

ФИЗИОЛОГИЯ

УДК 612.821.2+612.434.018+591.51

ВЛИЯНИЕ ОРИГИНАЛЬНОГО СТРУКТУРНОГО АНАЛОГА АВП(6-9) — Ас-D-SPRG НА ОРИЕНТИРОВОЧНО-ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКОЕ ПОВЕДЕНИЕ И УРОВЕНЬ ТРЕВОЖНОСТИ БЕЛЫХ КРЫС**А.С. Белякова, О.Г. Воскресенская, А.А. Каменский, В.П. Голубович****(кафедра физиологии человека и животных; e-mail: alixletter@yandex.ru)*

Изучено влияние синтетического структурного аналога аргинин-вазопрессина Ас-D-SPRG на ориентировочно-исследовательское поведение и уровень тревожности белых крыс. Ас-D-SPRG вводили интраназально в дозах 0,01; 0,1; 1,0 и 10,0 мкг/кг в объеме 1 мкл/10 г массы тела за 5 мин до тестирования. Ас-D-SPRG во всех дозах вызывал угнетение ориентировочно-исследовательской реакции (ОИР) и повышение уровня тревожности животных. Противоречивые литературные данные не дают возможности однозначно говорить о механизмах, лежащих в основе регуляции уровня тревожности и ОИР со стороны АВП, но, безусловно, подтверждают участие данного гормона в этом процессе.

Ключевые слова: нейрофизиология, аргинин-вазопрессин, тревожность, фармакология, регуляторные пептиды.

Регуляторные пептиды вызывают большой интерес у современных исследователей. В частности, в настоящее время установлен целый ряд нейропептидов, играющих роль нейромедиаторов и нейромодуляторов [1]. Это гипоталамические гормоны (люлиберин, тиролиберин, меланостатин, соматостатин и др.), некоторые тахикинины (вещество Р, нейро-тензин и др.), бомбезиноподобные пептиды, ангиотензин, а также гипофизарные гормоны: вазопрессин, окситоцин, кортикотропин и др.

Эти гормоны, как стало известно с середины 60-х гг. XX в., обладают, помимо своей специфической гормональной активности, рядом экстрагормональных эффектов [2]. Одним из представляющих наибольший интерес гормонов пептидной природы является аргинин-вазопрессин (АВП), синтезирующийся в задней доле гипофиза. Помимо периферического действия, он вызывает ряд центральных эффектов, модулируя процессы обучения и памяти и ответные реакции организма на действие стрессогенных факторов [3].

Известно, что аргинин-вазопрессин распадается в организме на несколько линейных фрагментов, и данные продукты протеолиза обладают нейротропной активностью, которая не уступает (а зачастую и превосходит) активность целой молекулы АВП в отношении стимуляции поведения, улучшения обучения и памяти [3].

При анализе результатов, полученных в нашей лаборатории при исследовании различных фраг-

ментов аргинин-вазопрессина, было выдвинуто предположение, что для сохранения у аналога поведенческой активности необходима следующая основная структура: $Z^6\text{-Pro}^7\text{-Arg}^8\text{-Gly}^9\text{-NH}_2$ (где Z — аминокислотный остаток). Таким образом, для получения аналога АВП(6-9), обладающего выраженным ноотропным эффектом, было целесообразно синтезировать пептид с заменой Cys⁶ на другую аминокислоту, способствующую повышению его устойчивости к протеолизу. На основании конформационного анализа, проведенного профессором В.П. Голубовичем в Институте биоорганической химии НАН Беларуси, был синтезирован тетрапептид Ас-D-Met⁶-Pro⁷-Arg⁸-Gly⁹-NH₂. По данным Н.С. Пономаревой, данный тетрапептид обладает ярко выраженным ноотропным действием, он улучшает восприятие информации и способствует консолидации памятного следа [4]. Кроме того, он усиливает ориентировочно-исследовательское поведение и снижает эмоциональность животных [5]. Он также обладает анксиолитическим и антидепрессантным действием [6, 7].

Следующим аналогом АВП(6-9), синтезированным в институте биоорганической химии НАН Беларуси, был тетрапептид Ас-D-Ser⁶-Pro⁷-Arg⁸-Gly⁹-NH₂ (Ас-D-SPRG).

Целью нашей работы было исследование влияния острого введения тетрапептида Ас-D-SPRG на ориентировочно-исследовательское поведение и уровень тревожности белых крыс.

* Институт биоорганической химии НАН Беларуси, Республика Беларусь.

Материалы и методы исследования

Работа проводилась на половозрелых самцах нелинейных белых крыс массой 220–250 г, в каждой группе было использовано в среднем по 18 животных. Ас-D-SPRG вводили интраназально в дозах 0,01; 0,1; 1,0 и 10,0 мкг/кг в объеме 1 мкл/10 г массы тела за 5 мин до тестирования. Контрольным животным вводили эквивалентный объем растворителя (дистиллированная вода).

Интраназальный способ введения был выбран с целью более быстрой доставки пептида в головной мозг, минуя гематоэнцефалический барьер. Кроме того, этот способ введения наименее стрессогенный, что является важным для исследования поведенческих реакций животных.

Ориентировочно-исследовательское поведение животных исследовали в тестах “открытое поле” (“бесстрессорная” и “стрессогенная” модификации) и “норковая камера”. При тестировании в “открытом поле” животное помещали в центр арены и в течение 2 мин (каждые 30 с) визуальнo оценивали горизонтальную и вертикальную двигательную активность, количество отхождений от стенки арены и количество выходов в центр арены, уровень груминга. Опыты проводили в тишине при свете красной лампы в бесстрессорной модификации, а в стрессогенной модификации вместо красной лампы над ареной помещали лампу мощностью 200 Вт и использовали электрический звонок. В тесте “норковая камера” кроме горизонтальной и вертикальной двигательной активности и груминга регистрировали характерную для крыс исследовательскую активность, а именно количество обследованных отверстий в полу арены. Регистрацию проводили визуальнo в течение трех минут в тишине при свете красной лампы.

Уровень тревожности животных исследовали в тестах “приподнятый крестообразный лабиринт” и “светлая-темная камера”. В “приподнятом крестообразном лабиринте” в течение трех минут регистрировали общее время нахождения на свету, латентный период захода в закрытый рукав, количество выходов на открытые рукава, 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, общее количество переходов, количество свешиваний с открытых рукавов лабиринта, количество выглядываний из закрытых рукавов лабиринта, вертикальную двигательную активность и груминг.

В тесте “светлая-темная камера” в течение 3 мин визуальнo регистрировали суммарное время, проведенное в светлом отсеке, латентный период перехода в темный отсек, количество стоек в светлом и темном отсеках, количество выглядываний из темного отсека, количество переходов между светлым и темным отсеками, груминг в светлом отсеке.

При обработке данных использовали стандартные методы статистического анализа. При сравнении полученных массивов данных использовали критерий Стьюдента (параметрический критерий), а также точный критерий Фишера и χ^2 (непараметрические критерии). Обработка результатов производилась с помощью пакета статистических программ Statistica 5.0 и средств Microsoft Excel.

Результаты

В бесстрессорной модификации теста “открытое поле” введение тетрапептида Ас-D-SPRG в дозе 0,01 мкг/кг не оказывало влияния на поведение животных.

При введении данного препарата в дозе 0,1 мкг/кг было зарегистрировано увеличение продолжительности латентного периода выхода за пределы центрального сектора. Введение препарата в дозе 1,0 мкг/кг привело к увеличению суммарного количества стоек у животных опытной группы.

Вещество в дозе 10 мкг/кг не оказывало влияния на ориентировочно-исследовательское поведение животных. Однако следует отметить, что наблюдалось достоверное снижение груминга в опытной группе по сравнению с контрольными животными.

В стрессогенной модификации теста “открытое поле” введение Ас-D-SPRG в дозах 1,0 и 0,01 мкг/кг не вызывало изменений параметров ориентировочно-исследовательского поведения. Однако наблюдалось достоверное снижение груминга в опытных группах по сравнению с контрольными животными, что может свидетельствовать об усилении пассивно-оборонительной реакции на фоне повышенной тревожности животных в стрессогенных условиях. В дозе 0,1 мкг/кг препарат приводил к повышению суммарного количества стоек. Введение Ас-D-SPRG в дозе 10 мкг/кг привело к уменьшению длины пробега в опытной группе по сравнению с контрольной, что свидетельствует о снижении двигательной активности животных (рис. 1). При этом также наблюдалось достоверное уменьшение количества отхождений от стен-

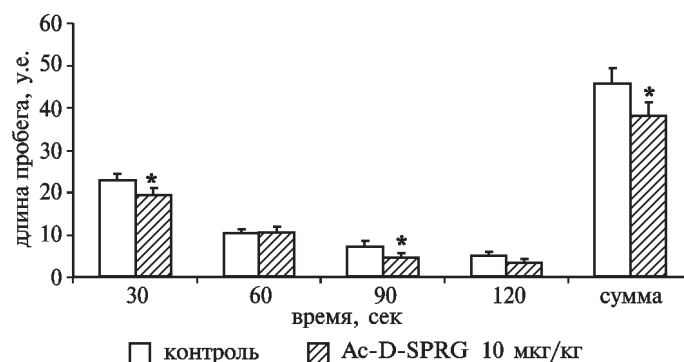


Рис. 1. Влияние Ас-D-SPRG в дозе 10 мкг/кг на двигательную активность животных в стрессогенной модификации теста “открытое поле”. Достоверное отличие от контроля отмечено звездочкой ($p < 0,05$)

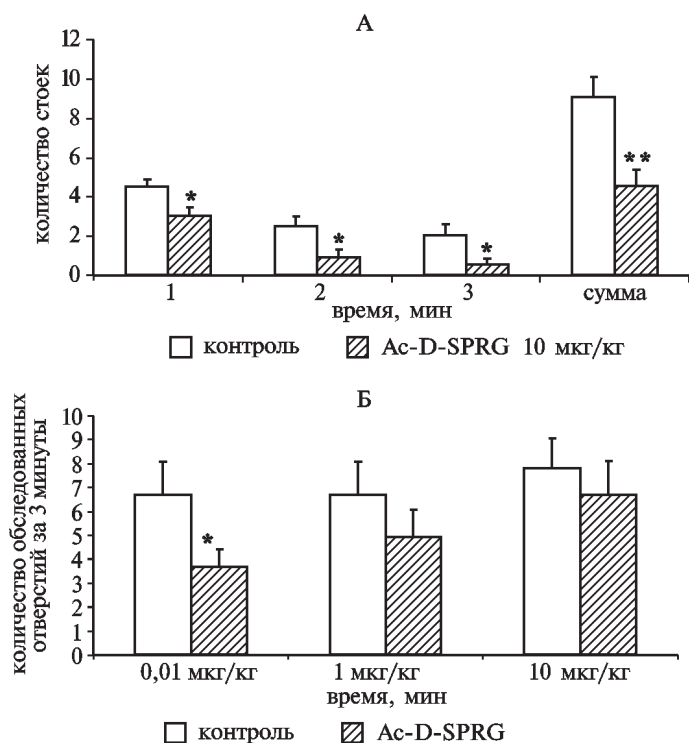


Рис. 2. Влияние Ac-D-SPRG на ориентировочно-исследовательское поведение животных в тесте «норковая камера»: А — количество стоек, Б — количество обследованных отверстий. Достоверное отличие от контроля отмечено: звездочкой при $p < 0,05$, двумя звездочками при $p < 0,01$

ки арены в опытной группе по сравнению с контрольной, что является показателем повышенной тревожности животных.

В тесте «норковая камера» было зарегистрировано выраженное угнетение ориентировочно-исследовательского поведения при введении Ac-D-SPRG в дозах 0,01; 0,1 и 10,0 мкг/кг (рис. 2). Наиболее выраженный эффект в отношении видоспецифической исследовательской активности животных — количества обследованных отверстий — наблюдался при использовании препарата в дозе 0,01 мкг/кг (рис. 2, Б). Введение Ac-D-SPRG в данном случае приводило к достоверному снижению количества обследованных отверстий как на первых двух минутах теста, так и суммарно. Препарат в дозе 0,1 мкг/кг вызывал снижение как горизонтальной двигательной активности на протяжении всего времени тестирования, так и суммарного количества исследованных отверстий. В дозе 1,0 мкг/кг Ac-D-SPRG не оказывал значимого влияния на поведение животных в данном тесте. При введении препарата в дозе 10,0 мкг/кг вертикальная активность животных снижалась на протяжении всего времени тестирования (рис. 2, А), наблюдалось снижение числа исследованных отверстий на третьей минуте эксперимента. Также зарегистрировано достоверное снижение груминга в опытной группе.

В тесте «приподнятый крестообразный лабиринт» при введении Ac-D-SPRG в дозе 0,01 мкг/кг наблю-

далось повышение уровня тревожности, выраженное в достоверном уменьшении количества переходов между светлыми отсеками лабиринта, количества выходов на первую и вторую половины светлого рукава (рис. 3). В дозе 0,1 мкг/кг Ac-D-SPRG не оказывал значимого влияния на уровень тревожности животных в данном тесте. При введении Ac-D-SPRG в дозе 1,0 мкг/кг наблюдалось достоверное уменьшение времени, проведенного животным на свету, числа свешиваний с открытых рукавов лабиринта, количества выходов на первую половину светлого рукава и количества переходов между светлыми отсеками лабиринта, что свидетельствует о повышенном уровне тревожности животных (рис. 3, А). Препарат в дозе 10,0 мкг/кг вызывал достоверное уменьшение суммарного количества стоек и количества выходов на первую половину светлого рукава лабиринта (рис. 3, Б). Наблюдавшееся достоверное снижение груминга в данном случае, по-видимому, свидетельствует об эмоциональной заторможенности животных при повышенном уровне тревожности. Таким образом, введение данного тетрапептида во всех использованных дозах приводило к повышению уровня тревожности животных, выраженному в снижении времени пребывания на свету, снижении вертикальной активности и количества выходов на открытые рукава лабиринта.

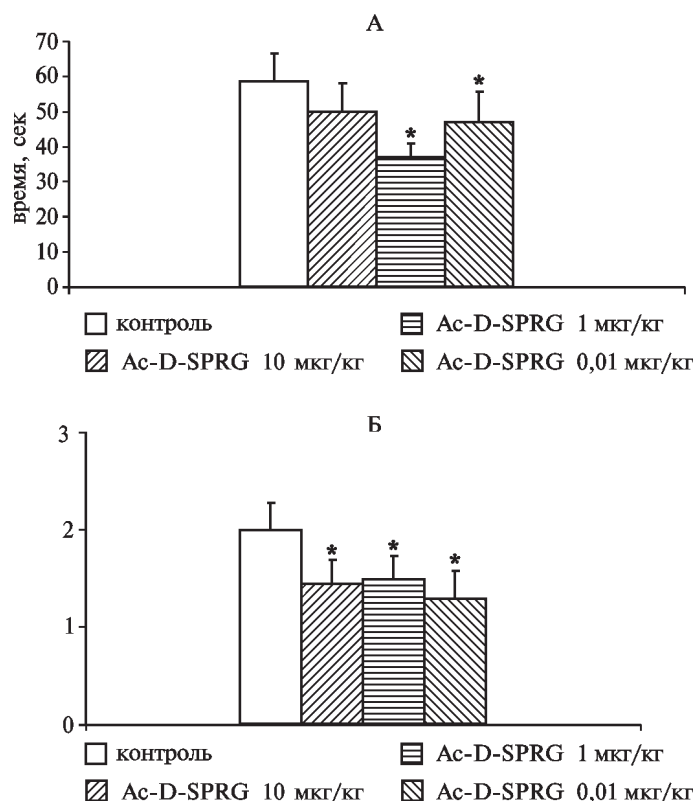


Рис. 3. Влияние Ac-D-SPRG на уровень тревожности крыс в тесте «приподнятый крестообразный лабиринт»: А — время, проведенное на свету, Б — количество выходов на открытые рукава лабиринта. Достоверное отличие от контроля отмечено звездочкой ($p < 0,05$)

Результаты, полученные при тестировании животных в “светлой-темной камере”, не позволяют однозначно судить о направленности действия Ас-D-SPRG в использованных дозах на уровень тревожности животных, а также на другие показатели, регистрируемые в данном тесте.

Так, суммарное количество стоек значительно изменялось только у животных, которым вводили Ас-D-SPRG в дозе 10,0 мкг/кг (снижалось), в то время как в остальных дозах влияния на данный параметр выявлено не было.

Однако для показателя вертикальной активности животных в светлом отсеке камеры такая картина не сохраняется. В этом случае значимые отличия наблюдаются для малых доз (0,01 и 0,1 мкг/кг); при этом у животных, получавших Ас-D-SPRG в дозе 0,01 мкг/кг, вертикальная активность в светлом отсеке камеры значительно возрастает, а у крыс, получавших препарат в дозе 0,1 мкг/кг, наоборот, снижается. Для больших доз значимых отличий зарегистрировано не было, однако эффект также не был однозначным для разных доз.

Время пребывания животных на свету значительно изменялось (снижалось) только в группе животных, получавших Ас-D-SPRG в дозе 0,1 мкг/кг. Для других доз достоверных изменений зарегистрировано не было.

Количество умываний значительно снижалось в группах животных, получивших Ас-D-SPRG в дозах 1,0 и 10,0 мкг/кг.

Обсуждение результатов

Результаты проведенных экспериментов показали, что интраназальное введение Ас-D-SPRG в дозах 10,0; 1,0; 0,1 и 0,01 мкг/кг вызывало угнетение ориентировочно-исследовательского поведения, которое было наиболее выражено в тесте “норковая камера”: введение Ас-D-SPRG приводило к достоверному уменьшению суммарного количества стоек и количества обследованных отверстий. По литературным данным [8], сам гормон аргинин-вазопресин при внутрибрюшинном введении за 1 ч до тестирования в “норковой камере” в дозе 0,001 мг/кг повышал количество обследованных отверстий. Наше исследование продемонстрировало, что Ас-D-SPRG в дозах 10; 1,0; 0,1 и 0,01 мкг/кг оказывает обратное действие.

Введение Ас-D-SPRG не оказывало значительного влияния на ориентировочно-исследовательское

поведение в бесстрессорной модификации теста, однако приводило к снижению горизонтальной двигательной активности животных в стрессогенной модификации теста. Это изменение, по-видимому, связано с повышенным уровнем тревожности животных, получавших пептид, что проявляется в реакции затаивания крыс в стрессогенных условиях. О повышенном уровне тревожности животных свидетельствует также снижение времени пребывания на свету, снижение вертикальной активности и количества выходов на открытые рукава “приподнятого крестообразного лабиринта”, наблюдаемые при введении пептида во всех использованных дозах.

Противоречивые литературные данные не дают возможности однозначно говорить о механизмах, лежащих в основе регуляции уровня тревожности со стороны АВП, но, безусловно, подтверждают участие данного гормона в этом процессе.

Проекции от АВП-синтезирующих клеток направляются в передний мозг, в частности в латеральную область септума. Здесь содержится густая сеть ВП-содержащих волокон [9]. Повреждения этой зоны мозга снижают уровень тревожности животных. АВП, выделяющийся в септуме, участвует в формировании эмоционального статуса (регуляции уровня тревожности и страха [10]). Имеющиеся литературные данные отрицают участие V1b-рецепторов в регуляции тревожности [11]. Однако рядом авторов [12, 13] было показано, что использование антагониста V1a-рецепторов имеет анксиолитическое действие, что было продемонстрировано в тесте “приподнятый крестообразный лабиринт”.

Полученные нами результаты свидетельствуют о том, что замена аминокислотного остатка Cys⁶ в молекуле АВП(6-9) на D-Ser привела к снижению ориентировочно-исследовательского поведения и повышению уровня тревожности животных. Следовательно, мы можем предположить, что Ас-D-SPRG является агонистом V1a рецепторов АВП.

Таким образом, исходя из полученных в наших экспериментах результатов, можно сделать заключение, что замена аминокислотного остатка в 4-м положении молекулы АВП(6-9) может способствовать созданию новых пептидных соединений с определенным заданным физиологическим действием.

* * *

Работа выполнена при поддержке ФЦП “Научные и научно-педагогические кадры инновационной России” на 2009—2013 гг. (№ П1057).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Herbert E.* Discovery of pro-opiomelanocortin-cellular polypeptide // *Trends in Biochemical Sciences.* 1981. Vol. 6. P. 184—188.
2. *de Wied D.* The influence of the posterior and intermediate lobe of the pituitary and pituitary peptides on the

maintenance of a conditioned avoidance response in rats // *International Journal of Neuropharmacology.* 1965. Vol. 4. N 3. P. 157—167.

3. *Burbach J.P., Kovacs G.L., de Wied D., van Nispen J.W., Greven H.M.* A major metabolite of arginine vaso-

pressin in the brain is a highly potent neuropeptide // *Science*. 1983. Vol. 221. P. 1310–1312.

4. Пономарева Н.С., Воскресенская О.Г., Каменский А.А. Влияние оригинального аналога С-концевого фрагмента вазопрессина на поведение белых крыс // *Журн. ВНД*. 1998. Т. 48. № 3. С. 471–477.

5. Пономарева Н.С., Воскресенская О.Г., Каменский А.А. Улучшение селективного восприятия и обучения крыс оригинальным аналогом С-концевого фрагмента вазопрессина // *Физиол. журн*. 1998. Т. 84. № 12. С. 1363–1369.

6. Воскресенская О.Г., Каменский А.А., Голубович В.П. Нейротропная активность синтетического аналога С-концевого фрагмента аргинин-вазопрессина // *News of Biomedical Sciences НАН Беларуси*. 2004. № 1. С. 72–78.

7. Voskresenskaya O.G., Golubovich V.P., Kamensky A.A. Prenatal administration of analog of AVP(6-9) — Ac-D-MPRG influences on the postpound behavior in white rats // *Abstracts of the 21st Congress of the European College of Neuropsychopharmacology*, August 20–September 3, 2008. Barcelona, 2008.

8. Никонова А.Б., Макарова Н.В., Титов С.А. Избирательное стимулирование вазопрессином исследователь-

ского поведения у крыс // *Журн. ВНД*. 1987. Т. 37. № 3. С. 570–572.

9. de Vries G.J., Miller M.A. Anatomy and function of extrahypothalamic vasopressin system in the brain // *Prod. Brain Res.* 1998. Vol. 119. P. 3–20.

10. de Vries G.J., Buijs R.M. The origin of the vasopressinergic and oxytocinergic innervation of the rat brain with special reference to the lateral septum // *Brain. Res.* 1983. Vol. 273. N 2. P. 307–317.

11. Stemmelin J., Lukovic L., Salome N., Griebel G. Evidence that the lateral septum is involved in the antidepressant-like effects of the vasopressin V1b receptor antagonist, SSR149415 // *Neuropsychopharmacology*. 2005. Vol. 30. N 1. P. 35–42.

12. Landgraf R. Intracerebrally released vasopressin and oxytocin (measurement, mechanism and behavioural consequences) // *J. Neuroendocrinol.* 1995. P. 243–253.

13. Everts H.G.J., Koolhaas J.M. Differential modulation of lateral septal vasopressin receptor blockade in spatial learning, social recognition, and anxiety-related behavior in rats // *Behav. Brain Res.* 1999. Vol. 99. P. 7–16.

Поступила в редакцию
13.12.10

INFLUENCE OF ORIGINAL STRUCTURAL ANALOGUE AVP(6-9), Ac-D-SPRG, ON EXPLORATORY ACTIVITY AND LEVEL OF ANXIETY OF WHITE RATS

A.S. Belyakova, O.G. Voskresenskaya, A.A. Kamensky, V.P. Golubovich

The influence of synthetic structural analogue of arginine-vasopressin (AVP) Ac-D-SPRG on orientation and exploratory activity and level of anxiety of white rats was studied. The c-D-SPRG was injected nasally in doses of 0,01; 0,1; 1,0 and 10,0 µg/kg in volume of 1 µl per 10 g of body weight 5 min before the testing. The analogue caused depression of orientation and exploratory activity (OEA) and increase of anxiety level in animals. The contradictory literature data give no opportunity to conclude unambiguously on mechanisms underlying bases of regulation of anxiety level and OEA from AVP but nevertheless confirm the participation of this hormone in given process.

Key words: *neurophysiology, arginine-vasopressin, anxiety, pharmacology, regulatory peptides.*

Сведения об авторах

Белякова Александра Сергеевна — инженер-лаборант, соискатель кафедры физиологии человека и животных биологического факультета МГУ. Тел.: 8-495-939-28-95; e-mail: alixletter@yandex.ru

Воскресенская Ольга Георгиевна — канд. биол. наук, ст. науч. сотр. кафедры физиологии человека и животных биологического факультета МГУ. Тел.: 8-495-939-28-95; e-mail: voskresenskaya05@mail.ru

Каменский Андрей Александрович — докт. биол. наук, проф., зав. кафедрой физиологии человека и животных биологического факультета МГУ. Тел.: 8-495-939-33-55; e-mail: kamensky_msu@mail.ru

Голубович Владимир Петрович — докт. биол. наук, проф., зав. лабораторией прикладной биохимии ГНУ института биоорганической химии НАН Беларуси. E-mail: golubovich@iboch.bas-net.by