360. 2008.
3. *Koroleva S.V., Myasoedov N.F.* Semax as a universal drug for therapy and research. *Biology Bulletin.* 45(6): 589–600. 2018.
4. *Yang Y., Hruby V.J., Chen M., Crasto Ch., Cai M., Harmon C.M.* Novel binding motif of ACTH analogues at the melanocortin receptors. *Biochem.* 48(41): 9775–9784. 2009.
5. *Levitskaya N.G., Vilenskii D.A., Sebensova E.A., Andreeva L.A., Kamensky A.A., Myasoedov N.F.* Influence of semax on the emotional state of white rats in the norm and against the background of cholecystokinin-tetrapeptide action. *Biol. Bull.* 37(2): 186–192. 2010.
6. *Holder J.R., Xiang Z., Bauzo R.M., Haskell-Luevano C.* Structure-activity relationships of the melanocortin tetrapeptide Ac-His-D-Phe-Arg-Trp-NH₂ at the mouse melanocortin receptors. 4. Modifications at the Trp position. *J. Med. Chem.* 45(26): 5736–5744. 2002.
7. *Dores R.M., Liang L., Davis P., Thomas A.L., Petko B.* 60 YEARS OF POMC: Melanocortin receptors: evolution of ligand selectivity for melanocortin peptides. *J. Mol. Endocrinol.* 56(4): T119–33. 2016.
<https://doi.org/10.1530/JME-15-0292>
8. *Hruby V.J., Wilkes B.C., Hadley M.E., Al-Obeidi F., Sawyer T.K., Staples D.J. et al.* Alpha-Melanotropin: the minimal active sequence in the frog skin bioassay. *J. Med. Chem.* 30(11): 2126–30. 1987.
9. *Clark A.J., Forfar R., Hussain M., Jerman J., McIver E., Taylor D., Chan L.* ACTH Antagonists. *Front Endocrinol (Lausanne).* 7: 101. 2016.
10. *Todorovic A., Lensing C.J., Holder J.R., cott J.W., Sorensen N.B., Haskell-Luevano C.* Discovery of melanocortin ligands via a double simultaneous substitution strategy based on the Ac-His-D-Phe-Arg-Trp-NH₂ template. *ACS Chem Neurosci.* 9(11): 2753–2766. 2018.
11. *Palmer D., Gonçalves J.P.L., V Hansen L., Wu B., Hald H., Schoffelen S. et al.* Click-Chemistry-Mediated Synthesis of Selective Melanocortin Receptor 4 Agonists. *J. Med. Chem.* 60(21): 8716–8730. 2017.
<https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.7b00353>
12. *Левицкая Н.Г., Глазова Н.Ю., Себенцова Е.А., Манченко Д.М., Андреева Л.А., Каменский А.А., Мясоедов Н.Ф.* Ноотропные и анксиолитические эффекты гептапептида АКТГ₆₋₉Pro-Gly-Pro. *Рос. физиол. журн. им. И.М. Сеченова.* 105(6): 761–770. 2019. [*Levitskaya N.G., Glazova N.Yu., Sebensova E.A., Manchenko D.M., Andreeva L.A., Kamensky A.A., Myasoedov N.F.* Nootropic And Anxiolytic Effects Of Heptapeptide ACTH₆₋₉Pro-Gly-Pro. *Russ. J. Physiol.* 105(6): 761–770. 2019. (In Russ)].
13. *Манченко Д.М., Глазова Н.Ю., Левицкая Н.Г., Андреева Л.А., Каменский А.А., Мясоедов Н.Ф.* Ноотропные и анальгетические эффекты семакса при различных способах введения. *Рос. физиол. журн. им. И.М. Сеченова.* 96(10): 1014–1023. 2010. [*Manchenko D.M., Glazova N.I., Levitskaia N.G., Andreeva L.A., Kamenskii A.A., Miasoedov N.F.* Nootropic and analgesic effects of Semax following different routes of administration. *Russ. J. Physiol.* 96(10): 1014–1023. 2010. (In Russ)].
14. *Shevchenko K.V., Nagaev I.Y., Babakov V.N., Andreeva L.A., Shevchenko V.P., Radilov A.S. et al.* Proteolysis of His-Phe-Arg-Trp-Pro-Gly-Pro in the blood and brain of rats *in vivo*. *Dokl Biochem Biophys.* 464: 301–304. 2015.
<https://doi.org/10.1134/S1607672915050087>
15. *Вьюнова Т.В., Шевченко К.В., Шевченко В.П., Бобров М.Ю., Безуглов В.В., Мясоедов Н.Ф.* Изучение особенностей связывания нейропептида семакс, меченного по концевому остатку пролина, с плазматическими мембранами мозга крыс. *Нейрохимия.* 23(1): 57–62. 2006. [*V'unova T.V., Shevchenko K.V., Shevchenko V.P., Bobrov M.Yu., Bezuglov V.V.,*

- Myasoedov N.F. Binding of Regulatory Neuropeptide [³H] Semax, Labeled in Terminal Pro, to Plasma Membranes of the Rat Forebrain. *Neurochem. J.* 23(1): 57–62. 2006. (In Russ)].
16. *Миронов А.Н.* Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств. Часть первая. М. Гриф и К. 2012. [*Mironov A.N.* Guidelines for preclinical studies of drugs. Part one. M. Grif i K. 2012. (in Russ)].
 17. *Millan M.J., Brocco M.* The Vogel conflict test: procedural aspects, g-aminobutyric acid, glutamate and monoamines. *European J. Pharmacology.* 463: 67–96. 2002.
 18. *Левицкая Н.Г., Каменский А.А.* Меланокортиновая система. Успехи физиол. наук. 40(1): 44–65. 2009. [*Levitskaya N.G., Kamensky A.A.* Melanocortin system. *Uspekhi Fiziologicheskikh Nauk.* 40(1): 44–65. 2009. (In Russ)].
 19. *Duval E.R., Javanbakht A., Liberzon I.* Neural circuits in anxiety and stress disorders: a focused review. *Ther Clin Risk Manag.* 11: 115–126. 2015.
 20. *Chaki S., Ogawa S., Toda Y., Funakoshi T., Okuyama S.* Involvement of the melanocortin MC4 receptor in stress-related behavior in rodents. *Eur. J. Pharmacol.* 474(1): 95–101. 2003.
 21. *Liu J., Garza J.C., Li W., Lu X.Y.* Melanocortin-4 receptor in the medial amygdala regulates emotional stress-induced anxiety-like behaviour, anorexia and corticosterone secretion. *Int. J. Neuropsychopharmacol.* 16(1): 105–120. 2013.
 22. *Karami Kheirabad M., Namavar Jahromi B., Tamadon A., Ramezani A., Ahmadloo S., Sabet Sarvestan F., Koochi-Hosseiniabadi O.* Expression of Melanocortin-4 Receptor mRNA in Male Rat Hypothalamus During Chronic Stress. *Int. J. Mol. Cell. Med.* 4(3): 182–187. 2015.
 23. *Ашмарин И.П.* Биохимия мозга. СПб. 1999. [*Ashmarin I.P.* Biochemistry of the brain. *Biohimiya mozga.* SPb. 1999. (In Russ)].
 24. *Yia X., Manickama D.S., Brynskikh A., Kabanova A.V.* Agile delivery of protein therapeutics to CNS. *Journal of Controlled Release.* 190: 637–663. 2014.
 25. *Chauhan M.B., Chauhan N.B.* Brain Uptake of Neurotherapeutics after Intranasal versus Intraperitoneal Delivery in Mice. *J. Neurol. Neurosurg.* 2(1): 9. 2015.
 26. *Шабанов П.Д.* Фармакология лекарственных препаратов пептидной структуры. Психофармакология и биол. наркология. 8(3–4): 2399–2425. 2008. [*Shabanov P.D.* Pharmacology of Drugs of Peptide Structure. *Psychopharmacology and Biological Narcology.* 8(3–4): 2399–2425. 2008. (In Russ)].
 27. *Макаренко И.Е., Авдеева О.И., Ванатиев Г.В., Рыбакова А.В., Ходько С.В., Макарова М.Н., Макаров В.Г.* Возможные пути и объемы введения лекарственных средств лабораторным животным. *Международный вестник ветеринарии.* 3: 72–78. 2013. [*Makarenko I.E., Avdeeva O.I., Vanatii G.V., Rybakova A.V., Khodko S.V., Makarova M.N., Makarov V.G.* Possible ways of administration and standard drugs in laboratory animals. *Mezhdunarodnyj vestnik veterinarii.* 3: 78–84. 2013. (In Russ)].
 28. *Бельх А.Е., Бобынцев И.И.* Дельта-сон индуцирующий пептид: отдельные биологические эффекты и механизмы их развития. *Курский научно-практический вестник “Человек и его здоровье”.* 1: 79–90. 2016. [*Belykh A.E., Bobyntsev I.I.* Delta sleep-inducing peptide: several biological effects and mechanisms of their development. *Kursk Scientific and Practical Bulletin “Man and His Health”.* 1: 79–90. 2016. (In Russ)].

Influence of ACTH_{6–9}-PGP and ACTH_{4–7}-PGP Peptides on Anxiety in Rats under Punished and Unpunished Behavior

S. A. Dodonova^{a,*}, I. I. Bobyntsev^a, A. E. Belykh^a, I. A. Telegina^a, Yu. A. Muzaleva^a, L. A. Andreeva^b, and N. F. Myasoedov^b

^aKursk State Medical University, 305004, Kursk, Russia

^bInstitute of Molecular Genetics, Russian Academy of Science, 123182, Moscow, Russia

*e-mail: dodonovasveta@mail.ru

One of the currently studied classes of regulatory peptides is melanocortins (MCs), which include biologically active substances such as adrenocorticotrophic hormone (ACTH), α -, β - and γ -melanocyte stimulating hormones (MSH). ACTH fragments, like other peptides of the MC family, have pronounced neurotropic effects aimed, in particular, at stimulating the processes of learning, memory and attention. Moreover, the active ACTH center necessary for the activation of all types of melanocortin receptors is the His-Phe-Arg-Trp sequence corresponding to the ACTH_{6–9} fragment. In the present work, we studied a synthetic peptide, ACTH_{6–9}-PGP, which contains a natural fragment ACTH_{6–9}-PGP stabilized from the C-terminus with the amino acid sequence prolyl-glycyl-proline (PGP) to increase resistance to the action of carboxypeptidases.

The effects of intraperitoneal administration of ACTH₆₋₉-PGP at doses of 0.5; 5; 50; 150 and 450 µg/kg were studied once 15 minutes before the start of the experiment on studying the level of anxiety in rats using the Vogel conflict test (punished behavior) and the elevated plus maze test (unpunished behavior). The effects of ACTH₆₋₉-PGP and its structural analogue, ACTH₄₋₇-PGP at doses of 50, 150 and 450 µg/kg were compared using these tests. It was found that ACTH₆₋₉-PGP in the Vogel conflict test led to an increase in the level of anxiety in rats, which manifested itself in a reduction in drinking time (in all doses) and a decrease in the number of licks (at doses of 0.5 and 150 µg/kg ($p < 0.01$)). In the elevated plus maze test, ACTH₆₋₉-PGP did not significantly affect rat behavior. In models of punished behavior and unpunished behavior, no effects of ACTH₄₋₇-PGP were detected. Thus, it was found that ACTH₆₋₉-PGP, in contrast to ACTH₄₋₇-PGP, affects the level of anxiety in rats depending on the dose of the peptide and the model of behavior studied.

Keywords: regulatory peptides, ACTH, anxiety, Vogel test, elevated plus maze, rats

ЦИТИРОВАТЬ:

Додонова С.А., Бобынцев И.И., Белых А.Е., Телегина И.А., Музалева Ю.А., Андреева Л.А., Мясоедов Н.Ф. Влияние пептидов АКTH₆₋₉-PGP и АКTH₄₋₇-PGP на уровень тревожности у крыс при наказуемом и ненаказуемом поведении. Рос. физиол. журн. им. И.М. Сеченова. 106(3): 283–293.

DOI: 10.31857/S0869813920030048

TO CITE THIS ARTICLE:

Dodonova S.A., Bobyntsev I.I., Belykh A.E., Telegina I.A., Muzaleva Yu.A., Andreeva L.A., Myasoedov N.F. Influence of ACTH₆₋₉-PGP and ACTH₄₋₇-PGP Peptides on Anxiety in Rats under Punished and Unpunished Behavior. Russian Journal of Physiology. 106(3): 283–293.

DOI: 10.31857/S0869813920030048