

I. О. ГАВРИЛОВ, С. Ю. ШТРИГОЛЬ

Національний фармацевтичний університет Міністерства охорони здоров'я України

ДОСЛІДЖЕННЯ АНТИДЕПРЕСАНТНОЇ ТА АКТОПРОТЕКТОРНОЇ АКТИВНОСТІ СИНТЕТИЧНОГО АНАЛОГА КІНЦЕВОЇ ДІЛЯНКИ НЕЙРОПЕПТИДУ Y

Актуальність. Значно поширений в організмі людини нейропептид Y (NPY) відповідає за різноманітні фізіологічні процеси, зокрема бере участь у регуляції емоційної сфери, пам'яті, обміну речовин. Запропонований нами короткий модифікований фрагмент NPY – нонапептид NP9 для інтраназального введення – виявляє певні біологічні властивості нативного пептиду, зокрема ансіолітичну та антиамнестичну дію. Залишається невідомим вплив NP9 на афективні порушення депресивного характеру та на фізичну працездатність.

Мета. Дослідити антидепресантну та актопротекторну активність NP9 на моделях підвищування мишей за хвіст, резерпін-індукованої депресії і плавання з навантаженням.

Матеріали та методи. Антидепресантні властивості NP9 досліджували в іммобілізаційному тесті підвищування мишей за хвіст, на моделі резерпін-індукованої депресії з реєстрацією температури тіла, блефоралтозу та поведінки в тестах примусового плавання за Порсолтом і відкритого поля. Актопротекторні властивості NP9 вивчали в тесті плавання з навантаженням (10% від маси тварини).

Результати та їх обговорення. У тесті підвищування мишей за хвіст NP9 достовірно збільшував латентний час першої іммобілізації порівняно з показниками інтактних тварин (у 3,2 раза) та групи іміпраміну (у 2,7 раза). На прояви резерпін-індукованої депресії NP9 суттєво не впливав. Ці результати свідчать про слабкі антидепресантні властивості NP9. Нонапептид достовірно збільшував час плавання до виснаження у 2,5 раза, що свідчить про актопротекторні властивості, за якими NP9 переважає препарат порівняння «Семакс».

Висновки. У м'якому тесті підвищування мишей за хвіст нонапептид NP9 виявляє дозозалежні антидепресантні властивості вже після першого введення, але на жорсткій резерпін-індукованій моделі депресії цей ефект практично не виявляється. NP9 підвищує фізичну витривалість тварин у тесті плавання з навантаженням та за ефективністю перевершує препарат порівняння «Семакс».

Ключові слова: антидепресанти; актопротектори; нейропептид Y

I. Havrylov, S. Shtrygol'

National University of Pharmacy of the Ministry of Health of Ukraine

The study of the antidepressant and actoprotective activity of a synthetic analog of the terminal region of neuropeptide Y

Topicality. Neuropeptide Y (NPY), which is significantly widespread in the human body, is responsible for various physiological processes, in particular it is involved in the regulation of the emotional behavior, memory and metabolism. The modified short fragment of NPY proposed – NP9 nonapeptide for intranasal administration – shows certain biological properties of the native peptide, in particular the anxiolytic and antiamnesic action. The effect of NP9 on affective disorders of depressive nature and physical endurance remains unknown.

Aim. To study the antidepressant and actoprotective activity of NP9 in models of tail suspension, reserpine-induced depression, and forced weighted swimming.

Materials and methods. The antidepressant properties of NP9 were studied in the immobilization tail suspension test in mice and on a model of reserpine-induced depression with registration of the body temperature, ptosis, and behavior in the Porsolt forced swimming tests and the open field test. The actoprotective properties of NP9 were studied in the swimming test with a load (10 % of the weight of the animal).

Results and discussion. In the tail suspension test, NP9 significantly increased the latent time of the first immobilization compared to the indicators of intact animals (3.2 times) and the imipramine group (2.7 times). NP9 did not significantly affect the manifestations of reserpine-induced depression. These results indicate the weak antidepressant properties of NP9. Nonapeptide significantly increased the swimming time to exhaustion by 2.5 times, indicating actoprotective properties, according to which NP9 exceeded the reference drug Semax.

Conclusions. In the tail suspension test, nonapeptide NP9 exhibits dose-dependent antidepressant properties after the first administration, but this effect is practically not manifested in the rigid reserpine-induced model of depression. NP9 increases the physical endurance of animals in the forced weighted swimming test and is superior to the reference drug Semax by its effectiveness.

Key words: antidepressants; actoprotectors; neuropeptide Y

И. А. Гаврилов, С. Ю. Штрыголь

Національний фармацевтичний університет Міністерства здравоохоронення України

Исследование антидепрессантной и актопротекторной активности синтетического аналога концевой участка нейропептида Y

Актуальность. Значительно распространенный в организме человека нейропептид Y (NPY) отвечает за различные физиологические процессы, в частности участвует в регуляции эмоциональной сферы, памяти, обмена веществ. Предложенный нами короткий модифицированный фрагмент NPY – нонапептид NP9 для интраназального введения – проявляет определенные биологические свойства нативного пептида, в частности анксиолитическое и антиамнестическое действие. Остается неизвестным влияние NP9 на аффективные нарушения депрессивного характера и на физическую работоспособность.

Цель. Исследовать антидепрессантную и актопротекторную активность NP9 на моделях подвешивания мышей за хвост, резерпин-индуцированной депрессии и плавания с нагрузкой.

Материалы и методы. Антидепрессантные свойства NP9 исследовали в иммобилизационном тесте подвешивания мышей за хвост и на модели резерпин-индуцированной депрессии с регистрацией температуры тела, блефоралтоза и поведения в тестах принудительного плавания по Порсолту и открытого поля. Актопротекторные свойства NP9 изучали в тесте плавания с нагрузкой (10 % от массы животного).

Результаты и их обсуждение. В тесте подвешивания мышей за хвост NP9 достоверно увеличивал латентное время первой иммобилизации по сравнению с показателями интактных животных (в 3,2 раза) и группы имипрамина (в 2,7 раза). На проявления резерпин-индуцированной депрессии NP9 существенно не влиял. Эти результаты указывают на слабые антидепрессантные свойства NP9. Нонапептид достоверно увеличивал время плавания до истощения в 2,5 раза, что свидетельствует об актопротекторных свойствах, по которым NP9 превосходит препарат сравнения «Семакс».

Выводы. В мягком тесте подвешивания мышей за хвост нонапептид NP9 проявляет дозозависимые антидепрессантные свойства уже после первого введения, но на жесткой резерпин-индуцированной модели депрессии этот эффект практически не проявляется. NP9 повышает физическую выносливость животных в тесте плавания с нагрузкой и по эффективности превосходит препарат сравнения «Семакс».

Ключевые слова: антидепрессанты; актопротекторы; нейропептид Y

ВСТУП

Нейропептид Y (NPY) – один із найпоширеніших нейропептидів у центральній нервовій системі ссавців. Його біологічна активність реалізується через вплив на Y1, Y2, Y4 та Y5 рецептори, які беруть участь у регуляції великої кількості фізіологічних і патологічних процесів. NPY впливає на енергетичний обмін, емоційну поведінку, циркадні ритми, ноцицепцію, автономну нервову систему тощо [1]. Виявлено високий рівень експресії цього пептиду в гіпокампі та корі великих півкуль головного мозку, ділянках, пов'язаних з афективними порушеннями, що зумовило вивчення причетності NPY до депресивних розладів. Чисельні дослідження на тваринах довели, що агоністи Y1 або антагоністи Y2 рецепторів здатні виявляти антидепресантні властивості [2]. Відомо, що екзогенний NPY або Y1 агоністи позитивно впливають на катехоламінінергічну систему, і цей вплив схожий на дію таких антидепресантів, як імипрамін та флуоксетин – інгібітори зворотного захоплення медіаторних моноамінів [3]. Це може підтверджувати теорію, що дія антидепресантів певною мірою зумовлена стимулюванням системи NPY [4].

Ліганди рецепторів NPY перспективні для фармакотерапії депресії, тривожних розладів, посттравматичного стресового розладу тощо [5]. Але синтез пептидів є складним та дуже коштовним. Ми запропонували економічно прийнятний нонапептид під умовною назвою (NP9) з амінокислотною послідовністю H-L-Ile-L-Asn-L-Leu-L-Nle-L-Ser-L-Arg-L-Asn-L-Arg-L-Tyr-NH₂, що є модифікованим аналогом C-кінцевої ділянки NPY. Ця ділянка є функціонально активним

фрагментом NPY, важливим для зв'язування з рецепторами [6]. Пептид NP9 складається з 9 амінокислотних залишків проти 36 у нативного пептиду NPY, що робить його простішим для хімічного синтезу, контролю якості, дешевшим, а тому доцільним для різнобічного дослідження і подальшого впровадження.

Теоретично запропонований пептид NP9 має принаймні частково виявляти характерну для NPY біологічну активність. При цьому не виключено, що як оригінальна сполука NP9 може мати не пов'язані з системою NPY механізми дії та біологічні ефекти. У попередніх дослідженнях [7] він виявив анксиолітичну дію, яка супроводжувалася підвищенням орієнтовно-дослідницької активності в тестах відкрите поле (ВП) та піднесений хрестоподібний лабіринт. NPY – це фактор стимуляції симпатичного відділу автономної нервової системи, що активується в умовах стресу, таких, як гіпоксія, голод, травми, або в ситуаціях, які є загрозою для життя. Тому припускають, що NPY постає як система фізіологічної адаптації до стресових факторів довкілля [8]. З урахуванням відомостей про антидепресантний вплив NPY метою нашого дослідження було визначити можливі антидепресантні властивості його похідного – нонапептиду NP9, а також, враховуючи здатність NP9 підвищувати локомоторну активність та здатність NPY підвищувати адаптацію до стресу, перевірити наявність актопротекторних властивостей.

МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ

Дослідження виконано на 66 білих нелінійних мишах-самках масою 22-26 г (42 тварини в тесті

підвішування за хвіст та 24 у тесті примусового плавання з навантаженням) та 24 білих нелінійних шурах-самках масою 190-220 г на резерпін-індукованій моделі депресії. Тварин було отримано з віварію ЦНДЛ (НФаУ, Харків). Досліди проводили з дотриманням Європейської конвенції «Про захист хребетних тварин, які використовуються для експериментальних і наукових цілей» (Страсбург, 1986 р.) та «Загальних етичних принципів експериментів на тваринах» (Київ, 2001 р.).

До проведення експерименту тварин утримували у стандартних поліпропіленових клітках з дотриманням 12-годинного режиму освітлення (темнота/світло) за температури повітря 20-26 °С, вологості 50 %, з вільним доступом до їжі та води.

Досліджуваний нонапептид NP9 синтезовано на наше замовлення компанією Shanghai Apeptide Co., Ltd. (China). Розчини пептиду готували безпосередньо перед експериментом шляхом розведення субстанції у 0,9 % розчині NaCl. Розчини готували в 4 концентраціях нонапептиду NP9, які забезпечували введення в дозах 0,04 мг/кг, 0,2 мг/кг, 0,4 мг/кг мишам і 0,2 мг/кг щурам. Останню дозу обрано на підставі міжвидового перерахунку з дози для мишей [9]. Використано інтраназальний (і/н) шлях застосування NP9, що дозволяє уникнути небажаних ефектів пептиду на периферійні органи та запобігти швидкому руйнуванню протеазами шлунка, сироватки крові тощо. Також це дозволяє пептиду безпосередньо потрапляти в ЦНС по периневральних просторах нюхових нервів, минаючи гематоенцефалічний бар'єр, що зумовлює високу церебральну біодоступність [10]. Для і/н введення, яке здійснювали в об'ємі 0,01 мл для мишей та 0,02 мл для щурів, використовували шприц із затупленою голкою.

Препаратом порівняння під час дослідження антидепресантних властивостей був добре вивчений трициклічний антидепресант іміпрамін («Меліпрамін®», EGIS, Угорщина) у дозі 20 мг/кг внутрішньоочеревинно (в/о) для мишей [11] та 15 мг/кг для щурів [12]. Як препарат порівняння для перевірки актопротекторних властивостей використовували синтетичний аналог кортикотропіну семакс («Семакс», «Пептоген», Росія) у розрахунку 0,1 мг/кг і/н. Цей позбавлений гормональної активності препарат чинить стимулювальний вплив на ЦНС. Його обрано з урахуванням пептидної будови (гептапептид *Met-Glu-His-Phe-Pro-Gly-Pro*) та і/н шляху введення.

Антидепресантну активність нонапептиду NP9 визначали на двох моделях – у поведінковому тесті підвішування мишей за хвіст і в нейрофізіологічному тесті на моделі резерпін-індукованої депресії.

Для тесту підвішування за хвіст мишей рандомізували на групи таким чином: 1) інтактні тварини, які отримували 0,9 % розчину NaCl і/н (n = 8); 2) тварини, які отримували NP9 у дозі 0,04 мг/кг і/н (n = 8); 3) тварини, які отримували NP9 у дозі 0,2 мг/кг і/н (n = 8); 4) тварини, які отримували NP9 у дозі 0,4 мг/кг

і/н (n = 8) та 5) тварини, які отримували іміпрамін у дозі 20 мг/кг в/о (n = 10). Реєстрували латентний період першої іммобілізації, загальну тривалість усіх іммобілізацій, їх кількість та середню тривалість одного акту іммобілізації [13].

Поглиблено антидепресантні властивості NP9 вивчали з використанням найбільш ефективної у попередньому досліді дози 0,4 мг/кг, що в перерахунку з мишей на щурів становить 0,2 мг/кг. Дослідження проводили на моделі резерпін-індукованої депресії з використанням резерпіну в дозі 4 мг/кг в/о [12, 14]. Тварин рандомізували на такі рівні за кількістю групи (n = 6): 1) інтактний контроль (0,9 % розчину NaCl і/н); 2) контрольна патологія (КП), тваринам вводили лише резерпін; 3) NP9 + резерпін; 4) іміпрамін + резерпін. Іміпрамін, нонапептид NP9 і фізіологічний розчин вводили тваринам протягом чотирьох днів з інтервалами 24 год. На четвертий день через 30 хв після останнього введення досліджуваних препаратів вимірювали ректальну температуру щурів електронним термометром Dr.Frei T-20, після чого тварини отримували резерпін. Через 4 год після ін'єкції резерпіну повторно вимірювали ректальну температуру та оцінювали виразність блефароптозу за 4-бальною шкалою (0 – відсутність опущення повік, 1 – опущення на 25 %, 2 – опущення на 50 %, 3 – опущення більше ніж на 75 %, 4 – повністю закрите око) [12, 14], потім тестували тварин у ВП з реєстрацією локомоторної активності (кількість перетнутих квадратів), орієнтовно-дослідну активність (кількість вертикальних стійок, заглядань в отвори) та емоційні і вегетативні реакції (грумінг, уринації, дефекації). Після ВП виконували плавальний тест Порсолта (ПТП), у якому реєстрували латентний час першої іммобілізації, загальну тривалість іммобілізації, кількість іммобілізацій та піднярювань тварин.

Актопротекторну дію нонапептиду NP9 визначали в тесті плавання з навантаженням (10 % від маси тіла) [15]. В експерименті використовували 24 білих нелінійних мишей-самок масою 22-26 г, яких випадковим чином розділили на 3 групи. 1 група тварин (інтактний контроль) отримувала розчинник – фізіологічний розчин (n = 8) за 30 хв до тестування. 2 група отримувала нонапептид NP9 у дозі 0,2 мг/кг і/н за 30 хв до тестування (n = 8). 3 група отримувала «Семакс» у дозі 0,1 мг/кг і/н також за 30 хв до експерименту (n = 8). Через 25-30 хв після введення препаратів на корінь хвоста прикріплювали вантаж (10 % маси тварини). Мишей вміщували в басейн з дегазованою (відстояною) водою температури 24 °С. За допомогою секундоміра реєстрували час плавання до виснаження, коли тварина не могла випірнути з води протягом 10 с.

Для статистичного аналізу використовували програмне забезпечення MS Excel та STATISTICA v.12.0 з розрахунком значущості відмінностей за критерієм Стьюдента (t) за нормального розподілу та непараметричними критеріями Манна-Вітні та Краскела-Волліса

за його відсутності. Динаміку внутрішньогрупових змін оцінювали за парним критерієм Вілкоксона. Відмінності вважали статистично значущими за $p \leq 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Як видно з табл. 1, у тесті підвищення за хвіст іміпрамін після одноразового введення мав неоднорідний вплив на тварин. Порівнюючи результати всієї вибірки ($n = 10$) з інтактним контролем, спостерігали характерну тенденцію до зменшення загальної тривалості іммобілізацій на 21 %, кількості епізодів іммобілізації на 19 % та середньої тривалості акту іммобілізації на 24 %, проте латентний час іммобілізації суттєво не змінювався.

Аналіз цих результатів дає підставу виділити середині групи іміпраміну дві протилежні за типом фармакологічної відповіді підгрупи. Перша з них («респондери», $n = 6$) дала типову для дії антидепресантів у використаному тесті відповідь на іміпрамін – статистично значуще збільшення латентного часу першої іммобілізації на 32 % ($p < 0,05$), зменшення загальної тривалості іммобілізацій на 49 % ($p < 0,01$) та середньої тривалості актів іммобілізації на 41 % ($p < 0,01$), але кількість таких актів не змінювалась. Друга підгрупа («нонреспондери», $n = 4$) не виявила виразних ознак зменшення депресивної поведінки під впливом іміпраміну: латентний період першої іммобілізації не мав значущих відмінностей з інтактним контролем, загальна тривалість іммобілізацій навіть зростала на 43 % ($p < 0,05$), а середня тривалість одного епізоду іммобілізації – у 2,1 раза ($p < 0,01$). Антидепресантній дії у цій підгрупі відповідає лише достовірне зменшення кількості епізодів нерухомого зависання проти контролю ($p < 0,05$). Також «нонреспондери» продемонстрували значуще менший від «респондерів» латентний період першої іммобілізації на 47 % ($p < 0,05$) за збільшення загального часу іммобілізації у 2,8 раза ($p < 0,01$) та середньої тривалості одного епізоду іммобілізації у 3,6 раза ($p < 0,01$).

Виявлена неоднорідність відповіді тварин на одноразове введення іміпраміну може пояснюватися особливостями індивідуальної реакції, оскільки відомо, що специфічний антидепресантний ефект здебільшого розвивається поступово за тривалого курсу введення трициклічних препаратів [16]. Саме ця неоднорідність призводить до великої дисперсії кожного показника депресивної поведінки тварин на тлі іміпраміну та пояснює причину лише тенденційного прояву антидепресантної дії у всій групі референтного препарату.

Відповідь тварин на досліджуваний нонапептид NP9 була більш однорідною. У найменшій дозі 0,04 мг/кг він виявив тенденцію до збільшення латентного часу першої іммобілізації на 44 % та загальної тривалості іммобілізації на 8 % за зменшення тривалості одного акту іммобілізації на 28 %. У дозі 0,2 мг/кг пептид NP9 чинив достовірну антидепресантну дію, збільшуючи латентний час першої іммобілізації на 70 % ($p < 0,05$) за майже незмінного загального часу нерухомого зависання тварин та зменшення середньої тривалості кожного його епізоду на 29 %. У дозі 0,4 мг/кг пептид NP9 дуже виразно збільшував латентний час першої іммобілізації – у 3,2 раза ($p < 0,01$), що достовірніше за показник як інтактних тварин, так і мишей групи іміпраміну, при цьому тенденційно на 13 % зменшував загальний час іммобілізації та на 21 % середню тривалість одного її епізоду. Отже, у тесті підвищення мишей за хвіст дозозалежна антидепресантна дія пептиду NP9, на відміну від іміпраміну, спостерігається навіть після одноразового введення у всіх тварин вибірки.

На моделі резерпін-індукованої депресії через 4 год температура тіла щурів групи КП почала знижуватись у середньому на 0,3 °C, що є типовою відповіддю на дію симпатолітика, тоді як в інтактному контролі вона тенденційно збільшилась на 0,4 °C, зростаючи відповідно до хроноритму та коливаючись у межах нормальних значень (табл. 2). На тлі нонапептиду

Таблиця 1

ВПЛИВ НОНАПЕПТИДУ NP9 ТА ІМІПРАМІНУ НА ДЕПРЕСИВНУ ПОВЕДІНКУ МИШЕЙ У ТЕСТІ ПІДВИЩУВАННЯ ЗА ХВІСТ (M [Q1; Q2])

Група, кількість тварин		Латентний період першої іммобілізації, с	Загальна тривалість іммобілізацій, с	Кількість епізодів нерухомого зависання	Середня тривалість одного акту іммобілізації, с
Інтактний контроль (n = 8)		28,5 [23,5; 35]	176 [146,5; 194,5]	8 [7,5; 10]	21,5 [17,2; 26,1]
Іміпрамін, 20 мг/кг	Вся група (n = 10)	33 [21; 40]	139,5 [79; 225]	6,5 [5; 10]	16,4 [10,9; 45]
	Респондери (n = 6)	37,5 [33; 58]* ^{&}	90 [72; 109]* ^{&&}	10 [5; 11]	12,65 [7,2; 15,8]* ^{&&}
	Нонреспондери (n = 4)	20 [16,5; 27]^	253 [218; 289]* ^{^^}	5,5 [5; 6,5]*	45,9 [37,6; 53,1]* ^{^^}
NP9	0,04 мг/кг (n = 8)	41 [30; 54] ^{&}	190,5 [145,5; 219]^ ^{&}	10 [8; 13,5] ^{&&}	15,4 [14,5; 20,5] ^{&&}
	0,2 мг/кг (n = 8)	48,5 [40; 57]* ^{&&}	159,0 [135; 191]^ ^{&&}	9 [8; 11] ^{&&}	15,5 [13,5; 22,1] ^{&&}
	0,4 мг/кг (n = 8)	91,5 [65; 105]* ^{^^&&}	153,5 [122,5; 183]^ ^{&&}	8 [7; 9,5] ^{&}	17 [15,3; 22,6]^ ^{&&}

Примітки. Статистично значущі відмінності з інтактним контролем: * – $p < 0,05$, ** – $p < 0,01$, *** – $p < 0,001$ щодо всієї групи іміпраміну; ^ – $p < 0,05$, ^^ – $p < 0,01$ щодо підгрупи іміпраміну «респондери»; & – $p < 0,05$, && – $p < 0,01$ щодо підгрупи іміпраміну «нонреспондери».

Таблиця 2

ВПЛИВ НОНАПЕПТИДУ NP9 ТА ІМПРАМІНУ НА ТЕМПЕРАТУРУ ТІЛА ЩУРІВ ІЗ МОДЕЛЛЮ РЕЗЕРПІН-ІНДУКОВАНОЇ ДЕПРЕСІЇ (M ± m)

Група, кількість тварин	Ректальна температура, °C		
	Вихідна	Через 4 год	Різниця з вихідним значенням
Інтактний контроль, n = 6	37,6 ± 0,2	37,9 ± 0,1	+0,4 ± 0,2
Контрольна патологія (резерпін), n = 6	37,8 ± 0,1	37,5 ± 0,2	-0,3 ± 0,2
NP9 + резерпін, n = 6	37,8 ± 0,3	37,5 ± 0,3	-0,3 ± 0,2
Іміпрамін + резерпін, n = 6	37,2 ± 0,4	37,1 ± 0,3	-0,1 ± 0,4

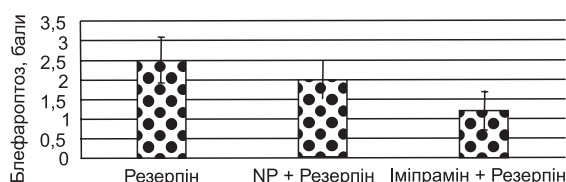


Рис. Вплив нонапептиду NP9 та іміпраміну на блефароптоз щурів із моделлю резерпін-індукованої депресії

NP9, як і в групі КП, спостерігали тенденційне всередині групи зниження температури на 0,3 °C (зміни порівняно з динамікою температури інтактних тварин, виміряної в той же час, становили -0,7 °C, $p < 0,05$), а в групі іміпраміну вона зазнала зниження лише на 0,1 °C (-0,5 °C щодо динаміки синхронного показника інтактного контролю, ця різниця не сягала значущого рівня).

Отже, за критерієм впливу на температуру тіла на резерпіновій моделі нонапептид NP9 не виявив притаманної антидепресантам здатності запобігати гіпотермії. Вплив іміпраміну на цей показник у динаміці був помірним.

Резерпін спричинив типовий блефароптоз (рис.). Іміпрамін та пептид NP9 (0,2 мг/кг) виявили тенденцію до зменшення блефароптозу в середньому відповідно на 52 % та 20 % щодо показника групи КП. На тлі NP9 та іміпраміну відсутні тварини з максимальним блефароптозом (4 бали), тоді як для КП таких тварин було 16,6 %.

У тесті ВП (табл. 3) у тварин групи КП локомоторна активність тенденційно знижувалась щодо по-

казників інтактних тварин на 70 %, орієнтовно-дослідницька активність зменшувалась на 71 % ($p < 0,05$), сума всіх активностей – на 70 % ($p = 0,05$) за майже незмінної суми емоційних реакцій, яка недостовірно збільшувалась на 7 %. Ці зміни є поведінковими маркерами депресивного стану тварин за рахунок виснаження церебрального пулу катехоламінів резерпіном.

На тлі пептиду NP9 локомоторна активність тенденційно знижувалась на 87 %, орієнтовно-дослідницька активність – на 65 %, сума емоційних реакцій – на 17 % (зокрема кількість уринацій – на 70 %, $p < 0,05$), сума всіх активностей – на 74 % ($p = 0,05$). Антидепресант іміпрамін також суттєво не поліпшував стан тварин: під його впливом локомоторна активність зменшилась на 54 %, орієнтовно-дослідницька активність – на 56 %, сума всіх активностей – на 54 %, і лише сума емоційних реакцій, на відміну від ефекту NP9, зросла на 7 %.

На моделі резерпін-індукованої депресії NP9 не впливав на локомоторну активність, несуттєво відновлював орієнтовно-дослідницьку активність і не впливав на суму всіх активностей, але, на відміну від іміпраміну, тенденційно знижував суму емоційних реакцій і достовірно зменшував кількість уринацій на 70 % щодо показника інтактних тварин ($p < 0,05$). Отже, на тлі дії резерпіну NP9 не виявив здатності впливати на маркери відновлення пулу катехоламінів у головному мозку та компенсувати відповідні порушення. Але навіть в умовах цієї жорсткої моделі NP9 редукував емоційні реакції, що відповідає даним щодо протитривожної дії досліджуваного нонапептиду [5].

Таблиця 3

ВПЛИВ НОНАПЕПТИДУ NP9 ТА ІМПРАМІНУ НА ПОВЕДІНКУ ЩУРІВ ІЗ МОДЕЛЛЮ РЕЗЕРПІН-ІНДУКОВАНОЇ ДЕПРЕСІЇ У ТЕСТІ ВІДКРИТОГО ПОЛЯ (M ± m)

Група, кількість тварин	Локомоторна активність	Орієнтовно-дослідницька активність	Емоційні реакції				Сума всіх активностей
			Грумінг	Болюси	Уринації	Сума	
Інтактний контроль, n = 6	37,5 ± 11,6	12,2 ± 3,9	1,3 ± 0,7	0,7 ± 0,3	1,0 ± 0,0	3,0 ± 0,7	49,7 ± 15,1
Контрольна патологія (резерпін), n = 6	11,3 ± 5,3	3,5 ± 1,0*	1,5 ± 0,7	0,8 ± 0,4	0,8 ± 0,2	3,2 ± 1,1	14,8 ± 6,0*
NP9 + резерпін, n = 6	8,5 ± 3,8	4,3 ± 1,3	1,0 ± 0,4	1,2 ± 0,4	0,3 ± 0,2*	2,5 ± 0,7	12,8 ± 4,9*
Іміпрамін + резерпін, n = 6	17,2 ± 7,0	5,3 ± 2,1	1,5 ± 0,7	0,8 ± 0,3	0,8 ± 0,2	3,2 ± 0,8	22,5 ± 9,1

Примітка. * – статистично значущі відмінності з інтактним контролем ($p \leq 0,05$).

Таблиця 4

**ВПЛИВ НОНАПЕПТИДУ NP9 ТА ІМПРАМІНУ НА ПОКАЗНИКИ ПЛАВАЛЬНОГО ТЕСТУ ПОРСОЛТА
У ЩУРІВ З МОДЕЛЛЮ РЕЗЕРПІН-ІНДУКОВАНОЇ ДЕПРЕСІЇ (M ± m)**

Група, кількість тварин	Латентний час іммобілізації, с	Загальна тривалість іммобілізації, с	Кількість іммобілізацій	Середня тривалість іммобілізації, с	Пірнання
Інтактний контроль, n = 6	110,4 ± 7,8	72,0 ± 12,0	8,17 ± 0,48	9,0 ± 1,2	1,33 ± 0,61
Контрольна патологія (резерпін), n = 6	69,6 ± 17,4	127,8 ± 22,8	4,67 ± 0,49**	29,4 ± 7,8**	0,83 ± 0,31
NP9 + резерпін, n = 6	78,0 ± 10,8 ^{&}	110,4 ± 15,0*	4,83 ± 0,31**	24,0 ± 4,2*	1,33 ± 0,49
Іміпрамін + резерпін, n = 6	114,6 ± 9,6 [#]	89,4 ± 17,4	4,00 ± 0,26**	22,2 ± 3,0**	0,67 ± 0,33

Примітка. Статистично значущі відмінності: * – p < 0,05, ** – p < 0,01 щодо інтактного контролю; # – p < 0,05 щодо КП; & – p < 0,05 щодо групи іміпраміну.

У ПТП, як видно з табл. 4, депресогенна дія резерпіну в групі КП виявлялася зменшенням латентного часу іммобілізації на 37 %, збільшенням загальної тривалості іммобілізації на 78 % та середньої тривалості іммобілізації у 3,2 раза (p < 0,01) за зниження кількості епізодів нерухомості на 43 % (p < 0,01).

На тлі іміпраміну відбувалось статистично значуще поліпшення окремих показників: латентний час іммобілізації зростав до рівня інтактних тварин, перевершуючи показник КП на 65 % (p < 0,05), при цьому загальна тривалість нерухомого стану зменшувалась щодо КП на 24 % без суттєвих змін кількості іммобілізації (табл. 4). Але середня тривалість одного акту іммобілізації майже не змінювалась, залишаючись вищою за таку в групі КП у 2,5 раза (p < 0,01). Це, як і обговорений вище незначний вплив на динаміку температури тіла та блефароптоз (табл. 2, рис.), свідчить про неповноту антидепресантного ефекту іміпраміну.

Під впливом NP9 виявлено слабку тенденцію до зниження депресогенної дії резерпіну. Латентний час настання нерухомого стану зменшився на 29 % проти 37 % у групі КП, а загальна та середня тривалість іммобілізацій збільшилась щодо інтактного контролю відповідно на 53 % (p < 0,05) проти 78 % у групі КП та у 2,7 раза (p < 0,05) проти 3,2 раза у КП (табл. 4).

Варто зауважити, що, за даними табл. 4, тварини всіх груп, які отримували резерпін, продемонстрували приблизно однакову значуще меншу кількість епізодів іммобілізації щодо показника інтактних щурів (p < 0,01), що пояснюється значним збільшенням середньої тривалості таких епізодів і припиненням тваринами спроб врятуватися.

Окрім зазначених параметрів, у цьому досліді визначали менш застосований показник – кількість пірнань щурів (спроб досліджень дна ємності) як маркер когнітивної активності, тобто спроб знайти альтернативний шлях до вивільнення. Ця поведінкова парадигма подібна тій, яку спостерігають у тесті екстраполяційного вивільнення. У групі КП цей показник тенденційно зменшувався на 38 % як ілюстрація притаманної депресії безпорадності. Нонапептид NP9

збільшував кількість спроб на 38 % відносно КП до рівня інтактних щурів та мав переваги перед іміпраміном, на тлі якого кількість пірнань була навіть дещо меншою, ніж у тварин групи КП, на 50 % поступаючись показникові інтактного контролю (табл. 4).

Резерпін-індукована депресія є жорсткою моделлю депресії з виснаженням запасів катехоламінів у мозку. Навіть класичний добре вивчений трициклічний антидепресант іміпрамін після 4-денного застосування не зміг повністю компенсувати викликані резерпіном порушення. Пептид NP9, який виявив антидепресантну активність навіть після одноразового введення у м'якому тесті підвішування за хвіст, на моделі виснаження церебрального пулу катехоламінів після 4-денного курсу не спричинив помітного впливу. Хоча супутні психотропні властивості NP9 – вже відоме [5] зниження емоційних реакцій (тривожності), поліпшення когнітивних функцій – спостерігались навіть в умовах жорсткої резерпінової моделі. Розбіжності між ефектами іміпраміну та NP9 можуть бути пов'язані з відсутністю в досліджуваного нонапептиду виразного впливу на обмін катехоламінів. Для пептидних препаратів характерна висока біологічна активність у мікро- або наноконцентраціях, тому нонапептид NP9 досліджується в емпірично визначеному діапазоні доз від 0,04 до 0,4 мг/кг, і в подальшому доцільно з'ясувати його вплив на перебіг модельної депресії у вищих дозах. Можна констатувати слабку антидепресантну активність пептиду NP9, яка може бути корисним доповненням потужної анксиолітичної та ноотропної дії.

У тесті плавання з навантаженням (табл. 5) час настання виснаження у тварин групи «Семаксу» (0,1 мг/кг) був у 2 рази більший, ніж в інтактному контролі (p < 0,05). Нонапептид NP9 у дозі 0,2 мг/кг статистично значуще збільшував цей час щодо інтактного контролю у 2,5 раза (p < 0,01) та у вигляді тенденції порівняно з ефектом «Семаксу» (на 24 %). Отже, нонапептид NP9 підвищує фізичну витривалість в ускладнених умовах функціонування, тобто виявляє виразну актопротекторну активність.

ВПЛИВ НОНАПЕПТИДУ NP9 І «СЕМАКСУ» НА ФІЗИЧНУ ВИТРИВАЛІСТЬ МИШЕЙ У ТЕСТІ ПЛАВАННЯ З НАВАНТАЖЕННЯМ

Група, кількість тварин	Час плавання до виснаження, хв	
	M ± m	M [Q1; Q2]
Інтактний контроль (n = 8)	10,6 ± 1,6	10,4 [8,3; 15,4]
«Семакс», 0,1 мг/кг (n = 8)	22,5 ± 4,8*	19,3 [17,5; 24,9]*
NP9, 0,2 мг/кг (n = 8)	27,9 ± 5,1**	25,9 [16,6; 39,1]**

Примітка. Статистично значущі відмінності з інтактним контролем: * – p < 0,05; ** – p < 0,01.

З'ясування нейрохімічних механізмів психотропних ефектів нонапептиду NP9 є завданням подальшого етапу досліджень.

Отримані в описаних дослідах результати поглиблюють знання про нонапептид NP9 як про потенційний анксиолітик зі слабкими антидепресантними та виразними актопротекторними властивостями, що обґрунтовує можливу сферу його застосування, а також можуть бути корисними для подальшої розробки модифікованих фрагментів NP9.

ВИСНОВКИ

1. У поведінковому тесті підвищення інтактних мишей за хвіст нонапептид NP9 за інтраназального введення в діапазоні доз 0,04-0,4 мг/кг чинить

дозозалежний антидепресантний ефект, який, на відміну від дії іміпраміну (20 мг/кг), є стабільним і розвивається вже після одноразового введення. На жорсткій моделі резерпін-індукованої депресії у щурів цей ефект майже не виявляється навіть після 4-денного курсу введення, що свідчить про відсутність виразного стимулювального впливу досліджуваного пептиду на обмін церебральних моноамінів на тлі їх виснаження симпатолітиком.

2. У тесті плавання з навантаженням до виснаження нонапептид NP9 (0,2 мг/кг) значно підвищує фізичну витривалість. Його актопротекторна активність вища, ніж у пептидного препарату порівняння «Семакс».

Конфлікт інтересів: відсутній.

ПЕРЕЛІК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ ІНФОРМАЦІЇ

1. Reichmann F, Holzer P. Neuropeptide Y. A stressful review. *Neuropeptides*. 2015. Vol. 55. P. 99–109. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.npep.2015.09.008>.
2. Morales-Medina J, Dumont Y, Quirion R. A possible role of neuropeptide Y in depression and stress. *Brain Research*. 2010. Vol. 1314. P. 194–205. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2009.09.077>.
3. Crespi F. Influence of Neuropeptide Y and antidepressants upon cerebral monoamines involved in depression: An in vivo electrochemical study. *Brain Research*. 2011. Vol. 1407. P. 27–37. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2011.05.033>.
4. Search for biological correlates of depression and mechanisms of action of antidepressant treatment modalities. Do neuropeptides play a role? / A. Mathé et al. *Physiology & Behavior*. 2007. Vol. 92, Iss. 1-2. P. 226–231. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.physbeh.2007.05.016>.
5. Brothers S., Wahlestedt C. Therapeutic potential of neuropeptide Y (NPY) receptor ligands. *EMBO Molecular Medicine*. 2010. Vol. 2, Iss. 11. P. 429–439. DOI: <https://doi.org/10.1002/emmm.201000100>.
6. Pedragosa-Badia X., Stichel J., Beck-Sickinger A. Neuropeptide Y receptors: how to get subtype selectivity. *Frontiers in endocrinology*. 2013. Vol. 4. DOI: <https://doi.org/10.3389/fendo.2013.00005>.
7. Загайко А. Л., Гаврилов І. О., Литкін Д. В. Дослідження впливу низькомолекулярного аналога нейропептиду Y на поведінкові реакції щурів. *Клінічна фармація*. 2019. Т. 23. № 4. С. 30–36. URL: <http://dspace.nuph.edu.ua/handle/123456789/20638>.
8. Kienast C., Gunga H.-C., Steinach M. Neuropeptide Y – Its role in human performance and extreme environments. *REACH*. 2019. № 14-15. P. 100032. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.reach.2019.100032>.
9. Nair A., Jacob S. A simple practice guide for dose conversion between animals and human. *Journal Of Basic And Clinical Pharmacy*. 2016. Vol. 7, Iss. 2. P. 27–31. DOI: <https://doi.org/10.4103/0976-0105.177703>.
10. Meredith M. E., Salameh T. S., Banks W. A. Intranasal Delivery of Proteins and Peptides in the Treatment of Neurodegenerative Diseases. *AAPS J*. 2015. Vol. 17. P. 780–787. DOI: <https://doi.org/10.1208/s12248-015-9719-7>.
11. Metabolomic identification of biochemical changes induced by fluoxetine and imipramine in a chronic mild stress mouse model of depression / J. Zhao et al. *Scientific Reports*. 2015. № 5. P. 1–8. DOI: <https://doi.org/10.1038/srep08890>.
12. The Antidepressant-like Activity of the New Tetrapeptide Neuroprotector KK-1, Homologous of ACTH15-18 Sequence / R. D. Deiko et al. *Journal of Depression Therapy*. 2016. Vol. 1, Iss. 3. P. 10–17. URL: <http://dspace.nuph.edu.ua/handle/123456789/14273>.
13. The Tail Suspension Test / A. Can et al. *Journal of Visualized Experiments*. 2011. № 59. P. e3769. DOI: <https://doi.org/10.3791/3769>.
14. Vogel H. G. Drug Discovery and Evaluation: Pharmacological Assays. 3-rd ed. Berlin Heidelberg New York : Springer-Verlag, 2007. 2071 с.
15. Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных веществ. Ч. 1 / Под ред. А. Н. Миронова и др. Москва : Гриф и К, 2012. 944 с.
16. Про затвердження та впровадження медико-технологічних документів зі стандартизації медичної допомоги при депресії : Наказ МОЗ України від 25.12.2014 № 1003. *Офіційний вебпортал парламенту України*. URL: <https://zakon.rada.gov.ua/rada/show/v1003282-14#Text>.

REFERENCES

1. Reichmann, F., Holzer, P. (2015). Neuropeptide Y: A stressful review. *Neuropeptides*, 55, 99–109. doi: <https://doi.org/10.1016/j.npep.2015.09.008>.
2. Morales-Medina, J. C., Dumont, Y., Quirion, R. (2010). A possible role of neuropeptide Y in depression and stress. *Brain Research*, 1314, 194–205. doi: [10.1016/j.brainres.2009.09.077](https://doi.org/10.1016/j.brainres.2009.09.077).
3. Crespi, F. (2011). Influence of Neuropeptide Y and antidepressants upon cerebral monoamines involved in depression: An in vivo electrochemical study. *Brain Research*, 1407, 27–37. doi: [10.1016/j.brainres.2011.05.033](https://doi.org/10.1016/j.brainres.2011.05.033).
4. Mathé, A. A., Husum, H., Khoury, A. E., Jiménez-Vasquez, P., Gruber, S. H. M., Wörtwein, G., Angelucci, F. (2007). Search for biological correlates of depression and mechanisms of action of antidepressant treatment modalities. Do neuropeptides play a role? *Physiology & Behavior*, 92 (1-2), 226–231. doi: [10.1016/j.physbeh.2007.05.016](https://doi.org/10.1016/j.physbeh.2007.05.016).

5. Brothers, S., Wahlestedt, C. (2010). Therapeutic potential of neuropeptide Y (NPY) receptor ligands. *EMBO Molecular Medicine*, 2 (11), 429–439. doi: 10.1002/emmm.201000100.
6. Pedragosa-Badia, X., Stichel, J., Beck-Sickinge, A. G. (2013). Neuropeptide Y receptors: how to get subtype selectivity. *Frontiers in endocrinology*, 4. doi: 10.3389/fendo.2013.00005.
7. Zagayko, A., Havrylov, I., Lytkin, D. (2019). The study of the effect of the low molecular analog of neuropeptide Y on behavioral reactions in rats. *Clinical Pharmacy*, 23 (4). 30–36. doi: 10.24959/cphj.19.1509.
8. Kienast, C., Gunga, H.-C., Steinach, M. (2019). Neuropeptide Y – Its role in human performance and extreme environments. *REACH*, 14–15, 100032. doi: 10.1016/j.reach.2019.100032.
9. Nair, A., Jacob, S. (2016). A simple practice guide for dose conversion between animals and human. *Journal Of Basic And Clinical Pharmacy*. 7 (2), 27. doi: 10.4103/0976-0105.177703.
10. Meredith, M., Salameh, T., Banks, W. (2015). Intranasal Delivery of Proteins and Peptides in the Treatment of Neurodegenerative Diseases. *AAPS J*. 17 (4), 780–787. doi: 10.1208/s12248-015-9719-7.
11. Zhao, J., Jung, Y., Jang, C., Chun, K., Kwon, S., Lee, J. (2015). Metabolomic identification of biochemical changes induced by fluoxetine and imipramine in a chronic mild stress mouse model of depression. *Scientific Reports*, 5 (1). doi: <https://doi.org/10.1038/srep08890>.
12. Deiko, R., Shtrygol, S., Kolobov, A., Simbirtsev, A., Mishchenko, M. (2017). The Antidepressant Activity Of The New Tetrapeptide Neuroprotector Kk-1, Homologous Of Acth15-18 Sequence (An Experimental Study). *Journal Of Depression And Therapy*, 1 (3), 10–17. doi: <https://doi.org/10.14302/issn.2476-1710.jdt-16-1346>.
13. Can, A., Dao, D. T., Terrillion, C. E., Piantadosi, S. C., Bhat, S., Gould, T. D. (2011). The Tail Suspension Test. *Journal of Visualized Experiments*, 58. doi: 10.3791/3769.
14. Vogel, H. (2008). *Drug Discovery and Evaluation: Pharmacological Assays*. 3rd ed. Berlin Heidelberg New York: Springer-Verlag, 2071.
15. Mironov, A. (Ed.). (2012). *Guidelines for pre-clinical drug research. Part 1*. 1st ed. Moscow: Grif and K, 944.
16. MOZ Ukrainy. (2014). Nakaz vid 25.12.2014 № 1003 «Pro zatverdzhennia ta vprovadzhennia medyko-tekhnologichnykh dokumentiv zi standartyzatsii medychnoi dopomohy pry depresii». *zakon.rada.gov.ua*. Available at: <https://zakon.rada.gov.ua/rada/show/v1003282-14#Text>.

Відомості про авторів:

Гаврилов І. О., аспірант кафедри фармакології та фармакотерапії, Національний фармацевтичний університет Міністерства охорони здоров'я України. E-mail: gavrilov.i.ok@gmail.com. ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-3483-1729>
Штриголь С. Ю., доктор мед. наук, професор, завідувач кафедри фармакології та фармакотерапії, Національний фармацевтичний університет Міністерства охорони здоров'я України. E-mail: shtrygol@ukr.net. ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-7257-9048>

Information about authors:

Havrylov I., postgraduate student of the Pharmacology and Pharmacotherapy Department, National University of Pharmacy of Ukraine of the Ministry of Health of Ukraine. E-mail gavrilov.i.ok@gmail.com. ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-3483-1729>
Shtrygol' S., Doctor of Medicine (Dr. habil.), professor, head of the Pharmacology and Pharmacotherapy Department, National University of Pharmacy of the Ministry of Health of Ukraine. E-mail: shtrygol@ukr.net. ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-7257-9048>

Сведения об авторах:

Гаврилов И. А., аспирант кафедры фармакологии и фармакотерапии, Национальный фармацевтический университет Министерства здравоохранения Украины. E-mail: gavrilov.i.ok@gmail.com. ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-3483-1729>
Штриголь С. Ю., доктор мед. наук, профессор, заведующий кафедрой фармакологии и фармакотерапии, Национальный фармацевтический университет Министерства здравоохранения Украины. E-mail: shtrygol@ukr.net. ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-7257-9048>

Надійшла до редакції 20.01.2021 р.