УДК 616.8-008.61-085-092.9

ВЛИЯНИЕ ТРИПЕПТИДА GLY-HIS-LYS НА ПОВЕДЕНИЕ КРЫС В ТЕСТЕ «ОТКРЫТОЕ ПОЛЕ»

Чернышёва О.И., Бобынцев И.И., Долгинцев М.Е.

ГБОУ ВПО «Курский государственный медицинский университет» Минздрава РФ, Курск, e-mail: bobig@mail.ru

Ключевые слова: открытое поле, пептид Gly-His-Lys, тревожность, поведение, эмоциональность

Исследовано влияние трипептида Gly-His-Lys (фактор роста гепатоцитов) при внутрибрюшинном введении за 12 минут до начала эксперимента в дозах 0,5, 5 и 50 мкг/кг на поведение самцов крыс Вистар в тесте «открытое поле» однократно со временем экспозиции 5 минут. Пептид во всех использованных дозах вызывал у животных снижение проявлений страха и тревожности, которое выразилось в повышении ориентировочно-исследовательской активности и ослаблении реакции замирания как в периферических, так и в центральных частях «открытого поля». Показатели эмоциональности (груминг и дефекации) при этом существенно не изменялись. Характер полученных результатов позволяет предполагать наличие у петтида нейротропных эффектов, в том числе анксиолитического.

THE TRIPEPTIDE GLY-HIS-LYS INFLUENCE ON BEHAVIOR OF RATS IN THE TEST «OPEN FIELD»

Chernysheva O.I., Bobyntsev I.I., Dolgintsev M.E.

Kursk State Medical University, Kursk, e-mail: bobig@mail.ru

The influence of the tripeptide Gly-His-Lys (hepatocyte growth factor, GHK) administered intraperitoneally 12 minutes before the start of the experiment at doses 0.5, 5 and 50 mkg/kg on male Wistar rats behavior in the test «open field» once with the exposure time 5 minutes has been analyzed. The peptide at all doses used caused a reduction of the manifestations of fear and anxiety manifested in increasing of the exploratory activity and decreasing of the immobility reaction in both the peripheral and in the central parts of the «open field». Emotionality indices (grooming and defecation) did not change significantly. The character of the received results suggests the presence of the peptide neurotropic effects, including anxiolytic.

Keywords: open field, the peptide Gly-His-Lys, anxiety, behavior, emotionality

В настоящее время известно, что короткие пептиды являются сигнальными молекулами, которые участвуют в регуляции гомеостаза на различных уровнях организации живой материи и являются частью сложнейшей системы специализированных молекул-сигнализаторов и переносчиков информации между клетками организма [2, 9]. К коротким регуляторным пептидам можно отнести трипептид Gly-His-Lys, для которого известны модулирующее влияние на рост и дифференцировку клеток [14], процессы ранозаживления за счет стимуляции синтеза коллагена фибробластами [11], физиологическую и репаративную регенерацию печени [8], стимулирующее влияние пептида на рост волос [15] и противовоспалительный эффект в поврежденных тканях [10]. Однако в литературе отсутствуют данные об исследовании нейротропных эффектов данного пептида. При этом вышеуказанная полифункциональность пептида и данные литературы о механизмах влияния коротких регуляторных пептидов на функции нервной системы [9] позволяют предполагать наличие подобных эффектов и у данного трипептида.

Одним из наиболее распространенных методов изучения поведения животных яв-

ляется тест «открытое поле», который позволяет в новых (стрессогенных) условиях оценить ориентировочно-исследовательские и защитно-оборонительные поведенческие реакции. Поэтому целью данного исследования являлось изучение влияния трипептида Gly-His-Lys на поведение крыс в тесте «открытое поле».

Материалы и методы исследования

Эксперименты выполнены на 40 крысах-самцах Вистар массой 180-220 г., полученных из питомника РАМН «Столбовая». Животных содержали в клетках по 10 особей в стандартных условиях вивария со свободным доступом к воде и пище при 12-часовом световом режиме и контролируемой температуре (22±2°С). Все процедуры с животными выполняли в соответствии с международными правилами и нормами (European Communities Council Directives of 24 November1986, 86/609/EEC).

В работе использовали пептид Gly-His-Lys синтезированный в НИИ химии Санкт-Петербургского государственного университета. Пептид растворяли в физиологическом растворе и вводили внутрибрющинно за 12 мин до начала опыта в дозах 0,5; 5 и 50 мкг/кг. Контрольным животным вводили эквивалентные объёмы физиологического раствора из расчёта 1 мл на 1 кг массы.

Эксперименты проводили в строго определённый временной промежуток: с 9 до 15 часов, в искусственно освещённом, максимально ограниченном от поступления посторонних шумов помещении. До на-

чала исследования животные были приучены к рукам экспериментатора. Открытое поле представляло собой квадратную площадку размером 90 х 90 см с непрозрачными бортиками высотой 30 см, разделенную на 36 квадратов, со сторонами 15 см.

Время каждой экспозиции составляло 5 минут. В ходе эксперимента оценивали следующие показатели: число пересеченных квадратов (центральных и периферических), а также продолжительность движения и замирания в них, число и продолжительность вертикальных стоек, замирание в периферических квадратах, число проявлений реакции груминга и ее продолжительность, количество фекальных болюсов.

Регистрацию вышеуказанных показателей производили с помощью разработанной нами компьютерной программы, позволяющей фиксировать частоту, продолжительность и время возникновения каждой оцениваемой реакции из числа последовательно возникающих в течение времени нахождения животного в открытом поле [5]. Достоверность результатов оценивали с помощью t-критерия Стьюдента. Результаты считали достоверным при р<0,05.

Результаты исследования и их обсуждение

Как видно из таблицы, трипептид Gly-His-Lys оказывал значительное влияние на исследованные формы поведения животных. При этом число пересечённых центральных квадратов и время движения в них при использовании всех доз пептида значительно превышало показатели контрольной группы. Так, продолжительность движения в группе животных, получавших пептид в дозе 0,5 мкг/кг, было в 6,8 раз (p<0,05) больше контрольных значений, в дозе 5 мкг/кг – в 4 раза (p<0,05), 50 мкг/ $\kappa\Gamma$ – в 9.5 раз (p<0.05). Число пересечённых квадратов после введения пептида в дозе 0.5 мкг/кг возрастало в 3.5 раза (p<0.05). в дозе 5 мкг/кг – в 2,8 раза (p<0,01), в дозе 50 мкг/кг – в 5,5 раз (p<0,01). Увеличение данных показателей происходило на фоне уменьшения продолжительности реакции неподвижности (замирания), достигавшего достоверных различий с контрольной группой после введения наименьшей использованной дозы 0,5 мкг/кг. Характер изменения исследованных поведенческих реакций в центральной части экспериментальной установки предполагает наличие у животных снижения проявлений реакции страха после введения пептида.

Показатели поведения крыс в тесте «открытое поле» после введения Gly-His-Lys (М±m)

Группа Показатель	Контроль	0,5 мкг/кг	5 мкг/кг	50 мкг/кг
Центральные квадраты				
Замирание (с)	3,0±0,8	2,1±0,1*	2,6±0,3	2,3±0,4
Движение (с)	1,2±0,3	8,1±2,7*	4,9±1,3*	11,4±4,2*
Число пересечённых квадратов	1,1±0,1	3,9±1,3*	3,1±0,7*	6,1±1,6*
Периферические квадраты				
Замирание (с)	47,6±15,8	4,5±2,5*	7,8±4,8*	7,9±5,8*
Движение (с)	91,6±14,8	189,1±7,9*	151,9±17,8*	170,8±10,7*
Число пересечённых квадратов	64,6±12,3	124,8±5,9*	109,0±12,2*	122,6±11,8*
Вставания (с)	37,5±7,6	48,0±4,7	43,4±4,4	41,2±6,8
Число вставаний	10,9±2,7	23,1±2,1*	19,2±2,9*	22,4±4,6*
Число фекальных болюсов	1,5±0,6	2,0±0,6	0,9±0,4	1,1±0,6
Груминг (с)	21,6±5,1	15,4±3,9	28,4±6,5	17,9±4,4
Число проявлений груминга	1,6±0,4	1,7±0,5	1,9±0,2	1,4±0,3

Примечание: * – p<0,05-0,001 по сравнению с показателями контрольной группы.

В периферических квадратах открытого поля во всех подопытных группах животных после введения пептида наблюдалось уменьшение длительности реакции неподвижности. Так, наиболее выраженное изменение данной реакции (на 91 %, p<0,05) отмечалось при введении Gly-His-Lys в дозе 0,5 мкг/кг. С увеличением вводимой дозы пептида эти изменения носили менее выра-

женный характер — на 83% (p<0,05) в обеих группах.

Изменения реакции движения на месте под действием Gly-His-Lys также имели однонаправленный характер. При этом использование пептида в наименьшей дозе 0,5 мкг/кг приводило к наиболее значительному снижению данного показателя (на 71%, p<0,001). Дальнейшее увеличе-

ние дозы вводимого препарата также вызывало уменьшение длительности реакции движения на месте: в группе животных, получавших Gly-His-Lys в дозе 5 мкг/кг на 48% (p<0,05), а в дозе 50 мкг/кг – на 51% (p<0,05).

Уровень горизонтальной двигательной активности, отражаемый временем движения животного и числом пересеченных квадратов, находился в обратной зависимости от значений реакции неподвижности. Во всех подопытных группах отмечалось увеличение длительности реакции движения по сравнению с контрольными животными. Применение пептида в дозе 0,5 мкг/кг приводило к росту продолжительности данной поведенческой реакции на 106% (р<0,001), в дозе 5 мкг/кг – на 66% (р<0,05), в дозе 50 мкг/кг – на 87% (р<0,001).

Подобные изменения закономерно наблюдались и при оценке числа пересеченных периферических квадратов. Использование пептида в заданном диапазоне доз приводило к выраженному и достоверному увеличению указанного показателя на 93% (p<0,001) при дозе 0,5 мкг/кг; на 69% (p<0,05) при дозе 5 мкг/кг и на 90% (p<0,01) при дозе 50 мкг/кг (таблица).

Влияние пептида на уровень вертикальориентировочно-исследовательской активности имело выраженный характер. Так, в минимальной использованной дозе 0,5 мкг/кг Gly-His-Lys увеличивал количество вставаний в арене на 112 % (р <0,01). В подопытной группе, получавшей препарат в дозе 5 мкг/кг, уровень вертикальной активности превышал контрольные значения на 76% (р <0,05). Дальнейшее увеличение вводимой дозы до 50 мкг/кг сопровождалось активацией данной формы поведения, которая достигала достоверных различий с контрольными значениями (на 106 %, p < 0,05). Данный факт, свидетельствующий в пользу повышения уровня исследовательской активности и, одновременно, уменьшения тревожности, является очередным подтверждением предполагаемой анксиолитической направленности действия пептида Gly-His-Lys.

Одним из важных компонентов поведенческой реакции, отражающим эмоциональность, является изменение количества фекальных болюсов. Применение пептида в дозе 0,5 мкг/кг вызывало увеличение данного показателя на 33%. Вместе с тем, с дальнейшим увеличением вводимой дозы пептида, напротив, отмечалось снижение числа болюсов в группе, получавшей препарат в дозе 5 мкг/кг (на 40%) и в дозе 50 мкг/кг (на 27%). Однако данные изменения не имели статистически значимых различий с показателями контрольной группы.

Характер изменений продолжительности и числа проявлений реакции груминга во всех подопытных группах не имели определённой направленности и различия в сравнении с показателями контрольной группы. Так, при использовании пептида в дозе 0,5 мкг/кг длительность указанной реакции снижалась на 29% при незначительном увеличении числа вставаний. Дальнейшее повышение дозы Gly-His-Lys до 5 мкг/кг сопровождалось увеличением длительности реакции (на 32%) и числа проявлений (на 19%). Однако введение трипептида в наибольшей из используемых доз 50 мкг/кг приводило к противоположному эффекту и снижало продолжительность реакции груминга (на 17%) и количество проявлений этой реакции (на 12%).

Обсуждение. Полученные результаты свидетельствуют о том, что применение трипептида Gly-His-Lys способствовало достоверному повышению горизонтальной и вергикальной двигательной активности при отсутствии существенных изменений эмоциональности, оцениваемой по реакциям дефекации и груминга.

Известно, что помещение животного в новую обстановку ведет к возникновению исследовательского поведения, которому препятствует возникающий при этом страх. Наиболее важных признаков снижения уровня страха является активация исследования животным центральных квадратов [4]. Обычно данная ситуация постепенно развивается при исследовании поведения на протяжении нескольких дней за счет угасания страха. В условиях нашей работы ослабление страха достигалось за счет влияния пептида, что в свою очередь могло способствовать усилению ориентировочно-исследовательской реакции в виде вертикальной и горизонтальной двигательной

В пользу ослабления страха свидетельствует и ослабление реакции замирания как в центральных, так и периферических квадратах. Необходимо отметить, что тревожность животных в первые минуты пребывания в новой обстановке может проявляться как в усилении двигательной активности, так и в противоположной реакции замирания. Поэтому отмеченное нами на фоне угнетения реакции замирания усиление двигательной активности, вероятно, имен-

но вследствие усиления исследовательского поведения и не является проявлением панической реакцией животных в условиях стресса. При этом нами не было установлено различий с контрольной группой по уровню эмоциональности, которую оценивали по реакциям дефекации и груминга. Данную реакцию относят к «категории комфортного поведения», однако груминг у грызунов является специфической общепризнанной реакцией на стресс [6, 12, 13]. Существенными факторами, определяющими состояние страха и тревожности, являются и показатели дефекации [6, 4, 16]. Поэтому отсутствие изменения данных показателей эмоционального состояния животных после введения Gly-His-Lys на фоне других проявлений ослабления реакции страха требует проведения дальнейших исследований в данном направлении.

Также важно отметить, что полученные данные об анксиолитическом действии пептида Gly-His-Lys являются очередным подтверждением существующих взглядов о полифункциональном характере эффектов регуляторных пептидов [3, 7].

Заключение

Трипептид Gly-His-Lys при внутрибрюшинном введении у крыс по результатам теста «открытое поле» вызывал снижение проявлений страха и тревожности, которое выразилось в повышении ориентировочно-исследовательской активности и ослаблении реакции замирания, в том числе и в центральной части экспериментальной установки. Характер полученных результатов позволяет предполагать наличие у пептида нейротропных эффектов, в том числе анксиолитического.

Список литературы

- 1. Акмаев, И.Г. От нейроэндокринологии к нейроиммуноэндокринологии / И.Г. Акмаев, В.В. Гриневич // Бюл. эксперим. биологии и медицины. - 2001. - Т. 131, №1. -C. 22-32.
- 2. Ашмарин И.П. Гормоны и регуляторные пептиды: различия и сходство понятий и функций. Место гормонов среди других межклеточных сигнализаторов // Российский химический журнал. 2002. Т. 49. №1. С.4-7/
- 3. Ашмарин И.П., Каразеева Е.П. // Успехи физиол наук. 2003. Т. 34, № 1. С. 14-19
- 4. Буреш Я., Бурешова О., Хьюстон Дж. П. Методики и основные эксперименты по изучению мозга и поведения. – М.: Высшая школа, 1991. С. 399/
- 5. Долгинцев М.Е. и др. Система экспериментальны тестов «Этолог» // Патент России № 2009612063. 2009 г.
- 6. Зайченко М.И., Ванециан Г.Л., Мержанова Г.Х. Раз личия в поведении импульсивных и самоконтолирующих крыс при исследовании их в тестах открытого поля и светло-темной камеры // Журнал высшей нервной деятельности. 2011. Т. 61. №3. С.340-350.
- 7. Королева С.В., Мясоедов Н.Ф. // Успехи физиол. наук. 2012. Т. 43, № 3. С. 38-47.

 8. Смахтин М.Ю., Конопля А.И., Северьянова Л.А. и др. // Курск. науч.-практ. вестн. «Человек и его здоровье». 2006. № 3. С 11-17.
- 9. Хавинсон В.Х., Соловьев А.Ю., Тарновская С.И., Линькова Н.С. Механизм биологической активности пептидов проникновение в клетку и эпитенетическая регуляция экспрессии генов // Успехи современной биологии. 2013. Т. 133. №3. С.310-316.
- 10. Ahmed M.R., Basha S.H., Gopinath D. et al. // J Peripher Nerv Syst. 2005. Vol. 10, N 1, P. 17-30.
- 11. Arul V., Kartha R., Jayakumar R. // Life Sci. 2007. Vol. 80, N 4. P. 275-284.
- 12. Barros H.M., Tannhauser S.L., Tannhauser M.A., Tannhauser M. The effect of GABAergic drugs on grooming behavior in the open field // Pharmacol. Toxicol. 1994 Vol. 74, N 6. P. 339-344.
- 13. Celis E.M., Torne E. Measurement of grooming behavior. Methods in Neurosciences. // Paradigms for the study of Behavior. 1993 Vol. 14, P. 359-378.
- 14. Pickart L. // J Biomater Sci Polym Ed. 2008. Vol. 19, N 8 P 969-988
- $15.\,Pyo$ H.K., Yoo H.G., Won C.H. et al. // Arch Pharm Res. 2007. Vol. 30, N 7. P. 834-839.
- 16. Rodgers R.J., Cole J.C., Aboualfa K., Stephenson L.H. Ethopharmacological analysis of the effects of putative 'anxiogenic' agents in the mouse elevated plus maze // Pharmacol. Biochem. 1995 Vol. 52, N 3. P. 1-9.