

І. О. Гаврилов¹, С. Ю. Штриголь¹, Т. В. Горбач²

Анксиолітичні властивості аналога кінцевого фрагмента нейропептиду Y та його вплив на вміст нейроактивних амінокислот у головному мозку

¹Національний фармацевтичний університет, м. Харків²Харківський національний медичний університет

Ключові слова: аналоги нейропептиду Y, анксиолітична активність, нейроактивні амінокислоти, головних мозок

Нейропептид Y (NPY) є одним з найпоширеніших пептидів у центральній нервовій системі (ЦНС), що відіграє ключову роль у багатьох фізіологічних процесах, таких як споживання їжі, енергетичний обмін, циркадіанні ритми, навчання, реакції на стрес тощо [1]. У людини NPY виявляє біологічну активність через активацію чотирьох підтипів NPY-рецепторів: Y₁, Y₂, Y₄, Y₅ [2]. У значній кількості рецептори NPY були знайдені в лімбічних структурах переднього мозку – мигдалині, гіпоталамусі та гіпокампі, які беруть участь у контролі емоційних реакцій та відповіді на стрес, процесах навчання та запам'ятовування, що й зумовлює регуляцію пептидом відповідних процесів [3].

NPY вже давно привернув до себе увагу в аспекті фармацевтичних розробок. Синтезовано велику кількість сполук, здатних впливати на систему NPY. Деякі з них виявляють перспективні фармакологічні властивості. Розмір молекул цих сполук менше ніж у нативного NPY, що доцільно з урахуванням вартості та складності пептидного синтезу. С-кінцева ділянка NPY має принципове значення для зв'язування з рецепторами, тому

попередні модифікації NPY проводили зі збереженням цього фрагмента [4]. З урахуванням досвіду попередніх розробок [4–6] ми запропонували структуру пептиду, що, на відміну від нативного NPY, складається з 9 амінокислотних залишків проти 36. Амінокислотну послідовність замінено таким чином, щоб не порушити третинну структуру, а отже й афінитет до рецепторів NPY. Цей нонапептид *H-L-Ile-L-Asn-L-Leu-L-Nle-L-Ser-L-Arg-L-Asn-L-Arg-L-Tyr-NH₂* отримав робочу назву NP9.

Коротша амінокислотна послідовність робить нонапептид NP9 простішим для хімічного синтезу, контролю за якістю, дешевшим, а тому більш доцільним для різнобічного дослідження й подальшого впровадження. Інтраназальний (і/н) шлях введення NP9 дозволяє запобігти швидкому руйнуванню пептиду протеазами шлунка, сироватки крові тощо. Також це дозволяє пептиду безпосередньо проникати в ЦНС, минаючи гематоенцефалічний бар'єр, що зумовлює високу церебральну біодоступність [7].

У попередніх дослідженнях встановлено виразні анксиолітичні [8], ноотропні [9], актопротекторні та слабкі антидепресантні властивості [10] нонапептиду NP9, продемонстровано відсутність небезпечних фармакодинамічних взаємодій зі сполука-

ми, що збуджують або пригнічують ЦНС [11]. Проте нейрохімічні, зокрема, аміноацидєргічні аспекти дії NP9 залишаються невідомими. Дослідити останні важливо з огляду на участь нейроактивних амінокислот у формуванні психотропних ефектів.

Джерела літератури свідчать, що в усіх ссавців, окрім людини та щурів, існує Y_6 рецептор, роль якого (у тому числі в анкіогенезі) ще потребує вивчення [12]. Ця інформація зумовила проведення досліджень на щурах у наших попередніх експериментах [8] для вивчення анкіолітичних властивостей NP9. Але для встановлення відтворюваності анкіолітичного ефекту нонапептиду на різних біологічних видах важливо провести дослідження тривожності на різних видах тварин, у тому числі на мишах.

Мета дослідження – поглиблено вивчити анкіолітичні властивості нонапептиду NP9 на мишах і щурах, з'ясувати його вплив на вміст нейроактивних амінокислот у головному мозку (ГМ).

Матеріали та методи. Нонапептид NP9 синтезовано за нашим замовленням компанією Shanghai Apeptide Co., Ltd. (Китай). Субстанцію NP9 розчиняли в 0,9 % розчині NaCl безпосередньо перед експериментом. Концентрація NP9 в отриманому розчині забезпечувала його введення мишам у дозі 0,2 мг/кг, яка зумовлює анкіолітичний і ноотропний ефекти [8, 9]. Для щурів використовували дози 0,05 та 0,1 мг/кг, які виявили анкіолітичні властивості в попередніх дослідженнях на цьому виді тварин [8]. Розчин NP9 вводили і/н в об'ємі 0,01 мл для мишей та 0,02 мл для щурів за допомогою інсулінового шприца зі затупленою голкою.

Як препарат порівняння в тестах «Відкрите поле» (ВП), «Піднесений

хрестоподібний лабіринт» (ПХЛ) і біохімічних дослідженнях використовували Семакс (Пептоген, РФ) у дозі 0,1 мг/кг і/н у тому самому об'ємі 0,01 мл. Цей пептид (*Met-Glu-His-Phe-Pro-Gly-Pro*) є аналогом кортикотропіну. Його обрано з урахуванням пептидної будови, психотропних (ноотропних, анкіолітичних) властивостей та і/н шляху введення [13]. Препаратом порівняння в тесті конфліктної ситуації за Н. G. Vogel був бензодіазепіновий анкіолітик гїдазепам (Гїдазепам ІС, Інтерхім, Україна) у дозі 5 мг/кг [14]. Готували водну суспензію препарату, що стабілізована твіном 80, і вводили з розрахунку 0,1 мл/100 г маси тварини внутрішньошлунково (в/ш).

Дослідження виконано на 45 білих нелїнійних мишах (24 самки, 21 самець) масою 22–26 г і на 24 нелїнійних щурах-самцях масою 340–370 г. Тварин отримано з вїварїю Навчально-наукового інституту прикладної фармації Національного фармацевтичного університету (м. Харків). Їх утримували в стандартних умовах у поліпропіленових клітках за температури 20–24 °С з 12-год режимом освітлення (день/ніч) і вільним доступом до їжі та води. Експерименти проводили згідно з Європейською конвенцією «Про захист хребетних тварин, які використовуються для експериментальних й інших наукових цілей» (м. Страсбург, 1986 р.) та «Загальних етичних принципів експериментів на тваринах» (м. Київ, 2001 р.).

Поведїнкові реакції мишей вивчали в два послїдовні дні в тестах ВП і ПХЛ. Використовували дозу пептиду NP9 0,2 мг/кг, яку отримали шляхом міжвидового перерахунку [15], виходячи з найефективнїшої анкіолітичної дози для щурів (0,1 мг/кг) [8]. Дослідження виконано на 24 мишах-самках, з яких випадковим чином

сформовано такі групи по 8 особин: 1) інтактний контроль (отримували розчинник – 0,9 % розчин NaCl); 2) група NP9 (0,2 мг/кг); 3) група Семаксу (0,1 мг/кг). Усі препарати вводили і/н за 30 хв до експериментів. Тест ВП проводили в стандартному приладі за загальноприйнятими умовами [16]. Протягом 3 хв реєстрували локомоторну (кількість пересічених квадратів), орієнтовно-дослідницьку активність (кількість вертикальних стійок і кількість обстежень отворів), емоційні реакції та їхній вегетативний супровід (кількість активів грумінгу, дефекацій та уринацій). ПХЛ є загальноприйнятою моделлю для визначення тривожності тварин. Тест виконували в стандартному приладі за загальноприйнятими умовами [16]. Реєстрували латентний період входу в темний рукав, час перебування в освітлених, затемнених рукавах і на центральному майданчику, сумарну тривалість перебування в освітлених компартментах (центральный майданчик + освітлені рукава), кількість переходів в освітлені, затемнені рукава та їхнє сумарне значення. Також розраховували відношення кількості переходів в освітлені рукава до загальної кількості переходів у відсотках [17]. Зазвичай гризуни через природні мотиви надають перевагу переходам у темні відсіки, тому збільшення кількості переходів до освітлених рукавів вважають маркером зниження тривожності та збільшення дослідницької активності. Але для коректного зіставлення результатів між групами тварин з різним рівнем локомоторної активності доцільно аналізувати відносні значення. Отже, у разі зниження тривожності тварин цей показник має збільшуватися щодо контрольної групи [17].

Специфічну анксиолітичну активність пептиду NP9 визначали на моде-

лі конфліктної ситуації за Н. G. Vogel [16, 18]. Експеримент проведено на 24 щурах, рандомізованих на 4 рівні групи. У групі 1 (контрольній) тварини за 60 хв до контрольного випробування отримували в/ш воду очищену з розрахунку 0,1 мл/100 г маси тварини, а через 15 хв – 0,9 % розчин NaCl і/н. У групах 2 і 3 щурам за 60 хв до контрольного дослідження вводили в/ш відповідний об'єм води очищеної, а через 15 хв – і/н розчин нонапептиду NP9 у дозах 0,05 мг/кг і 0,1 мг/кг відповідно. У групі 4 тваринам за 60 хв до контрольного випробування вводили в/ш гідазепам 5 мг/кг у відповідному об'ємі, а через 15 хв – і/н 0,9 % розчин NaCl. Через 48 год питної депривації для формування умовного рефлексу щурів вміщували в експериментальну камеру, де тварина знаходила поїлку. Після навчання щурів обмежували у воді ще на 24 год, аж до проведення експерименту. У контрольному експерименті після введення препаратів тварину розташовували, як і при навчанні, але тепер через 10 с після початку пиття та з кожною наступною спробою вона отримувала короткий удар електричним струмом (напруга 25 V). Таким чином, зіштовхувались питна та оборонна мотивації. Реєстрували час першого підходу до поїлки після першого покарання та кількість спроб взяття води за 5 хв. Кількість караних спроб взяття води та час першого караного підходу до поїлки є обернено залежними індикаторами тривожності.

У ГМ мишей визначали вміст гальмівних (гамма-аміномасляна кислота (ГАМК), гліцин) і збуджувальних (глутамат, аспартат) амінокислот, оскільки добре відома їхня роль у патогенезі тривожних станів і когнітивних розладів [19]. У цих досліджах миші-самці були рандомізовані на 3 групи по 7 особин: 1) інтактний

контроль (отримували розчинник – 0,9 % розчин NaCl); 2) група NP9 (0,2 мг/кг); 3) група Семаксу (0,1 мг/кг). Усі препарати вводили і/н щоденно протягом 3 днів. Через 30 хв після останнього введення тварин декапітували, ГМ швидко вилучали, заморожували рідким азотом і зберігали до аналізу за температури -70°C . Методом високовольтного електрофорезу визначали вміст ГАМК, аспарагінової та глутамінової кислот [20]. Розділення проводили в піридин-оцтовокислому буфері за напруги 600 V 3 год. Наважку замороженого ГМ розтирали в порошок. Екстракцію проводили в 96 % спирті етиловому на киплячій водяній бані (співвідношення спирт – тканина 10:1) протягом 19 хв. Методом тонкошарової хроматографії (ТШХ) на пластинах Silufol визначали вміст гліцину [21] з використанням розчинників н-бутанол – крижана оцтова кислота – вода у співвідношенні 90:10:25. Як стандарт викорис-

товували субстанцію гліцину ($\geq 99\%$, HPLC; Sigma, США).

Результати обробляли з використанням STATISTICA 12.0. Усі отримані результати обробляли з використанням дескриптивної статистики та представляли у вигляді $M \pm SEM$, $Me (Q_1; Q_3)$ з розрахунком значущості відмінностей за критерієм Стьюдента (t) за нормального розподілу та непараметричними критеріями Манна-Вітні та Краскела-Волліса за його відсутності. Статистичні відмінності виявляли за допомогою тесту Манна-Вітні. Значущість вважали достовірною в разі $p < 0,05$.

Результати та їх обговорення. Результати тесту ВП на мишах (табл. 1) подібні даним, які раніше були отримані на щурах [8]. Під впливом NP9 тенденційно збільшувалась відносно контролю кількість перетнутих квадратів, стійок та обстежених отворів, що зумовило збільшення на 22 % загальної рухової та дослідницької

Таблиця 1

Поведінкові реакції мишей у тесті «Відкрите поле» за впливу нонапептиду NP9 і Семаксу, $M \pm SEM$, $Me (Q_1; Q_3)$

Показник за 3 хв	Інтактний контроль (n = 8)	NP9 0,2 мг/кг (n = 8)	Семакс 0,1 мг/кг (n = 8)
Перетнуто квадратів	27,3 ± 2,3 25 [23; 28]	33,1 ± 3,4 33 [28,5; 39,5]	30,6 ± 3,2 29 [23,5; 36,5]
Стійки	7,2 ± 1,6 6 [4; 12]	8,8 ± 2,0 8 [4,5; 14,5]	5,2 ± 2,2 3 [0,5; 9,5]
Отвори	13,5 ± 2,2 13 [11; 16]	16,8 ± 3,5 14 [10; 23,5]	14,1 ± 1,7 14 [11; 15,5]
Сума активностей	48,1 ± 3,0 49 [42; 54]	58,8 ± 6,0 60 [47; 64]	50,0 ± 6,1 51 [35; 56,5]
Грумінг	1,2 ± 0,3 1 [1; 2]	0,2 ± 0,2* 0 [0; 0,5]	0,5 ± 0,3 0 [0; 1]
Дефекації	0,2 ± 0,2 0 [0; 0]	0,3 ± 0,3 0 [0; 0,5]	0,5 ± 0,3 0 [0; 1]
Уринації	0 ± 0 0 [0; 0]	0 ± 0 0 [0; 0]	0,25 ± 0,20 0 [0; 0,5]
Сума емоційних реакцій	1,4 ± 0,3 1 [1; 2]	0,6 ± 0,3* 0,5 [0; 1]	1,25 ± 0,40 1 [0,5; 2]

Примітка. Статистично значущі відмінності порівняно з групою контролю: * $p < 0,05$.

активності тварин. Проте показники емоційних реакцій на тлі NP9 зменшувались: кількість актів грумінгу знижувалась у 6 разів ($p < 0,05$), їхній вегетативний супровід (кількість дефекацій та уринацій) залишався на рівні контролю (близько 0), а сума емоційних реакцій знижувалась у 2,3 разу ($p < 0,05$). Семакс не вплинув ні на локомоцію, ні на орієнтовно-дослідницьку активність, ані на емоційні реакції.

Ці результати вказують на анкіоселективні властивості NP9, оскільки він зменшує саме емоційну складову поведінки у ВП без впливу на рухову та дослідницьку активність. Препарат порівняння «Семакс» не спричинив жодних значущих змін поведінки мишей у тесті ВП.

Результати тесту ПХЛІ наведено в таблиці 2.

Пептид NP9 незначно збільшував латентний період входу в темний рукав на відміну від Семаксу, на тлі якого цей показник зростав у 4,3 разу, але за рахунок великої дисперсії зміни не сягали достовірності. Тривожність мишей, що отримували NP9, зменшувалась. Про це свідчить комплекс показників (табл. 2): збільшення тривалості перебування в освітлених рукавах у 2,9 разу ($p < 0,05$) та сумарно в освітлених компартментах у 2,2 разу ($p < 0,01$) проти контролю; зниження на 22,6 % часу перебування в темних відсіках ($p < 0,01$); кількість переходів в освітлені рукава збільшувалась в 3,8 і 2,7 разу відповідно проти показників

Таблиця 2

Поведінкові реакції мишей у тесті «Піднесений хрестоподібний лабіринт» за впливу нонапептиду NP9 і Семаксу, $M \pm SEM$, $Me (Q_1; Q_3)$

Показник за 5 хв	Інтактний контроль (n = 8)	NP9 0,2 мг/кг (n = 8)	Семакс 0,1 мг/кг (n = 8)
Латентний період входу в темний рукав, с	24,4 ± 4,0 20,5 [17; 33]	35,4 ± 11,5 25 [10; 57]	104,1 ± 43,7 49,5 [20; 190]
Час перебування в освітлених рукавах, с	25,6 ± 4,8 26,5 [14,5; 37]	73,1 ± 14,6* 74 [39; 100]	125,6 ± 42,2 101,5 [20,5; 223]
Час перебування в затемнених рукавах, с	253,5 ± 6,5 249 [241; 267]	196,1 ± 17,2** 190 [153; 237]	149,1 ± 38,2* 169 [56,5; 236]
Час перебування на центральному майданчику, с	20,9 ± 6,7 18 [8; 24,5]	30,8 ± 4,8 29 [20,5; 39]	32,8 ± 12,3 24,5 [4,5; 51,5]
Сумарний час перебування в освітлених компартментах, с	46,5 ± 6,5 51 [33; 59]	103,9 ± 17,2** 109,5 [63; 147]	158,4 ± 40,0* 131 [64; 274]
Кількість переходів в освітлені рукава	1,6 ± 0,6 1,5 [0; 2,5]	6,1 ± 1,5*.# 6 [2,5; 9]	2,3 ± 0,9 1,5 [0; 4]
Кількість переходів у затемнені рукава	5,0 ± 1,3 3,5 [2; 7,5]	6,0 ± 0,8** 6 [4; 7]	2,3 ± 0,8 2 [0,5; 3,5]
Сумарна кількість переходів між рукавами	6,6 ± 1,9 4 [3; 10]	12,1 ± 2,2*.# 11 [7,5; 16]	4,5 ± 1,5 5 [0,5; 6]
Переходи в освітлені рукава/сумарна кількість переходів, %	19,2 ± 6,3 24 [0; 28]	44,8 ± 6,1* 52 [28; 58]	31,4 ± 10,9 30 [0; 55]

*Примітка. Статистично значущі відмінності порівняно з групою контролю: * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$; з групою Семаксу: # $p < 0,05$, ## $p < 0,01$.*

груп контролю ($p < 0,05$) та Семаксу ($p < 0,05$); відношення переходів в освітлені рукава до сумарної кількості збільшувалося в 2,3 рази ($p < 0,05$); збільшення сумарної кількості переходів щодо контролю в 1,8 рази ($p < 0,05$) і щодо Семаксу в 2,7 рази ($p < 0,05$).

У групі Семаксу абсолютні значення низки показників тесту ПХЛ, які вказують на зниження тривожності, були вищі, ніж на тлі NP9, але неоднорідна реакція тварин на Семакс не дозволила перевершити нонапептид на рівні статистичної значущості. Час перебування в освітлених рукавах збільшувався щодо контролю в 4,9 рази, але, на відміну від NP9, не досягав рівня статистичної значущості; тривалість перебування в темних відсіках зменшувалась на 41 % ($p < 0,05$ щодо контролю), сумарний час перебування в освітлених компартментах збільшувався в 3,4 рази ($p < 0,05$). Але кількість відвідувань освітлених рукавів лабіринту Семакс практично не змінював. На протитривожні властивості вказує тенденційне збільшення відношення кількості переходів в освітлені рукава до сумарної кількості переходів у 1,6 рази.

Підсумовуючи результати експериментів на мишах, слід відмітити, що як і в досліджах на щурах [8] нонапептид NP9 достовірно знижував показники емоційних реакцій без загальної седації в тесті ВП, що підтверджується виразними протитривожними властивостями зі збільшенням рухової активності тварин у тесті ПХЛ. Рухова активність на тлі NP9 підвищується зі зростанням кількості переходів в освітлені рукава, що віддзеркалюється збільшенням на 13,4 % відношення кількості переходів в освітлені рукава до сумарної кількості переходів порівняно з таким у групі препарату порівняння. Семакс

не впливав на емоційні реакції в тесті ВП, у тесті ПХЛ його неоднорідна протитривожна активність за ступенем статистичної значущості поступалась активності NP9. Анксіолітичні властивості Семаксу виявились нестабільними, що відповідає даним [22] про залежність його впливу на тривожність від генетичних чинників, фенотипу емоційно-стресової реакції, шляху введення тощо.

Анксіолітичні властивості NP9 визначали також у тесті конфліктної ситуації за Н. G. Vogel, в якому стикаються питна та оборонна мотивація. Щоб втамувати спрагу, щури повинні долати страх покарання за взяття води з кожним наступним електробольовим подразненням. Як видно з таблиці 3, у дозі 0,05 мг/кг пептид NP9 тенденційно зменшив час першого підходу до поїлки в 5,6 рази, а в дозі 0,1 мг/кг – достовірно в 11,25 рази ($p < 0,01$).

Класичний анксіолітик гідазепам зменшив цей час у 3,5 рази ($p < 0,05$). Кількість караних спроб взяття води на тлі пептиду NP9 у дозі 0,05 мг/кг збільшилась проти контролю в 2,2 рази ($p < 0,01$), а в дозі 0,1 мг/кг – у 1,8 рази ($p < 0,05$), аналогічний ефект спричинив гідазепам.

Отже, пептид NP9 значно знижував тривожність тварин в умовах жорсткої конфліктної ситуації. За виразністю ефекту він не поступався відомому бензодіазепіновому анксіолітику гідазепаму. Це вказує на його потужні анксіолітичні властивості в діапазоні доз 0,05–0,1 мг/кг, але найвиразніший ефект виявлявся в дозі 0,1 мг/кг.

Результати досліджень впливу нонапептиду NP9 і Семаксу на вміст гальмівних і збуджувальних амінокислот у ГМ мишей наведено в таблиці 4.

Після триденного введення нонапептиду NP9 вміст ГАМК і гліцину в

Поведінкові реакції щурів у тесті конфліктної ситуації (за Н. G. Vogel) за впливу нонапептиду NP9 і гідазепаму, $M \pm SEM$, $Me (Q_1; Q_3)$

Група (кількість тварин)	Латентний час взяття води до покарання, с	Кількість спроб взяття води з покаранням
Інтактний контроль (n = 6)	22,0 ± 4,2 22,5 [13; 25]	4,5 ± 0,8 4,5 [3; 5]
NP9 0,05 мг/кг (n = 6)	9,8 ± 6,1 4,0 [3; 6]	10,7 ± 1,8** 10 [7; 13]
NP9 0,1 мг/кг (n = 6)	2,2 ± 0,5** 2,0 [1; 3]	8,2 ± 1,0* 9,0 [7; 9]
Гідазепам 5 мг/кг (n = 6)	6,3 ± 3,9* 2,5 [2; 4]	8,0 ± 1,3* 7,0 [6; 9]

Примітка. Статистично значущі відмінності порівняно з групою контролю: * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$.

Вміст нейроактивних амінокислот у гомогенаті головного мозку мишей за впливу нонапептиду NP9 і Семаксу, $M \pm SEM$

Група (кількість тварин)	ГАМК, мкмоль/г	Гліцин, мкмоль/г	Глутамат, мкмоль/г	Аспартат, мкмоль/г
Інтактний контроль (n = 7)	6,88 ± 0,11	2,08 ± 0,09	8,70 ± 0,10	4,94 ± 0,09
NP9 0,2 мг/кг (n = 7)	2,37 ± 0,12**, #	1,0 ± 0,05**, #	36,35 ± 0,47**, #	6,87 ± 0,21**, #
Семакс 0,1 мг/кг (n = 7)	3,59 ± 0,13*	1,87 ± 0,08	28,27 ± 0,32*	5,94 ± 0,09*

Примітка. Статистично значущі відмінності порівняно з групою контролю: * $p < 0,01$, ** $p < 0,001$; з групою Семаксу: # $p < 0,01$.

ГМ зменшився відповідно на 66 % ($p < 0,001$) і 48 % ($p < 0,001$), а вміст глутамату та аспартату, навпаки, збільшувався відповідно в 4,2 ($p < 0,001$) і 1,4 рази ($p < 0,001$). Подібні за напрямом зсуви вмісту всіх амінокислот, але менш виразні щодо таких у групі NP9 ($p < 0,05$) спостерігались на тлі Семаксу: вміст ГАМК і гліцину зменшувався на 48 % ($p < 0,001$) і 10 % відповідно, а глутамату та аспартату збільшувався відповідно в 3,3 рази ($p < 0,01$) і на 20 % ($p < 0,01$).

Привертає увагу суттєве збільшення рівня глутамату та аспартату на тлі застосування NP9. Добре відома важлива роль глутамату як збуджувального медіатора, що бере участь у регулюванні настрою, когнітивних функцій і нейропластичності [23]. Підвищення рівня збуджувальних

амінокислот (глутамату й аспартату) може пояснювати виявлені в попередніх досліджах ноотропні властивості NP9, але, на перший погляд, може суперечити виразним анксиолітичним властивостям пептиду. Однак відомо, що підвищення рівня глутамату в певних ділянках мозку, наприклад, у полі Бродмана 25, навпаки, зменшує тривожність і стабілізує емоційний стан [24]. Вище вже описувалось, що напрям нейрохімічних змін на тлі препаратів подібний, проте за змінами рівня гліцину Семакс не досягав значущості відмінностей з контролем. Це важливо в контексті того, що гліцин виявляє не лише гальмівні, а й збуджувальні властивості, оскільки є ко-агоністом NMDA-рецепторів, за рахунок чого активує та посилює глутаматергічну нейротрансмісію [25].

Високий вміст гліцину в пресинаптичному просторі (наприклад, при пароксизмах) активує гальмівні Gly рецептори, його звичайний нормальний рівень сприяє глутаматергічній передачі, у той самий час зниження рівня гліцину послаблює глутаматне збудження через NMDA-рецептори [26]. Це може пояснювати анксиолітичні властивості пептиду без пригнічення, а зі збільшенням локомоції, на тлі підвищеного рівня глутамату, збуджувальна та анксиогенна активність якого не може повністю виявитися через нестачу гліцину, необхідного для активації NMDA-рецепторів. До того ж відомо, що NMDA-зв'язані Gly-B рецептори знижують анксиолітичну активність препаратів у ПХЛ [27], а антагоністи NMDA/Gly сайту виявляють анксиолітичні властивості як щодо умовної, так і щодо безумовної конфліктної поведінки [28].

На окрему увагу заслугове зниження рівня ГАМК на тлі застосування NP9 і Семаксу. Загальновідомо, що ГАМК є головним гальмівним нейро-медіатором у ЦНС, а вплив на ГАМК-рецептори є механізмом дії переважної більшості анксиолітичних препаратів [29]. Але навіть класичні бензодіазепінові транквілізатори можуть виявляти неочікуваний вплив на рівень гальмівних медіаторів у ГМ. Так, після тривалого застосування тріазоламу в усіх відділах ГМ тварин суттєвого знижувався рівень ГАМК [30] і гліцину [31]. За нетривалого введення терапевтичних доз тріазоламу вміст як гліцину, так і ГАМК збільшувався [30, 31]. Подібні результати були отримані з фенобарбіталом, що в низьких дозах не впливав, а у вищих – значно знижував рівень ГАМК у ГМ тварин [32]. Отже, діапазон доз та режими застосування можуть відігравати суттєву роль у впливі на рівень деяких нейрохімічних маркерів у ГМ.

У попередніх дослідженнях [11] ми з'ясували взаємодію NP9 зі збуджувальними агентами – пентилентетразолом і тіосемікарбазидом. Дія пентилентетразолу зумовлена антагонізмом з ГАМК, тіосемікарбазиду – з інгібуванням глутаматдекарбоксілази, що пригнічує утворення ГАМК з накопиченням глутамату та викликає судоми. Взаємодії NP9 зі зазначеними збуджувальними сполуками не виявлені. Ці факти, як і збільшення вмісту збуджувальних амінокислот (аспартату, глутамату) на тлі NP9 у зіставленні з впливом цього пептиду на поведінкові реакції тварин переконливо доводять відсутність у нього надмірної збуджувальної активності. Отримані нейрохімічні дані, очевидно, не претендують на вичерпне відзеркалення біохімічних механізмів дії NP9, але демонструють їхню аміноацидергічну складову. Це стосується також механізмів дії препарату порівняння «Семакс».

З урахуванням викладених результатів нейрохімічного дослідження, які на перший погляд можуть здаватися парадоксальними, у подальшому будуть вивчені психотропні властивості NP9 у ширшому діапазоні доз, за коротко- та довготривалого введення, а також його вплив на вміст нейроактивних амінокислот й інших нейротрансмітерів в окремих структурах ГМ.

Висновки

1. Нонапептид NP9 – оригінальний аналог кінцевого фрагмента нейропептиду Y структури *H-L-Ile-L-Asn-L-Leu-L-Nle-L-Ser-L-Arg-L-Asn-L-Arg-L-Tyr-NH₂* – за і/н введення у дозі 0,2 мг/кг виявляє виразні анксиолітичні властивості в мишей у тесті ПХЛ. Ця дія є анксиоселективною, оскільки не супроводжується загальним пригніченням

тварин у тесті ВП, в якому пептид NP9 ізольовано пригнічує емоційні реакції, але не рухову та дослідницьку активність.

2. Анксиолітичні властивості пептиду NP9 (0,05 мг/кг та особливо 0,1 мг/кг) підтвержені на жорсткій моделі конфліктної ситуації за Н. G. Vogel у щурів. За виразніс-

тю протитривожних властивостей досліджуваній нонапептид не поступається бензодіазепіновому анксиолітику гідазепаму в дозі 5 мг/кг.

3. Нонапептид NP9 (0,2 мг/кг) після триденного і/н введення мишам підвищує вміст глутамату та аспартату, а також знижує вміст гліцину та ГАМК у гомогенаті ГМ.

1. Reichmann F., Holzer P. Neuropeptide Y. A stressful review. *Neuropeptides*. 2015. V. 55. P. 99–109.
2. A Promising Therapeutic Target for Metabolic Diseases: Neuropeptide Y Receptors in Humans. M. Yi, H. Li, Z. Wu et al. *Cell. Physiol. Biochem*. 2018. V. 45. P. 88–107.
3. Eaton K., Sallee F. R., Sah R. Relevance of neuropeptide Y (NPY) in psychiatry. *Curr. Top Med. Chem*. 2007. V. 7. P. 1645–1659.
4. Pedragosa-Badia X., Stichel J., Beck-Sickingler A. Neuropeptide Y receptors: how to get subtype selectivity. *Frontiers in endocrinology*. 2013. V. 4. P. 5–16.
5. First selective agonist of the neuropeptide Y1-receptor with reduced size. D. Zwanziger, I. Bohme, D. Lindner et al. *J. Pept. Sci*. 2009. V. 15. P. 856–866.
6. Selective and brain penetrant neuropeptide YY2 receptor antagonists discovered by wholecell high-throughput screening. S. P. Brothers, S. A. Saldanha, T. P. Spicer et al. *Mol. Pharmacol*. V. 77. P. 46–57.
7. Meredith M., Salameh T., Banks W. Intranasal Delivery of Proteins and Peptides in the Treatment of Neurodegenerative Diseases. *AAPS J*. 2015. V. 17 (4). P. 780–787.
8. Загайко А. Л., Гаврилов І. О., Литкін Д. В. Дослідження впливу низькомолекулярного аналога нейропептиду Y на поведінкові реакції щурів. *Клінічна фармація*. 2019. № 4. С. 30–36.
9. Havrylov I. O., Shtrygol S. Yu. Investigation of the effect of a modified fragment of neuropeptide Y on memory phases and extrapolation escape of animals. *Ceska a Slovenska farmacie: casopis*. 2021. V. 70 (3). P. 93–101.
10. Гаврилов І. О., Штриголь С. Ю. Дослідження антидепресантної та актопротекторної активності синтетичного аналога кінцевої ділянки нейропептиду Y. *Український біофармацевтичний журнал*. 2021. № 1. С. 29–35.
11. Гаврилов І. О., Штриголь С. Ю. Фармакодинамічна взаємодія модифікованого аналога кінцевого фрагмента нейропептиду Y з речовинами, що пригнічують або збуджують центральну нервову систему. *Фармакологія та лікарська токсикологія*. 2021. Т. 15, № 1. С. 3–9.
12. Neuropeptide Y-family receptors Y6 and Y7 in chicken. Cloning, pharmacological characterization, tissue distribution and conserved synteny with human chromosome region. T. Bromée, P. Sjödin, R. Fredriksson et al. *FEBS J*. 2006. V. 273 (9). P. 2048–2063.
13. Koroleva S. V., Myasoedov N. F. Semax as a Universal Drug for Therapy and Research. *Biol. Bull. Russ. Acad. Sci*. 2018. V. 45. P. 589–600.
14. Манвелян Э. А., Батулин В. А. Эпифиз и действие гизадепама на уровень тревожности у лабораторных животных в условиях многопараметрического тестирования. *Наука. Инновации. Технологии*. 2002. № 31. С. 7–12.
15. Nair A., Jacob S. A simple practice guide for dose conversion between animals and human. *Journal Of Basic And Clinical Pharmacy*. 2016. V. 7 (2). P. 27.
16. Vogel H. G. Drug Discovery and Evaluation: Pharmacological Assays 3rd ed. Berlin Heidelberg New York : Springer-Verlag, 2007. 2071 p.
17. Lister R. G. The use of a plus-maze to measure anxiety in the mouse. *Psychopharmacology (Berl)*. 1987. V. 92 (2). P. 180–185.
18. Millan M. J., Brocco M. The Vogel conflict test: procedural aspects, gamma-aminobutyric acid, glutamate and monoamines. *Eur. J. Pharmacol*. 2003. V. 463, № 1–3. P. 67–96.
19. Григорова О. В., Ахапкин Р. В., Александровский Ю. А. Современные представления о патогенетической терапии тревожных расстройств. *Журнал неврологии и психиатрии им. С. С. Корсакова*. 2019. Т. 119 (10). С. 111–120.
20. Зайцева Т. Н., Тюленева І. М. Метод хроматографічного розділення амінокислот. *Лабораторна справа*. 1958. Т. 3. С. 24–30.
21. Матеранская Н. П. Определение белка в гомогенатах тканей : практикум по биол. химии. Москва : Высш. шк., 1970. 296 с.

22. Преобладание ноотропного или анксиолитического эффекта пептидов селанк, семакс и ноопепт в зависимости от пути их введения мышам BALB/С и С57BL/6. Е. В. Васильева и др. *Нейрохимия*. 2020. Т. 37, № 3. С. 208–219.
23. Reznikov L. R., Fadel J. R., Reagan, L. P. Glutamate-mediated neuroplasticity deficits in mood disorders. Springer, Tarporley, 2011. P. 13–26.
24. Glutamate within the marmoset anterior hippocampus interacts with area 25 to regulate the behavioral and cardiovascular correlates of high-trait anxiety. J. L. Zeredo, S. K. L. Quah, C. U. Wallis et al. *J. Neurosci*. 2019. V. 39. P. 3094–3310.
25. The NMDA receptor as a target for cognitive enhancement. G. L. Collingridge, A. Volianskis, N. Bannister et al. *Neuropharmacology*. 2013. V. 64. P. 13–26.
26. Role of glycine receptors in glycine-induced LTD in hippocampal CA1 pyramidal neurons. R-Q. Chen, S-H. Wang, W. Yao et al. *Neuropsychopharmacol*. 2011. V. 36, № 9. P. 1948–1958.
27. De-Souza M. M., Schenberg L. C., de-Padua-Carobrez A. NMDA-coupled periaqueductal gray glycine receptors modulate anxiolytic drug effects on plus-maze performance. *Behav. Brain Res*. 1998. V. 90. P. 157–165.
28. Kotlinska J., Liljequist S. A characterization of anxiolytic-like actions induced by the novel NMDA/glycine site antagonist, L-701,324. *Psychopharmacology (Berl)*. 1998. № 135. P. 175–181.
29. Neurotransmitters as food supplements: the effects of GABA on brain and behavior. E. Boonstra, R. de Kleijn, L. S. Colzato et al. *Frontiers in psychology*. 2015. V. 6. P. 1520.
30. Effects of acute and chronic triazolam treatments on brain GABA levels in albino rats. S. M. Aburawi, A. S. Elhwuegi, S. S. Ahmed et al. *Acta Neurobiol. Exp*. 2000. V. 60. P. 447–455.
31. Brain glycine levels in triazolam-treated albino rats. S. M. Aburawi, S.S. Ahmed, A.S. Elhwuegi et al. *J. Neural. Transm. (Vienna)*. 2001. V. 108, № 5. P. 527–539.
32. Effects of some anticonvulsant drugs on brain GABA level and GAD and GABA-T activities. L. Battistin, M. Varotto, G. Berlese et al. *Neurochem. Res*. 1984. V. 9. № 2. P. 225–231.

І. О. Гаврилов, С. Ю. Штриголь, Т. В. Горбач

Анксиолітичні властивості аналога кінцевого фрагмента нейропептиду Y та його вплив на вміст нейроактивних амінокислот у головному мозку

Мета дослідження – поглиблено вивчити анксиолітичні властивості наонапептиду NP9 на мишах і щурах, з'ясувати його вплив на вміст нейроактивних амінокислот у головному мозку.

Експеримент проведено на 45 білих нелінійних мишах (24 самки, 21 самець) і на 24 нелінійних щурах-самцях. Нонапептид NP9 вводили інтраназально в дозі 0,2 мг/кг мишам і в дозах 0,05 та 0,1 мг/кг щурам. Як препарати порівняння використовували Семакс (Пептоген, РФ) у дозі 0,1 мг/кг інтраназально мишам і гідазепам (Гідазепам ІС, Інтерхім, Україна) у дозі 5 мг/кг внутрішньошлунково щурам. Поведінкові реакції вивчали в тестах «Відкрите поле» і «Піднесений хрестоподібний лабіринт» на мишах. Анксиолітичні властивості вивчали також у тесті конфліктної ситуації за Н. G. Vogel на щурах. Визначали вміст гліцину, гамма-аміномасляної кислоти (ГАМК), глутамату й аспартату у головному мозку мишей.

Нонапептид NP9 суттєво знижував тривожність мишей без пригнічення рухової активності та будь-яких ознак седатції в тестах «Відкрите поле» і «Піднесений хрестоподібний лабіринт», що відповідає результатам попередніх досліджень на щурах. Його анксиолітична активність була стабільнішою, ніж у Семаксу. У тесті конфліктної ситуації за Н. G. Vogel на щурах підтверджені анксиолітичні властивості наонапептиду в дозах 0,05 мг/кг та особливо 0,1 мг/кг, за протитривожною дією він не поступався гідазепаму в дозі 5 мг/кг. Після триденного інтраназального введення NP9 (0,2 мг/кг) мишам у гомогенаті головного мозку збільшувався вміст глутамату та аспартату при зниженні вмісту гліцину та ГАМК.

Таким чином, анксиолітичні властивості наонапептиду NP9 підтверджено як на мишах, так і на щурах. Його дія є анксиоселективною, оскільки не супроводжується загальним пригніченням тварин. Досліджуваний наонапептид після триденного інтраназального введення мишам підвищує вміст глутамату й аспартату, а також знижує вміст гліцину та ГАМК у головному мозку.

Ключові слова: аналоги нейропептиду Y, анксиолітична активність, нейроактивні амінокислоти, головний мозок

И. А. Гаврилов, С. Ю. Штриголь, Т. В. Горбач

Анксиолитические свойства аналога конечного фрагмента нейропептида Y и его влияние на содержание нейроактивных аминокислот в головном мозге

Цель исследования – углубленно изучить анксиолитические свойства наонапептида NP9 на мышах и крысах, выяснить его влияние на содержание нейроактивных аминокислот в головном мозге.

Эксперимент проведен на 45 белых нелинейных мышах (24 самки, 21 самец) и на 24 нелинейных крысах-самцах. Нонапептид NP9 вводили интраназально в дозе 0,2 мг/кг мышам и в дозах 0,05

и 0,1 мг/кг крысам. Как препараты сравнения использовали Семакс (Пептоген, РФ) в дозе 0,1 мг/кг интраназально мышам и гидазепам (Гидазепам ІС, Інтерхім, Україна) в дозе 5 мг/кг в желудок крысам. Поведенческие реакции изучали в тестах «Открытое поле» и «Приподнятый крестообразный лабиринт» на мышах. Анксиолитические свойства изучали также в тесте конфликтной ситуации по Н. G. Vogel на крысах. Определяли содержание глицина, гамма-аминомасляной кислоты (ГАМК), глутамата и аспартата в головном мозге мышей.

Нонапептид NP9 существенно снижал тревожность мышей без подавления двигательной активности и каких-либо признаков седации в тестах «Открытое поле» и «Приподнятый крестообразный лабиринт», что соответствует результатам предыдущих исследований на крысах. Его анксиолитическая активность была стабильнее, чем у Семакса. В тесте конфликтной ситуации по Н. G. Vogel на крысах анксиолитические свойства нонапептида были подтверждены в дозах 0,05 мг/кг и особенно 0,1 мг/кг, по противотревожным свойствам он не уступал гидазепаму в дозе 5 мг/кг. После трехдневного интраназального введения NP9 (0,2 мг/кг) мышам в гомогенате головного мозга увеличивалось содержание глутамата и аспартата при снижении содержания глицина и ГАМК.

Таким образом, анксиолитические свойства нонапептида NP9 подтверждены как на мышах, так и на крысах. Его действие является анксиоселективным, поскольку не сопровождается общим угнетением животных. Исследуемый нонапептид после трехдневного интраназального введения мышам повышает содержание глутамата и аспартата, а также снижает содержание глицина и ГАМК в головном мозге.

Ключевые слова: аналоги нейропептида Y, анксиолитическая активность, нейрорактивные аминокислоты, головной мозг

I. O. Havrylov, S. Yu. Shtrygol', T. V. Gorbach

Anxiolytic properties of analogue of the terminal fragment of neuropeptide Y and its effect on the content of neuroactive amino acids in the brain

The aim of study – to investigate in depth the anxiolytic properties of nonapeptide NP9 in mice and rats, to find out its effect on the content of neuroactive amino acids in the brain.

The experiment was carried out on 45 white random bread mice (24 females, 21 males) and 24 white random bread male rats. Nonapeptide NP9 was administered intranasally at a dose of 0.2 mg/kg to mice and at doses of 0.05 and 0.1 mg/kg to rats. Semax (Peptogen, Russia) at a dose of 0.1 mg/kg intranasally to mice and gidazepam (Gidazepam ІС, Interkhim, Ukraine) at a dose of 5 mg/kg intragastrically to rats were used as reference drugs. Behavioral responses were studied in the open field and elevated plus maze tests in mice. Anxiolytic properties were also studied in the H. G. Vogel conflict test on rats. The content of glycine, GABA, glutamate, and aspartate in the brain of mice was determined.

Nonapeptide NP9 significantly reduced animal anxiety without motor suppression or any signs of sedation in the both tests open field and elevated plus maze, which is consistent with the results of previous studies in rats. Its anxiolytic activity was more stable than that of Semax. In the H. G. Vogel conflict test in rats, the anxiolytic properties of nonapeptide were confirmed in the dose range of 0.05 to 0.1 mg/kg; in terms of anti-anxiety properties, it was not inferior to gidazepam at a dose of 5 mg/kg. After a three-day intranasal administration of NP9 (0.2 mg/kg) to mice, the content of glutamate and aspartate in the brain homogenate increased while the content of glycine and GABA decreased.

Thus, the anxiolytic properties of nonapeptide NP9 have been confirmed both in mice and rats. Its action is anxiolytic, since it is not accompanied by a general depression of animals. After a three-day intranasal administration to mice, the studied nonapeptide increases the content of glutamate and aspartate, and also reduces the content of glycine and GABA in the brain.

Key words: analogues of neuropeptide Y, anxiolytic properties, neuroactive amino acids, brain

Надійшла: 26 січня 2022 р.

Прийнята до друку: 14 квітня 2022 р.

Контактна особа: Гаврилов Ігнат Олександрович, аспірант, кафедра фармакології та фармакотерапії, Національний фармацевтичний університет, буд. 12, вул. Куликівська, м. Харків, 61003.
Електронна пошта: gavrilov.i.ok@gmail.com