



ВЛИЯНИЕ СУБХРОНИЧЕСКОГО ВВЕДЕНИЯ ПЕПТИДА HLDF-6 НА ЭФФЕКТИВНОСТЬ ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКОГО ПОВЕДЕНИЯ МЫШЕЙ ЛИНИЙ Balb/c И C57Bl/6

© 2021 г. Г. И. Ковалев*, #, Е. В. Васильева*, Р. М. Салимов*,
Ю. А. Золотарев**, А. К. Дадаян**, А. П. Богачук***, В. М. Липкин***

*ФГБНУ НИИ фармакологии имени В.В. Закусова, Россия, 125315 Москва, ул. Балтийская, 8

**ФГБУН Институт молекулярной генетики РАН, Россия, 123182 Москва, пл. акад. Курчатова, 2

***ФГБУН Институт биоорганической химии им. акад. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, Россия, 117997 Москва, ул. Миклухо-Маклая, 16/10

Поступила в редакцию 06.05.2020 г.

После доработки 21.05.2020 г.

Принята к публикации 23.05.2020 г.

Проведен сравнительный анализ психотропной активности пептида HDLF-6 в кислотной (TGENHR) и амидной (HLDF-6-амид, TGENHR-NH₂) формах с использованием метода оценки поведения мышей аутобредных линий Balb/c (обладающей исходным дефицитом ориентировочно-исследовательской активности) и C57Bl/6 (линия сравнения) в тесте “закрытый крестообразный лабиринт” (ЗКЛ) при внутрибрюшинном (в дозе 100 мкг/кг в сутки, пятикратно) и интраназальном (в ежедневных дозах 30, 100 и 300 мкг/кг в сутки) введении в течение 5 суток. Введение амидной защиты по С-концу пептида HDLF-6 приводило к развитию селективного ноотропного эффекта у HLDF-6-амида (но не у HLDF-6) у мышей линии Balb/c как при интраназальном, так и при внутрибрюшинном применении пептида. Напротив, у мышей C57Bl/6 этот эффект не воспроизводился. При этом двигательная активность и уровень тревожности не изменялись у мышей этих генетических линий при использовании обеих форм пептида. На основании результатов поведенческих экспериментов в ЗКЛ сделан вывод о наличии у пептида HLDF-6-амида избирательного фармакологического эффекта, проявляющегося в повышении исследовательской активности только у животных с исходным когнитивным дефицитом, что является характерным для ноотропных препаратов. С помощью радиорецепторного анализа впервые установлено, что у пептида HLDF-6 и его производных обнаруживается общая мишень для высокоаффинного специфического связывания на мембранных препаратах головного мозга крыс. Таким образом, представляется перспективной дальнейшая разработка на основе пептида HLDF-6-амида оригинального ноотропного препарата для интраназального применения.

Ключевые слова: пептид HLDF-6, ноотропная активность, эффективность исследовательского поведения, закрытый крестообразный лабиринт, радиорецепторный анализ

DOI: 10.31857/S0132342321010115

ВВЕДЕНИЕ

Ранее из клеток HL-60 промиелоцитарного лейкоза человека был выделен новый фактор дифференцировки лейкоцитов (HLDF), который является гликозилированным белком, содержащим 54 а.о. В составе фактора HLDF был идентифицирован шестичленный фрагмент HLDF-6 (₄₁TGENHR₄₆), полностью воспроизводящий дифференцирующую активность полноразмерного белка [1, 2]. Были

определены уровни белкового фактора HLDF в отделах мозга и показано положительное влияние гексапептида HLDF-6 на биосинтез *de novo* ДНК и белка в гомогенизатах мозга [3]. В условиях бета-амилоидной токсичности пептид HLDF-6 проявляет антиапоптотическую активность на первичных культурах нейронов мозжечка и гиппокампа. Показано, что нейропротекторный пептид HLDF-6 в дозах 1–50 мкг/кг предотвращает нейродегенерацию в гиппокампе, а также потерю долговременной памяти и снижение ориентировочно-исследовательской активности у крыс на экспериментальной модели болезни Альцгеймера [4]. Установлено, что пептид HLDF-6 обладает антиишемическим эффектом на модели хронической церебральной

Сокращения: HLDF – фактор дифференцировки лейкоцитов; HLDF-6 – пептидный фрагмент ₄₁TGENHR₄₆ фактора HLDF; HLDF-6-амид – амидная форма пептида HLDF-6; ЗКЛ – закрытый крестообразный лабиринт.

Автор для связи: (тел.: +7 (495) 601-20-51; факс: +7 (495) 601-20-51; эл. почта: kovalev@academpharm.ru).

ишемии, обеспечивая как защиту нейронов, так и восстановление когнитивных способностей животных в поведенческих тестах [5]. Ранее было показано, что замещение в пептиде HLDF-6 С-концевой карбоксильной группы на амидную повышает протеолитическую стабильность модифицированного пептида HLDF-6-амида в плазме крови крыс [6]. Также на токсических моделях болезни Альцгеймера было показано, что пептид HLDF-6-амид обладает более высокой ноотропной и нейропротекторной активностью по сравнению с пептидом HLDF-6, не содержащим амидной защиты [7]. Установлено, что фармакологические эффекты пептида HLDF-6-амида реализуются с участием NMDA-глутаматергической системы гиппокампа [8].

Известно, что ноотропная активность препаратов наиболее специфично проявляется в условиях создания когнитивного дефицита [9]. Один из оптимальных способов его моделирования – применение неинвазивных методов оценки дефицита исследовательского поведения в ранее неизвестной обстановке, в частности метода “закрытый крестообразный лабиринт” (ЗКЛ) [10]. Другая существенная особенность препаратов с ноотропной активностью – их способность проявлять специфическую фармакологическую активность после неоднократного системного введения [11, 12]. Для моделирования сниженной эффективности исследовательского поведения в ЗКЛ были использованы мыши инбредной линии Balb/c, обладающие исходным дефицитом исследовательской активности; в качестве линии сравнения использовали мышей линии C57Bl/6 [10].

Целью данного исследования стал сравнительный анализ ноотропной активности пептида HLDF-6 в кислотной (TGENHR) и амидной (пептид HLDF-6-амид, TGENHR-NH₂) формах с применением неинвазивного поведенческого теста “закрытый крестообразный лабиринт” для оценки способности к пространственной ориентации без предварительного обучения, уровня тревожности и двигательной активности, а также поиск предполагаемых мест специфического связывания этого гексапептида.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Сравнительное изучение влияния пептидов HLDF-6 и HLDF-6-амида на поведение мышей линий Balb/c и C57Bl/6 в тесте ЗКЛ. Ранее установлено, что специфическое действие ноотропных препаратов проявляется преимущественно в условиях когнитивного дефицита и сниженной восстановительной способности мозга [9, 13]. Предполагаемое воздействие на когнитивное поведение изучали в неинвазивном тесте ЗКЛ на мышах. Данный тест основан на использовании врожденных индивидуальных способностей животных по простран-

ственной ориентации в новой обстановке без предшествующего обучения, что принципиально отличает его от методов условного рефлекса пассивного избегания и условного рефлекса активного избегания, в основе которых лежит предварительное обучение. Тест способен выявлять воздействие психотропных препаратов на когнитивную активность, тревожность, вызванную новизной обстановки, а также на двигательную активность. Для сравнительного анализа ноотропной активности пептидов HLDF-6 и HLDF-6-амида были использованы инбредные мыши линий Balb/c и C57Bl/6, различающиеся как по эффективности исследовательского поведения в лабиринте, так и по уровню тревожности и двигательной активности [10]. Инбредные мыши Balb/c служили моделью для оценки состояния когнитивного дефицита и повышенной тревожности, а мыши линии C57Bl/6 – в качестве линии сравнения.

Внутрибрюшинное введение пептидов. Пептиды HLDF-6 и HLDF-6-амид вводили внутрибрюшинно в ежедневной дозе 100 мкг/кг в течение 5 суток. Последнее введение осуществляли за 30 мин до поведенческой сессии. Избирательный фармакологический эффект, связанный с ноотропной активностью пептидов, оценивали по двум параметрам эффективности ориентировочно-исследовательского поведения – “длина первого цикла патрулирования”, отражающей количество заходов, затрачиваемых на первый полный обход всех четырех боковых отсеков лабиринта, и “число циклов патрулирования” – количеству полных обходов тупиков за сессию [14].

Результаты компьютерной обработки исследовательской активности животных представлены на рис. 1а, 1б. Из них следует, что плацебо-группа линии Balb/c (белые столбцы) уступает плацебо-группе линии C57Bl/6 (сплошные серые столбцы) по ряду поведенческих актов: мыши линии C57Bl/6 превосходят животных Balb/c по параметру “длина первого цикла патрулирования” (F_PtrN) на 14% ($p < 0.05$), а по параметру “число циклов патрулирования” (PtrN) – на 11% ($p < 0.05$).

У мышей опытной группы C57Bl/6 после субхронического внутрибрюшинного введения пептида HLDF-6-амид в ежедневной дозе 100 мкг/кг в течение 5 суток оба показателя эффективности исследовательского поведения не отличаются от значений в контроле, тогда как у мышей линии Balb/c наблюдается повышение эффективности исследовательского поведения до значений, характерных для соответствующих групп линии C57Bl/6 (рис. 1а).

После введения по аналогичному протоколу пептида HLDF-6 (рис. 1б) значимых изменений эффективности исследовательского поведения не отмечено ни у мышей Balb/c, ни у мышей C57Bl/6. Таким образом, субхроническое внутрибрюшин-

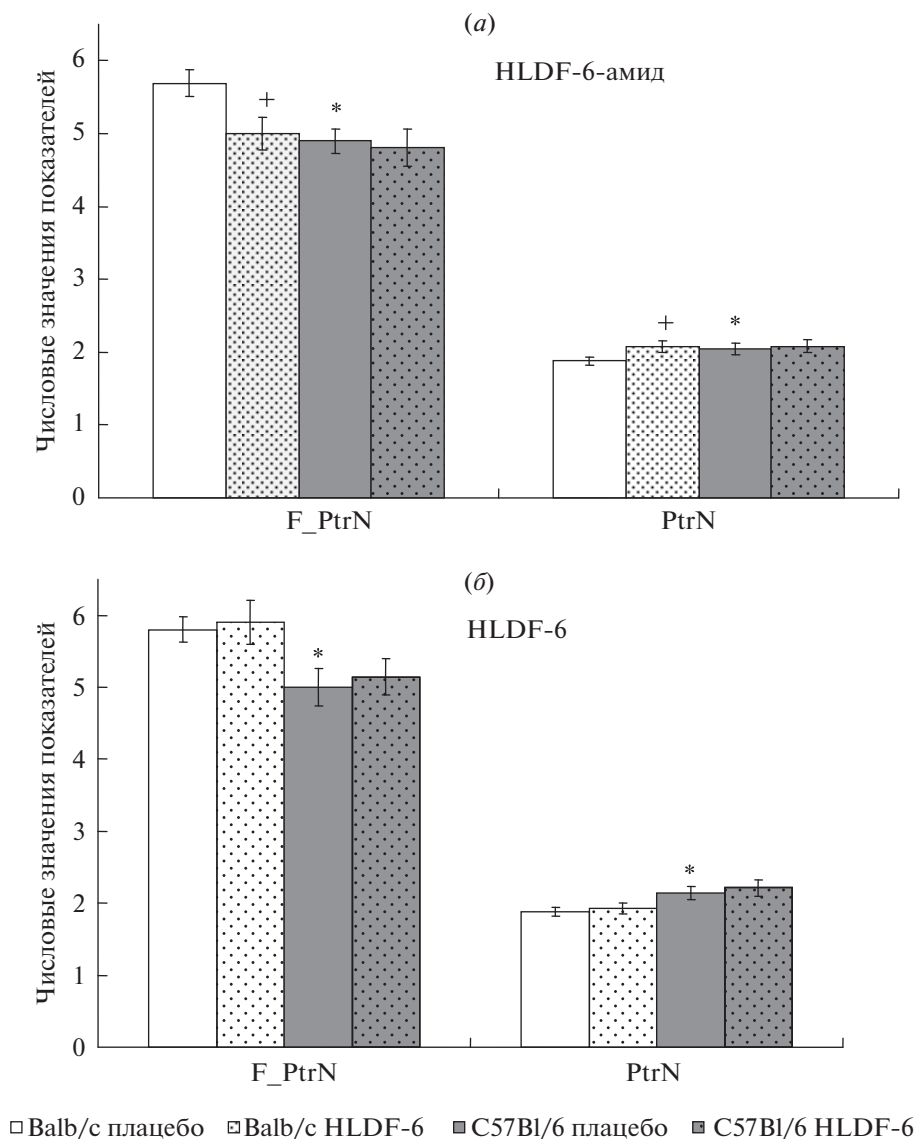


Рис. 1. Влияние субхронического внутрибрюшинного введения пептидов HLDF-6-амида (а) и HLDF-6 (б) в дозе 100 мкг/кг в сутки на эффективность исследовательской активности мышей линий Balb/c и C57Bl/6 в тесте “закрытый крестообразный лабиринт”. Обозначения: * – статистически значимые отличия от мышей Balb/c по *t*-критерию Стьюдента; + – статистически значимые отличия от контроля по *U*-критерию Манна–Уитни; F_PtrN – длина первого цикла патрулирования; PtrN – число циклов патрулирования; F_ChTm – латентное время до 1-го захода в боковой отсек; F_GITm – время пребывания в первом боковом отсеке; T_ChTm – общее время пребывания животного в центральном отсеке лабиринта; T_GITm – общее время, проведенное в боковых отсеках.

ное введение пептида HLDF-6 в дозе 100 мкг/кг в сутки оказывается неэффективным в отношении показателей исследовательского поведения, соответствующих ноотропной активности, присущей амидной форме пептида (рис. 1а).

На рис. 2 представлены результаты сравнительного анализа влияния пептидов на двигательную активность и уровень тревожности у двух линий мышей. Из них следует, что по исходному показателю тревожности – “латентное время до 1-го захода в боковой отсек” (F_ChTm) – мыши плацебо-

группы линии Balb/c (белые столбцы) вдвое превосходят мышей плацебо-группы линии C57Bl/6 (сплошные серые столбцы). Субхроническое введение как пептида HLDF-6, так и HLDF-6-амида к существенным сдвигам в этих элементах поведения не приводит, т.е. анксиолитическая активность обоих пептидов не развивается. Этот результат согласуется с данными, полученными ранее в тесте “открытое поле”, по которому анксиолитический эффект пептида HLDF-6-амида развивался не ранее трех недель внутрибрюшинного введения [8]. Можно предположить, что ноотроп-

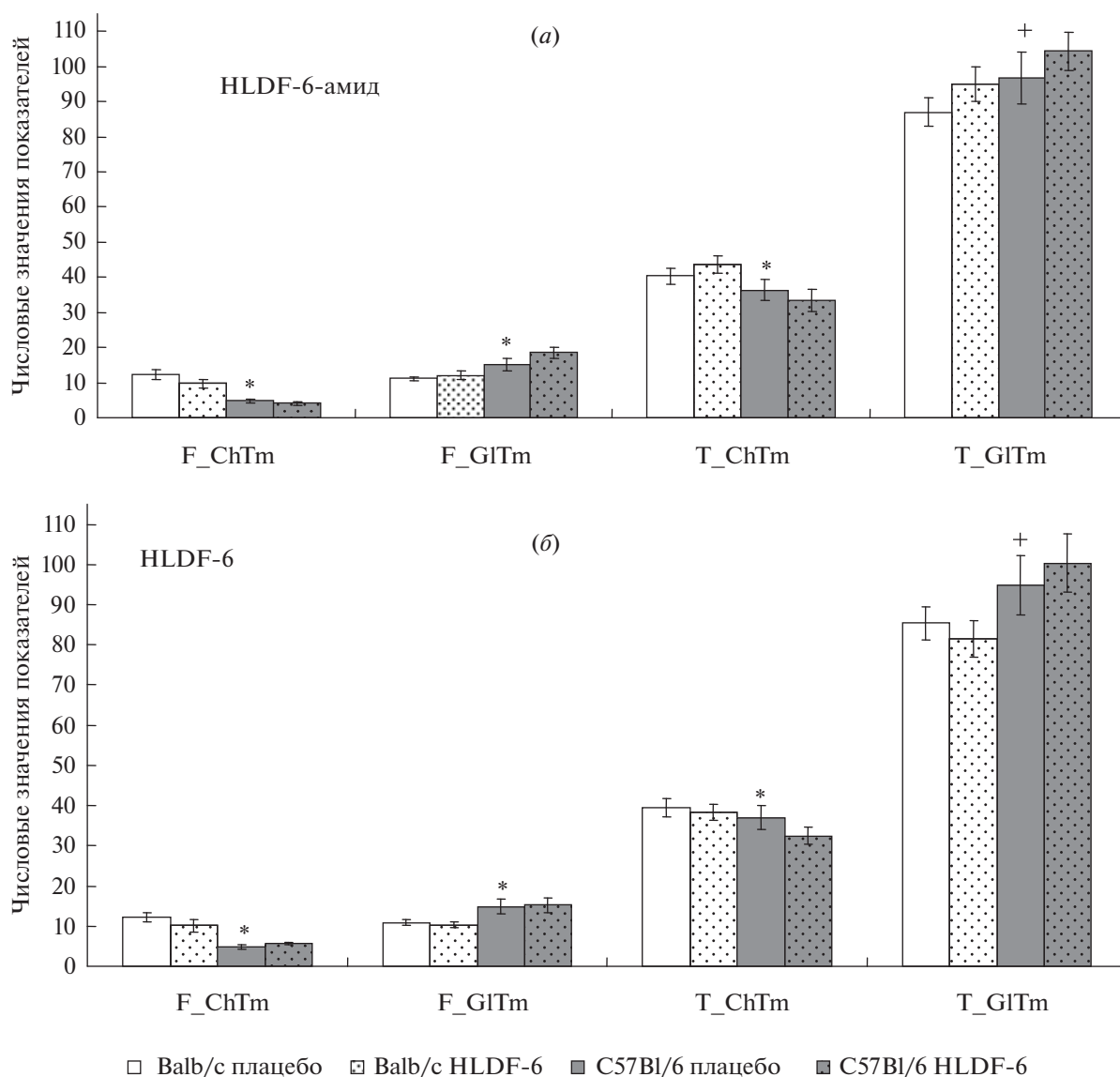


Рис. 2. Влияние субхронического внутрибрюшинного введения пептидов HLDF-6-амида (а) и HLDF-6 (б) в дозе 100 мкг/кг в сутки на уровень тревожности и двигательную активность мышей линий Balb/c и C57Bl/6 в тесте “закрытый крестообразный лабиринт”. Обозначения: *, + – статистически значимые отличия от мышей BALB/c по *t*-критерию Стьюдента и *U*-критерию Манна–Уитни соответственно; F_PtrN – длина первого цикла патрулирования; PtrN – число циклов патрулирования; F_ChTm – латентное время до 1-го захода в боковой отсек; F_GITm – время пребывания в первом боковом отсеке; T_ChTm – общее время пребывания животного в центральном отсеке лабиринта; T_GITm – общее время, проведенное в боковых отсеках.

ный эффект пептида HLDF-6-амид проявляется значительно быстрее анксиолитического.

Кроме того, приведенные на рис. 2 данные свидетельствуют о том, что при 5-кратном введении обеих форм пептида HLDF-6 в дозе 100 мкг/кг в сутки изменений двигательной активности у мышей обеих линий не наблюдается.

Сравнительный анализ влияния пептидов HLDF-6-амида и HLDF-6 на ряд показателей поведения мышей инбредных линий Balb/c и C57Bl/6, исходно различающихся по эффективности иссле-

довательского поведения и уровню тревожности, свидетельствует о том, что пептид HLDF-6-амид избирательно улучшает когнитивное поведение мышей линии Balb/c с исходным дефицитом исследовательской активности, не изменяя поведения мышей сравнения C57Bl/6. Селективность относительно когнитивного дефицита присуща и традиционным ноотропам – пирацетаму [11], фенотропилу [15], пантогаму [12], используемым в более высоких дозах (50–200 мг/кг), а также пептидным препаратам семаксу и ноопепту в дозах 0.6 и 1.0 мг/кг соответственно [16, 17].

Таблица 1. Влияние субхронического интраназального введения пептида HLDF-6-амида на исследовательское поведение мышей в тесте “закрытый крестообразный лабиринт”

Линия мышей	Группы (мкг/кг в сутки)	Длина первого цикла патрулирования, число заходов (F_PtrN)	Число циклов патрулирования (PtrN)
Balb/c	Плацебо (физ. раствор)	6.18 ± 1.32	1.72 ± 0.66
	HLDF-6-амид (30)	6.33 ± 2.61	1.60 ± 0.69
	HLDF-6-амид (100)	5.83 ± 1.95	1.91 ± 0.67
	HLDF-6-амид (300)	5.24 ± 1.12*	2.00 ± 0.53*
C57Bl/6	Плацебо (физ. раствор)	5.45 ± 1.30 [#]	1.98 ± 0.49
	HLDF-6-амид (30)	5.84 ± 0.8	2.14 ± 0.55
	HLDF-6-амид (100)	5.58 ± 1.24	2.00 ± 0.58
	HLDF-6-амид (300)	5.77 ± 2.01	2.01 ± 0.48

* Статистически значимые отличия от внутрилинейного контроля по *t*-критерию Стьюдента ($p < 0.05$).

[#] Статистически значимые межлинейные отличия в контроле по *t*-критерию Стьюдента (при $p < 0.05$).

Данные представлены в виде $m \pm S.E.M.$

Таблица 2. Влияние субхронического интраназального введения пептида HLDF-6 на исследовательское поведение мышей в тесте “закрытый крестообразный лабиринт”

Линия мышей	Группы (мкг/кг в сутки)	Длина первого цикла патрулирования (F_PtrN)	Число циклов патрулирования (PtrN)
Balb/c	Плацебо (физ. раствор)	6.18 ± 2.32	1.72 ± 0.66
	HLDF-6 (30)	5.97 ± 2.10	1.67 ± 0.64
	HLDF-6 (100)	6.08 ± 1.67	1.62 ± 0.65
	HLDF-6 (300)	5.34 ± 1.33*	1.81 ± 0.47
C57Bl/6	Плацебо (физ. раствор)	5.45 ± 1.30 [#]	1.98 ± 0.49
	HLDF-6 (30)	5.91 ± 1.31	2.15 ± 0.38
	HLDF-6 (100)	6.08 ± 1.98	2.00 ± 0.71
	HLDF-6 (300)	5.64 ± 1.12	2.08 ± 0.51

* Статистически значимые отличия от внутрилинейного контроля по *t*-критерию Стьюдента ($p < 0.05$).

[#] Статистически значимые межлинейные отличия в контроле по *t*-критерию Стьюдента (при $p < 0.05$).

Данные представлены в виде $m \pm S.E.M.$

Не содержащий амидной защиты пептид HLDF-6 при субхроническом внутрибрюшинном введении в дозе 100 мкг/кг в сутки оказался неактивным и не улучшал когнитивный компонент поведения в условиях данного эксперимента.

Интраназальное введение пептидов. Вторая часть исследования выполнена с применением интраназального введения пептидов как адекватного пути введения препаратов пептидной природы, позволяющего исключить пресистемный метаболизм в желудочно-кишечном тракте и печени, вследствие чего ускоряется достижение терапевтического эффекта. Пептиды HLDF-6-амид и HLDF-6 в дозах 30, 100 и 300 мкг/кг в сутки или физиологический раствор вводили мышам линий Balb/c и C57Bl/6 в течение 5 суток.

Результаты компьютерной обработки исследовательской поведенческой активности мышей обеих линий представлены в табл. 1 и 2. Показано, что мыши линии Balb/c плацебо-группы уступают

мышам линии C57Bl/6 из соответствующей группы в эффективности исследовательского поведения в незнакомой обстановке — длина первого цикла патрулирования (F_PtrN) у мышей линии Balb/c была на 13% больше, чем у C57Bl/6 ($p < 0.05$).

Субхроническое 5-кратное введение пептида HLDF-6-амида в ежедневной дозе 30 мкг/кг не оказывало положительного эффекта. При введении в дозе 100 мкг/кг в сутки проявлялась выраженная тенденция к улучшению ($p = 0.058$), тогда как в дозе 300 мкг/кг в сутки улучшение наступало сразу по двум параметрам исследовательского поведения: длина первого цикла (F_PtrN) сокращалась на 15%, а общее число полных циклов (PtrN) увеличивалось на 16%. Напротив, у мышей линии сравнения C57Bl/6 аналогичное введение пептида HLDF-6-амида не оказывало достоверного влияния на эффективность исследовательского поведения ни в одной из доз (табл. 1).

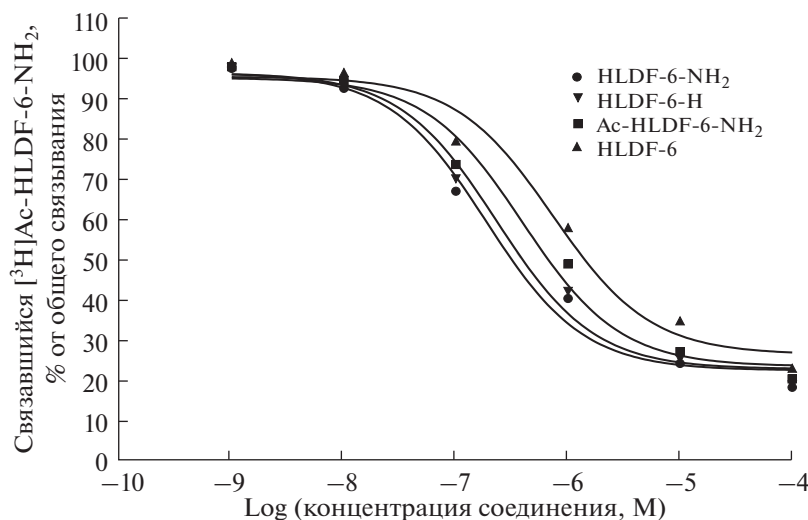


Рис. 3. Кривые конкуренции пептида HLDF-6 и его производных HLDF-6-NH₂, HLDF-6-H и Ac-HLDF-6-NH₂ за места специфического связывания [³H]Ac-HLDF-6-NH₂ с мембранами головного мозга крыс Вистар.

Как и в случае с HLDF-6-амидом, изменений в исследовательском поведении у мышей линии сравнения C57Bl/6 в результате 5-кратного интраназального введения пептида HLDF-6 не отмечено. У мышей линии Balb/c, обнаруживающей когнитивный дефицит, после интраназального введения пептида HLDF-6 в дозе 300 мкг/кг в сутки эффективность исследовательского поведения улучшалась лишь по одному параметру — снижалась длина первого цикла патрулирования (F_{PtrN}) (табл. 2).

Ранее на примере пептидов семакса и ноопепта нами было показано, что выраженное ноотропное действие пептидных препаратов при интраназальном введении мышам Balb/c может означать, что при экстранейрональном пути поступления пептиды через обонятельный эпителий попадают в большей степени в области мозга, связанные с процессами памяти и обучения, тогда как при внутрибрюшинном введении — преимущественно в структуры мозга, ответственные за эмоциональный статус (передний мозг и лимбические области), вследствие чего преобладает анксиолитический эффект [17]. Следовательно, дальнейшая разработка ноотропного фармакологического препарата с интраназальным способом введения на основе пептида HLDF-6-амид представляется перспективной.

Радиорецепторный анализ связывания меченного тритием пептида [³H]Ac-HLDF-6-NH₂ с мембранными препаратами головного мозга крыс. В проведенных ранее экспериментах исследователям не удалось обнаружить специфического связывания пептида HLDF-6 на поверхности клеток, хотя было установлено, что даже однократные замены аминокислотных остатков в его структуре

приводят к потере дифференцирующей активности [2]. В нашей работе с использованием меченого тритием пептида [³H]Ac-HLDF-6-NH₂ было впервые продемонстрировано, что на мембранных препаратах, приготовленных из головного мозга самцов крыс Вистар, имеются места высокоаффинного специфического связывания пептида HLDF-6 и его производных (рис. 3). Показано, что величина IC₅₀ для исходного пептида HLDF-6 составляет 1813 ± 0.19 нМ, тогда как у его содержащих защитные группировки производных HLDF-6-амид, HLDF-6-AA (ацетил-амидная форма пептида HLDF-6) и HLDF-6-H (TGEXHR-NH₂, где X = Hse) эта величина составляет 531 ± 0.15, 754 ± 0.18 и 574 ± 0.14 нМ соответственно. Таким образом, у пептида HLDF-6 и его производных обнаружена общая мишень специфического связывания на мембранах головного мозга крыс. Введение амидной и ацетильной защиты в пептид не только не лишило этих производных средства к местам специфического связывания на мембранах мозга, но и привело к увеличению средства к местам связывания [³H]Ac-TGENHR-NH₂ в 3.4 и 2.4 раза соответственно. Можно предположить, что в дальнейших экспериментах специфические фармакологические эффекты, установленные для незащищенной формы пептида HLDF-6, будут подтверждены и для других исследованных форм пептида.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Экспериментальные животные. Для *in vivo* исследований использовали самцов мышей инбредных линий Balb/c (*n* = 160) и C57Bl/6 (*n* = 108), полученных из питомника лабораторных живот-

ных ФИБХ РАН “Пушино”, массой 23–25 г. Для радиолигандного анализа *in vitro* применяли мембранные препараты мозга самцов аутбредных крыс Вистар (питомник “Столбовая”, $n = 8$, масса 200–220 г), приготовленные по стандартной методике, описанной ниже.

Содержание животных соответствовало Правилам лабораторной практики при проведении доклинических исследований в Российской Федерации (ГОСТ 351.000.3-96 и 51000.4-96) и Правилам надлежащей лабораторной практики (утв. приказом Министерства здравоохранения Российской Федерации от 1 апреля 2016 г. № 199н). Мышей содержали по 8 особей в клетке, крыс – по 4 особи, всех в условиях свободного доступа к воде и корму при температуре 21°C и постоянном световом дне 14 ч (включение света в 8 ч утра). Факторы внешней среды (температура, влажность, освещенность, состав подстила) соответствовали требованиям по содержанию лабораторных животных.

Изучение влияния пептидов HLDF-6-амида и HLDF-6 на поведение мышей линий Balb/c и C57Bl/6 в тесте ЗКЛ. Пептиды HLDF-6-амид и HLDF-6 в дозах 30, 100 и 300 мкг/кг (опытные группы) или физиологический раствор (плацебо-группы) вводили внутрибрюшинно (100 мкг/кг, по весу животного) или интраназально (30, 100 и 300 мкг/кг, в объеме 10 мкл) ежедневно в течение 5 суток. Количество животных в каждой группе – от 10 до 15. Для оценки исследовательского поведения животных использовали закрытый крестообразный лабиринт, который состоял из четырех прозрачных пластмассовых закрытых пустых отсеков, соединявшихся с таким же центральным отсеком с помощью входных отверстий [18]. Тупиковые отсеки размером 14 × 14 × 14 см были пронумерованы по часовой стрелке от 1 до 4. Пол лабиринта очищали влажным ватным тампоном перед каждым опытом. Мышь помещали в центральный отсек, после чего лабиринт накрывали прозрачной крышкой. Животное могло свободно перемещаться по его отделениям, а экспериментатор синхронно фиксировал номера посещаемых отделений, используя компьютерную программу, регистрирующую последовательность и продолжительность переходов. Критерием захода в отсек лабиринта считалось наличие всех четырех лап животного внутри этого помещения. Эксперимент продолжался до тех пор, пока животное не совершит 12 переходов из одного бокового отсека в другой (т.е. пока оно не совершит 13 визитов в боковые отсеки).

Последующий компьютерный анализ данных позволил выделить следующие показатели:

1) “длина первого цикла патрулирования” (F_PtrN) и “число циклов патрулирования” ($PtrN$), совершенных за время эксперимента. Показатель

“длина первого цикла патрулирования” исчисляется числом заходов животного в боковые отсеки лабиринта до момента, когда животное побывает во всех четырех боковых отсеках лабиринта хотя бы один раз. Чем меньше число заходов в боковые отсеки при первом цикле патрулирования и чем больше выполнено циклов патрулирования, тем более упорядоченно и эффективно происходит исследование лабиринта. Эти показатели могут быть использованы для оценки ноотропного действия вещества;

2) “общее время пребывания животного в центральном отсеке лабиринта” (T_ChTm) и “общее время, проведенное в боковых отсеках” (T_GITm) в секундах, не считая 1-го захода в боковой отсек. Эти показатели отражают уровень двигательной активности животного, а также характеризуют интенсивность обследования ими новой среды и могут быть использованы для оценки стимулирующего/тимолептического или, наоборот, седативного эффекта вещества;

3) “латентное время до 1-го захода в боковой отсек” (F_ChTm) и “время пребывания в нем” (F_GITm). Эти показатели отражают баланс между любопытством и настороженностью животного при первом контакте с новой обстановкой. Если их величины значительно превышают, соответственно, показатели п. 2, то это может рассматриваться как признак настороженности и тревоги.

Статистическую обработку экспериментальных данных проводили с помощью программы Statistica 6.0.

Радиорецепторный анализ связывания меченного тритием пептида [3H]Ac-HLDF-6-NH₂ с мембранами головного мозга крыс Вистар *in vitro*. После декапитации выделяли головной мозг, ткань немедленно замораживали в жидком азоте и хранили в низкотемпературной морозильной камере при –80°C для последующих экспериментов в условиях *in vitro*. В день эксперимента ткань мозга измельчали в гомогенизаторе Поттера “тефлон–стекло” в 25 объемах буфера (50 мМ Tris-HCl, 10 мМ EDTA, pH 7.1). Гомогенат центрифугировали 10 мин при 48000 g. Полученный осадок гомогенизировали в буфере и инкубировали 10 мин при 37°C, затем центрифугировали 10 мин при 48000 g. Осадок ресуспендировали в 5 объемах буфера и замораживали в криобирках при –80°C.

В день анализа ткань размораживали, разбавляли в 100 объемах буфера (50 мМ Tris-HCl, pH 7.1), центрифугировали 3 раза по 10 мин при 48000 g. Осадок ресуспендировали в необходимом количестве буфера (50 мМ Tris-HCl, pH 7.1).

В экспериментах по радиолигандному связыванию использовали меченый тритием пептид [3H]Ac-HLDF-6-NH₂ с удельной активностью 22 Кюри/ммоль. Инкубационная смесь (конечный

объем 0.5 мл) содержала 50 мкл [³H]Ac-HLDF-6-NH₂, 200 или 250 мкл буфера (50 mM Tris-HCl, pH 7.1) и 200 мкл белковой суспензии мембран, для неспецифического связывания добавляли 50 мкл немеченого пептида (HLDF-6-AA). Реакционную смесь инкубировали при 4°C в течение 30 мин. По окончании инкубации пробы фильтровали через стекловолоконные фильтры GF/C (Whatman, Великобритания), предварительно выдержанные в течение 2 ч в 0.3%-ном полиэтиленамине при 4°C. Каждую пробирку промывали 2 раза холодным буфером (50 mM Tris-HCl, pH 7.1), затем фильтры промывали 2 раза тем же объемом буфера. Фильтры просушивали на воздухе и переносили в сцинтилляционные флаконы, содержавшие по 5 мл сцинтилляционной жидкости на основе толуола (4 г PPO, 0.2 г POPOP на 1 л толуола). Определение радиоактивности проб осуществляли на сцинтилляционном счетчике Tri-Carb 2900TR (Perkin Elmer, США) с эффективностью счета 42–46%. Результаты измерений по радиорецепторному связыванию проводили с помощью программы Graph-Pad Prism 4.

ФОНДОВАЯ ПОДДЕРЖКА

Работа выполнена при частичной поддержке Министерства образования и науки Российской Федерации (государственный контракт № 14N08.11.0002) и программ Президиума РАН “Фундаментальные науки – медицине” за 2012–2014 гг.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Исследование проводили согласно Правилам лабораторной практики в Российской Федерации [19], а также рекомендациям, изложенным в “Руководстве по проведению доклинических исследований лекарственных средств” [20], и в соответствии с международными требованиями по правилам GLP FDA и GLP OECD на лабораторных животных (экспериментальных биомоделях) SPF-статуса (свободные от патогенной флоры). Мышей SPF-статуса получали из Питомника лабораторных животных ФИБХ РАН, имеющего международную аккредитацию AAALAC. Система управления качеством производства лабораторных животных в Питомнике сертифицирована на соответствие международным требованиям ИСО 9001:2008. Проведение экспериментов одобрено Комиссией по биомедицинской этике ФГБНУ “НИИ фармакологии им. В.В. Зукосова”.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Kostanyan I.A., Astapova M.V., Starovoytova E.V., Dranitsyna S.M., Lipkin V.M.* // FEBS Letters. 1994. V. 356. P. 327–329. [https://doi.org/10.1016/0014-5793\(94\)01306-3](https://doi.org/10.1016/0014-5793(94)01306-3)
2. *Костанян И.А., Астапова М.В., Наволоцкая Е.В., Лепихова Т.Н., Драницина С.М., Телегин Г.Б., Родионов И.Л., Байдакова Л.К., Золотарев Ю.А., Молотковская И.М., Липкин В.М.* // Биоорг. химия. 2000. Т. 26. С. 505–511. [*Kostanyan I.A., Astapova M.V., Navolotskaya E.V., Lepikhova T.N., Dranitsyna S.M., Telegin G.B., Rodionov I.L., Baidakova L.K., Zolotarev Yu.A., Molotkovskaya I.M., Lipkin V.M.* // Russ. J. Bioorg. Chem. 2000. V. 26. P. 505–511.] <https://doi.org/10.1007/BF02758614>
3. *Sewell R.D., Gruden M.A., Pache D.M., Storozeva Z.I., Kostanyan I.A., Proshin A.T., Yurasov V.V., Sherstnev V.V.* // J. Psychopharmacol. 2005. V. 19. P. 602–608. <https://doi.org/10.1177/0269881105056645>
4. *Костанян И.А., Жохов С.С., Сторожева З.И., Прошин А.Т., Сурина Е.А., Бабиченко И.И., Шерстнев В.В., Липкин В.М.* // Биоорг. химия. 2006. Т. 32. С. 399–407. [*Kostanyan I.A., Zhokhov S.S., Storozeva Z.I., Proshin A.T., Surina E.A., Babichenko I.I., Sherstnev V.V., Lipkin V.M.* // Russ. J. Bioorg. Chem. 2006. V. 32. P. 360–367.] <https://doi.org/10.1134/S1068162006040066>
5. *Костанян И.А., Сторожева З.И., Семенова Н.А., Липкин В.М.* // Доклады Академии наук. 2009. Т. 428. С. 565–569. [*Kostanyan I.A., Storozeva Z.I., Semenova N.A., Lipkin V.M.* // Doklady Biol. Sci. 2009. V. 428. P. 418–422.] <https://doi.org/10.1134/S0012496609050081>
6. *Золотарев Ю.А., Дадаян А.К., Кост Н.В., Воеводина М.Э., Соколов О.Ю., Козик В.С., Шрам С.И., Азев В.Н., Бочаров Э.В., Богачук А.П., Липкин В.М., Мясоедов Н.Ф.* // Биоорг. химия. 2015. Т. 41. С. 644–656. [*Zolotarev Yu.A., Dadayan A.K., Kost N.V., Voevodina M.E., Sokolov O.Y., Kozik V.S., Shram S.I., Bocharov E.V., Bogachuk A.P., Azev V.N., Lipkin V.M., Myasoedov N.F.* // Russ. J. Bioorg. Chem. 2015. V. 41. P. 578–589.] <https://doi.org/10.1134/S1068162015060205>
7. *Bogachouk A.P., Storozeva Z.I., Solovjeva O.A., Sherstnev V.V., Zolotarev Yu.A., Azev V.N., Rodionov I.L., Surina E.A., Lipkin V.M.* // J. Psychopharmacol. 2016. V. 30. P. 78–92. <https://doi.org/10.1177/0269881115616393>
8. *Zolotarev Yu.A., Kovalev G.I., Kost N.V., Voevodina M.E., Sokolov O.Y., Dadayan A.K., Kondrakhin E.A., Vasileva E.V., Bogachuk A.P., Azev V.N., Lipkin V.M., Myasoedov N.F.* // J. Psychopharmacol. 2016. V. 30. P. 922–935. <https://doi.org/10.1177/0269881116660705>
9. *Ковалев Г.И., Фирстова Ю.Ю.* // Клиническая фармакология и терапия. 2010. Т. 19. С. 72–73.
10. *Ковалев Г.И., Васильева Е.В., Салимов Р.М.* // Журнал высшей нервной деятельности им. И.П. Павлова. 2019. Т. 69. С. 123–130. <https://doi.org/10.1134/S0044467719010064>
11. *Ковалев Г.И., Кондрахин Е.А., Салимов Р.М., Незнамов Г.Г.* // Экспер. и клин. фармакол. 2014. Т. 77. С. 49–55.

12. Кондрахин Е.А., Салимов Р.М., Ковалев Г.И., Незнамов Г.Г. // Фармакокинетика и фармакодинамика. 2015. № 1. С. 44–51.
13. Васильева Е.В., Салимов Р.М., Ковалев Г.И. // Экспер. и клин. фармакол. 2012. Т. 75 С. 32–37.
14. Salimov R.M. // Alcohol. 1999. V. 17. P. 157–162.
15. Фирстова Ю.Ю., Абаимов Д.А., Капица И.Г., Воронина Т.А., Ковалев Г.И. // Нейрохимия. 2011. Т. 28. С. 130–141.
16. Ковалев Г.И., Фирстова Ю.Ю., Салимов Р.М., Кондрахин Е.А. // Психиатрия. 2010. Т. 3. С. 23–27.
17. Васильева Е.В., Салимов Р.М., Ковалев Г.И. // Фармакокинетика и фармакодинамика. 2016. № 2. С. 31–36.
18. Салимов Р.М. // Журнал высшей нервной деятельности. 1988. Т. 38. С. 569–571.
19. Национальный стандарт Российской Федерации, ГОСТ Р 53434 – (2009).
20. Миронов А.Н. Бунятян Н.Д., Васильев А.Н. // Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств / Под ред. Миронова А.Н. Часть первая. М.: Гриф и К., 2012. 944 с.

Influence of Sub-Chronic Peptide HLDF-6 Administration on the Exploratory Behavior of Inbred Mice Balb/c and C57Bl/6 Strains

G. I. Kovalev^{*,#}, E. V. Vasileva^{*}, R. M. Salimov^{*}, Yu. A. Zolotarev^{**},
A. K. Dadayan^{**}, A. P. Bogachouk^{***}, and V. M. Lipkin^{***}

[#]Phone: +7 (495) 601-20-51; fax: +7 (495) 601-20-51; e-mail: kovalev@academpharm.ru

^{*}Zakusov Research Institute of Pharmacology, ul. Baltiyskaya 8, Moscow, 125315 Russia

^{**}Institute of Molecular Genetics, pl. Kurchatova 2, Moscow, 123182 Russia

^{***}Shemyakin–Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, ul. Mikluho-Maklaya 16/10, Moscow, 117997 Russia

A comparative analysis of the psychotropic activity of the HDLF-6 peptide in acidic (TGENHR) and amide forms (HLDF-6-amide, TGENHR-NH₂) was carried out using the method for assessing the behavior on 2 inbred mice strains Balb/c (with initial deficiency of exploratory efficacy) and C57Bl/6 (as reference) in the “closed cross-maze”-test (CCM) using sub-chronic intraperitoneal (100 µg/kg, daily) and intranasal administration at daily doses 30, 100 and 300 µg/kg. It was shown that the introduction of amide protection at the C-terminus of the HDLF-6 peptide reveals the selective nootropic effect of HLDF-6-amide (but not HLDF-6) in Balb/c population after both intranasal and intraperitoneal routes of the peptides administrations. On the contrary, in the group of C57Bl/6 mice this effect was not reproduced. The locomotor activity and the anxiety level did not change in these strains after injections of both forms of the peptide. Based on the results of behavioral experiments in CCM-test, it was concluded that the HLDF-6-amide peptide has a selective pharmacological effect, which manifests itself in an increase in exploratory activity only in animals with initial cognitive deficit, which is characteristic of nootropic drugs. Using radioreceptor analysis, it was for the first time established that the peptide HLDF-6 and its derivatives showed a common target of specific high affinity binding on the rat cerebral membranes. Thus, it seems promising to further develop, based on the HLDF-6-amide peptide, an original nootropic drug for intranasal use.

Keywords: HLDF-6 peptide, nootropic activity, the effectiveness of exploratory behavior, closed cross maze, radioreceptor analysis