

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ  
СТАТЬИ

НООТРОПНЫЕ И АНКСИОЛИТИЧЕСКИЕ ЭФФЕКТЫ  
ГЕПТАПЕПТИДА АКТГ<sub>6-9</sub>PRO-GLY-PRO

© 2019 г. Н. Г. Левицкая<sup>1,2</sup>, Н. Ю. Глазова<sup>1</sup>, Е. А. Себенцова<sup>1</sup>, Д. М. Манченко<sup>2</sup>,  
Л. А. Андреева<sup>1</sup>, А. А. Каменский<sup>1,2</sup>, Н. Ф. Мясоедов<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Институт молекулярной генетики РАН, Москва, Россия

<sup>2</sup>Биологический факультет МГУ им. М.В. Ломоносова, Москва, Россия

\*E-mail: nglevitskaya@gmail.com

Поступила в редакцию 23.01.2019 г.

После доработки 29.03.2019 г.

Принята к публикации 12.04.2019 г.

Меланокортины (МК) обладают широким спектром физиологической активности. В структуре всех природных МК присутствует общая последовательность His-Phe-Arg-Trp, соответствующая фрагменту АКТГ<sub>6-9</sub>. Эта последовательность необходима для активации всех типов меланокортиновых рецепторов, однако сам тетрапептид обладает незначительной активностью и низкой селективностью. Исследования показали, что присоединение к природным пептидам последовательности, обогащенной пролином, приводит к увеличению выраженности и пролонгации их нейротропных эффектов. Примером такого соединения является аналог фрагмента АКТГ<sub>4-10</sub> пролонгированного действия гептапептид семакс (АКТГ<sub>4-7</sub>Pro-Gly-Pro). Данная работа посвящена исследованию эффектов синтетического пептида, содержащего в своей структуре природную последовательность АКТГ<sub>6-9</sub> и фрагмент Pro-Gly-Pro – АКТГ<sub>6-9</sub>PGP (HFRWPGP). Изучалось влияние этого пептида на способность к обучению и уровень тревожности белых крыс. Пептид вводили интраназально, в дозе 0.05 мг/кг за 15 мин или 20 ч до эксперимента. Было показано, что гептапептид АКТГ<sub>6-9</sub>PGP при введении за 15 мин до тестирования улучшает выработку пищедобывательного рефлекса на место и воспроизведение рефлекса пассивного избегания болевого раздражителя, а также проявляет анксиолитическую активность в тесте приподнятый крестообразный лабиринт. Инъекции пептида за 20 ч до эксперимента не приводили к изменениям параметров обучения и уровня тревожности животных по сравнению с контролем. Таким образом, пептид, структура которого включает в себя фрагмент АКТГ<sub>6-9</sub> и трипептид PGP, обладает ноотропной и анксиолитической активностью. Следовательно, спектр нейротропной активности АКТГ<sub>6-9</sub>PGP совпадает со спектром активности семакса, однако длительность его эффектов значительно меньше.

**Ключевые слова:** меланокортины, синтетические аналоги, обучение, тревожность, интраназальное введение, крысы

**DOI:** 10.1134/S0869813919060049

Меланокортины (АКТГ/МСГ-подобные пептиды, МК) обладают широким спектром биологической активности. Эндогенные МК и их рецепторы образуют периферическую и центральную сигнальную систему, которая контролирует целый ряд важнейших физиологических процессов в организме [1]. Пептиды этого класса обладают ноотропным, нейропротекторным и нейротрофическим действием, участвуют в регуляции ответа организма на стрессорные воздействия, влияют на

пищевое поведение и процессы терморегуляции, модулируют ответ иммунной системы при воспалении и болевую чувствительность [2–4]. Открытие семейства меланокортиновых рецепторов (MC1R–MC5R), доказательство образования МК в различных регионах мозга и подтверждение возможности прохождения коротких пептидов этого класса через гематоэнцефалический барьер подтвердили возможность множественных эффектов пептидов этого класса. Широкий спектр физиологических эффектов делает МК перспективными с точки зрения их клинического применения [4, 5].

Использование коротких фрагментов природных гормонов позволяет отделить гормональные (кортикотропные и меланотропные) свойства исходных молекул от их экстрагормонального действия [1, 3, 4]. В структуре всех природных МК присутствует общая последовательность – фармакофор His-Phe-Arg-Trp, соответствующий фрагменту АКТГ/ $\alpha$ -MSH<sub>6-9</sub> [6, 7]. Показано, что эта последовательность необходима для связывания и активации всех типов МК рецепторов, однако сам тетрапептид обладает незначительной активностью и низкой селективностью [8]. Для проявления функциональной активности МК, кроме последовательности АКТГ<sub>6-9</sub>, важны остатки Met<sub>4</sub> и Glu<sub>5</sub> [6].

Структурно-функциональные исследования показали, что ответственной за нейротропную активность является N-концевая область молекулы АКТГ. Наиболее коротким фрагментом, сохраняющим ноотропную активность целой молекулы гормона, является фрагмент АКТГ<sub>4-10</sub> [9, 10]. Почти такой же активностью обладает тетрапептид АКТГ<sub>4-7</sub> [7]. АКТГ<sub>6-10</sub> является самым коротким фрагментом, оказывающим нейротрофическое действие [9, 10]. Нейротрофической активностью обладают также пептиды, в структуре которых присутствует последовательность АКТГ<sub>4-7</sub> и АКТГ<sub>7-10</sub> [5, 11–13]. Исследования нейротропных эффектов фрагментов АКТГ позволили предположить, что аминокислотная последовательность гормона включает в себя несколько сайтов, которые могут активировать различные рецепторы, вызывая при этом сходные эффекты.

Протеолитическая нестабильность пептидов ограничивает их биодоступность при периферических способах введения. С целью увеличения устойчивости пептидов к действию эндогенных протеаз исследователями использовались циклизация пептидных последовательностей, включение неприродных аминокислот, модификации N- и C-концевых последовательностей [14]. Проведенные ранее исследования показали, что присоединение обогащенной пролином последовательности Pro-Gly-Pro (PGP) к природным пептидам приводит к увеличению выраженности действия и пролонгации их эффектов [15]. Примером такого соединения является пептид семакс (МЕНFPGP), являющийся аналогом фрагмента АКТГ<sub>4-10</sub>, в котором три C-концевые аминокислоты заменены на последовательность PGP. Этот пептид обладает ноотропной и анксиолитической активностью [16–18]. Длительность нейротропных эффектов семакса составляет 20–24 ч, а длительность эффектов природного фрагмента АКТГ<sub>4-10</sub> не превышает 60 мин [17, 19]. В настоящее время на основе пептида семакс производятся лекарственные препараты, которые используются в медицине в качестве ноотропов и нейропротекторов [20].

Целью представленной работы явилось изучение нейротропных эффектов нового аналога фрагмента АКТГ гептапептида HFRWPGP, в структуре которого присутствует природный фрагмент АКТГ<sub>6-9</sub> и последовательность PGP.

## МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Работа выполнена на 53 самцах крыс линии Wistar. Масса тела крыс в начале эксперимента составила 200–250 г. Животных содержали в стандартных условиях

вивария со свободным доступом к пище и воде и соблюдением 12-ти часового светового режима дня. До начала эксперимента для всех крыс проводили 10-дневную адаптацию — ежедневный хэндлинг в течение 1–2 мин. Исследование проведено с соблюдением биоэтических норм обращения с экспериментальными животными в соответствии с “Правилами лабораторной практики в РФ” (Приказ МЗ РФ № 267 от 19.06.2003).

Изучалось влияние пептида АКТГ<sub>6-9</sub>PGP (HFRWPGP) на способность к обучению и уровень тревожности крыс. Пептид вводили интраназально (и/н), в дозе 0.05 мг/кг в водном растворе из расчета 0.1 мл/кг массы тела. Было проведено 2 серии экспериментов. В первой серии пептид вводили за 15 мин, во второй — за 20 ч до тестирования. Контрольным животным и/н вводили эквивалентный объем дистиллированной воды в те же сроки. В каждой серии для проведения экспериментов использовали одних и тех же животных. Тесты проводили в следующем порядке: “Приподнятый крестообразный лабиринт” (ПКЛ), выработка пищедобывательного рефлекса в Т-образном лабиринте, выработка условного рефлекса пассивного избегания. Интервал между тестами составлял не менее одной недели.

Исследовалось влияние пептида на обучение животных в тестах с различным знаком подкрепляющего раздражителя. В качестве модели обучения с положительным (пищевым) подкреплением использовали выработку условного пищедобывательного рефлекса на место в Т-образном лабиринте, в качестве модели обучения с отрицательным (болевым) подкреплением — выработку условного рефлекса пассивного избегания болевого раздражителя. Для оценки уровня тревожности животных использовали тест приподнятый крестообразный лабиринт.

**Выработка условного пищедобывательного рефлекса на место.** За сутки до обучения животных подвергали 24-часовой пищевой депривации. В первый день эксперимента крыс помещали в лабиринт на 20 мин для угашения ориентировочно-исследовательской реакции. В последующие 4 дня каждую крысу помещали в лабиринт по 5 раз подряд ежедневно, причем длительность каждой посадки не превышала 3-х минут. В дни опыта животных кормили один раз в сутки, через час после обучения. Препараты вводили ежедневно за 15 мин или 20 ч до сеанса обучения. Ежедневно регистрировали: количество выполненных реакций (КВР, число заходов в подкрепляемый отсек и съедания подкрепления), латентный период (ЛП, время выхода из стартового отсека); количество ошибок (число заходов в неподкрепляемый отсек лабиринта).

**Выработку условного рефлекса пассивного избегания (УРПИ)** болевого раздражителя проводили в экспериментальной камере, разделенной перегородкой с отверстием на два отсека: один — ярко освещенный, другой — затемненный. Камера устанавливалась на решетчатый металлический пол, подсоединенный к источнику тока. В первый день эксперимента животное помещали в освещенный отсек камеры и регистрировали латентный период перехода в темный отсек, в котором крысу подвергали неизбежному удару электрическим током длительностью 3 с. Напряжение подбиралось индивидуально для каждого животного по вокализации (в диапазоне 60–90 В), частота составляла 50 Гц, длительность — 10 мс. Через 72 ч проводили проверку выработки навыка. Животное на 3 мин помещали в светлый отсек камеры и регистрировали латентный период перехода в темный отсек и суммарное время, проведенное в светлом отсеке. Препараты вводили перед сеансом обучения.

**Тест приподнятый крестообразный лабиринт (ПКЛ).** Экспериментальная камера лабиринта состоит из четырех расходящихся из центра рукавов. Два противоположных рукава закрыты с торцов стенками и затемнены (8 лк); два других — открыты и ярко освещены (450 лк). Поведение животных в ПКЛ оценивали в течение 3 мин. Крысу помещали в центр лабиринта и регистрировали время нахождения на от-

крытых рукавах лабиринта; количество заходов в открытые и закрытые рукава; количество свешиваний с открытых рукавов.

**Статистическая обработка.** Обработку данных производили при помощи пакета статистических программ “Statistica 10”. Оценку нормальности распределений выборок проводили с помощью критерия Колмогорова–Смирнова. Если распределение выборок соответствовало нормальному, для оценки результатов использовали критерий Стьюдента (тест ПКЛ) или метод дисперсионного анализа (ANOVA) для повторных измерений для факторов “пептид” и “дни обучения” (обучение в Т-образном лабиринте). В случае ненормального распределения для оценки различий использовали U критерий Манна-Уитни (тест УРПИ). Данные на рисунках представлены в виде среднего  $\pm$  стандартная ошибка среднего в случае нормального распределения или в виде медианы и интерквартильного размаха с минимум и максимумом значений при ненормальном распределении данных в выборках. Различия между группами считали статистически значимыми при  $p < 0.05$ .

## РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

### *Выработка условного пищедобывательного рефлекса на место*

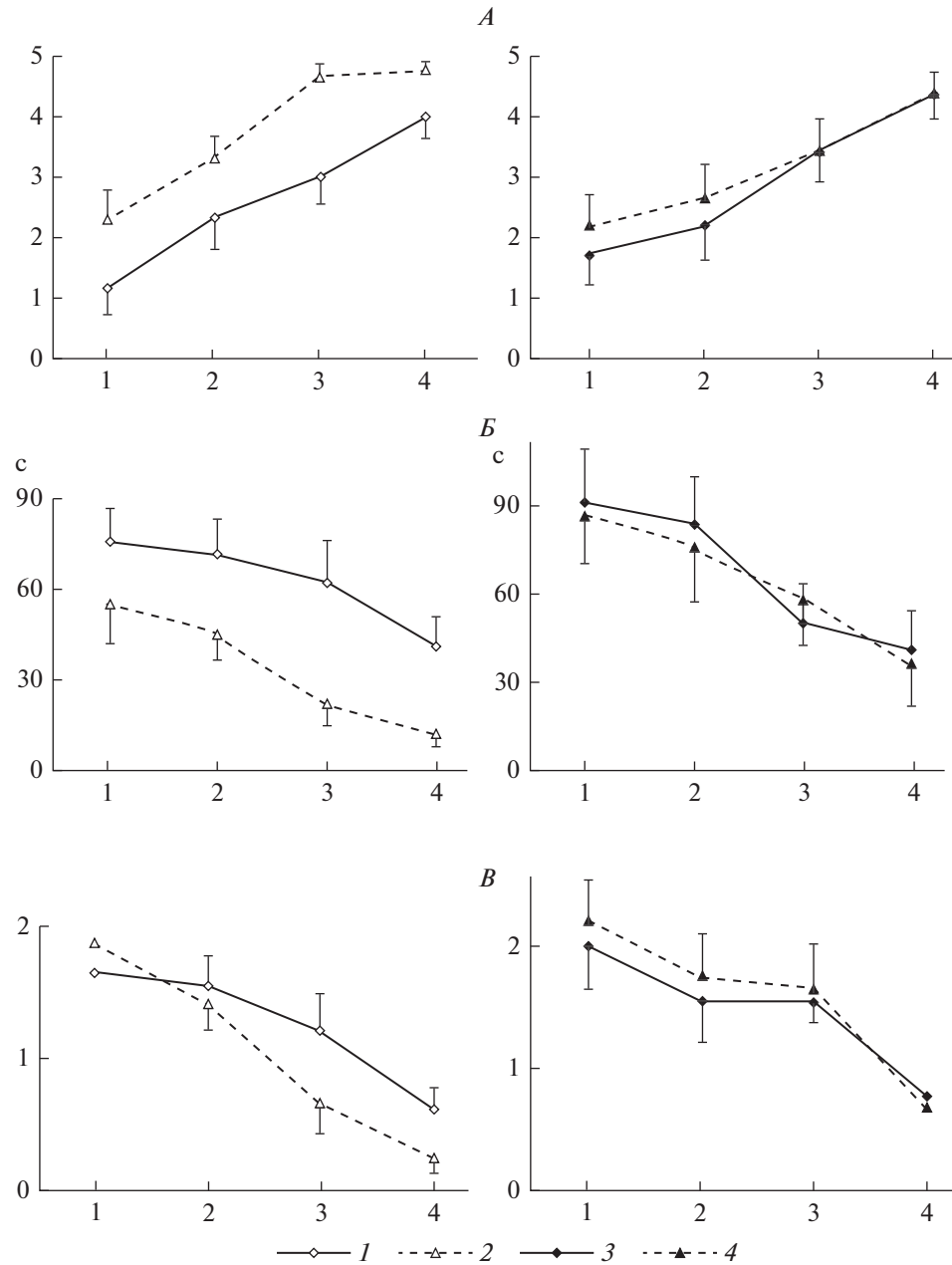
Метод ANOVA для повторных измерений выявил значимое влияние фактора “дни обучения” на параметры, регистрируемые в Т-образном лабиринте в первой ( $F_{3,99} > 11.0$ ;  $p < 0.001$ ) и второй сериях экспериментов ( $F_{3,48} > 9.1$ ;  $p < 0.001$ ). В ходе обучения во всех группах крыс наблюдалось возрастание количество выполненных реакций (КВР), снижение числа ошибок и латентного периода выхода из стартового отсека (ЛП), что свидетельствует об успешном обучении животных всех групп (рис. 1). В первой серии опытов (введение HFRWPGP за 15 мин до сеанса обучения) было зарегистрировано значимое влияние фактора “пептид” на КВР ( $F_{1,33} = 6.90$ ;  $p = 0.013$ ) и ЛП ( $F_{1,33} = 6.25$ ;  $p = 0.018$ ), а также влияние этого фактора на уровне тенденции на число ошибок ( $F_{1,33} = 3.19$ ;  $p = 0.08$ ). Статистически значимого взаимодействия между факторами “пептид” и “дни обучения” отмечено не было ( $F_{3,99} < 1.6$ ;  $p > 0.25$ ). Во второй серии экспериментов (введение HFRWPGP за 20 час до обучения) не было зарегистрировано значимого влияния фактора “пептид” на показатели обучения в лабиринте ( $F_{1,16} < 0.15$ ;  $p > 0.70$ ), а также значимого взаимодействия между факторами ( $F_{3,48} < 0.45$ ;  $p > 0.70$ ).

### *Выработка УРПИ*

Введение HFRWPGP как за 15 мин, так и за 20 ч до обучения не влияло на величину ЛП перехода в темный отсек камеры в первый день эксперимента ( $p > 0.55$ ). При проверке выработки УРПИ было зарегистрировано значимое увеличение ЛП перехода в темный отсек ( $p = 0.004$ ) и времени, проведенного в светлом отсеке камеры, ( $p = 0.013$ ) в группе крыс, получавших инъекцию пептида за 15 мин до обучения, по сравнению с соответствующим контролем (рис. 2). Введение HFRWPGP за 20 ч до обучения не приводило к значимому изменению регистрируемых показателей ( $p > 0.35$ ).

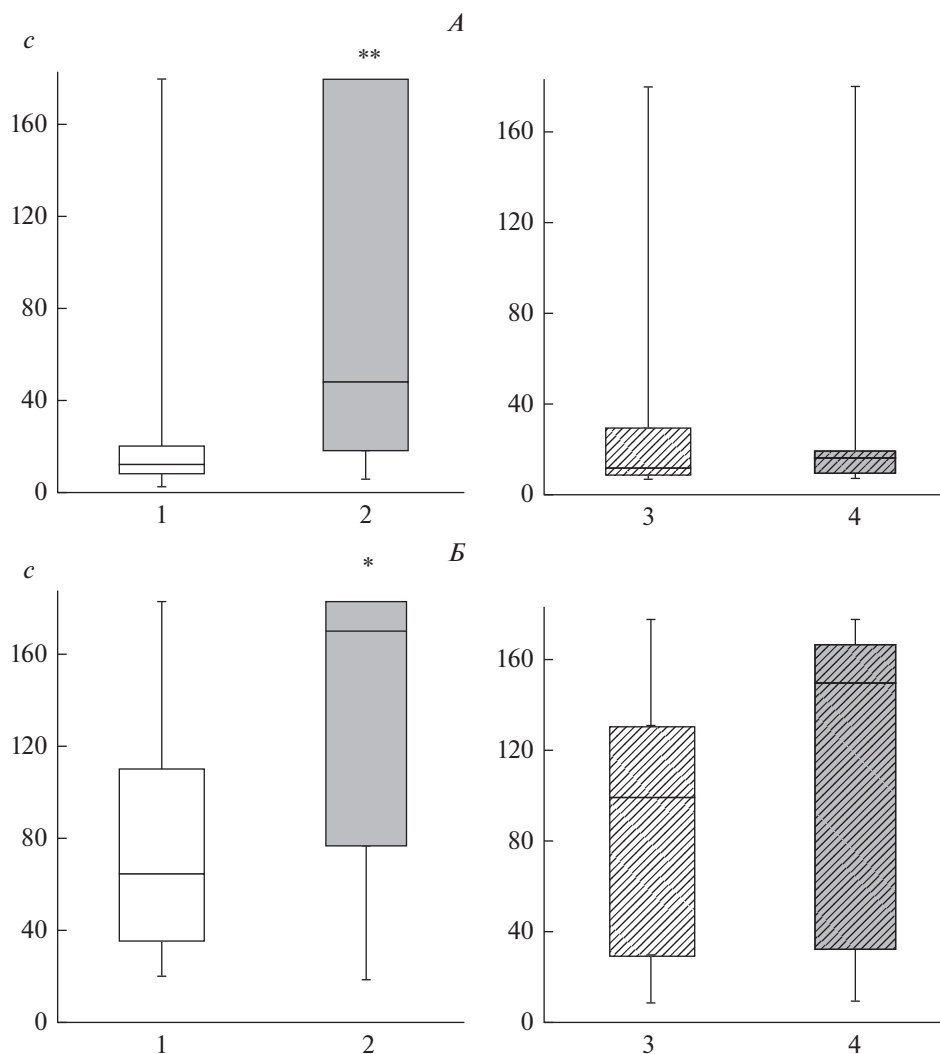
### *Приподнятый крестообразный лабиринт*

В группе крыс, которым вводили HFRWPGP за 15 мин до тестирования, отмечалось значимое увеличение таких показателей, как время, проведенное на открытых рукавах, число выходов на открытые рукава и число свешиваний с открытых рукавов лабиринта относительно соответствующего контроля ( $p < 0.04$ ). Значимого изменения числа заходов в закрытые рукава отмечено не было ( $p = 0.63$ ). Введение



**Рис. 1.** Влияние пептида HFRWPGP в дозе 0.05 мг/кг на выработку пищедобывательного рефлекса на место в Т-образном лабиринте.

По оси абсцисс – дни обучения, по оси ординат: *A* – число выполненных реакций, *Б* – латентный период выхода из стартового отсека, *с*; *В* – число ошибок. При введении HFRWPGP за 15 мин до обучения отмечалось значимое влияние фактора “пептид” на количество выполненных реакций и ЛП выхода из стартового отсека ( $F_{1,33} > 6.2$ ;  $p < 0.02$ ; ANOVA для повторных измерений). 1 – группа “контроль-15 мин” ( $n = 18$ ); 2 – группа “HFRWPGP-15 мин” ( $n = 17$ ); 3 – группа “контроль-20 ч” ( $n = 9$ ); 4 – группа “HFRWPGP-20 ч” ( $n = 9$ ).



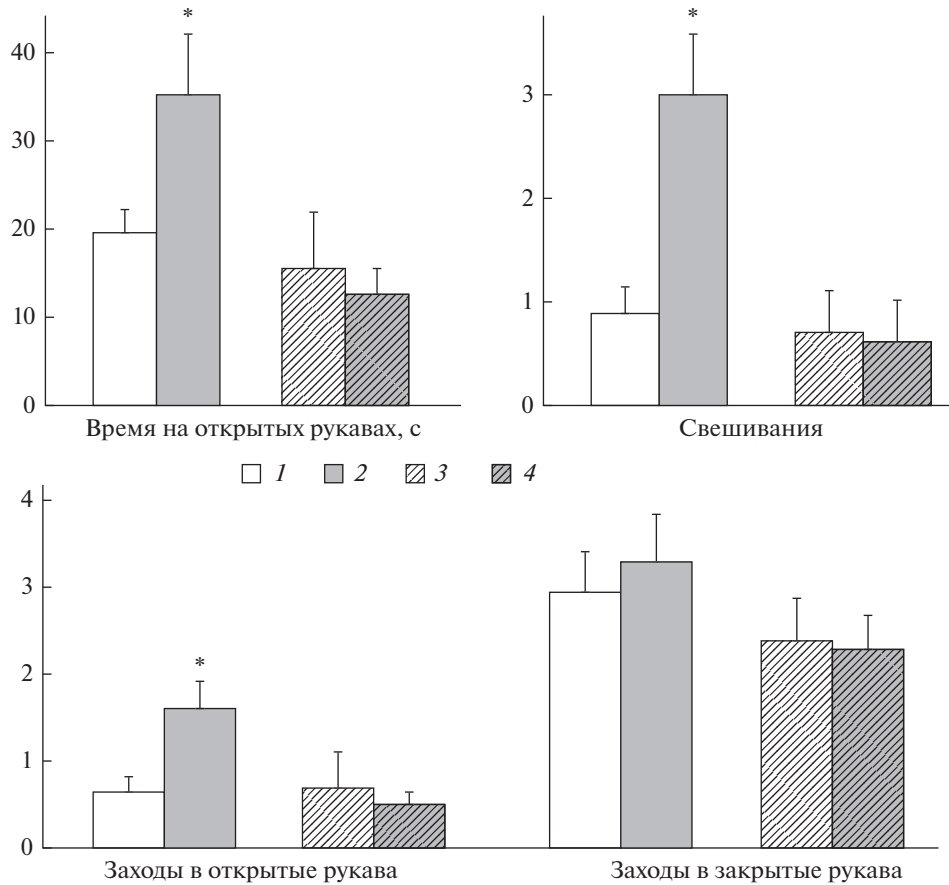
**Рис. 2.** Влияние пептида HFRWPGP в дозе 0.05 мг/кг на выработку условного рефлекса пассивного избегания болевого раздражителя.

*A* – латентный период перехода в темный отсек, *с*; *B* – время, проведенное в светлом отсеке камеры, *с*. Значимые отличия от соответствующего контроля отмечены \* ( $p < 0.05$ ) и \*\* ( $p < 0.01$ ); U-критерий Манна–Уитни. Обозначения те же, что и на рис. 1.

пептида за 20 ч до эксперимента не приводило к значимому изменению параметров поведения крыс в ПКЛ ( $p > 0.65$ ) (рис. 3).

### ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Последовательность HFRW (АКТГ<sub>6-9</sub>) присутствует в структуре всех природных меланокортинов и важна для активации всех типов меланокортиновых рецепторов, однако активность этого тетрапептида незначительна [6–8]. Присоединение последовательности PGP к природным пептидам приводит к увеличению выражен-



**Рис. 3.** Влияние пептида HFRWPGP в дозе 0.05 мг/кг на поведение крыс в тесте приподнятый крестообразный лабиринт. Значимые отличия от соответствующего контроля отмечены \* ( $p < 0.05$ ;  $t$ -критерий Стьюдента). Обозначения те же, что и на рис. 1.

ности их действия [19]. Мы предположили, что пептид, структура которого включает в себя фрагмент АКТГ<sub>6-9</sub> и трипептид PGP, будет проявлять нейротропную активность. Эффекты пептида изучали при интраназальном введении, так как такой способ введения в настоящее время рассматривается многими исследователями как альтернативный метод доставки веществ в ЦНС, минуя системный кровоток и гематоэнцефалический барьер [21, 22]. Для многих физиологически активных веществ показано преимущественное попадание в мозг при интраназальном введении по сравнению с системным [21]. Семакс эффективнее улучшает обучение при и/н, чем при внутрибрюшинном введении в организм [23]. Показано, что пептид АКТГ<sub>6-9</sub>PGP при и/н введении хорошо проникает в мозг [24].

Проведенные эксперименты показали, что новый аналог фрагмента АКТГ гептапептид АКТГ<sub>6-9</sub>PGP при интраназальном введении за 15 мин до сеанса обучения в дозе 0.05 мг/кг улучшает выработку пищевого рефлекса на место и воспроизведение рефлекса пассивного избегания болевого раздражителя. Следовательно, этот пептид обладает ноотропной активностью, и его эффекты не зависят от

знака подкрепляющего раздражителя. Изучение эффектов семакса (АКТГ<sub>4-7</sub>РGP) показало, что этот гептапептид при и/н введении улучшает обучение как с положительным, так и с отрицательным подкреплением [16, 17]. Таким образом, при введении за 15 мин до сеанса обучения аналог АКТГ<sub>6-9</sub>РGP проявляет ноотропную активность, сопоставимую с активностью семакса.

Ранее нами было показано, что интраназальное введение семакса приводит к снижению тревожности крыс в тесте ПКЛ [16]. Изучение влияния АКТГ<sub>6-9</sub>РGP на эмоциональное состояние животных показало, что при введении за 15 мин до тестирования в ПКЛ пептид вызывает увеличение времени на открытых рукавах, числа свешиваний и выходов на открытые рукава. Возрастание этих показателей свидетельствует о сниженном уровне тревожности. При этом число заходов в закрытые рукава — показатель, связанный с исследовательской активностью, значимо не изменяется. Следовательно, пептид АКТГ<sub>6-9</sub>РGP, так же, как и семакс, обладает анксиолитической активностью.

Семакс сохраняет нейротропную активность в течение 20 ч после введения [15, 17]. Для оценки длительности эффектов нового аналога нами проводилось исследование влияния пептида АКТГ<sub>6-9</sub>РGP на обучение и уровень тревожности животных при введении препарата за 20 ч до тестирования. В группах крыс, получавших инъекции АКТГ<sub>6-9</sub>РGP за 20 ч до обучения, параметры обучения крыс не отличались от контроля. Введение АКТГ<sub>6-9</sub>РGP за 20 ч до тестирования в ПКЛ также не приводило к изменениям уровня тревожности животных. Следовательно, длительность нейротропных эффектов АКТГ<sub>6-9</sub>РGP меньше, чем длительность эффектов семакса.

Изучение протеолитической деградации семакса показало, что, как и в случае его природного прототипа АКТГ<sub>4-10</sub>, расщепление пептида происходит как с N-, так и с C-конца пептидной цепи [14, 25]. АКТГ<sub>6-9</sub>РGP также подвергается N- и C-концевому протеолизу, однако определяющим фактором является действие аминопептидаз [24]. При инкубации в присутствии плазматических мембран клеток головного мозга крысы скорость протеолитической деградации АКТГ<sub>6-9</sub>РGP близка к скорости деградации семакса [26]. Эффекты, наблюдаемые при введении пептидов, могут быть результатом действия как исходного пептида, так и его производных. Изучение эффектов продуктов деградации семакса показало наличие у них нейротропной активности, что может обеспечивать его пролонгированное действие [27]. Можно предположить, что пептиды, образующиеся в результате протеолиза АКТГ<sub>6-9</sub>РGP (FRWPGP, RWPGP, HFRWPG и др.), неактивны или обладают незначительной активностью, что, вероятно, может определять меньшую длительность его эффектов.

Таким образом, проведенные эксперименты подтвердили высказанное нами предположение. Пептид, структура которого включает в себя фрагмент АКТГ<sub>6-9</sub> и трипептид РGP, обладает ноотропной и анксиолитической активностью. Следовательно, спектр нейротропной активности АКТГ<sub>6-9</sub>РGP совпадает со спектром активности семакса, однако длительность его эффектов значительно меньше.

#### ИСТОЧНИК ФИНАНСИРОВАНИЯ

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского Фонда Фундаментальных Исследований (грант № 17-00-00104 КОМФИ).

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Gantz I., Fong T.M. The melanocortin system. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 284: E468–E474. 2003.



2. *Левецкая Н.Г., Каменский А.А.* Меланокортиновая система. Успехи физиол. наук. 40(1): 44–65. 2009. [*Levitskaya N.G., Kamensky A.A.* Melanocortin system. *Uspekhi Fiziologicheskikh Nauk.* 40(1): 44–65. 2009. (In Russ.)].
3. *Bertolini A., Tacchi R., Vergoni A.V.* Brain effects of melanocortins. *Pharmacol. Res.* 59(1): 13–47. 2009.
4. *Starowicz K., Przewlocka B.* The role of melanocortins and their receptors in inflammatory processes, nerve regeneration and nociception. *Life Sci.* 73(7): 823–847. 2003.
5. *Catania A.* Neuroprotective actions of melanocortins: a therapeutic opportunity. *Trends Neurosci.* 31(7): 353–360. 2008.
6. *Ericson M.D., Lensing C.J., Fleming K.A., Schlasner K.N., Doering S.R., Haskell-Luevano C.* Bench-top to clinical therapies: A review of melanocortin ligands from 1954 to 2016. *Biochim. Biophys. Acta Mol. Basis Dis.* 1863(10): 2414–2435. 2017.
7. *Proneth B., Pogożheva I.D., Portillo F.P., Mosberg H.I., Haskell-Luevano C.* Melanocortin tetrapeptide Ac-His-DPhe-Arg-Trp-NH<sub>2</sub> modified at the para position of the benzyl side chain (DPhe): importance for mouse melanocortin-3 receptor agonist versus antagonist activity. *J. Med. Chem.* 51(18): 5585–5593. 2008.
8. *Mowlazadeh Haghighi S., Zhou Y., Dai J., Sawyer J.R., Hruby V.J., Cai M.* Replacement of Arg with Nle and modified D-Phe in the core sequence of MSHs, Ac-His-D-Phe-Arg-Trp-NH<sub>2</sub>, leads to hMC1R selectivity and pigmentation. *Eur. J. Med. Chem.* 151: 815–823. 2018.
9. *Dekker A., Gispen W.H., De Wied D.* Axonal regeneration, growth factors and neuropeptides. *Life Sci.* 41: 1667–1678. 1987.
10. *De Wied D.* Neurotrophic effects of ACTH/MSH neuropeptides. *Acta Neurobiol. Exp. (Wars).* 50(4–5): 353–366. 1990.
11. *Attella M.J., Hoffman S.W., Pilote M.P., Stein D.G.* Effects of BIM-22015, an analog ACTH(4–10), on functional recovery after frontal cortex injury. *Behav. Neural. Biol.* 57(2): 157–166. 1992.
12. *Catania A., Gatti S., Colombo G., Lipton J.M.* Targeting melanocortin receptors as a novel strategy to control inflammation. *Pharmacol. Rev.* 56(1): 1–29. 2004.
13. *Strand F.L.* David and Goliath – the slingshot that started the neuropeptide revolution. *Eur. J. Pharmacol.* 405(1–3): 3–12. 2000.
14. *Lim H.K., Cao Y., Qiu X., Silva J., Evans D.C.* A nonradioactive approach to investigate the metabolism of therapeutic peptides by tagging with <sup>127</sup>I and using inductively-coupled plasma mass spectrometry analysis. *Drug Metab. Dispos.* 43(1): 17–26. 2015.
15. *Ashmarin I.P., Samonina G.E., Lyapina L.A., Kamenskii A.A., Levitskaya N.G., Grivennikov I.A., Dolotov O.V., Andreeva L.A., Myasoedov N.F.* Natural and hybrid (“chimeric”) stable regulatory glyproline peptides. *Pathophysiology.* 11: 179–185. 2005.
16. *Glazova N.Yu., Atanov M.S., Pyzgareva A.V., Andreeva L.A., Manchenko D.M., Markov D.D., Inozemtseva L.S., Dolotov O.V., Levitskaya N.G., Kamensky A.A., Grivennikov I.A., Myasoedov N.F.* Neurotropic Activity of ACTH7–10PGP, an Analog of an ACTH Fragment. *Dokl. Biol. Sci.* 440: 270–274. 2011.
17. *Levitskaya N.G., Glazova N.Yu., Sebentsova E.A., Manchenko D.M., Vilensky D.A., Andreeva L.A., Kamensky A.A., Myasoedov N.F.* Investigation of the Spectrum of Physiological Activities of the Heptapeptide Semax, an ACTH 4–10 Analogue. *Neurochem. J.* 2(1–2): 95–101. 2008.
18. *Levitskaya N.G., Vilenskii D.A., Sebentsova E.A., Andreeva L.A., Kamensky A.A., Myasoedov N.F.* Influence of semax on the emotional state of white rats in the norm and against the background of cholecystokinin-tetrapeptide action. *Biol. Bull.* 37(2): 186–192. 2010.
19. *Ashmarin I.P., Nezavibatko V.N., Levitskaya N.G., Koshelev V.B., Kamensky A.A.* Design and investigation of an ACTH(4–10) analogue lacking D-amino acids and hydrophobic radicals. *Neurosci. Res. Comm.* 16(2): 105–112. 1995.
20. *Ашмарин И.П., Незавибатько В.Н., Мясоедов Н.Ф., Каменский А.А., Гривенников И.А., Пonomareva-Степная М.А., Андреева Л.А., Каплан А.Я., Кошелев В.Б., Рясина Т.В.* Ноотропный аналог адренокортикотропина 4–10 – Семакс. Журн. высш. нерв. деятельности им. И.П. Павлова. 47(2): 420–430. 1997. [*Asmarin I.P., Nezavibat'ko V.N., Miasoedov N.F., Kamenski A.A., Grivennikov I.A., Ponomareva-Stepnaia M.A., Andreeva L.A., Kaplan A.Ia., Koshelev V.B., Riasina T.V.* A nootropic adrenocorticotropin analog 4–10-semax. *Zh. Vyssh. Nerv. Deiat. Im. I. P. Pavlova.* 47(2): 420–430. 1997. (In Russ.)].
21. *Dhuria S.V., Hanson L.R., Frey W.H.* Intranasal delivery to the central nervous system: mechanisms and experimental considerations. *J. Pharmac. Sci.* 99(4): 1654–1673. 2010.
22. *Thorne R.G., Emory C.R., Ala T.A., Frey W.H.* Quantitative analysis of the olfactory pathway for drug delivery to the brain. *Brain Res.* 692(1–2): 278–282. 1995.
23. *Манченко Д.М., Глазова Н.Ю., Левецкая Н.Г., Андреева Л.А., Каменский А.А., Мясоедов Н.Ф.* Ноотропные и анальгетические эффекты семакса при различных способах введения. Рос. физиол. журн. им. И.М. Сеченова. 96(10): 1014–1023. 2010. [*Manchenko D.M., Glazova N.I., Levitskaia N.G., Andreeva L.A., Kamenskii A.A., Miasoedov N.F.* Nootropic and analgesic effects of Semax following different routes of administration. *Russ. J. Physiol.* 96(10): 1014–1023. 2010. (In Russ.)].

24. Shevchenko K.V., Nagaev I.Y., Babakov V.N., Andreeva L.A., Shevchenko V.P., Radilov A.S., Myasoedov N.F. Proteolysis of His-Phe-Arg-Trp-Pro-Gly-Pro in the blood and brain of rats *in vivo*. Dokl. Biochem. Biophys. 464: 301–304. 2015.
25. Zolotarev Yu.A., Dolotov O.V., Inozemtseva L.S., Dadayan A.K., Dorokhova E.M., Andreeva L.A., Alfeeva L.Yu., Grivennikov I.A., Myasoedov N.F. Degradation of the ACTH(4-10) analog Semax in the presence of rat basal forebrain cell cultures and plasma membranes. Amino Acids. 30: 403–408. 2006.
26. Vyunova T.V., Shevchenko K.V., Andreeva L.A., Shevchenko V.P., Radilov A.S., Dulov S.A., Pektunov S.G., Myasoedov N.F. Enzymatic stability and possible molecular targets of synthetic peptide HFRWPGP. Pharmac. Chem. J. 51(5): 337–339. 2017.
27. Levitskaya N.G., Sebentsova E.A., Glazova N.Yu., Voskresenskaya O.G., Andreeva L.A., Alfeeva L.Yu., Kamenskii A.A., Myasoedov N.F. Study on the neurotropic activity of the products of Semax enzymatic degradation. Dokl. Biol. Sci. 372(1–6): 243–246. 2000.

### Nootropic and Anxiolytic Effects of Heptapeptide ACTH<sub>6-9</sub>Pro-Gly-Pro

N. G. Levitskaya<sup>a, b, \*</sup>, N. Yu. Glazova<sup>a</sup>, E. A. Sebentsova<sup>a</sup>, D. M. Manchenko<sup>b</sup>,  
L. A. Andreeva<sup>a</sup>, A. A. Kamensky<sup>a, b</sup>, N. F. Myasoedov<sup>a</sup>

<sup>a</sup>Institute of Molecular Genetics, Russian Academy of Science, 123182 Moscow, Russia

<sup>b</sup>Biological Faculty, Lomonosov Moscow State University, 119992 Moscow, Russia

\*e-mail: nglevitskaya@gmail.com

**Abstract**—Melanocortins (MCs) have a wide spectrum of physiological activity. All native MCs have a core pharmacophore structure of tetrapeptide His-Phe-Arg-Trp sequence, corresponding to ACTH<sub>6-9</sub> fragment. The sequence is necessary for activation of all subtypes of MC receptors, but the tetrapeptide has poor potency and selectivity. It was shown earlier that the addition of proline-rich sequences to natural peptides led to enhancing and prolongation of their neurotropic effects. An example of such a compound is fragment ACTH<sub>4-10</sub> analog with prolonged neurotropic effects heptapeptide Semax (ACTH<sub>4-7</sub>Pro-Gly-Pro). The work is devoted to the research of the effects of a synthetic peptide comprising the natural ACTH<sub>6-9</sub> sequence and the fragment PGP in its structure – ACTH<sub>6-9</sub>PGP (HFRWPGP). The peptide effects on the learning ability and anxiety level were studied in white rats. The peptide was injected intranasally at a dose of 0.05 mg/kg 15 min or 20 h before the experiment. It was shown that heptapeptide ACTH<sub>6-9</sub>PGP improved the acquisition of food-motivated maze task and retention of passive avoidance task, and also it exhibited an anxiolytic activity in elevated plus maze test when injected 15 min before testing. The peptide administration 20 h before testing did not lead to changes in learning parameters and anxiety level in comparison to control animals. Thus, the peptide the structure of which includes ACTH<sub>6-9</sub> fragment and tripeptide PGP has nootropic and anxiolytic activity. Consequently, the spectrum of neurotropic activity of ACTH<sub>6-9</sub>PGP coincides with the spectrum of Semax activity, but the duration of its effects is much shorter.

**Keywords:** melanocortins, synthetic analogs, learning, anxiety, intranasal administration, rat

#### ЦИТИРОВАТЬ:

Левицкая Н.Г., Глазова Н.Ю., Себенцова Е.А., Манченко Д.М., Андреева Л.А., Каменицкий А.А., Мясоедов Н.Ф. Ноотропные и анксиолитические эффекты гептапептида АКТГ6-9Pro-Gly-Pro. Рос. физиол. журн. им. И.М. Сеченова. 105(6): 761–770.

DOI: 10.1134/S0869813919060049

#### TO CITE THIS ARTICLE:

Levitskaya N.G., Glazova N.Yu., Sebentsova E.A., Manchenko D.M., Andreeva L.A., Kamensky A.A., Myasoedov N.F. Nootropic And Anxiolytic Effects Of Heptapeptide ACTH<sub>6-9</sub>Pro-Gly-Pro. Russian Journal of Physiology. 105(6): 761–770.

DOI: 10.1134/S0869813919060049