

УДК 615.032

3.3.6 Фармакология, клиническая фармакология

DOI: 10.37903/vsgma.2025.3.3 EDN: BYYSPK

ОЦЕНКА ТРАНСПОРТИРОВКИ КИССПЕПТИНА ЧЕРЕЗ ГЕМАТОЭНЦЕФАЛИЧЕСКИЙ БАРЬЕР ПОСЛЕ ИНTRANАЗАЛЬНОГО ВВЕДЕНИЯ**© Литвинова М.В., Лебедев А.А., Бычков Е.Р., Шабанов П.Д.***Институт экспериментальной медицины, Россия, 197022, Санкт-Петербург, ул. Акад. Павлова, 12**Резюме*

Цель. Оценить эффективность кисспептина-10 при транспортировке через ГЭБ после интраназального введения.

Методика. В работе использовали 45 беспородных мышей. Животные получали кисспептин-10 интраназально в дозах 0,1, 1 и 10 мкг; кисспептин-10 в дозах 1, 10, 100 мкг внутрибрюшинно (в/б). Поведение животных исследовали с помощью тестов «открытое поле», «приподнятый крестообразный лабиринт» и «половая мотивация».

Результаты. В настоящем исследовании были получены стабильные и дозозависимые эффекты кисспептина-10 на поведение крыс после интраназального введения. Интраназальный кисспептин-10 вызывал достоверное повышение половой мотивации, повышение горизонтальной и вертикальной двигательной активности, уменьшение стресса и увеличение исследовательской активности у половозрелых самцов крыс. Наибольшие изменения в поведении вызывала дозировка 10 мкг, оказывая центральное действие на мозг после интраназального введения в сравнении с группами животных после в/б введения. В то время как показатели после в/б введения кисспептина-10 практически не вызывали изменений в поведении при дозах 1 и 10 мкг. Повышение дозировки до 100 мкг в/б показывало достоверное изменение в поведении, однако не такое сильное, как после интраназального введения вещества в количестве 10 мкг.

Заключение. Для достоверного изменения поведения при интраназальном пути введения требовались концентрации в 10 раз меньше, чем при в/б введении. Исходя из очевидных эффектов кисспептина-10 после интраназального введения в каждом teste, можно предположить, что кисспептин-10 проникал в мозг, минуя ГЭБ и оказывал центральное действие. Данные подтверждают потенциальную возможность и значимость данного способа доставки вещества в ЦНС.

Ключевые слова: кисспептин, интраназальное введение, гематоэнцефалический барьер, центральная нервная система, стратегии доставки лекарственных средств в центральную нервную систему, половая мотивация, приподнятый крестообразный лабиринт, открытое поле, поведенческий тест, половое поведение

EVALUATION OF THE TRANSPORTATION OF KISSPEPTINS THROUGH A BLOOD-BRAIN BARRIER AFTER INTRANASAL ADMINISTRATION**Litvinova M.V.¹, Lebedev A.A.¹, Bychkov E.R.¹, Shabanov P.D.¹***Institute of Experimental Medicine, 12, Acad. Pavlov St., 197022, St. Petersburg, Russia**Abstract*

Objective. The aim was to assess efficiency of Kisspeptin -10 during transportation through a GEB after intranasal administration.

Methods. The study used 45 outbred mice. The first group of experimental animals was not exposed to any effect – an intact group. In the second, third and fourth group, animals received kisspeptin-10 intranasally in doses of 0.1, 1 and 10 µg, respectively. In the fifth, sixth and seventh group, experimental animals received kisspeptin-10 in doses of 1, 10, 100 µg intra-abdominal in the amount of 0.2 ml, respectively. In the eighth group, animals received a physiological solution of intranasally 20 µl, the ninth group of animals received a physiological solution intra -abdominal 0.2 ml. The behavior of animals was studied using the tests “Open Field”, “Raised Cross Labyrinth” and “Sexual Motivation”.

Results. In the present study stable and dose-dependent effects of kisspeptin-10 on the behavior of rats after intranasal administration were obtained. Intranasal kisspeptin-10 caused a significant increase in sexual motivation, an increase in horizontal and vertical motor activity, a decrease in stress, and an increase in exploratory activity in sexually mature male rats. The greatest changes in behavior were caused by a dosage of 10 µg and the central effect of kisspeptin-10 on the brain after intranasal administration in comparison with groups of animals after intraperitoneal administration. While the indicators after intraperitoneal administration of kisspeptin-10 caused virtually no changes in behavior at doses of 1 and 10 µg. Increasing the dosage to 100 µg intraperitoneally showed a significant change in behavior, but not as strong as after intranasal administration of the substance in an amount of 10 µg.

Conclusions. To significantly change behavior, intranasal administration required concentrations 10 times lower than intraperitoneal administration. Based on the apparent effects of kisspeptin-10 after intranasal administration in each test, it can be assumed that kisspeptin-10 penetrated into the brain, bypassing the BBB and exerting a central effect. The data confirm the potential and significance of this method of delivering the substance to the central nervous system.

Keywords: kisspeptin, intranasal administration, blood-brain barrier, central nervous system, strategies for the delivery of drugs to the central nervous system, sexual motivation, elevated plus maze, open field, behavioral test, sexual behaviour

Введение

Заболевания центральной нервной системы (ЦНС) являются основной причиной заболеваний во всем мире и в настоящее время приобретают все большую актуальность из-за роста численности населения, увеличения продолжительности жизни и пандемии COVID-19 [8]. Данные расстройства, в том числе неопластические, нейродегенеративные (болезнь Паркинсона и Альцгеймера) и психические расстройства (депрессия, шизофрения и биполярное расстройство) сложно поддаются лечению фармакологическими методами из-за гематоэнцефалического барьера (ГЭБ). ГЭБ-микроциркуляторная система головного мозга, которая жестко регулирует движение ионов, молекул и клеток между плазмой крови и мозгом [4].

Хотя ГЭБ служит для защиты мозга от токсинов и патогенов, он также создает существенное препятствие для доставки терапевтических средств, поскольку 98% малых молекул и почти 100% крупных молекул не могут проникнуть в мозг [9]. Таким образом, сохраняется потребность в разработке инновационных стратегий, которые помогут доставлять терапевтические средства в мозг для лечения заболеваний ЦНС [1]. Интраназальная (ИН) доставка все чаще рассматривается как альтернативный подход к доставке терапевтических средств в ЦНС для лечения сопутствующих заболеваний. Интраназальный путь имеет несколько преимуществ при доставке лекарственного средства по сравнению с традиционным пероральным введением: ИН путь обходит основные фармакокинетические препятствия, обычно связанные с пероральной доставкой лекарственного средства в ЦНС, включая pH желудочно-кишечного тракта, ферменты, эффект первого прохождения в печени, почечная фильтрация и ГЭБ [2]; носовой эпителий обеспечивает оптимальную поглощающую поверхность для доставки лекарственного средства, благодаря его высокой проницаемости, неплотному межклеточному функциональному комплексу и обширной васкуляризации [10]; пути обонятельного и тройничного нервов, которые иннервируют эпителий носа, обеспечивают прямой путь к мозгу, что приводит к повышению терапевтической биодоступности ЦНС, уменьшению побочных эффектов, снижению дозы и быстрому наступлению эффекта [4]; и с точки зрения ухода за пациентами, ИН путь является неинвазивным, простым для самостоятельного введения и лучше подходит для пациентов с двигательными расстройствами, симптомами тошноты, нарушением функции желудочно-кишечного тракта и/или дисфункцией слюнных желез (сухость во рту).

Одним из перспективных и неизученных семейств с точки зрения интраназальной доставки является семейство пептидов, кодируемых геном kiss1-кисспептины [3, 7]. Один из возможных механизмов действия связывают с тем, что нейроны кисспептина взаимодействуют с нейронами, синтезирующими оксид азота в вентромедиальном гипоталамусе, выступая центральным регуляторным узлом гипоталамо-гипофизарной репродуктивной оси [6]. Экспрессия кисспептина была выявлена в лимбической системе, что делает его участником не только репродуктивной функции, но и возможным регулятором поведенческих, эмоциональных и когнитивных реакций [5]. На сегодняшний день нет ни одного фундаментального исследования, оценивающего возможность применения интраназального пути введения для кисспептинов.

Целью работы явился анализ кисспептина-10 на транспортировку его через ГЭБ при интраназальном введении. Задачами было оценить влияние различных доз кисспептина-10 после интраназального и в/б введений на поведение экспериментальных животных

Методика

В работе использовали 45 беспородных мышей массой 20-30 г, полученных из питомника Рапполово (Ленинградская область). Животных содержали в стандартных пластмассовых клетках в условиях вивария при свободном доступе к воде и пище в условиях инвертированного освещения с 8.00 до 20.00 при температуре $22\pm2^{\circ}\text{C}$. Поведение животных исследовали с помощью тестов «открытое поле», «приподнятый крестообразный лабиринт» и «половая мотивация».

Тест «приподнятый крестообразный лабиринт». Данный тест выполняется для выявления тревожного поведения у экспериментальных животных. Беспородных мышей помещали в центр экспериментальной камеры – крестообразного лабиринта, который состоит из 4 рукавов длиной 30 см и шириной 6 см, соединенных под прямым углом. Два рукава имеют с 2 сторон стенки высотой 30 см, а 2 других открыты и освещены рассеянным искусственным светом. Лабиринт расположен на подставке высотой 40 см над уровнем пола. В течение 5 мин систематически проводили визуальную регистрацию следующих параметров: время нахождения в освещенных рукавах; количество выходов из темных рукавов в освещенные; время, которое мыши проводили на центральной площадке; количество свешиваний с открытых рукавов.

Тест «открытое поле». Данным тестом исследовали свободную двигательную активность животных. Конструкция представляла собой круглую площадку диаметром 80 см, ограниченную по окружности непрозрачными стенами высотой 30 см. По всей площади открытого поля равномерно расположены 16 ходов (норок). Диаметр отдельной норки составлял 3 см каждая. Они предназначены для выявления элемента исследовательской активности у крыс (норковый рефлекс). Освещенность открытого поля равнялась 100 лк. Продолжительность одного опыта составляла 5 мин. На основании характерологического поведенческого атласа для грызунов извлекали ряд двигательных актов и поз, совокупность которых характеризует целостное поведение в «открытом поле». Для определения ориентировочной реакции мышь помещали в открытое поле, пол которого разделен на секторы. Подсчитывали число вставаний на задние лапы (вертикальная составляющая ориентировочной реакции), число пересечений квадратов (горизонтальная компонента), количество обнюхиваний (исследовательская компонента), груминг, фризинг и болюсные выделения, а также число заглядываний в отверстия в полу (норковое поведение, отражающее исследовательскую активность) за 5 мин. наблюдения.

Для оценки половой мотивации использовали установку, состоящую из 4 экспериментальных камер ($15\times30\text{ см}^2$), к каждой из которых прилегала стимулирующая клетка, разделенная проницаемой стенкой [11]. Перфорированная перегородка позволяла самцам крыс исследовать (обонять) потенциального партнера (самку в стадии эструса) в камере, но препятствовала тактильному взаимодействию или копуляции. За день до тестирования мотивационного поведения все экспериментальные животные были адаптированы к условиям установки в течение 30 минут. Поведение регистрировали в форме видеозаписи в темной комнате при красном свете в течение 10 минут. Между экспозициями установку и перегородку очищали 3%-ным раствором перекиси водорода для устранения запаха. Для измерения половой мотивации для каждого животного фиксировали число попыток достичь самку, время, проведенное вблизи перегородки и латентное время до начала реакции на самку.

В работе был использован кисспептин-10 (Sigma, США), который разводили в дистиллированной воде для 3 доз: 0,1 мкг в 20 мкл 1 мкг в 20 мкл и 10 мкг в 20 мкл и вводили интраназально. Для внутрибрюшинного (в/б) введения применяли кисспептин-10 в дозах 1 мкг на 0,2 мл, 10 мкг на 0,2 мл и 100 мкг на 0,2 мл. Контролем служил 0,9 % раствор хлорида натрия. За 10-15 мин до посадки в установки для оценки поведения, крысам интраназально и в/б вводили кисспептин-10.

Оценку статистической достоверности различий проводили при помощи пакета программ GraphPad Prism 8.3.4. с использованием однофакторного дисперсионного анализа. Для сравнения контрольной и экспериментальных групп применяли однофакторный дисперсионный анализ ANOVA. Из непараметрических критериев использовали критерий Краскела-Уоллиса для сравнения групп. Различия считали статистически значимыми при значении $p < 0,05$. Для представления полученных данных использовали такие показатели описательной статистики, как среднеарифметическое значение и ошибка среднего.

Результаты исследования

При изучении половой мотивации у каждого животного фиксировалось время, проведенное вблизи перегородки и латентное время до начала реакции на самку. Первая группа экспериментальных животных не подвергалась никакому воздействию – интактная группа. Во второй, третьей и четвертой группе животные получали кисспептин-10 интраназально в дозах 0,1, 1 и 10 мкг (в 20 мкл, по 10 мкл в каждую ноздрю) соответственно. В пятой, шестой и седьмой группе экспериментальные животные получали кисспептин-10 в дозах 1, 10, 100 мкг в/б в объеме 0,2 мл соответственно. В восьмой группе животные получали физиологический раствор интраназально 20 мкл (10 мкл в каждую ноздрю) (ложно интраназальная группа), девятая группа животных «ложно в/б группа» получала физиологический раствор в/б 0,2 мл. Контрольное латентное время до начала реакции самца на самку составило $9,1 \pm 1,0$ с. Интраназальное введение кисспептина-10 достоверно сократило латентное время. При введении 1 мкг кисспептина латентное время достоверно отличалось от интактной группы мышей ($p \leq 0,05$) и составило $4,0 \pm 0,4$ сек., а при введении 10 мкг латентное время уменьшалось до $3,4 \pm 0,4$, по сравнению с интактной группой ($p \leq 0,01$). Внутрибрюшинное введение кисспептина-10 только максимальной дозировке достоверно сократило латентное время ($p \leq 0,05$) по сравнению с интактной группой и составило $4,1 \pm 0,5$ с (табл.). Остальные дозировки в/б введения кисспептина-10 (1 и 10 мкг) достоверно не изменяли контрольное латентное время. Интраназальное и в/б введения физиологических растворов достоверных изменений по сравнению с интактной группой не показало, что говорит о том, что уровень тревожности у животных значительно не повысился и манипуляции проведены правильно. Таким образом, интраназально введенный кисспептин-10 в дозировке 1 мкг вызывал уменьшение времени до начала реакции, как и при в/б введении, но при дозировке, в 10 раз превышающей интраназальную.

Таблица. Поведение животных в teste «половая мотивация» по показателю после интраназального и внутрибрюшинного (в/б) введений физиологического раствора и кисспептина-10 ($M \pm m$)

| Группа | Интактные | Физ. р. в/б | Физ. р. интраназально | Кисспептин интраназально, 0,1 мкг | Кисспептин интраназально 1 мкг | Кисспептин интраназально, 10 мкг | Кисспептин в/б, 1 мкг | Кисспептин в/б, 10 мкг | Кисспептин в/б, 100 мкг |
|--------------------|----------------|----------------|-----------------------|-----------------------------------|--------------------------------|----------------------------------|-----------------------|------------------------|-------------------------|
| Латентное время, с | $9,1 \pm 1,0$ | $8,3 \pm 1,1$ | $8,5 \pm 1,4$ | $6,7 \pm 1,1$ | $4,0 \pm 0,4^*$ | $3,4 \pm 0,4^{**}$ | $8,7 \pm 1,1$ | $8,0 \pm 1,3$ | $4,1 \pm 0,5^*$ |
| Число попыток | $13,5 \pm 1,0$ | $14,0 \pm 1,2$ | $12,5 \pm 1,2$ | $13,4 \pm 1,2$ | $22,2 \pm 2,0^*$ | $22,8 \pm 1,8^{**}$ | $11,1 \pm 1,2$ | $13,0 \pm 2,2^{##}$ | $15,7 \pm 2,1$ |

Примечание: * – $p \leq 0,05$, ** – $p \leq 0,01$ - различие между группой с введением кисспептина-10 и интактной группой; ## – $p \leq 0,01$, различие между интраназально введенным кисспептином и в/б введенным кисспептином одной дозировкой

Следующая задача эксперимента в исследовании полового поведения у крыс самцов заключалась в определении количества попыток достижения самки самцом у перегородки. Каждая экспериментальная группа получала аналогичные препараты, как и в предыдущем исследовании. Количество попыток достижения самки самцом у перегородки в интактной группе составило $13,5 \pm 1,0$. Интраназальное введение кисспептина-10 достоверно ($p \leq 0,05$ и $p \leq 0,01$ соответственно) увеличило количество попыток достижения самки самцом у перегородки в дозировках 1 и 10 мкг по сравнению с интактной группой и составило $22,2 \pm 2,0$ и $22,8 \pm 1,8$ с. Внутрибрюшинное введение кисспептина-10 в дозировке 100 мкг недостоверно увеличило количество попыток достижения самки самцом у перегородки по сравнению с интактной группой и составило $15,7 \pm 2,1$ с. При сравнении групп мышей после интраназального и в/б введений кисспептина было установлено достоверное увеличение количества подходов к самке почти вдвое по сравнению с в/б группой при одинаковой дозировке 10 мкг. Таким образом, интраназальное введение кисспептина-10 в дозировках 1 и 10 мкг увеличило в 1,5 раза ($22,2 \pm 2,0$ и $22,8 \pm 1,8$ с) количество попыток достижения самки самцом у перегородки по сравнению с интактной группой ($13,5 \pm 1,0$ с). Внутрибрюшинное введение кисспептина-10 в дозировках 1 и 10 мкг не повлияло на количество попыток достижения самки самцом у перегородки по сравнению с интактной группой. Интраназальное и в/б введение физиологического раствора достоверных изменений по сравнению с интактной группой не показало и составило $12,5 \pm 1,2$ и $14,0 \pm 1,2$ соответственно, что говорит о том, что уровень тревожности у животных значительно не повысился и манипуляции введения проведены правильно. Интраназально введенный кисспептин-10 достоверно увеличил количество попыток достижения самки самцом у перегородки в двух дозировках 1 и 10 мкг, в то время как в/б введение даже 100 мкг не вызвало достоверных изменений по данному показателю. Кисспептин-10 заметно усиливает предпочтение крыс самцов к самкам после интраназального введения. Интраназальное введение кисспептина-10 оказалось влияние на половое поведение крыс-самцов, уменьшив

латентное время до начала реакции на самку и увеличив количество попыток достижения самки в концентрациях в 10 раз меньше необходимых при в/б введении. Доза 100 мкг при в/б введении оказалась недостаточно эффективной для изменения поведения мышей в тесте «половая мотивация».

Тест «приподнятый крестообразный лабиринт». При интраназальном введении кисспептина-10 во всех трех дозировках наблюдалось увеличение числа перебежек по сравнению с интактной группой животных, однако достоверное увеличение было в группах после введения кисспептина-10 1 мкг и 10 мкг, что говорит об уменьшении тревожности и повышении исследовательской активности у группы крыс после интраназального введения кисспептина-10 (рис. 1).

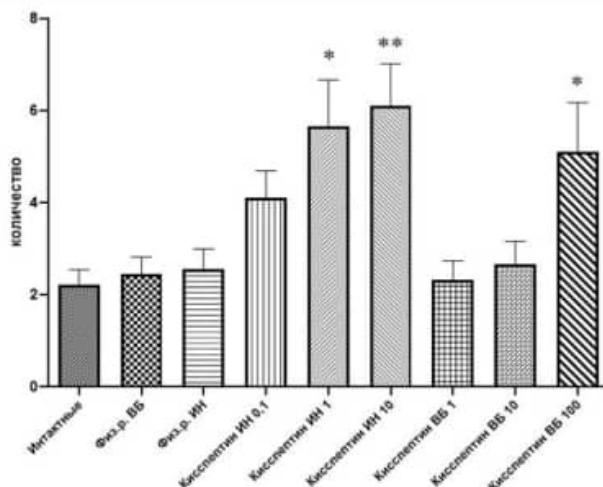


Рис. 1. Количество перебежек между рукавами в тесте «приподнятый крестообразный лабиринт». Здесь и в других рисунках: интактные – интактная группа; физ. р. ВБ – физ. раствор в/б; физ.р. ИН – физ. раствор интраназально; кисспептин ИН 0,1 – 0,1 мкг интраназально; кисспептин ИН 1 – 1 мкг интраназально; кисспептин ИН 10 – 10 мкг интраназально; кисспептин ВБ 1 – 1 мкг в/б; кисспептин ВБ 10 – 10 мкг в/б; кисспептин ВБ 100 – 100 мкг в/б. Различия между интактными и экспериментальными животными: * – $p \leq 0,05$, ** – $p \leq 0,01$

После интраназального введения кисспептина-10 в количестве 1 мкг количество перебежек увеличилось с $2,2 \pm 0,3$ у интактной группы до $5,7 \pm 1,0$. После интраназального введения кисспептина-10 в количестве 10 мкг количество перебежек достоверно увеличилось до $6,1 \pm 0,9$. Прослеживался дозозависимый эффект после введения кисспептина-10 интраназально. Различий в количестве перебежек у группы интраназального введения физиологического раствора ($2,5 \pm 0,4$) и в/б введения физиологического раствора ($2,4 \pm 0,3$) и интактной группой ($2,2 \pm 0,3$) обнаружено не было. Внутрибрюшинное введение кисспептина в дозах 1 и 10 мкг достоверных изменений по сравнению с интактной группой не показало и составило $2,0 \pm 0,3$. При повышении дозировки до 100 мкг в/б наблюдалось достоверное увеличение перебежек до $5,1 \pm 1,1$ по сравнению с интактной группой. Следующим оцениваемым показателем было время, проведенное в открытых рукавах.

При интраназальном введении кисспептина-10 в двух дозировках наблюдалось увеличение времени в открытых рукавах по сравнению с интактной группой животных, в то время как в/б введение вызвало эффект лишь при одной дозировке (рис. 2). Достоверное увеличение показателя было в группах после введения 1 мкг кисспептина, которое составило $32,8 \pm 5,4$ с по сравнению с интактной группой $15,1 \pm 2,1$ с.

При введении 10 мкг кисспептина интраназально, время, проведенное в открытых рукавах, достоверно увеличивалось до $35,8 \pm 6,0$ по сравнению с интактной группой $15,1 \pm 2,1$ с. При в/б введении кисспептина достоверные изменения наблюдались только при максимальной дозировке, показав увеличение времени в открытых рукавах до $32,5 \pm 2,5$ по сравнению с интактной группой $15,1 \pm 2,1$ с. Остальные группы – интраназального и в/б введений физиологического раствора, в/б введения 1 и 10 мкг кисспептина, а также интраназальное введение кисспептина-10 в дозе 1 мкг достоверных изменений по сравнению с интактной группой не показало.

При оценке показателя количество свешиваний с рукава было обнаружено, что интраназальное введение 1 и 10 мкг кисспептина-10 вызывали достоверное увеличение в связи с возможным уменьшением уровня стресса и повышением исследовательской и двигательной активностей.

Показатель после интраназального введения средней дозировки увеличился до $4,1 \pm 0,3$ (1 мкг), а после максимальной дозировки (10 мкг)- до $4,4 \pm 0,5$, по сравнению с интактной группой $1,7 \pm 0,2$. Кисспептин-10, вводимый в/б в количестве 100 мкг также вызывал достоверное изменение в поведении, увеличив количество свешиваний до $4,4 \pm 0,5$ по сравнению с интактной группой. Можно предположить, что дозировка 1 мкг при интраназальном введении и 1 и 10 мкг при в/б введении являются неэффективными, поскольку не вызывали изменений в поведении. Дозировка 10 мкг при интраназальном введении фармакологического агента вызывала достоверные изменения по всем оцениваемым параметрам, как и после в/б введения 100 мкг. Таким образом, для достоверного изменения поведения мышей в тесте приподнятый крестообразный лабиринт кисспептина-10 потребовалось в 10 раз меньше, чем при в/б введении. По остальным оцениваемым показателям – время в закрытых рукавах и число актов груминга достоверных различий между группами выявлено не было.

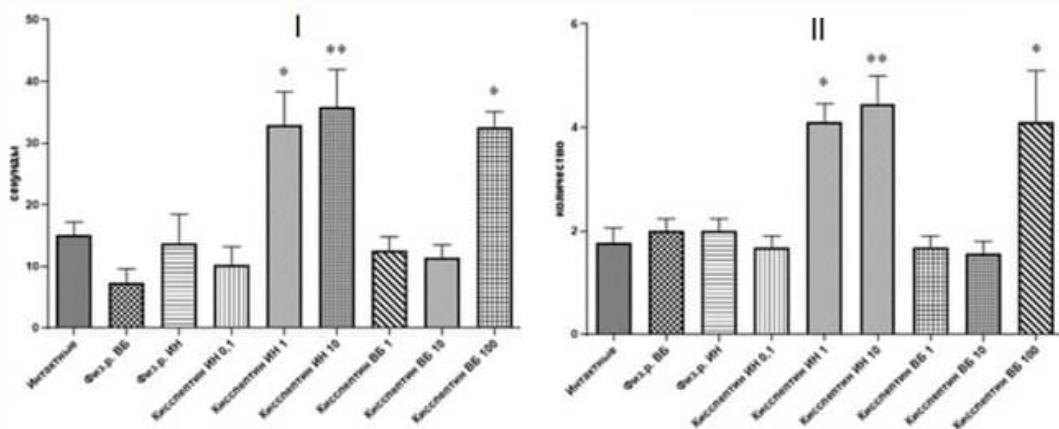


Рис. 2. Результаты теста «приподнятый крестообразный лабиринт». I – оцениваемый параметр: время, проведенное в открытых рукавах; II – оцениваемый параметр: количество свешиваний с рукава.

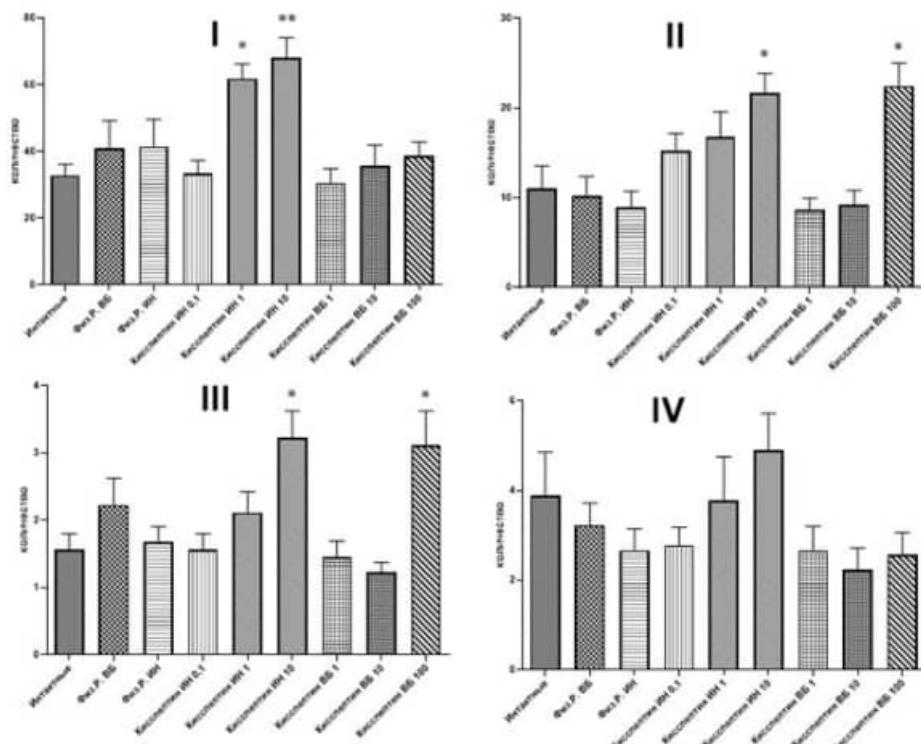


Рис. 3. Результаты теста «открытое поле» по показателям обнюхивание (I), локомоция (II), вертикальные стойки (III) и стойки с упором (IV).

Тест «открытое поле». По литературе известно, что нейроны кисспептина-10 локализуются в заднедорсальной медиальной миндалине головного мозга, которая в свою очередь отвечает за эмоциональное поведение и мотивацию полового поведения, а также функционально связана со страхом и тревогой. Поэтому, было проведено исследование влияния интраназального кисспептина-10 на эмоционально-исследовательское и двигательное поведение у крыс самцов. Результаты исследования поведения самцов крыс в тесте «Открытое поле» представлены на рис. 3 и 4.

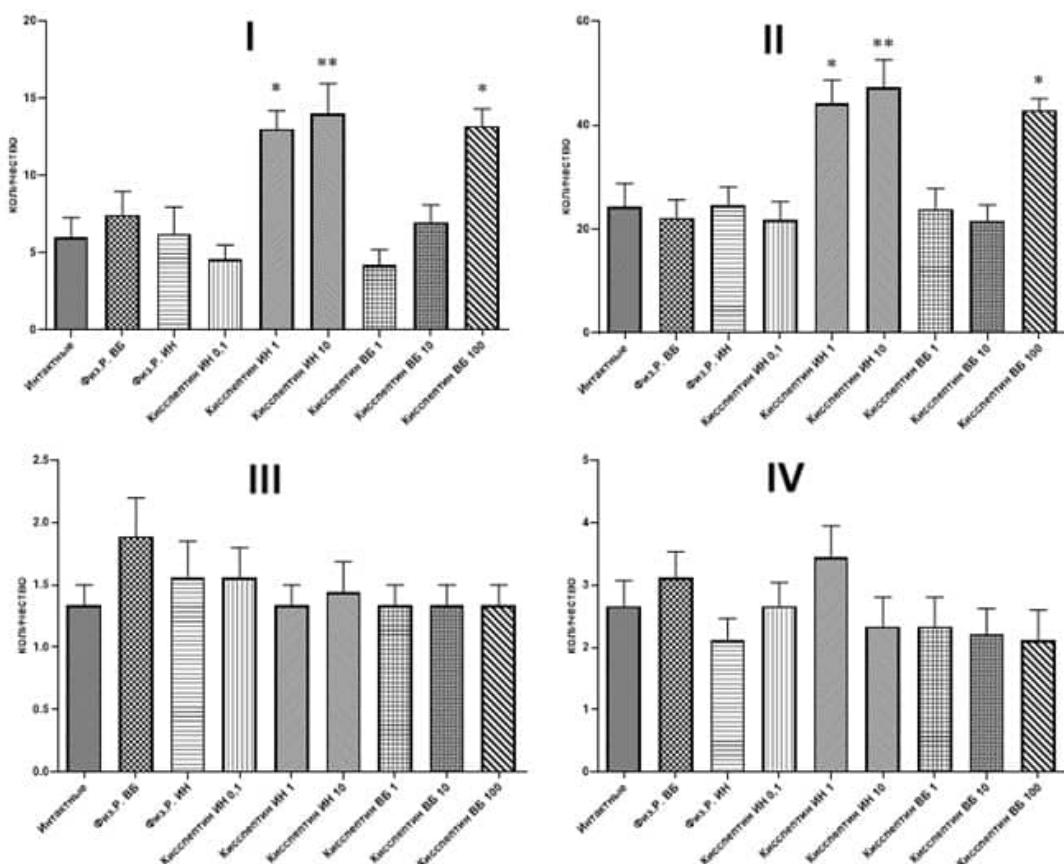


Рис. 4. Результаты теста «открытое поле» по показателям исследование норок (I), пересеченные квадраты (II), количество болюсов (III) и груминг (IV)

У группы животных, которым вводили интраназально 1 мг кисспептина-10, наблюдалось небольшое увеличение горизонтальной двигательной активности (возрастание количества пересеченных квадратов) по сравнению с интактной группой, увеличение исследовательской активности: достоверно увеличивалось количество обнюхиваний ($p \leq 0,05$), количество исследованных норок ($p \leq 0,05$) и пересеченных квадратов ($p \leq 0,05$) по сравнению с интактной группой. Выявлено, что после интраназального введения 10 мкг кисспептина-10 у животных наблюдалось достоверное увеличение исследовательской деятельности (увеличение количества исследований норок ($p \leq 0,01$), обнюхиваний ($p \leq 0,01$), вертикальных стоек ($p \leq 0,05$), пересеченных квадратов ($p \leq 0,01$)) по сравнению с интактной группой.

У групп животных интраназального и в/б введения физиологического раствора достоверных различий с интактной группой ни по одному параметру обнаружено не было. При определении параметров стоек с упором, груминга и количества болюсов достоверных различий экспериментальные группы не показали.

Поведение животных, которым вводили кисспептин-10 в дозах 1 и 10 мкг достоверно не изменялось ни по одному параметру. Внутрибрюшинное введение 100 мкг кисспептина-10 характеризуется достоверным увеличением горизонтальной активности, вертикальных стоек, исследований норок и пересеченных квадратов ($p \leq 0,05$), по сравнению с интактными мышами. Остальные показатели не показали достоверных отличий от интактной группы.

Таким образом, эмоционально-исследовательское и двигательное поведения после интраназального введения кисспептина-10 изменялись достоверно и дозозависимо, по сравнению с интактной группой. Внутрибрюшинное введение кисспептина-10 в дозировке в 10 раз превышающей дозировку при интраназальном введении достоверно меньше влияло на поведение животных, что указывает на эффективность интраназального метода доставки кисспептина-10 в ЦНС в более низких дозах по сравнению с в/б способом введения.

Обсуждение результатов исследования

В работе впервые показана принципиальная возможность доставки кисспептина-10 в ЦНС при помощи интраназального введения, а также дозозависимость исследованного эффекта препарата. Это подтверждается увеличением горизонтальной и вертикальной двигательной активности (возрастание количества пересеченных квадратов, обнюхиваний, исследований норок) в тесте «Открытое поле» после введения 1 мкг исследованного вещества интраназально по сравнению с интактной группой. При увеличении концентрации кисспептина-10 до 10 мкг достоверно изменяются дополнительно к вышеперечисленным показателям горизонтальная активность и стойки с упором ($p \leq 0,01$).

В то время как в/б введение кисспептина-10 в дозировках 1 и 10 мкг достоверных различий не продемонстрировало, а введение 100 мкг оказало влияние на показатели норки, пересеченные квадраты, вертикальные стойки и горизонтальная активность по сравнению с интактными мышами ($p \leq 0,05$). Таким образом, тестирование в открытом поле продемонстрировало достоверное повышение исследовательской и двигательной активности у крыс после интраназального введения исследуемого вещества и увеличение эффекта при увеличении дозы. Группа крыс после в/б введения вещества показала достоверные различия в тесте по 4 показателям из 8, в то время как интраназальное введение в дозировке в 10 раз меньше показало изменения по 5 показателям из 8 с большей достоверностью.

В teste «приподнятый крестообразный лабиринт» при интраназальном введении кисспептина-10 0,1 мкг достоверных изменений не наблюдалось. При введении 1 мкг интраназально было отмечено достоверное увеличение двух показателей: времени, проведенного в открытых рукавах и количества свешивания с рукава ($p \leq 0,05$) по сравнению с интактными мышами. После введения 10 мкг исследуемого вещества, наблюдались изменения по трем показателям: количество перебежек между рукавами, время в открытых рукавах и количество свешивания с рукава ($p \leq 0,01$), что указывает на дозозависимый эффект кисспептина-10. Наиболее эффективной концентрацией оказалась 10 мкг.

Внутрибрюшинное введение 1 и 10 мкг кисспептина-10 не влияло на поведение животных, однако введение 100 мкг вызывало увеличение времени проведения в открытых рукавах, количество свешивания и количество перебежек между рукавами ($p \leq 0,05$), данные эффекты сопоставимы интраназальному введению кисспептина в дозировке 1 мкг. Увеличение данных показателей опосредовано уменьшением тревожности и/или повышением исследовательской активности у группы крыс после интраназального введения кисспептина-10. По остальным оцениваемым показателям время в закрытых рукавах и число актов груминга достоверных различий между группами выявлено не было. Таким образом, кисспептин, доставляемый интраназальным методом доставки проникает в ЦНС, в результате чего достоверно изменял поведение в teste приподнятый крестообразный лабиринт. Эффекты кисспептина-10 при в/б введении сопоставимы интраназальному введению кисспептина в дозировке 1 мкг. Наибольший эффект вызывает интраназальное введение кисспептина в дозировке 10 мкг.

В teste «Половая мотивация» оба исследуемых показателя продемонстрировали изменения у группы мышей после интраназального метода доставки кисспептина-10. Интраназальное введение фармакологического агента достоверно сократило латентное время и увеличило количество попыток достижения самки самцом у перегородки в дозе 1 мкг ($p \leq 0,05$) и 10 мкг ($p \leq 0,01$) соответственно по сравнению с интактной группой.

Что касается в/б введения, достоверные изменения наблюдались только после введения 100 мкг и только по одному показателю. Наблюдалось уменьшение латентного времени ($p \leq 0,05$) по сравнению с интактной группой мышей. Действие кисспептина после в/б введения может быть связано с его опосредованным влиянием на половое поведение или проникновением части вещества в центральные структуры. Таким образом, можно предположить, что кисспептин-10 при интраназальном введении проникал в мозг и оказывал центральное действие, за счет чего вызывал повышение половой мотивации у половозрелых самцов крыс по обоим параметрам. Кисспептин-10 заметно усиливал предпочтение крыс самцов к самкам, в то время как в/б введение

киссептина-10 показало изменение по одному из параметров. Результаты настоящего исследования демонстрируют возможность доставки киссептина в мозг после интраназального введения.

Таким образом, в каждом из трех поведенческих тестов наблюдались достоверные изменения после интраназального введения киссептина-10, который проявлял дозозависимый эффект. В то время как показатели после в/б введения киссептина-10 практически не вызывали изменений в поведении при дозах 1 и 10 мкг. Повышение дозировки до 100 мкг в/б показывало достоверное изменение в поведении, однако не такое сильное, как после интраназального введения вещества в количестве 10 мкг. Суммируя, можно предположить, что интраназальный метод доставки можно рассматривать в качестве метода доставки исследуемых веществ в ЦНС, минуя ГЭБ и заслуживает дальнейшего изучения. Интраназальный метод доставки требовал более низких доз фармацевтического агента для достижения эффектов.

Заключение

Интраназальный путь доставки имеет множество преимуществ и заслуживает дальнейшего изучения. Одним из главных преимуществ метода является обход ГЭБ. В настоящем исследовании впервые было продемонстрировано центральное действие киссептина-10 на мозг после интраназального введения, в сравнении с группами животных после в/б введения, а также введения физиологического раствора аналогичными способами, и показана дозозависимость наблюдаемого эффекта. Были получены стабильные и дозозависимые эффекты киссептина-10 на поведение крыс после интраназального введения. Интраназальный киссептин-10 вызывал достоверное повышение половой мотивации, повышение горизонтальной и вертикальной двигательной активности, уменьшение стресса и увеличение исследовательской активности у половозрелых самцов крыс. Исходя из очевидных эффектов киссептина-10 после интраназального введения в каждом teste, можно предположить, что киссептин-10 проникал в мозг, минуя ГЭБ и оказывал центральное действие. Данные подтверждают потенциальную возможность и значимость данного способа доставки для регуляции полового поведения и для воздействия процессы эмоциональной природы (например, уменьшение тревожности).

Вторым преимуществом интраназального пути доставки является низкая дозировка активного вещества. В данной работе использовали 3 дозы киссептина-10 интраназально, которые меньше в/б доз в 10 раз. Даже высокая концентрация вещества не показала значительных изменений в поведении при в/б введении, в отличие от интраназального введения.

Создание интраназальных лекарственных препаратов для лечения заболеваний ЦНС - перспективное направление современной фармакологии, но на пути стоит ряд проблем, ограничивающих его применение, это и невозможность интраназального введения некоторых препаратов, и сложность в обеспечении стабильной концентрации интраназальных препаратов, и сложность точного дозирования. В связи с этим, существует большая необходимость в фундаментальных исследованиях интраназального метода доставки.

Источник финансирования

Государственное задание по теме НИР FGWG-2025-0020 «Поиск молекулярных мишней для фармакологического воздействия при аддиктивных и нейроэндокринных нарушениях с целью создания новых фармакологически активных веществ, действующих на рецепторы ЦНС».

Литература (references)

1. Литвинова М.В., Тиссен И.Ю., Лебедев А.А. и др. Анализ действия окситоцина на центральную нервную систему при различных путях введения // Психофармакология и биологическая наркология. – 2023. – Т.14. – №2. – С. 139-148. [Litvinova M.V., Tissen I.Y. i dr. *Psihofarmakologiya I biologicheskaya narkologiya. Psychopharmacology and biological narcology.* – 2023. – V.14. – N2. – P. 139-148. (in Russian)]
2. Литвинова М.В., Трофимов А.Н., Шабанов П.Д. и др. Молекулярные механизмы транспорта веществ через гематоэнцефалический барьер как мишени для фармакологического воздействия. Часть 2. Современные способы доставки фармакологических агентов в центральную нервную систему // Формулы Фармации. – 2022. – Т.4., №3. – С. 82-96. [Litvinova M.V., Trofimov A.N., Shabanov P.D.,

- Lebedev A.A., Bychkov E.R., Arseniev N.A., Tyukavin A.I. *Formuly Farmacii. Pharmacy Formulas.* – 2022. – V.4., N3. – P. 82-96. (in Russian)]
3. Тиссен И.Ю., Чепик П.А., Лебедев А.А. и др. Условная реакция предпочтения места киссцептина-10 // Обзоры по клинической фармакологии и лекарственной терапии. – 2021. – Т.19. – №1. – С. 47-53. [Tissen I.Y., Chepik P.A., Lebedev A.A. i dr. *Obzory po klinicheskoy farmakologii i lekarstvennoj terapii. Reviews on Clinical Pharmacology and Drug Therapy.* – 2021. – V.19. – N1. – P. 47-53. (in Russian)].
4. Трофимов А.Н., Литвинова М.В., Шварц А.П. и др. Молекулярные механизмы транспорта веществ через гематоэнцефалический барьер как мишени для фармакологического воздействия. Часть 1. Структурно-функциональная организация ГЭБ Ф – 2022. – Т.4. – №2. – С. 60-69. [Trofimov A.N., Litvinova M.V., Schwarz A.P. i dr. *Formuly Farmacii. Pharmacy Formulas.* – 2022. – V.4. – N2. – P. 60-69. (in Russian)]
5. Edouard G.A., Mills K.T., Comninos A.N. Kisspeptin as a behavioral hormone // Seminars in Reproductive Medicine. – 2019. – V.37. – N2. – P. 56-63.
6. Hellier V., Brock O., Candlish M. et al. Female sexual behavior in mice is controlled by kisspeptin neurons // Nature communications. – V.9. – N1, – P. 400-402
7. Magaramova L., Tissen I., Blazhenko A. et al. Kisspeptin is Testosterone independent regulator of Sexual Motivation in Male Rats. // Journal of Experimental Biology and Agricultural Sciences. – 2022. – V.10. – N1. – P. 131-134.
8. Pfeferbaum B., North C.S. Mental health and the Covid-19 pandemic // The New England Journal of Medicine. – 2020. – V.383. – N6. – P. 510-512.
9. Profaci C.P., Munji R.N., Pulido R.S., Daneman R. The blood-brain barrier in health and disease: important unanswered questions // Journal of Experimental Medicine. – 2020. – V.3. – N1. – P. 80-85.
10. Veronesi M.C., Alhamami M., Miedema S.B. et al. Imaging of intranasal drug delivery to the brain // American Journal of Nuclear Medicine and Molecular Imaging. – 2020. – V.10. – N1. – P. 1-31.
11. Zhukov I.S., Ptukha M.A., Zolotoverkhaja E.A. et al. Evaluation of Approach to a Conspecific and Blood Biochemical Parameters in TAAR1 Knockout Mice // Brain Sciences. – 2022. – V.12. – N5. – P. 614.

Информация об авторах

Литвинова Мария Владимировна – аспирант отдела нейрофармакологии им. С.В. Аничкова Института экспериментальной медицины. E-mail: litvinova-masha@bk.ru

Лебедев Андрей Андреевич – доктор биологических наук, профессор, заведующий лабораторией общей фармакологии им. С.В. Аничкова Института экспериментальной медицины. E-mail: aalebedev-iem@rambler.ru

Бычков Евгений Рудольфович – доктор медицинских наук, заведующий лабораторией химии и фармакологии лекарственных веществ Института экспериментальной медицины. E-mail: bychkov@mail.ru

Шабанов Петр Дмитриевич – доктор медицинских наук, профессор, заведующий кафедрой фармакологии Военно-медицинской академии им. С.М. Кирова Министерства Обороны России, заведующий отделом нейрофармакологии им. С.В. Аничкова Института экспериментальной медицины. E-mail: pdshabanov@mail.ru

Конфликт интересов: авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила 01.06.2025

Принята к печати 25.09.2025