

УДК 57.084+001.891.53+577.171.5+591.3/5+612.014.4-092.9
DOI: 10.56871/RBR.2023.62.82.004

ВЛИЯНИЕ КИСПЕПТИНА НА ПОВЕДЕНИЕ КРЫС-САМЦОВ В ТЕСТЕ «ОТКРЫТОЕ ПОЛЕ»

© Виталий Сергеевич Полетаев, Алиса Ильинична Шпильберг, Алексей Николаевич Инюшкин

Самарский национальный исследовательский университет имени академика С.П. Королева, биологический факультет. 443086, г. Самара, ул. Московское шоссе, 34

Контактная информация: Виталий Сергеевич Полетаев — аспирант кафедры физиологии человека и животных. E-mail: vit4014@yandex.ru
ORCID ID: 0009-0000-8979-1379

Для цитирования: Полетаев В.С., Шпильберг А.И., Инюшкин А.Н. Влияние кисспептина на поведение крыс-самцов в тесте «Открытое поле» // Российские биомедицинские исследования. 2023. Т. 8. № 1. С. 27–31. DOI: <https://doi.org/10.56871/RBR.2023.62.82.004>

Поступила: 09.11.2022

Одобрена: 15.01.2023

Принята к печати: 27.02.2023

Резюме. Цель работы — изучить характер поведенческих реакций крыс в тестовых заданиях при интраназальном введении кисспептина. Проанализировать влияние кисспептина на структуру поведения крыс в тесте «Открытое поле». В процессе работы использованы методы исследования: тестирование крыс в тесте «Открытое поле», методы математической статистики. В результате работы определено, что кисспептин оказывает модулирующее влияние на поведенческие реакции крыс в новых (стрессогенных) условиях. В проведенном исследовании с использованием тестовой установки «Открытое поле» получены новые данные об особенностях поведения крыс в условиях фармакологической активации кисспептинергических рецепторов. Отмечено, что кисспептин активизирует двигательную, исследовательскую активность, обладает противотревожным эффектом и положительно влияет на процессы пространственной памяти. Результаты, представленные в данной статье, позволяют уточнить механизмы гормонального действия рецепторов кисспептина на исследовательские реакции, уровень тревожности и память.

Ключевые слова: кисспептин; поведение; открытое поле; крысы; вертикальная двигательная активность; тревожный груминг; кисспептинергические рецепторы (GPR54).

THE EFFECT OF KISSPEPTIN ON THE BEHAVIOR OF MALE RATS IN THE «OPEN FIELD» TEST

© Vitaliy S. Poletaev, Alisa I. Shpilberg, Alexey N. Inyushkin

Samara National Research University named after Academician S.P. Koroleva, Department of Biology. St. Moscow highway, 34, Samara, Russian Federation, 443086

Contact information: Vitaliy S. Poletaev — postgraduate student of the Department of Human and Animals. E-mail: vit4014@yandex.ru
ORCID ID: 0009-0000-8979-1379

For citation: Poletaev VS, Shpilberg AI, Inyushkin AN. The effect of kisspeptin on the behavior of male rats in the «Open field» test. Russian biomedical research (St. Petersburg). 2023; 8(1): 27-31. DOI: <https://doi.org/10.56871/RBR.2023.62.82.004>

Received: 09.11.2022

Revised: 15.01.2023

Accepted: 27.02.2023

Abstract. The aim of the work is to study the nature of the behavioral reactions of rats in test tasks with intranasal administration of kisspeptin. To analyze the effect of kisspeptin on the behavioral response of rats in the «Open Field» test. In the process of work, research methods were used: testing rats in the «Open Field» test, methods of mathematical statistics. As a result of the work, it was determined that kisspeptin affects the behavioral responses of rats in new (stressful) conditions. In the experiment conducted with the use of the Open Field test setup, new data were obtained on the behavioral characteristics of rats under conditions of pharmacological activation of kisspeptin-energy receptors. It is noted that kisspeptin activates motor, exploratory activity, causes an anti-anxiety effect and the likelihood of cases

of memory infection. The results presented in this article indicate a high frequency of hormonal effects of kisspeptin receptors on exploratory responses, anxiety levels, and memory.

Key words: kisspeptin; behavior; open field; rats; vertical motor activity; anxious grooming; kisspeptinergic receptors (GPR54).

ВВЕДЕНИЕ

Кисспептин (КП) является нейрогормоном, ответственным за начало полового созревания и дальнейшую регуляцию репродуктивной функции [8]. В 2001 году стало известно, что пептидные продукты этого гена проявляют свою биологическую активность с помощью связывания с G-белок-сопряженным рецептором — GPR54. Этот рецептор был клонирован в 1999 году. Пептиды Кисс-1 были названы кисспептинами [5, 8, 10].

Кисспептин относится к семейству нейропептидов, которые кодируются геном *Kiss1*. У человека ген *Kiss1* находится на хромосоме 1q32, кодирует 144 аминокислотных остатка и имеет четыре экзона [11]. Этот пептид расщепляется в 54-аминокислотный пептид, известный как kisspeptin-54. Существуют также более короткие пептиды, которые имеют общее с kisspeptin-54 RF-амидированные основания, такие как kisspeptin-10, -13 и -14 [3, 9].

Кисспептину принадлежит связанный с G-белком рецептор GPR54, который имеет высокий процент гомологии с галактин-рецептором (44–45%). GPR54 мРНК экспрессируется в головном мозге, в том числе в гипоталамусе [6], и в различных других органах, таких как гипофиз, плацента, поджелудочная железа [10] и яичники [2]. Связывание Kiss-1r с Kiss-1 пептидом приводит к активации G-белок-активированной фосфолипазы C (PLC β), что свидетельствует о G q/11 опосредованном сигнальном пути [7]. Эти сигнальные молекулы, в свою очередь, выступают в качестве посредника высвобождения внутриклеточного Ca²⁺ и активации протеинкиназы C. КП стимулирует секрецию гонадолиберина (ГЛ) путем активации катионных каналов и ингибирования выхода калия из каналов с помощью DAG и/или Ca²⁺.

Исследование механизмов функционирования репродуктивной системы, влияние половых гормонов на функции центральной нервной системы (ЦНС) и организацию поведения является одной из актуальных задач физиологии. В 1999 году открыт новый гипоталамический фактор — кисспептин, играющий ключевую роль в запуске и в последующем контроле функционирования гипоталамо-гипофизарно-гонадной системы (ГГГС). В частности, установлено включение данного нейропептида в контроль выработки ГЛ. Выявлено развитие гипоталамической формы гипогонадизма при недостаточном функционировании кисспептинергической системы. Данные обстоятельства указывают на возможное использование КП при коррекции нарушений половой функции [4].

На данный момент малоизученным является вопрос об участии кисспептина в регуляции адаптивного поведения (двигательной активности, пространственной памяти, тревожного груминга).

Настоящее исследование посвящено изучению особенностей влияния поведения крыс в условиях активации кисспептинергических рецепторов мозга на различные компоненты целостного поведения лабораторных крыс.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Эксперимент проводился на 20 половозрелых самцах крыс линии Wistar. Животных содержали в отдельной комнате на стандартном сбалансированном рационе.

На первом этапе осуществляли приучение животных к рукам в течение 14 дней.

На втором этапе нашего исследования изучали особенности поведенческого статуса крыс в зависимости от функционального состояния рецепторов к кисспептину. С этой целью формировали опытную группу крыс, которым интраназально в объеме 10 мкл в каждый носовой вход вводили активатор кисспептинергических рецепторов (kiss-1 68-80, 10⁻⁴ М; фирма Sigma). Контрольной группе крыс вводили физиологический раствор по аналогичной схеме.

Использование интраназального введения препарата более предпочтительно в силу быстрого эффекта и простоты инъекции. Хорошее кровоснабжение носовой полости способствует более быстрому проникновению препарата в кровоток, облегчает его проникновение в мозг, что связано с отсутствием гематоэнцефалического барьера в зоне обонятельных путей. Это приводит не только к уменьшению времени от момента введения вещества до момента его связывания с рецепторами, но и способствует формированию максимального количества комплексов лиганд–рецептор, что улучшает эффективность препарата [1].

При тестировании в установке «Открытое поле» в течение трех минут регистрировали горизонтальную двигательную активность, вертикальную активность, уровень тревожности, время латентного перехода в первый квадрат, время латентного перехода в центральный квадрат.

Данные, полученные в ходе эксперимента, обрабатывались с помощью программы SigmaStat с использованием теста One Way ANOVA и t-теста Стьюдента. Графики построены с помощью программы SigmaPlot.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Результаты исследования позволили выявить некоторые особенности влияния активации кисспептинергических рецепторов головного мозга на поведение крыс при выполнении различных экспериментальных задач.

Горизонтальная двигательная активность оказалась менее выраженной при получении крысами кисспептина. За

3 минуты крысы, которым вводили кисспептин, осваивали в среднем 35 секторов, крысы из контрольной группы — 47 секторов.

Наиболее экспериментально значимые отличия были выявлены по такому показателю, как вертикальная двигательная активность. На 4-й и 5-й дни наблюдения данный показатель оказался почти в 2 раза более выраженным у крыс опытной группы (рис. 1).

Исследовательская активность также оказалась на более высоком уровне в группе крыс, получавших кисспептин. На 3-, 6- и 11-й дни наблюдения отличия между группами составили 25, 37 и 78% соответственно (рис. 2).

В условиях теста «Открытое поле» не удалось выявить статистически значимой разницы в уровне тревожности по реакции незавершенного груминга. В группе крыс, пребывающих под действием кисспептина, число актов подобного груминга на 11-й день эксперимента составило 0, а у крыс из контрольной группы — 2. Так, реакции тревожного груминга у контрольных особей не претерпевали значительных изменений, в то время как опытные крысы через сутки от момента получения кисспептина демонстрировали относительно низкую тревожность.

Такой показатель, как латентное время первого перехода в соседний сектор, говорит об активации исследовательского поведения у животных из опытной группы (рис. 3.).

Так, на 11-е сутки первый показатель у контрольных крыс в среднем составил 6,9 с, а у опытных — менее 1 с. Латентное время первого посещения центрального сектора на 11-е сутки у контрольных крыс составило в среднем 73 с, а у опытных — 20 с. Кроме того, в тесте «Открытое поле» установлено влияние на поведение активации кисспептинергических рецепторов.

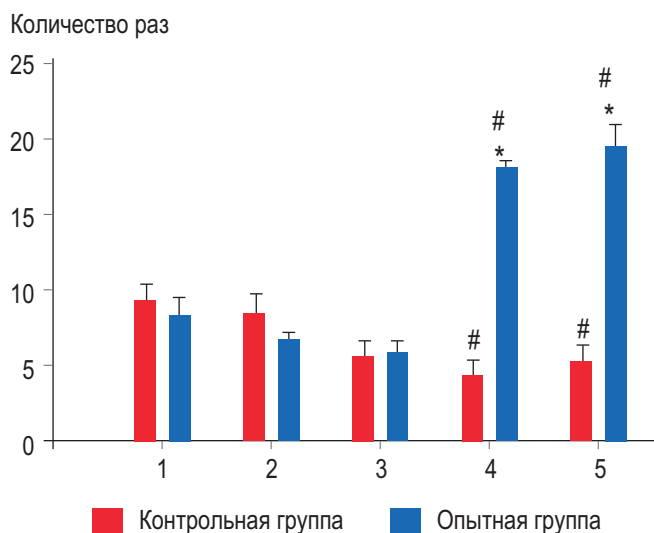


Рис. 1. Особенности поведенческих реакций крыс в тесте «Открытое поле». Вертикальная активность с опорой: 1 — исходное тестирование; 2 — тестирование через 40 минут после введения кисспептина; 3 — тестирование на 3-й день; 4 — тестирование на 11-й день. # $p < 0,05$ — статистически значимые различия с исходным уровнем при $p < 0,01$; * — статистически значимые различия между контролем и опытом при $p < 0,05$

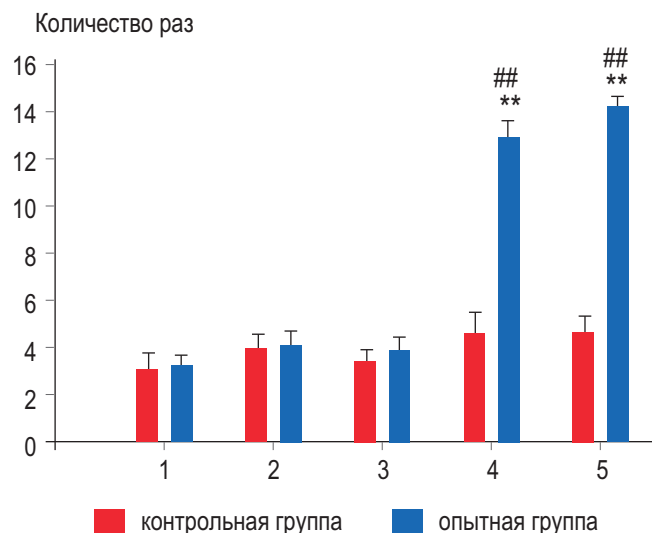


Рис. 2. Особенности поведенческих реакций крыс в тесте «Открытое поле». Вертикальная активность с опорой: 1 — исходное тестирование; 2 — тестирование через 40 минут после введения кисспептина; 3 — тестирование на 3-й день; 4 — тестирование на 11-й день. ## — статистически значимые различия с исходным уровнем при $p < 0,01$; ** — статистически значимые различия между контролем и опытом при $p < 0,01$

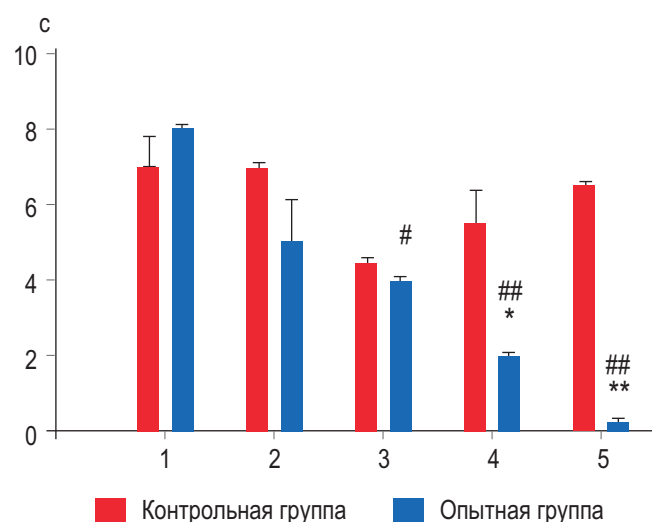


Рис. 3. Особенности поведенческих реакций крыс в тесте «Открытое поле». Латентное время (с) первого перехода: 1 — исходное тестирование; 2 — тестирование через 40 минут после введения кисспептина; 3 — тестирование на 3-й день; 4 — тестирование на 6-й день; 5 — тестирование на 11-й день. # $p < 0,05$ — статистически значимые различия с исходным уровнем; ## — статистически значимые различия с исходным уровнем при $p < 0,01$; * — статистически значимые различия между контролем и опытом при $p < 0,05$; ** — статистически значимые различия между контролем и опытом при $p < 0,01$

ОБСУЖДЕНИЕ

В проведенных экспериментах анализировали особенности поведенческих реакций крыс при активации кисспептинергических рецепторов. В связи с активацией кисспептинергических рецепторов (GPR54) происходит активная стимуляция гипоталамо-гипофизарно-половой оси и увеличение выработки соответствующих гонадотропинов (лютеинизирующего и фолликулостимулирующего гормонов). Принимая во внимание результаты исследований, можно говорить о повышенной выработке данных половых гормонов, следствием которой является увеличение продукции тестостерона у крыс-самцов.

Высокий уровень тестостерона оказывает специфическое воздействие на состояние центральной нервной системы, включая структуры коры мозга и лимбической системы. Центральные эффекты тестостерона обеспечивают особое состояние «охоты», во время которой деятельность животного становится более активной.

Полученные результаты указывают на сравнительно низкий уровень тревожности крыс при активации GPR 54-рецепторов. При накоплении кисспептина в организме снижается уровень тревожности. Возможно, что активация GPR 54 повышает уровень активности гипоталамических нейронов, секретирующих ГЛ.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Активация кисспептинергической системы оказала выраженное влияние на поведение крыс в различных тестовых установках. В тесте «Открытое поле» под влиянием кисспептина возросла представленность в структуре поведения вертикальной двигательной и исследовательской активности, также было замечено более активное освоение ее секторов. В ходе эксперимента было установлено, что интраназальное введение кисспептина положительно влияет на исследовательское поведение и память, снижает уровень тревожности. Полученные результаты можно, вероятно, объяснить активацией представленных в структурах коры мозга, лимбической системы специфических рецепторов (GPR54) к данному нейропептиду.

ДОПОЛНИТЕЛЬНАЯ ИНФОРМАЦИЯ

Вклад авторов. Все авторы внесли существенный вклад в разработку концепции, проведение исследования и подготовку статьи, прочли и одобрили финальную версию перед публикацией.

Конфликт интересов. Авторы декларируют отсутствие явных и потенциальных конфликтов интересов, связанных с публикацией настоящей статьи.

Источник финансирования. Авторы заявляют об отсутствии внешнего финансирования при проведении исследования.

Все процедуры соответствовали этическим стандартам, утвержденным правовыми актами РФ, принципам Базельской декларации и рекомендациям комитета по биоэтике

биологического факультета Самарского национального исследовательского университета им. академика С.П. Королева (протокол № 11 от 03.10.2013 г.).

ADDITIONAL INFORMATION

Author contribution. Thereby, all authors made a substantial contribution to the conception of the study, acquisition, analysis, interpretation of data for the work, drafting and revising the article, final approval of the version to be published and agree to be accountable for all aspects of the study.

Competing interests. The authors declare that they have no competing interests.

Funding source. This study was not supported by any external sources of funding.

All procedures complied with ethical standards approved by legal acts of the Russian Federation, the principles of the Basel Declaration, and the recommendations of the bioethics committee of the biological faculty of Samara National Research University (protocol No. 11 from 3.10.2013).

ЛИТЕРАТУРА

1. Шишкина И.В. Рецепторы к половым гормонам в гипоталамусе и их роль в половой дифференцировке мозга у крыс. Автореф. дис. ... канд. биол. наук. М.; 1984.
2. Bhattacharya Moshmi, Babwah Andy V. Kisspeptin: Beyond the Brain. *Endocrinology*. 2015; 156(4): 1218–27.
3. Bilban M., Ghaffari-Tabrizi N., Hintermann E. et al. Kisspeptin-10, a KiSS-1/metastin-derived decapeptide, is a physiological invasion inhibitor of primary human trophoblasts. *J. Cell Sci*. 2004; 117(8): 1319–28.
4. Kauffman A.S., Park J.H., Gottsch M.L. The kisspeptin receptor GPR54 is required for sexual differentiation of the brain and behavior. *J. Neurosci*. 2007; 33: 8826–35.
5. Kotani M., Detheux M., Vandenbogaerde A. et al. The metastasis suppressor gene KiSS-1 encodes kisspeptins, the natural ligands of the orphan G protein-coupled receptor GPR54. *J. Biol. Chem*. 2001; 276: 34631–6.
6. Lee D.K., Nguyen T., O'Neill G.P. et al. Discovery of a receptor related to the galanin receptors. *Federation of European Biochemical Societies Letters*. 1999; 446: 103–7.
7. Miele M.E., Robertson G., Lee J.H. et al. Metastasis suppressed, but tumorigenicity and local invasiveness unaffected, in the human melanoma cell line MeJuSo after introduction of human chromosomes 1 or 6. *Mol. Carcinog*. 1996; 15(4): 284–99.
8. Muir A.I., Chamberlain L., Elshourbagy N.A. et al. AXOR12, a novel human G protein-coupled receptor, activated by the peptide KiSS-1. *J. Biol. Chem*. 2001; 276: 28969–75.
9. Oakley A.E., Clifton D.K., Steiner R.A. Kisspeptin Signaling in the Brain. *Endocrine Reviews*. 2009; 30: 713–43.
10. Ohtaki T., Shintani Y., Honda S. Metastasis suppressor gene KiSS-1 encodes peptide ligand of a G-protein-coupled receptor. *Nature*. 2001; 411: 613–7.
11. Packard M.G., Teather L.A. *Neurobiol. Learn. Mem*. 2007; 68: 172–88.



REFERENCES

1. Shishkina I.V. Retseptory k polovym gormonom v gipotalamuse i ikh rol' v polovoy differentsirovke mozga u kryss [Sex hormone receptors in the hypothalamus and their role in the sexual differentiation of the brain in rats]. Avtoref. dis. ... kand. biol. nauk. Moskva; 1984. (in Russian).
2. Bhattacharya Moshmi, Babwah Andy V. Kisspeptin: Beyond the Brain. *Endocrinology*. 2015; 156(4): 1218–27.
3. Bilban M., Ghaffari-Tabrizi N., Hintermann E. et al. Kisspeptin-10, a KiSS-1/metastin-derived decapeptide, is a physiological invasion inhibitor of primary human trophoblasts. *J. Cell Sci.* 2004; 117(8): 1319–28.
4. Kauffman A.S., Park J.H., Gottsch M.L. The kisspeptin receptor GPR54 is required for sexual differentiation of the brain and behavior. *J. Neurosci.* 2007; 33: 8826–35.
5. Kotani M., Detheux M., Vandenbogaerde A. et al. The metastasis suppressor gene KiSS-1 encodes kisspeptins, the natural ligands of the orphan G protein-coupled receptor GPR54. *J. Biol. Chem.* 2001; 276: 34631–6.
6. Lee D.K., Nguyen T., O'Neill G.P. et al. Discovery of a receptor related to the galanin receptors. *Federation of European Biochemical Societies Letters*. 1999; 446: 103–7.
7. Miele M.E., Robertson G., Lee J.H. et al. Metastasis suppressed, but tumorigenicity and local invasiveness unaffected, in the human melanoma cell line MelJuSo after introduction of human chromosomes 1 or 6. *Mol. Carcinog.* 1996; 15(4): 284–99.
8. Muir A.I., Chamberlain L., Elshourbagy N.A. et al. AXOR12, a novel human G protein-coupled receptor, activated by the peptide KiSS-1. *J. Biol. Chem.* 2001; 276: 28969–75.
9. Oakley A.E., Clifton D.K., Steiner R.A. Kisspeptin Signaling in the Brain. *Endocrine Reviews*. 2009; 30: 713–43.
10. Ohtaki T., Shintani Y., Honda S. Metastasis suppressor gene KiSS-1 encodes peptide ligand of a G-protein-coupled receptor. *Nature*. 2001; 411: 613–7.
11. Packard M.G., Teather L.A. *Neurobiol. Learn. Mem.* 2007; 68: 172–88.