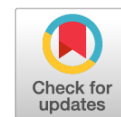


DOI: <https://doi.org/10.17816/RCF676528>

EDN: JBKGXL



Оценка транспортировки кисспептина через гематоэнцефалический барьер после интраназального введения

М.В. Литвинова, А.А. Лебедев, Е.Р. Бычков, П.Д. Шабанов

Институт экспериментальной медицины, Санкт-Петербург, Россия

АННОТАЦИЯ

Обоснование. Семейство пептидов, кодируемых геном *kiss1*, кисспептины (KISS1), — одно из новых неизученных семейств с точки зрения эффективности и интраназальной доставки. Кисспептины участвуют не только в репродуктивной функции, но и в поведенческих, эмоциональных и когнитивных реакциях. Эффективность доставки кисспептинов в центральную нервную систему откроет новые перспективы их применения.

Цель — оценить эффективность кисспептина-10 при транспортировке через гематоэнцефалический барьер после интраназального введения.

Методы. 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 внутривбрюшинно. 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 мышей после интраназального введения. Интраназальный кисспептин-10 вызывал статистически значимое повышение половой мотивации, повышение горизонтальной и вертикальной двигательной активности, уменьшение стресса и увеличение исследовательской активности у половозрелых самцов мышей. Наибольшие изменения в поведении вызвала дозировка 10 мкг, оказывая центральное действие на мозг после интраназального введения в сравнении с группами животных после внутривбрюшинного введения, в то время как показатели после внутривбрюшинного введения кисспептина-10 практически не вызывали изменений в поведении при дозах 1 и 10 мкг. Повышение дозировки до 100 мкг внутривбрюшинно показывало достоверное изменение в поведении, однако не такое сильное, как после интраназального введения вещества в количестве 10 мкг.

Заключение. Для статистически значимого изменения поведения при интраназальном пути введения требовались концентрации в 10 раз меньше, чем при периферическом введении. Исходя из очевидных эффектов кисспептина-10 после интраназального введения в каждом тесте, можно предположить, что кисспептин-10 проникал в мозг, минуя гематоэнцефалический барьер и оказывал центральное действие. Данные подтверждают потенциальную возможность и значимость такого способа доставки вещества в центральную нервную систему.

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; мыши.

Как цитировать

Литвинова М.В., Лебедев А.А., Бычков Е.Р., Шабанов П.Д. Оценка транспортировки кисспептина через гематоэнцефалический барьер после интраназального введения // Обзоры по клинической фармакологии и лекарственной терапии. 2025. Т. 23, № 2. С. 191–201. DOI: 10.17816/RCF676528 EDN: JBKGXL

DOI: <https://doi.org/10.17816/RCF676528>

EDN: JBKGXL

Evaluation of Kisspeptin Transport Across the Blood–Brain Barrier After Intranasal Administration

Maria V. Litvinova, Andrei A. Lebedev, Eugenio R. Bychkov, Petr D. Shabanov

Institute of Experimental Medicine, Saint Petersburg, Russia

ABSTRACT

BACKGROUND: The kisspeptin family (KISS1), encoded by the *kiss1* gene, is among the newly identified yet underexplored peptide families in terms of efficacy and intranasal delivery. Kisspeptins are involved not only in reproductive function but also in behavioral, emotional, and cognitive processes. Efficient delivery of kisspeptins to the central nervous system could open new perspectives for their application.

AIM: The work aimed to evaluate the efficacy of kisspeptin-10 transport across the blood–brain barrier after intranasal administration.

METHODS: The study included 45 outbred mice. Animals received kisspeptin-10 intranasally at doses of 0.1, 1, and 10 µg, and intraperitoneally at doses of 1, 10, and 100 µg. Animal behavior was assessed using the open field test, elevated plus maze, and sexual motivation test.

RESULTS: In the present study, stable and dose-dependent effects of kisspeptin-10 on mouse behavior were observed after intranasal administration. Intranasal kisspeptin-10 induced statistically significant increases in sexual motivation, horizontal and vertical locomotor activity, reduced anxiety, and enhanced exploratory behavior in sexually mature male mice. The most pronounced behavioral changes were produced by the 10 µg dose, exerting central effects after intranasal administration compared with the groups receiving intraperitoneal administration. In contrast, intraperitoneal kisspeptin-10 at doses of 1 µg and 10 µg produced virtually no behavioral changes. Increasing the intraperitoneal dose to 100 µg resulted in statistically significant behavioral changes; however, the effect was less pronounced than that observed after intranasal administration of 10 µg.

CONCLUSION: Statistically significant behavioral changes following intranasal administration required concentrations 10-fold lower than those needed for peripheral administration. Given the evident effects of intranasal kisspeptin-10 in each behavioral test, it can be assumed that kisspeptin-10 penetrated the brain, bypassing the blood–brain barrier, and exerted central effects. These findings support the potential feasibility and importance of this delivery route for targeting the central nervous system.

Keywords: kisspeptin; intranasal administration; blood–brain barrier; central nervous system; central nervous system drug delivery systems; sexual motivation; elevated plus maze; open field test; behavioral tests; sexual behavior; mice.

To cite this article

Litvinova MV, Lebedev AA, Bychkov ER, Shabanov PD. Evaluation of Kisspeptin Transport Across the Blood–Brain Barrier After Intranasal Administration. *Reviews on Clinical Pharmacology and Drug Therapy*. 2025;23(2):191–201. DOI: 10.17816/RCF676528 EDN: JBKGXL

ОБОСНОВАНИЕ

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 [1]. 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 [2]. 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 [3]. Таким образом, сохраняется потребность в разработке инновационных стратегий, которые помогут доставлять терапевтические средства в мозг для лечения заболеваний ЦНС [4]. Интраназальная 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: интраназальный 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, почечную фильтрацию и ГЭБ [5]; носовой эпителий обеспечивает оптимальную поглощающую поверхность для доставки лекарственного средства, благодаря его высокой проницаемости, неплотному межклеточному функциональному комплексу и обширной васкуляризации [6]; пути обонятельного и тройничного нервов, которые иннервируют эпителий носа, обеспечивают прямой путь к мозгу, что приводит к повышению терапевтической биодоступности ЦНС, уменьшению периферических побочных эффектов, снижению дозы и быстрому наступлению эффекта [5]; и с точки зрения ухода за пациентами, интраназальный 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).

Одно из перспективных и неизученных семейств с точки зрения интраназальной доставки — семейство пептидов, кодируемых геном *kiss1*, — кисспептины [7, 8]. 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 [9]. Экспрессия кисспептина была выявлена в лимбической системе, что делает его участником не только репродуктивной функции, но и возможным регулятором поведенческих, эмоциональных и когнитивных реакций [10]. На сегодняшний день нет ни одного фундаментального исследования, оценивающего возможность применения интраназального пути введения для кисспептинов.

Цель исследования. Анализ кисспептина-10 на транспортровку его через ГЭБ при интраназальном введении. Задачами было оценить влияние различных доз кисспептина-10 после интраназального и периферического введений на поведение экспериментальных животных.

МЕТОДЫ

Животные

В работе использовали 45 беспородных мышей массой 20–30 г, полученных из питомника Рапполово (Ленинградская обл.). 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 $22 \pm 2^\circ\text{C}$.

Тестирование животных

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. Мышей помещали в центр экспериментальной камеры — крестообразного лабиринта, который состоит из четырех рукавов длиной 30 см и шириной 6 см, соединенных под прямым углом. Два рукава имеют с двух сторон стенки высотой 30 см, а два 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 грызунов (норковый рефлекс). Освещенность открытого поля — 100 лк. Продолжительность одного

опыта — 5 мин. На основании характерологического поведенческого атласа для грызунов извлекали ряд двигательных актов и поз, совокупность которых характеризует целостное поведение в тесте. 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 пересеченных 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.

Тест «половая мотивация». Для оценки половой мотивации использовали установку, состоящую из 4 экспериментальных камер (15×30 см²), к каждой из которых прилежала стимулирующая клетка, разделенная проницаемой стенкой [11]. Перфорированная перегородка позволяла самцам мышей 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 мин. Поведение регистрировали в форме видеозаписи в темной комнате при красном свете в течение 10 мин. Между экспозициями установку и перегородку очищали 3% раствором перекиси водорода для устранения запаха. Для измерения половой мотивации для каждого животного фиксировали число попыток достичь самки, время, проведенное вблизи перегородки, и латентное время до начала реакции на самку.

Фармакологические средства

В работе был использован кисспептин-10 (Sigma, США), который разводили в дистиллированной воде для трех доз: 0,1 мкг в 20 мкл; 1 мкг в 20 мкл; 10 мкг в 20 мкл, и вводили интраназально. Для внутрибрюшинного 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 натрия хлорида. За 10–15 мин до посадки в установки для оценки поведения мышам интраназально и внутрибрюшинно вводили кисспептин-10.

Статистические методы анализа

Оценку статистической значимости 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 $p < 0,05$. Для представления полученных данных использовали такие показатели описательной статистики, как среднее арифметическое значение и ошибка среднего.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Тест «половая мотивация»

При изучении половой мотивации у каждого животного фиксировалось время, проведенное вблизи перегородки, и латентное время до начала реакции на самку (рис. 1, 2, табл. 1). Первая группа экспериментальных животных не подвергалась никакому воздействию — интактная группа. Во второй, третьей и четвертой группе животные получали

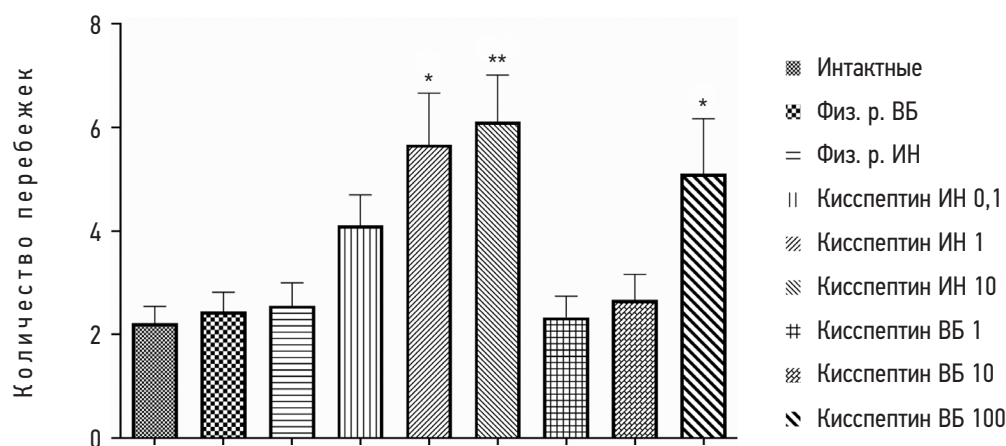


Рис. 1. Количество перебежек между рукавами в тесте «приподнятый крестообразный лабиринт». Интактные — интактная группа мышей без воздействия; Физ. р. ВБ — внутрибрюшинное введение 0,9% раствора натрия хлорида; Физ. р. ИН — интраназальное введение 0,9% раствора натрия хлорида; Кисспептин ИН 0,1 — интраназальное введение кисспептина-10 в дозировке 0,1 мкг; Кисспептин ИН 1 — интраназальное введение кисспептина-10 в дозировке 1 мкг; Кисспептин ИН 10 — интраназальное введение кисспептина-10 в дозировке 10 мкг; Кисспептин ВБ 1 — внутрибрюшинное введение кисспептина-10 в дозировке 1 мкг; Кисспептин ВБ 10 — внутрибрюшинное введение кисспептина-10 в дозировке 10 мкг; Кисспептин ВБ 100 — внутрибрюшинное введение кисспептина-10 в дозировке 100 мкг. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$ — различия между интактными и экспериментальными животными.

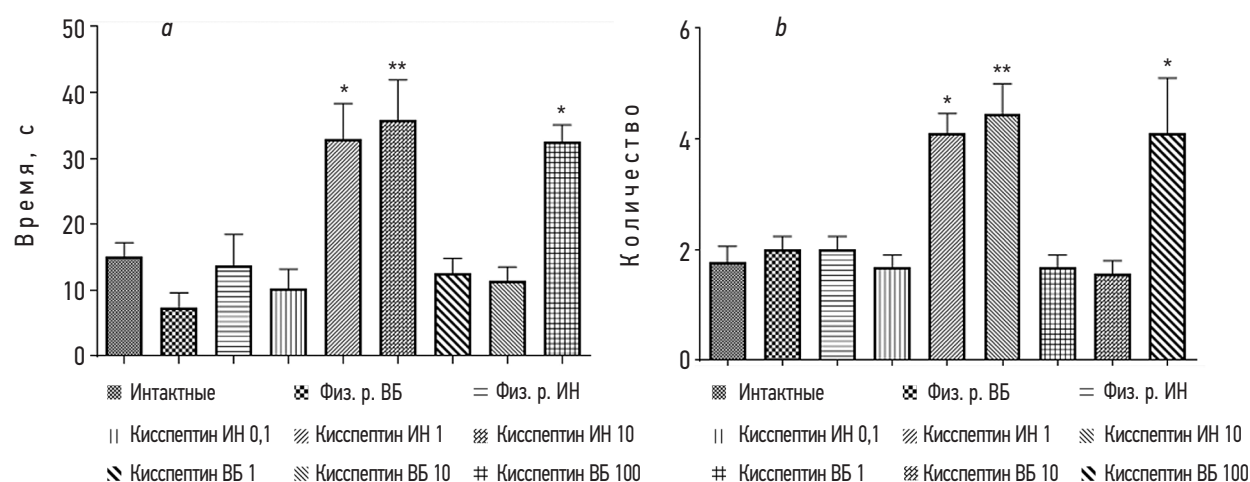


Рис. 2. Результаты теста «приподнятый крестообразный лабиринт»: *a* — время, проведенное в открытых рукавах; *b* — количество свешиваний с рукавов. Обозначения групп, как на рис. 1. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$, различия между интактными и экспериментальными животными.

Таблица 1. Поведение мышей в тесте «половая мотивация» по показателю после интраназального и внутрибрюшинного введений 0,9% раствора натрия хлорида и кисспептина-10 ($M \pm m$)

Группа	Латентное время, с	Число попыток
Интактные	9,1±1,0	13,5±1,0
Физ. р. ВБ	8,3±1,1	14,0±1,2
Физ. р. ИН	8,5±1,4	12,5±1,2
Кисспептин ИН 0,1	6,7±1,1	13,4±1,2
Кисспептин ИН 1	4,0±0,4*	22,2±2,0*
Кисспептин ИН 10	3,4±0,4**	22,8±1,8**
Кисспептин ВБ 1	8,7±1,1	11,1±1,2
Кисспептин ВБ 10	8,0±1,3	13,0±2,2 [#]
Кисспептин ВБ 100	4,1±0,5*	15,7±2,1

Примечание. Интактные — интактная группа животных без воздействия; Физ. р. ВБ — внутрибрюшинное введение 0,9% раствора натрия хлорида; Физ. р. ИН — интраназальное введение 0,9% раствора натрия хлорида; Кисспептин ИН 0,1 — интраназальное введение кисспептина-10 в дозировке 0,1 мкг; Кисспептин ИН 1 — интраназальное введение кисспептина-10 в дозировке 1 мкг; Кисспептин ИН 10 — интраназальное введение кисспептина-10 в дозировке 10 мкг; Кисспептин ВБ 1 — внутрибрюшинное введение кисспептина-10 в дозировке 1 мкг; Кисспептин ВБ 10 — внутрибрюшинное введение кисспептина-10 в дозировке 10 мкг; Кисспептин ВБ 100 — внутрибрюшинное введение кисспептина-10 в дозировке 100 мкг. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$ — различие между группой с введением кисспептина-10 и интактной группой; [#] $p < 0,01$ — различие между интраназально введенным кисспептином и внутрибрюшинно введенным кисспептином одной дозировки.

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 — кисспептин-10 в дозах 1, 10, 100 мкг внутрибрюшинно в объеме 0,2 мл соответственно; в восьмой группе — 0,9% раствор натрия хлорида интраназально 20 мкл (10 мкл в каждую ноздрю) (ложно интраназальная группа), девятая группа животных «ложно внутрибрюшинная группа» — 0,9% раствор натрия хлорида внутрибрюшинно 0,2 мл. Контрольное латентное время до начала реакции самца на самку составило 9,1±1,0 с. Интраназальное введение кисспептина-10 значительно сократило латентное время. При введении 1 мкг

кисспептина латентное время достоверно отличалось от интактной группы мышей ($p < 0,05$) и составило 4,0±0,4 с, а при введении 10 мкг латентное время уменьшалось до 3,4±0,4 с, по сравнению с интактной группой ($p < 0,01$). Внутрибрюшинное введение кисспептина-10 только максимальной дозировки существенно сократило латентное время ($p < 0,05$) по сравнению с интактной группой и составило 4,1±0,5 с. Остальные дозировки внутрибрюшинного введения кисспептина-10 (1 и 10 мкг) значимо не изменяли контрольное латентное время. Интраназальное и внутрибрюшинное введения 0,9% раствора натрия хлорида значимых изменений по сравнению с интактной группой

не показало, что говорит о незначительном повышении уровня тревожности у животных, то есть манипуляции проведены правильно. Таким образом, интраназально введенный кисспептин-10 в дозировке 1 мкг вызывал уменьшение времени до начала реакции, как и при внутрибрюшинном введении, но при дозировке, в 10 раз превышающей интраназальную.

Следующая задача эксперимента в исследовании полового поведения у мышей-самцов заключалась в определении количества попыток достижения самки самцом у перегородки. Каждая экспериментальная группа получала аналогичные препараты, как и в предыдущем исследовании. Количество попыток в интактной группе составило $13,5 \pm 1,0$. Интраназальное введение кисспептина-10 в дозировках 1 и 10 мкг статистически значимо ($p < 0,05$ и $p < 0,01$ соответственно) увеличило количество попыток по сравнению с интактной группой и составило $22,2 \pm 2,0$ и $22,8 \pm 1,8$ с соответственно. Внутрибрюшинное введение кисспептина-10 в дозировке 100 мкг существенно увеличило количество попыток по сравнению с интактной группой и составило $15,7 \pm 2,1$ с. При сравнении групп мышей после интраназального и внутрибрюшинного введений кисспептина было установлено статистически значимое увеличение количества подходов к самке почти вдвое по сравнению с группой внутрибрюшинного введения 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 соответственно) 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 по сравнению с интактной группой. Интраназальное и внутрибрюшинное введение 0,9 % раствор натрия хлорида статистически значимых 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 незначительном повышении уровня тревожности у животных, то есть манипуляции введения проведены правильно. Интраназально введенный кисспептин-10 существенно увеличил количество попыток достижения самки самцом у перегородки в двух дозировках 1 и 10 мкг, в то время как внутрибрюшинное введение даже 100 мкг не вызвало статистически значимых изменений по данному показателю. Кисспептин-10 заметно усиливает предпочтение мышей-самцов к самкам после интраназального введения. Интраназальное введение кисспептина-10 оказало влияние на половое поведение мышей-самцов, уменьшив латентное время до начала реакции на самку и увеличив количество попыток достижения самки в концентрациях в 10 раз меньше необходимых при внутрибрюшинном введении. Доза 100 мкг при внутрибрюшинном 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 статистически значимое увеличение было в группах после введения кисспептина-10 в дозах 1 и 10 мкг, что говорит об уменьшении тревожности и повышении исследовательской активности у группы мышей после интраназального введения кисспептина-10 (см. рис. 1). После интраназального введения кисспептина-10 в дозе 1 мкг количество перебежек у интактной группы увеличилось с $2,2 \pm 0,3$ до $5,7 \pm 1,0$. После интраназального введения кисспептина-10 в дозе 10 мкг количество перебежек статистически значимо увеличилось до $6,1 \pm 0,9$. Прослеживался дозозависимый эффект после введения кисспептина-10 интраназально. Различий в количестве перебежек у группы интраназального ($2,5 \pm 0,4$) и внутрибрюшинного введения 0,9% раствора натрия хлорида ($2,4 \pm 0,3$) и интактной группой ($2,2 \pm 0,3$) обнаружено не было. Внутрибрюшинное введение кисспептина в дозах 1 и 10 мкг существенных изменений по сравнению с интактной группой не показало и составило $2,0 \pm 0,3$. При повышении дозировки до 100 мкг внутрибрюшинно наблюдалось статистически значимое увеличение перебежек до $5,1 \pm 1,1$ по сравнению с интактной группой.

Следующий оцениваемый показатель — время, проведенное в открытых рукавах.

При интраназальном введении кисспептина-10 в двух дозировках наблюдалось увеличение времени пребывания в открытых рукавах по сравнению с интактной группой животных, в то время как внутрибрюшинное введение вызвало эффект лишь при одной дозировке (см. рис. 2). Существенное 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, статистически значимо увеличивалось до $35,8 \pm 6,0$ с по сравнению с интактной группой ($15,1 \pm 2,1$ с). При внутрибрюшинном введении кисспептина значимые изменения наблюдались только при максимальной дозировке, показав увеличение времени пребывания в открытых рукавах до $32,5 \pm 2,5$ с по сравнению с интактной группой ($15,1 \pm 2,1$ с). Остальные группы — интраназального и внутрибрюшинного введения 0,9% раствора натрия хлорида, внутрибрюшинного введения 1 и 10 мкг кисспептина, а также интраназальное введение кисспептина-10 в дозе 1 мкг — статистически значимых изменений по сравнению с интактной группой не показали.

При оценке количества свешиваний с рукавов было обнаружено, что интраназальное введение 1 и 10 мкг кисспептина-10 вызывало существенное увеличение в связи с возможным уменьшением уровня стресса и повышением исследовательской и двигательной активностей. Показатель после интраназального введения средней дозировки

увеличился до $4,1 \pm 0,3$ (при 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 внутрибрюшинно в дозе 100 мкг также вызывал статистически значимое 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 внутрибрюшинном введении неэффективны, поскольку не вызвали изменений в поведении. Дозировка 10 мкг при интраназальном введении фармакологического агента вызывала статистически значимые изменения по всем оцениваемым параметрам, как и после внутрибрюшинного введения 100 мкг. Таким образом, для существенного изменения поведения мышей в тесте «приподнятый крестообразный лабиринт» кисспептина-10 потребовалось в 10 раз меньше, чем при внутрибрюшинном введении.

По остальным оцениваемым показателям — время в закрытых рукавах и число актов груминга — статистически значимых различий между группами выявлено не было.

Тест «открытое поле»

Как известно, нейроны кисспептина-10 локализируются 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 исследовано влияние интраназального кисспептина-10 на эмоционально-исследовательское и двигательное поведение у мышей-самцов. Результаты исследования поведения самцов мышей в тесте «открытое поле» представлены на рис. 3 и 4. У группы животных, которым вводили интраназально 1 мкг кисспептина-10, наблюдалось небольшое увеличение горизонтальной двигательной активности (возрастание количества пересеченных квадратов) по сравнению с интактной группой, а также увеличение исследовательской активности: статистически значимо увеличивалось количество обнюхиваний ($p < 0,05$), количество исследованных норок ($p < 0,05$) и пересеченных квадратов ($p < 0,05$) по сравнению с интактной группой.

Выявлено, что после интраназального введения 10 мкг кисспептина-10 у животных наблюдалось существенное увеличение исследовательской деятельности — увеличение количества исследований норок ($p < 0,01$), обнюхиваний ($p < 0,01$), вертикальных стоек ($p < 0,05$), пересеченных квадратов ($p < 0,01$) — по сравнению с интактной группой. У групп животных интраназального и внутрибрюшинного введения 0,9% раствор натрия хлорида статистически значимых различий с интактной группой ни по одному

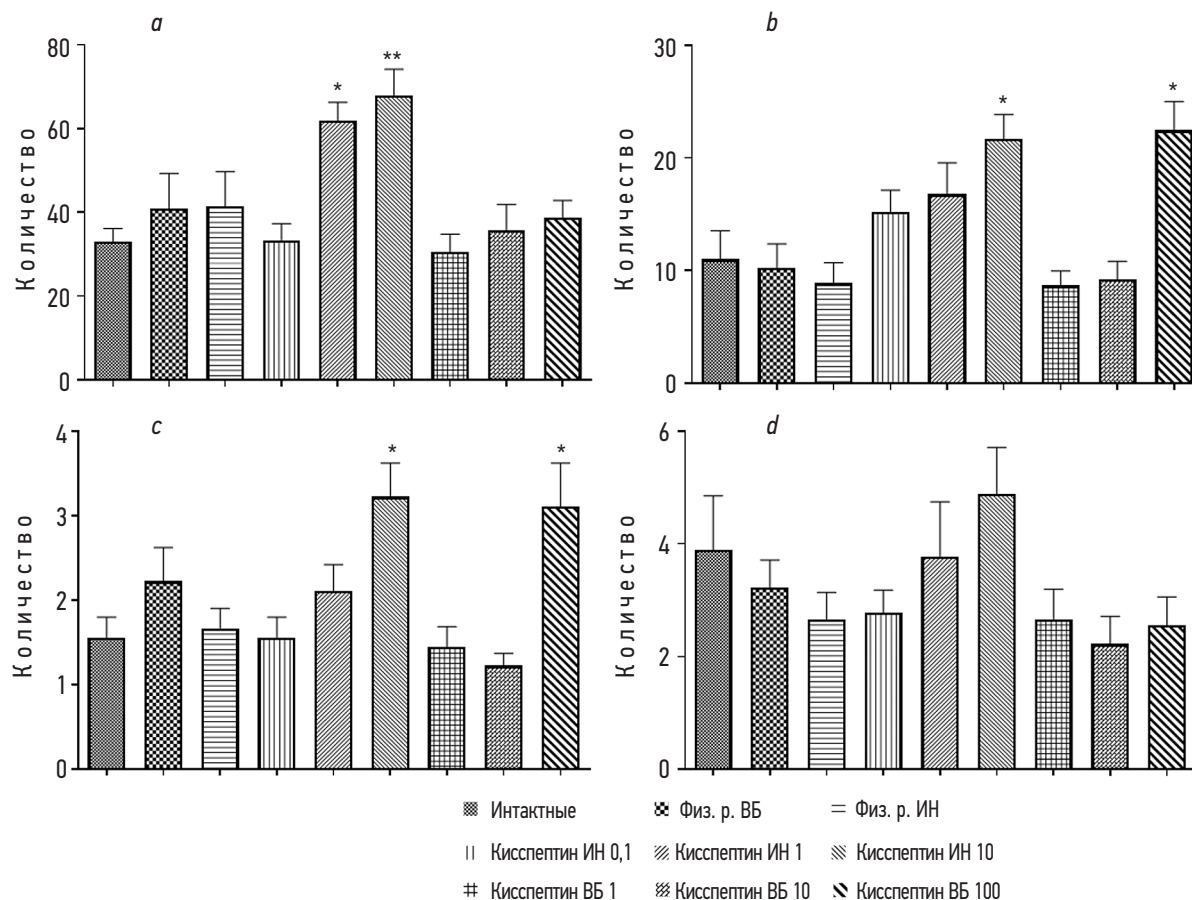


Рис. 3. Результаты теста «открытое поле» по показателям обнюхивание (a), локомоция (b), вертикальные стойки (c) и стойки с упором (d). Обозначения, как на рис. 1. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$ — различия между интактными и экспериментальными животными.

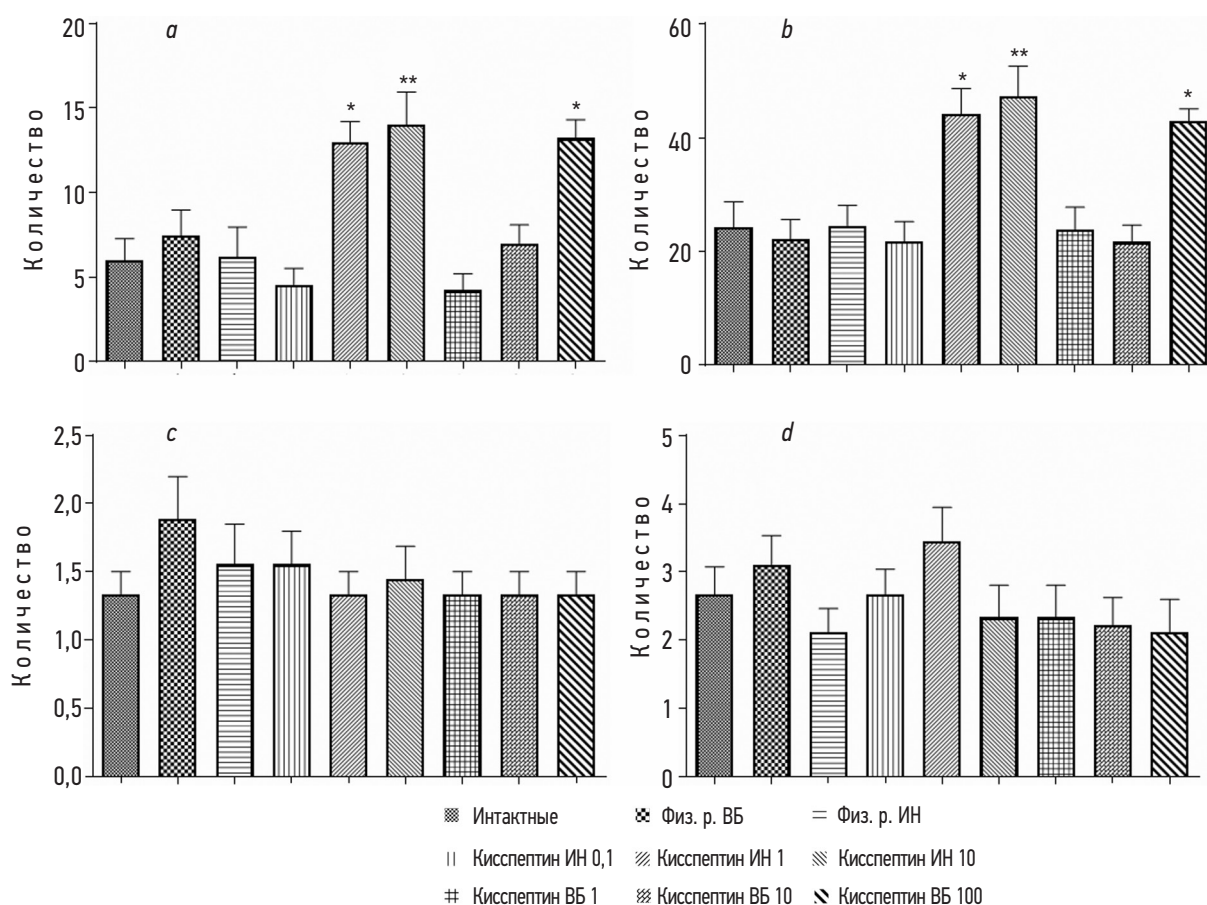


Рис. 4. Результаты теста «открытое поле» по показателям исследование норок (а), пересеченные квадраты (б), количество болюсов (в) и груминг (д). Обозначение групп, как на рис. 1. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$ — различия между интактными и экспериментальными животными.

параметру обнаружено не было. При определении параметров стоек с упором, груминга и количества болюсов значимых различий экспериментальные группы не показали.

Поведение животных, которым вводили кисспептин-10 в дозах 1 и 10 мкг, существенно не изменялось ни по одному параметру. Внутривбрюшинное введение 100 мкг кисспептина-10 характеризуется статистически значимым увеличением горизонтальной активности, вертикальных стоек, исследований норок и пересеченных квадратов ($p < 0,05$) по сравнению с интактными мышами. По остальным показателям не выявлено статистически значимых отличий от интактной группы.

Таким образом, эмоционально-исследовательское и двигательное поведение после интраназального введения кисспептина-10 изменялось значимо и дозозависимо, по сравнению с интактной группой. Внутривбрюшинное введение кисспептина-10 в дозировке, в 10 раз превышающей дозировку при интраназальном введении, статистически значимо меньше влияло на поведение животных, что указывает на эффективность интраназального метода доставки кисспептина-10 в ЦНС в более низких дозах по сравнению с периферическими методами введения.

ОБСУЖДЕНИЕ

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 значимо изменяются дополнительно к вышеперечисленным показателям горизонтальная активность и стойки с упором ($p < 0,01$).

В то время как внутривбрюшинное введение кисспептина-10 в дозировках 1 и 10 мкг существенных различий не продемонстрировало, а введение 100 мкг оказало влияние на показатели исследования норок, пересеченные квадраты, вертикальные стойки и горизонтальная активность по сравнению с интактными мышами ($p < 0,05$).

Таким образом, тестирование в открытом поле продемонстрировало значимое повышение исследовательской и двигательной активности у мышей после

интраназального введения исследуемого вещества и увеличение эффекта при повышении дозы. Группа мышей после внутрибрюшинного 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 значимостью.

В тесте «приподнятый крестообразный лабиринт» при интраназальном введении ксипептина-10 в дозе 0,1 мкг существенных изменений не наблюдалось. При введении 1 мкг интраназально было отмечено значимое увеличение двух показателей: времени, проведенного в открытых рукавах, и количества свешиваний с рукавов ($p < 0,05$) 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 свешиваний с рукавов ($p < 0,01$), что указывает на дозозависимый эффект ксипептина-10. Наиболее эффективной концентрацией оказалась доза 10 мкг.

Внутрибрюшинное введение 1 и 10 мкг ксипептина-10 не влияло на поведение животных, однако введение 100 мкг вызывало увеличение времени проведения в открытых рукавах, количество свешиваний и количество перебежек между рукавами ($p < 0,05$), данные эффекты сопоставимы интраназальному введению ксипептина в дозировке 1 мкг.

Увеличение данных показателей опосредовано уменьшением тревожности и/или повышением исследовательской активности у группы мышей после интраназального введения ксипептина-10.

По остальным оцениваемым показателям — время в закрытых рукавах и число актов груминга — статистически значимых различий между группами выявлено не было.

Таким образом, ксипептин, доставляемый интраназальным методом проникал в ЦНС, в результате чего значимо изменял поведение в тесте «приподнятый крестообразный лабиринт». Эффекты ксипептина-10 при внутрибрюшинном введении сопоставимы интраназальному введению ксипептина в дозировке 1 мкг. Наибольший эффект вызывает интраназальное введение ксипептина в дозе 10 мкг.

В тесте «половая мотивация» оба исследуемых показателя продемонстрировали изменения у группы мышей после интраназального метода доставки ксипептина-10. Интраназальное введение фармакологического агента достоверно сократило латентное время и увеличило количество попыток достижения самки самцом у перегородки в дозе 1 мкг ($p < 0,05$) и 10 мкг ($p < 0,01$) соответственно по сравнению с интактной группой. При внутрибрюшинном введении значимые изменения наблюдались только после введения 100 мкг и только по одному показателю. Наблюдалось уменьшение латентного времени ($p < 0,05$) по сравнению с интактной группой мышей. Действие

ксипептина после периферического введения может быть связано с его опосредованным влиянием на половое поведение или проникновением части вещества в центральные структуры. Таким образом, можно предположить, что ксипептин-10 при интраназальном введении проникал в мозг и оказывал центральное действие, за счет чего вызывал повышение половой мотивации у половозрелых самцов мышей по обоим параметрам. Ксипептин-10 заметно усиливал предпочтение мышей-самцов к самкам, в то время как внутрибрюшинное введение показало изменение по одному из параметров. Результаты настоящего исследования демонстрируют возможность доставки ксипептина в мозг после интраназального введения.

Таким образом, в каждом из трех поведенческих тестов наблюдались достоверные изменения после интраназального введения ксипептина-10, который проявлял дозозависимый эффект. В то время как показатели после внутрибрюшинного введения ксипептина-10 практически не вызывали изменений в поведении при дозах 1 и 10 мкг. Повышение дозировки до 100 мкг внутрибрюшинно показывало существенное изменение в поведении, однако не такое сильное, как после интраназального введения вещества в количестве 10 мкг. Суммируя, можно предположить, что интраназальный метод 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, одно из главных — обход ГЭБ. В настоящем исследовании впервые было продемонстрировано центральное действие ксипептина-10 на мозг после интраназального введения, в сравнении с группами животных после внутрибрюшинного введения, а также введения 0,9% раствора натрия хлорида аналогичными способами, и показана дозозависимость наблюдаемого эффекта. Были получены стабильные и дозозависимые эффекты ксипептина-10 на поведение мышей после интраназального введения. Интраназальный ксипептин-10 вызывал значимое повышение половой мотивации, повышение горизонтальной и вертикальной двигательной активности, уменьшение стресса и увеличение исследовательской активности у половозрелых самцов мышей. Исходя из очевидных эффектов ксипептина-10 после интраназального введения в каждом тесте, можно предположить, что ксипептин-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 на процессы эмоциональной природы (например, уменьшение тревожности).

Вторым преимуществом интраназального пути доставки является низкая дозировка активного вещества. В данной работе использовали три дозы киспептина-10 интраназально, которые меньше внутрибрюшинных доз в 10 раз. Даже высокая концентрация вещества не показала значительных изменений в поведении при периферическом 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 их стабильной концентрации, и сложность точного дозирования. В связи с этим существует большая необходимость в фундаментальных исследованиях интраназального метода доставки.

ДОПОЛНИТЕЛЬНАЯ ИНФОРМАЦИЯ

Вклад авторов. М.В. Литвинова, А.А. Лебедев, Е.Р. Бычков — получение результатов, анализ данных, написание статьи; П.Д. Шабанов — разработка общей концепции, рецензирование статьи. Все авторы одобрили рукопись (версию для публикации), а также согласились нести ответственность за все аспекты работы, гарантируя надлежащее рассмотрение и решение вопросов, связанных с точностью и добросовестностью любой ее части.

Этическая экспертиза. Проведение исследования одобрено локальным этическим комитетом ФГБНУ «Институт экспериментальной медицины» (протокол № 2/23 от 15.06.2023).

Источник финансирования. Исследование выполнено в рамках государственного задания ФГБНУ «Институт экспериментальной медицины» FGWG-2025-0020 «Поиск молекулярных мишеней для фармакологического воздействия при аддиктивных и нейроэндокринных нарушениях с целью создания новых фармакологически активных веществ, действующих на рецепторы ЦНС».

Раскрытие интересов. Авторы заявляют об отсутствии отношений, деятельности и интересов за последние три года, связанных с третьими лицами (коммерческими и некоммерческими), интересы которых могут быть затронуты содержанием статьи.

Оригинальность. При создании настоящей работы авторы не использовали ранее опубликованные сведения (текст, иллюстрации, данные).

Доступ к данным. Все данные, полученные в настоящем исследовании, доступны в статье.

Генеративный искусственный интеллект. При создании настоящей статьи технологии генеративного искусственного интеллекта не использовали.

Рассмотрение и рецензирование. Настоящая работа подана в журнал в инициативном порядке и рассмотрена по обычной процедуре. В рецензировании участвовали два внешних рецензента и член редакционной коллегии.

ADDITIONAL INFO

Author contributions: M.V. Litvinova, A.A. Lebedev, E.R. Bychkov: investigation, formal analysis, writing—original draft; P.D. Shabanov: conceptualization, writing—review & editing. All the authors approved the version of the draft to be published and agreed to be accountable for all aspects of the work, ensuring that issues related to the accuracy or integrity of any part of the work are appropriately investigated and resolved.

Ethics approval: The conduct of the study was approved by the local ethical committee of Institute of Experimental Medicine (protocol No. 2/23 dated 2023 Jun 15).

Funding source: The study was carried out within the framework of the state assignment of the Institute of Experimental Medicine FGWG-2025-0020 “Search for molecular targets for pharmacological action in addictive and neuroendocrine disorders with the aim of creating new pharmacologically active substances acting on CNS receptors”.

Disclosure of interests: The authors have no relationships, activities or interests for the last three years related with for-profit or not-for-profit third parties whose interests may be affected by the content of the article.

Statement of originality: No previously obtained or published material (text, images, or data) was used in this study or article.

Data availability statement: All data generated in this study are available in the article.

Generative AI: Generative AI technologies were not used for this article creation.

Provenance and peer-review: This work was submitted to the journal on its own initiative and reviewed according to the standard procedure. Two external reviewers, and a member of the editorial board participated in the review.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ | REFERENCES

1. Pfeferbaum B, North CS. Mental health and the COVID-19 pandemic. *N Engl J Med*. 2020;383(6):510–512. doi: 10.1056/NEJMp2008017
2. Trofimov AN, Litvinova MV, Schwarz AP, et al. Molecular mechanisms of molecular transfer across the blood-brain barrier as a target for pharmacological action. Part 1. Structure, function and pathology of the BBB. *Pharmacy Formulas*. 2022;4(2):60–69. doi: 10.17816/phf109914 EDN: UQEDBL
3. Profaci CP, Munji RN, Pulido RS, Daneman R. The blood–brain barrier in health and disease: important unanswered questions. *J Exp Med*. 2020;217(4):e20190062. doi: 10.1084/JEM.20190062/151582
4. Litvinova MV, Tissen IY, Lebedev AA, et al. Influence of oxytocin on the central nervous system by different routes of administration. *Psychopharmacology and biological narcology*. 2023;14(2):139–148. doi: 10.17816/phbn501752 EDN: ANORKE
5. Litvinova MV, Trofimov AN, Shabanov PD, et al. Molecular mechanisms of transport of substances across the blood-brain barrier as targets for pharmacological action. Part 2. Modern methods of delivery of pharmacological agents to the central nervous system. *Pharmacy Formulas*. 2022;4(3):82–96. doi: 10.17816/phf120109 EDN: QSCSBH

6. Veronesi MC, Alhamami M, Miedema SB, et al. Imaging of intranasal drug delivery to the brain. *Am J Nucl Med Mol Imaging*. 2020;10(1):1–31.
7. Tissen IYu, Chepik PA, Lebedev AA, et al. Conditioned place preference of kisspeptin-10. *Reviews on Clinical Pharmacology and Drug Therapy*. 2021;19(1):47–53. doi: 10.17816/RCF19147-53 EDN: SSEPQB
8. Magarramova L, Tissen I, Blazhenko A, et al. Kisspeptin is testosterone independent regulator of sexual motivation in male rats. *J Exp Biol Agric Sci*. 2022;10(1):131–134. doi: 10.18006/2022.10(1).131.134
9. Hellier V, Brock O, Candlish M, et al. Female sexual behavior in mice is controlled by kisspeptin neurons. *Nat Commun*. 2018;9(1):400. doi: 10.1038/s41467-017-02797-2
10. Edouard GA, Mills KT, Comninou AN. Kisspeptin as a behavioral hormone. *Semin Reprod Med*. 2019;37(2):56–63. doi: 10.1055/s-0039-3400239
11. Zhukov IS, Ptukha MA, Zolotoverkhaja EA, et al. Evaluation of approach to a conspecific and blood biochemical parameters in TAAR1 knockout mice. *Brain Sci*. 2022;12(5):614. doi: 10.3390/brainsci12050614

ОБ АВТОРАХ

***Литвинова Мария Владимировна**; адрес: Россия, 197376, Санкт-Петербург, ул. Академика Павлова, д. 12;
eLibrary SPIN: 9548-4683; e-mail: litvinova-masha@bk.ru

Лебедев Андрей Андреевич, д-р биол. наук, профессор;
ORCID: 0000-0003-0297-0425; eLibrary SPIN: 4998-5204;
e-mail: aalebedev-iem@rambler.ru

Бычков Евгений Рудольфович, д-р мед. наук;
ORCID: 0000-0002-8911-6805; eLibrary SPIN: 9408-0799;
e-mail: bychkov@mail.ru

Шабанов Петр Дмитриевич, д-р мед. наук, профессор;
ORCID: 0000-0003-1464-1127; eLibrary SPIN: 8974-7477;
e-mail: pdshabanov@mail.ru

AUTHORS' INFO

***Maria V. Litvinova**; address: 12 Akademika Pavlova st., 197376, Saint Petersburg, Russia; eLibrary SPIN: 9548-4683;
e-mail: litvinova-masha@bk.ru

Andrei A. Lebedev, Dr. Sci. (Biology), Professor;
ORCID: 0000-0003-0297-0425; eLibrary SPIN: 4998-5204;
e-mail: aalebedev-iem@rambler.ru

Eugenii R. Bychkov, MD, Dr. Sci. (Medicine);
ORCID: 0000-0002-8911-6805; eLibrary SPIN: 9408-0799;
e-mail: bychkov@mail.ru

Petr D. Shabanov, MD, Dr. Sci. (Medicine), Professor;
ORCID: 0000-0003-1464-1127; eLibrary SPIN: 8974-7477;
e-mail: pdshabanov@mail.ru

* Автор, ответственный за переписку / Corresponding author