

## КРАТКОЕ СООБЩЕНИЕ

УДК 57.021+57.023+57.026

**Влияние пептида Ас-D-MPRG на основе С-концевого фрагмента аргинин-вазопрессина(6-9) на поведение крыс разного возраста****А.А. Стаханова<sup>1</sup>, \* , О.Г. Воскресенская<sup>1</sup>, В.П. Голубович<sup>2</sup>, А.А. Каменский<sup>1</sup>**<sup>1</sup>*Кафедра физиологии человека и животных, биологический факультет, Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, 119234, г. Москва, Ленинские горы, д. 1, стр. 12;*<sup>2</sup>*Лаборатория прикладной биохимии, Институт биоорганической химии, Национальная академия наук Беларуси, 220141, г. Минск, ул. Академика В.Ф. Купревича, д. 5, к. 2*\*e-mail: [anna.stahanova@inbox.ru](mailto:anna.stahanova@inbox.ru)

В данной работе было выявлено, что Ас-D-MPRG – тетрапептид, синтезированный на основе С-концевого фрагмента аргинин-вазопрессина(6-9) – при хроническом неонатальном введении влияет на тревожность и ориентировочно-исследовательское поведение крыс всех трех изученных возрастных групп. Также было установлено, что пептид оказывает наиболее выраженное действие в стрессогенных условиях. У крыс, получавших пептид во всех трех исследуемых дозах, наблюдали сниженный уровень тревожности, что проявлялось в уменьшении количества актов груминга в тесте «Приподнятый крестообразный лабиринт» и увеличении времени нахождения в светлом отсеке в тесте «Светло-темная камера». Двигательная активность изменялась от пассивного затаивания в препубертатном периоде к активному избеганию в пубертатный период и у взрослых животных. На основании полученных данных можно сделать вывод, что пептид проявляет свое действие только при наличии биологически значимых стимулов.

**Ключевые слова:** поведение, тревожность, пептидные препараты, аналог аргинин-вазопрессина, ориентировочно-исследовательская реакция, интраназальное введение

DOI: 10.55959/MSU0137-0952-16-78-2-1

Фармакологические препараты пептидной природы в последнее время стали привлекать пристальное внимание исследователей в области психофармакологии. С каждым годом растет разнообразие пептидных препаратов, обладающих ноотропным, антидепрессантным и анксиолитическим действием.

Вазопрессин, в дополнение к широко известной гормональной активности, вызывает ряд негормональных эффектов. Помимо действия на периферийные органы, аргинин-вазопрессин (АВП) вызывает целый набор эффектов в центральной нервной системе, воспроизводя процессы обучения и запоминания, а также изменяя ответные реакции на стрессогенные факторы. АВП является одним из регуляторных пептидов, способных модифицировать процесс обучения. Он обладает анксиолитическим и антидепрессантным действием [2].

Ранее было выявлено, что АВП и ряд его структурных аналогов при их хроническом неонатальном введении оказывают антистрессорное действие, способствуют улучшению обучаемости. Данные эффекты не ослабевают со временем, что может доказывать влияние пептидов этого ряда на созревание и формирование разнообразных ней-

роэндокринных систем мозга в постэмбриональном периоде развития животных [3].

В первый раз о ноотропном воздействии АВП и его структурных аналогов было упомянуто в ранних исследованиях группы Де Вида [4, 5]. В них же было представлено доказательство наличия негормональных эффектов АВП. Было показано, что периферическое, а также внутримозговое введение АВП положительно влияет на обучаемость животных и степень их депрессивности.

При поиске минимально возможных фрагментов АВП, вызывающих ноотропный эффект, был синтезирован целый ряд аналогов АВП, в частности – (АВП(6-9)). После этого был проведен ряд исследований по их влиянию на память и обучение животных. В результате были синтезированы пептиды, в состав которых входили с 6-й по 9-ю аминокислоты из АВП: Cys-Pro-Arg-Gly-NH<sub>2</sub> (CPRG) и Cys-Pro-Arg (CPR) [6]. Например, пептид CPRG, один из пептидов, синтезированных на основе АВП(6-9), не оказывал воздействия на выработку навыка в тесте «условная реакция активного избегания» (УРАИ) у здоровых крыс, но был эффективен у животных, находящихся под действием галоперидола [6–7].

В лаборатории общей физиологии и регуляторных пептидов на кафедре физиологии человека и животных биологического факультета МГУ исследовалась биологическая активность таких фрагментов АВП, как АВП(4-8), АВП(4-9), АВП(5-9) и АВП(6-9). Было показано, что именно биологическая активность АВП(6-9) является наиболее высокой. Опираясь на полученные данные [8], сотрудники лаборатории прикладной биохимии Института биоорганической химии НАН Беларуси под руководством профессора В.П. Голубовича синтезировали аналог С-концевого фрагмента АВП с заменой С<sub>ys</sub> в 6-м положении на D-Met – Ас-D-MPRG. Было высказано предположение о том, что данная замена С<sub>ys</sub> на D-Met способна привести к увеличению устойчивости данного пептида к разрушению пептидазами [7].

### Материалы и методы

Исследования проводились на самцах и самках нелинейных белых крыс, были работоспособны 215 особей. Животные находились в стандартных условиях вивария. Доступ к пище и воде был свободным, также соблюдался 12-часовой световой режим дня (искусственное освещение с 9 до 21 ч). Вся экспериментальная работа на крысах проводилась с 10 до 20 ч. Опыты проводились в рамках биоэтических норм.

В эксперименте использовали аналог С-концевого фрагмента АВП – тетрапептид Ас-D-MPRG, который был синтезирован в Институте биоорганической химии Национальной академии наук Беларуси. Вещество вводили детенышам белых крыс интраназально в дозах 0,01 мг/кг, 1,0 мг/кг и 10 мг/кг в течение 5 сут с 3-х по 7-е сут жизни. В свою очередь контрольным животным вводили соответствующий объем растворителя – дистиллированной воды – в те же сроки введения.

Детеныши белых крыс каждого выводка содержались вместе в отдельной клетке. С матерью крысята находились до месячного возраста. На 45-е сут жизни, когда крысята достигают половозрелости, самцов и самок рассаживали, чтобы избежать близкородственного скрещивания.

Тестирование животных проводилось в трех возрастах: 35–39-е сут жизни (препубертатный период), 49–54-е сут жизни (пубертатный период), 63–69-е сут жизни (взрослые животные).

### Тест «Открытое поле»

**Бесстрессорная модификация.** «Открытое поле» представляет собой стандартную круглую пластиковую арену диаметром 100 см с высокими стенками и полом, расчерченным двумя концентрическими окружностями, расположенными на равном расстоянии друг от друга и от края арены, а также отрезками прямых, делящими поле на 19 равных по площади областей. Тест в данной модификации

проводится под красным светом лампы с мощностью 15 Вт и в тишине [9]. Тестируемых животных помещали в установку на 2 мин и каждые 30 с эксперимента фиксировали параметры: период выхода из центра арены (латентный период); пробег – количество пройденных секторов (горизонтальную двигательную активность); стойки – количество подъемов на задние лапы (вертикальную двигательную активность); количество отходов от стенки арены – выходы I – количество пересечений внешней концентрической окружности; количество выходов в центр арены – выходы II – количество пересечений внутренней концентрической окружности; количество умываний – груминг – количество касаний животным морды передними лапами.

**Стрессогенная модификация.** Красный свет был заменен на ярко-белый мощностью 200 Вт и электрический звонок. Тестирование животных проводилось, как описано выше.

### Тест «Приподнятый крестообразный лабиринт»

Эксперимент проводили в стандартном лабиринте для взрослых крыс. Установка была разделена на четыре рукава: два – с направленным ярким светом мощностью 200 Вт и без перегородок (открытое пространство) и два – без освещения и стенками (закрытое безопасное пространство.) Тестируемых животных помещали в установку мордой на освещенный рукав, тест проводили в течение 3 мин [8]. В тесте оценивали: латентный период первого захода в темный отсек, с; общее время нахождения на свету, с; количество выходов на первую или вторую половину светлого рукава; количество переходов из одного темного отсека в другой; количество переходов из одного светлого отсека в другой; количество пересечений центра лабиринта – общее количество переходов; количество свешиваний с открытых рукавов лабиринта; количество выглядываний из закрытых рукавов лабиринта; вертикальная двигательная активность – стойки – количество подъемов на задние лапы; количество умываний – груминг – количество касаний морды передними лапами.

### Тест «Светлая – темная камера»

Установка представляет собой камеру (размер 30 × 22 × 35 см), разделенную перегородкой с отверстием на два отсека: один – ярко освещенный, другой – затемненный. Животное помещали в светлый отсек и в течение 3 мин наблюдали перемещение крыс из отсека в отсек. Более подробно методика описана ранее [8]. Параметры, исследуемые в тесте: латентный период перехода в темный отсек, с; суммарное время, проведенное в светлом отсеке, с; количество стоек в светлом и темном отсеках; количество выглядываний из темного отсека; количество переходов между светлым и темным отсеками; количество умываний в светлом и темном отсеках.

### Статистическая обработка результатов

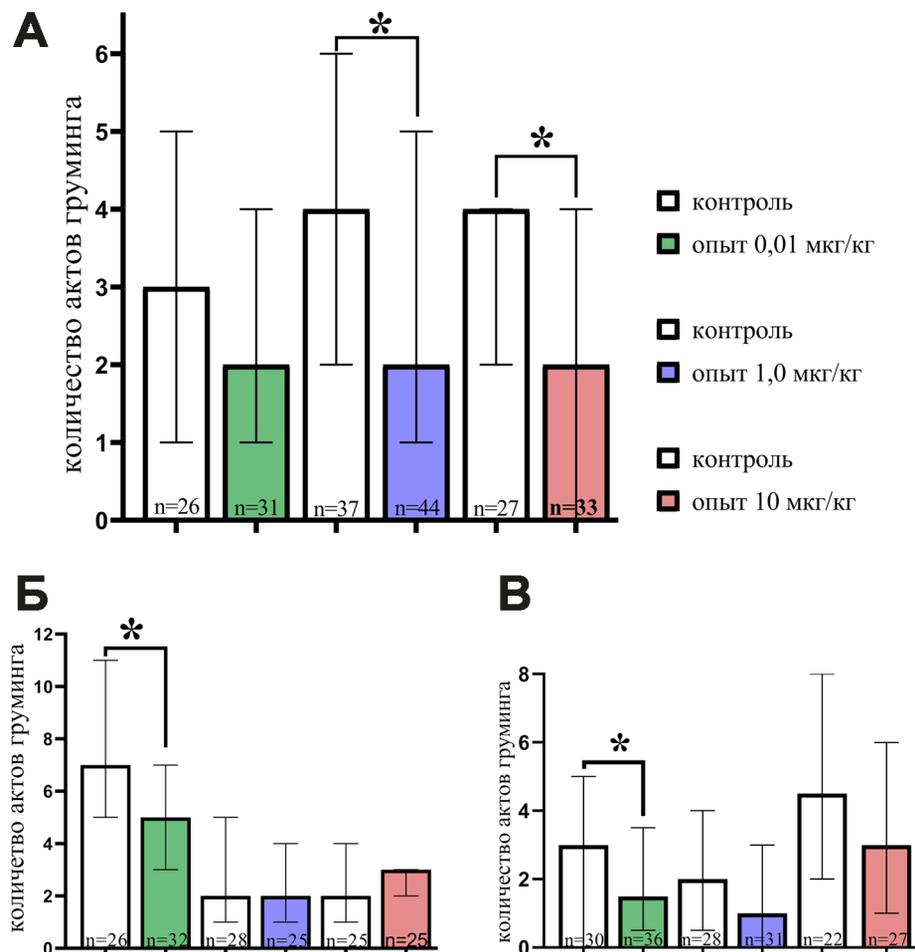
Полученные экспериментальные данные обрабатывали с использованием стандартных методов статистического анализа. Для проверки нормальности распределения использовали критерий Шапиро-Уилка. Для сравнения параметров эксперимента массив данных сравнивали с помощью непараметрического критерия Манна-Уитни. Обработку массива данных проводили с помощью статистических программ «GraphPad Prism 8.0» (GraphPad Software, США), «Statistica 10.0», «Microsoft Excel». На графиках данные представлены в виде медианы и интерквартильного размаха. Значимыми различия считались при вероятности ошибки  $p < 0,05$ .

### Результаты и обсуждение

**Тетрапептид Ас-D-MPRG влияет на уровень тревожности в тесте «приподнятый крестообразный лабиринт».** Хроническое неонатальное введение тетрапептида в дозе 0,01 мкг/кг вызывало статистически значимое снижение количества актов

груминга, которое наблюдали в период 49–54 сут жизни (рис. 1Б) и 63–69 сут жизни (рис. 1В) ( $p = 0,0110$  и  $p = 0,0437$  соответственно), а также в этих группах наблюдали значимое увеличение количества свешиваний с открытых рукавов лабиринта у опытной группы по сравнению с контрольной ( $p = 0,0291$  и  $p = 0,0254$  соответственно). В период 35–39 сут жизни введение Ас-D-MPRG в дозах 1,0 и 10 мкг/кг приводило к статистически значимому уменьшению количества актов груминга ( $p = 0,0064$  и  $p = 0,0487$  соответственно) (рис. 1А), что свидетельствует о снижении эмоциональной напряженности животных. Таким образом, неонатальное введение Ас-D-MPRG в дозе 0,01 мкг/кг в период с 49 по 69 сут жизни и в дозах 1,0 и 10 мкг/кг в период с 35 по 39 сут жизни приводит к понижению уровня тревожности и эмоциональной реактивности животных.

**Влияние Ас-D-MPRG на тревожность в тесте «Светло-темная камера».** В тесте «Светло-темная камера» неонатальное введение Ас-D-MPRG в период 35–39 сут жизни во всех трех дозах (0,01, 1,0



**Рис. 1.** Изменение груминга у животных, неонатально получавших Ас-D-MPRG, в тесте «приподнятый крестообразный лабиринт» (данные представлены в виде медианы и интерквартильного размаха)

Значимые отличия от контроля: \* –  $p < 0,05$ ; \*\* –  $p < 0,01$

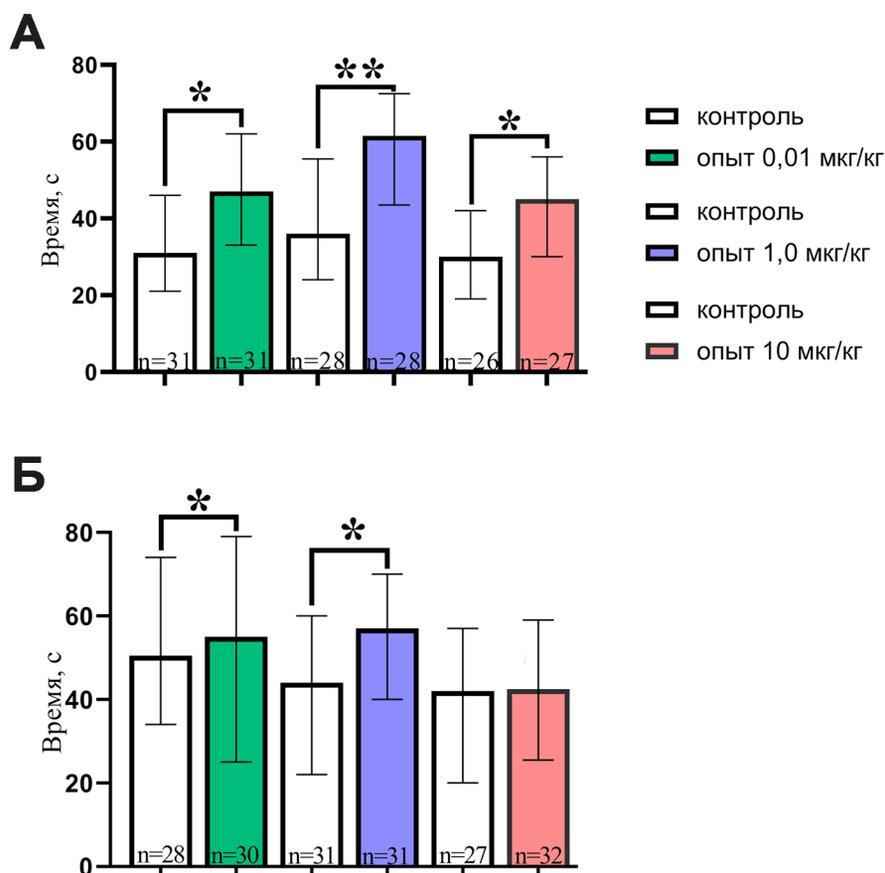
А – 35–39 сут жизни – препубертатный период; Б – 49–54 сут жизни – пубертатный период; В – 63–69 сут жизни – взрослые животные

и 10 мкг/кг) приводило к статистически значимому увеличению времени, проводимого в светлом отсеке камеры, у животных опытной группы по сравнению с контрольной ( $p = 0,0124$ ,  $p = 0,0001$  и  $p = 0,0207$  для доз 0,01, 1,0 и 10 мкг/кг соответственно) (рис. 2А). Животные из опытной группы также значимо больше делали переходов между отсеками камеры ( $p = 0,0251$ ,  $p = 0,0429$  и  $p = 0,0140$  для доз 0,01, 1,0 и 10 мкг/кг соответственно), но значимо реже выглядывали из темного отсека, чем крысы контрольной группы ( $p = 0,0109$  и  $p = 0,007$  для доз 0,01 и 1,0 мкг/кг соответственно). В период 49–54 сут жизни введение тетрапептида приводило к статистически значимому увеличению времени нахождения на свету только при введении в дозе 1,0 мкг/кг ( $p = 0,0251$ ) (рис. 2Б), также уменьшилось количество выглядываний из темного отсека камеры у опытных крысят при введении препарата в дозах 0,01 и 1,0 мкг/кг ( $p = 0,0455$  и  $p = 0,0463$  соответственно). У взрослых животных статистически значимых отличий между группами не выявлено.

Регуляцию уровня тревожности выполняет АВП, синтезируемый в экстрагипоталамической части вазопрессинергической системы [10]. В этой

зоне проекции нейронов следуют в передний мозг к его латеральному септуму, в котором содержится плотная сеть вазопрессин-содержащих нейронов [11]. Для этой области мозга характерна высокая плотность V1a-рецепторов АВП [12]. Локальная экстрагипоталамическая активация рецепторов данного типа участвует в обеспечении влияния АВП на уровень тревожности животных [13]. Мы предполагаем, что для проявления эффекта необходимы более стрессогенные условия. Например, в тесте «приподнятый крестообразный лабиринт» условия менее стрессогенные, чем в «светло-темной камере», так как камера меньше по размерам и перепад освещенности двух отсеков камеры ярче выражен. В период неонатального введения Ас-D-MPRG часть вазопрессинергической системы, которая отвечает за эту поведенческую активность, еще не окончательно сформирована, поэтому мы и наблюдали влияние пептида на уровень тревожности животных только в более стрессогенных условиях [14].

*Влияние Ас-D-MPRG на ориентировочно-исследовательское поведение в тесте «открытое поле» (бесстрессорная и стрессогенная модификация).* В тесте «открытое поле» (бесстрессорная модифи-



**Рис. 2.** Изменение двигательной активности у животных, неонатально получавших Ас-D-MPRG, в тесте «светло-темная камера» (данные представлены в виде медианы и интерквартильного размаха)

Значимые отличия от контроля: \* –  $p < 0,05$ ; \*\* –  $p < 0,01$

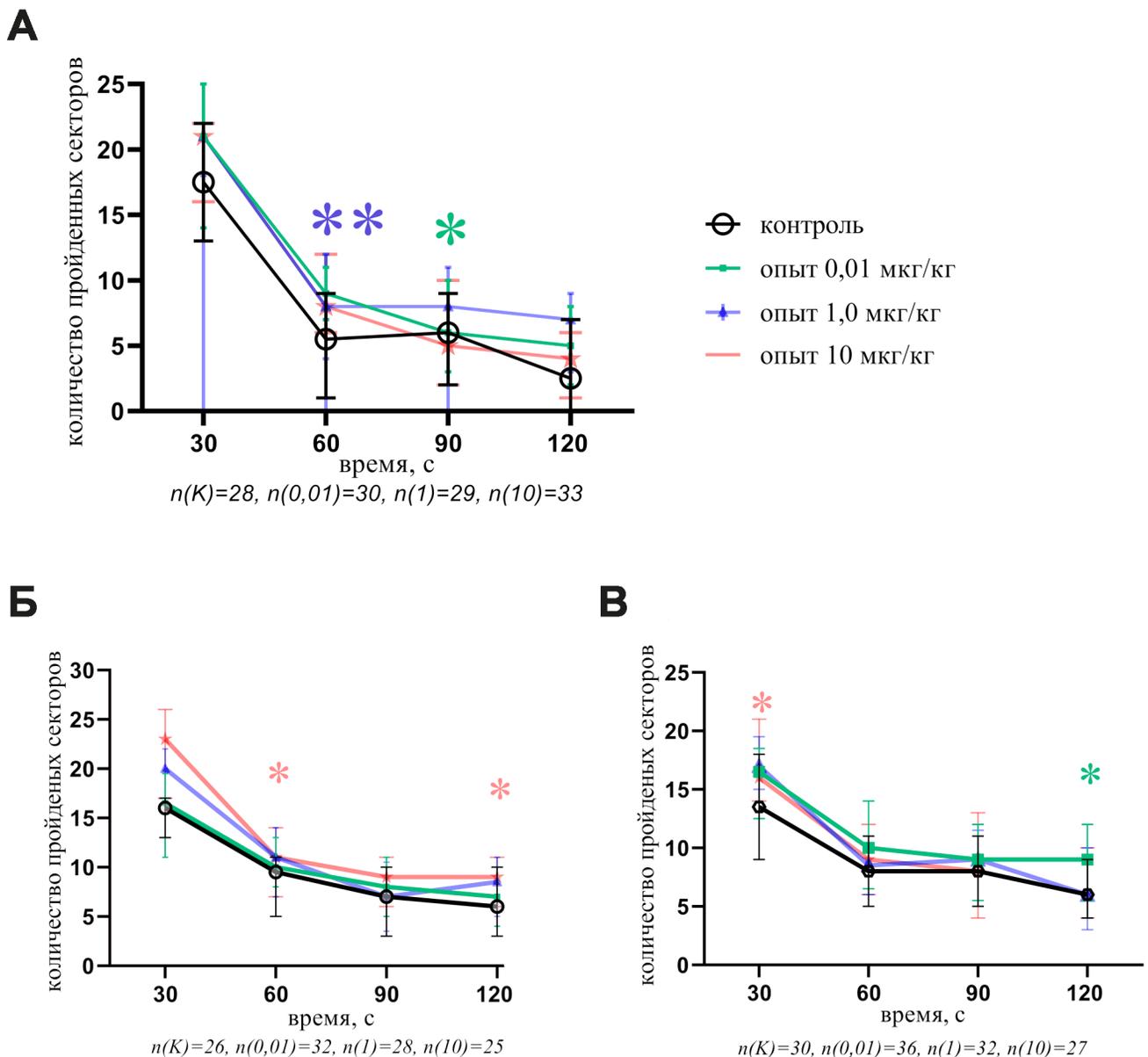
А – 35–39 сут жизни – препубертатный период; Б – 49–54 сут жизни – пубертатный период

кация) не было значимых отличий в поведении крыс контрольной и опытной группы при неонатальном введении Ас-D-MPRG во всех трех дозах и во всех возрастах.

В тесте «открытое поле» (стрессогенная модификация) в период 35–39 сут жизни наиболее эффективной оказалась доза пептида 1,0 мкг/кг: статистически значимо уменьшался пробег у опытных животных в период 30–60 с тестирования ( $p = 0,0105$ ) (рис. 3А), а также суммарный пробег за все время тестирования ( $p = 0,0099$ ). На 49–54 сут жизни статистически значимо увеличивался пробег у опытных животных в период 30–60 с ( $p = 0,0198$ ) и в период 90–120 с ( $p = 0,0269$ ) (рис. 3Б), а также

в период 30–60 с увеличивалось количество стоек ( $p = 0,0056$ ) при использовании тетрапептида в дозе 10 мкг/кг. На 63–69 сут жизни наблюдалось статистически значимое увеличение пробега в период 0–30 с ( $p = 0,0130$ ) и суммарный пробег ( $p = 0,0147$ ) (рис. 3В) при хроническом введении тетрапептида в дозе 1 мкг/кг.

Данные результаты подтверждают то, что в условиях неизбежного стресса у животных, начиная с пубертатного периода, наблюдается усиление ориентировочно-исследовательской реакции. Это может свидетельствовать о преимущественном развитии реакции избегания при действии стрессогенных факторов.



**Рис. 3.** Изменение горизонтальной двигательной активности у животных, неонатально получавших Ас-D-MPRG, в тесте «открытое поле» (стрессогенная модификация) (данные представлены в виде медианы и интерквартильного размаха)

Значимые отличия от контроля: \* –  $p < 0,05$ ; \*\* –  $p < 0,01$

А – 35–39 сут жизни – препубертатный период; Б – 49–54 сут жизни – пубертатный период; В – 63–69 сут жизни – взрослые животные

Понятие двигательной активности состоит из достаточно большого числа поведенческих составляющих, определяемых степенью возбуждения моторных центров, а также уровнем исследовательской активности, способностью к созданию новых двигательных программ и др. Уровень горизонтальной двигательной активности хорошо характеризует уровень возбуждения локомоторных центров. Соответствующие исполнительные области располагаются в спинном мозге. Вертикальная же активность рассматривается в рамках ориентировочного поведения, которое направлено на соби́рание новой информации. При переходе от горизонтальной двигательной активности к вертикальной (выполнение стоек) обеспечиваются торможение локомоторных проявлений, а также смена двигательных программ. Эта задача решается как высшими центрами головного мозга, так и корой больших полушарий, и базальными ганглиями [13].

Таким образом, в результате работы было показано, что синтетический аналог фрагмента АВП(6-9) – Ас-D-MPRG – вызывает отставленные поведенческие эффекты. Тетрапептид ока-

зывает влияние на двигательную активность животных всех возрастов, а также проявляет некоторое анксиолитическое действие. Наиболее эффективными оказались дозы 0,01 и 1,0 мкг/кг. Влияние хронического неонатального введения Ас-D-MPRG наиболее выражено у животных в препубертатный и пубертатный периоды жизни.

Работа выполнена в рамках государственного задания МГУ имени М.В. Ломоносова (№ 121032300071-8), без поддержки государственных или частных фондов в рамках договора о научно-техническом сотрудничестве между «Институтом биоорганической химии» Национальной академии наук Беларуси и биологическим факультетом Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова с целью проведения работ по исследованию пептидных соединений. Эксперименты проведены с соблюдением этических норм работы с животными и одобрены комиссией Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова по биоэтике (протокол № 107-д). Авторы заявляют об отсутствии конфликтов интересов.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Freeman S.M., Bales K.L. Oxytocin, vasopressin, and primate behavior: diversity and insight. *Am. J. Primatol.* 2018;80(10):e.22919.
2. Li C.Y., Zhang L., Li J., Qi C.L., Li D.Y., Liu X., Qu X. Effect of endogenous arginine-vasopressin arising from the paraventricular nucleus on learning and memory functions in vascular dementia model rats. *Biomed. Res. Int.* 2017;2017:3214918.
3. Møller M. Vasopressin and oxytocin beyond the pituitary in the human brain. *Handbook of clinical neurology. The human hypothalamus. Middle and posterior region, vol. 180.* Eds. D.F. Swaab, F. Kreier, P.J. Lucassen, A. Salehi, and R.M. Buijs. Elsevier; 2021: 7–24.
4. de Wied D. Central actions of neurohypophysial hormones. *Prog. Brain Res.* 1983;60:155–167.
5. de Wied D. Long term effect of vasopressin on the maintenance of a conditioned avoidance response in rats. *Nature.* 1971;232(5305):58–60.
6. Бородина К.В., Стаханова А.А., Мартинович В.П., Воскресенская О.Г., Голубович В.П., Каменский А.А. Синтез и исследование влияния аналога аргинин-вазопрессина(6-9) на поведение крыс различных возрастных групп. *Изв. Нац. акад. наук Бел. Сер. хим. наук.* 2021;57(1):61–69.
7. Голубева М.Г., Григорьева М.Е. Влияние нейрогипофизарных гормонов и их модифицированных форм на гемостаз. *Нейрохимия.* 2008;25(1):17–22.
8. Воскресенская О.Г., Каменский А.А., Голубович В.П. Влияние хронического постнатального введения АС-D-MPRG на уровень тревожности белых крыс. *Рос. физиол журн.* 2004;90(8):170.
9. Ким П.А., Воскресенская О.Г., Мартинович В.П., Голубович В.П., Каменский А.А. Отставленные эффекты неонатального введения аргинин-вазопрессина и его структурного аналога Ас-D-SPRG на поведение белых крыс. *Вопр. биол., мед. фарм. хим.* 2011;(4):17–22.
10. Угрюмов М.В. *Механизмы нейроэндокринной регуляции.* М.: Наука; 1999. 298 с.
11. Walker D.L., Devis M., Young L.J. Double dissociation between the involvement of the bed nucleus of the stria terminalis and the central nucleus of the amygdala in startle increases produced by conditioned versus unconditioned fear. *J. Neurosci.* 1997;17(23):9375–9383.
12. Наточин Ю.В., Канашкина Т.А., Мордвинцев Д., Шахматова Е.И. Рецепторы вазопрессина: структура и стимуляция 1-дезамино-аргинин-вазотонином у крыс. *Рос. физиол. журн.* 2007;93(6):624–635.
13. Lago T.R., Brownstein M. J., Page E., Beydler E., Manbeck A., Beale A., Roberts C., Balderston N., Damiano E., Pineles S.L., Simon N., Emst M., Grillon C. The novel vasopressin receptor (V1aR) antagonist SRX246 reduces anxiety in an experimental model in humans: a randomized proof-of-concept study. *Psychopharmacology.* 2021;238(9):2393–2403.
14. Freeman S.M., Bales K.L. Oxytocin, vasopressin, and primate behavior: diversity and insight. *Am. J. Primatol.* 2018;80(10):e22919.

Поступила в редакцию 25.10.2022

После доработки 10.03.2023

Принята в печать 29.03.2023

## SHORT COMMUNICATION

**The effect of the Ac-D-MPRG peptide based on the C-terminal fragment of arginine-vasopressin(6-9) on the character of rats of different ages**А.А. Stakhanova<sup>1</sup>, \* , О.Г. Voskresenskaya<sup>1</sup>, , <sup>1</sup><sup>1</sup>*Department of Human and Animal Physiology, Faculty of Biology, Lomonosov Moscow State University, 1–12 Leninskie gory, Moscow, 119234, Russia;*<sup>2</sup>*Applied Biochemistry Laboratory, Institute of Bioorganic Chemistry, National Academy of Science of Belarus, 5/2 Acad. V.F. Kuprevich str., Minsk, 220141, Belarus*\*e-mail: [anna.stahanova@inbox.ru](mailto:anna.stahanova@inbox.ru)

In this work, it was found that Ac-D-MPRG, a tetrapeptide synthesized on the basis of the C-terminal fragment of arginine-vasopressin(6-9), upon chronic neonatal administration, affects anxiety and exploratory behavior in rats of three age groups. The most significant effect of the peptide was manifested under more stressful conditions. The rats of the experimental group showed less anxiety. They did less grooming in the Elevated Plus Maze test and increased time in light in the Light-Dark Chamber test. Motor activity changed from passive holding in the prepubertal period to active avoidance in puberty and adulthood. Based on the data obtained, we conclude that the effects of the peptide are manifested only when exposed to a biologically significant stimulus.

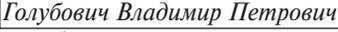
**Keywords:** *behavior, anxiety, peptide drugs, arginine-vasopressin analog, orienting-exploratory reaction, intranasal administration*

**Funding:** The work was carried out within the framework of the state task of Lomonosov Moscow State University (No. 121032300071-8), without the support of public or private funds under the agreement on scientific and technical cooperation between the “Institute of Bioorganic Chemistry of the National Academy of Sciences of Belarus” and the Biology Faculty.

**Сведения об авторах**

*Стаханова Анна Андреевна* – аспирант кафедры физиологии человека и животных биологического факультета МГУ. Тел.: 8-495-939-28-95; e-mail: [anna.stahanova@inbox.ru](mailto:anna.stahanova@inbox.ru); ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-2086-3746>

*Воскресенская Ольга Георгиевна* – канд. биол. наук, доц., ст. науч. сотр. кафедры физиологии человека и животных биологического факультета МГУ. Тел.: 8-495-939-28-95; e-mail: [voskresenskaya05@mail.ru](mailto:voskresenskaya05@mail.ru)

 – докт. биол. наук, зав. лаб. прикладной биохимии Института биоорганической химии НАН Беларуси.

 – докт. биол. наук, проф. кафедры физиологии человека и животных биологического факультета МГУ.