

РОЛЬ КИССПЕПТИНА В РЕГУЛЯЦИИ ЭМОЦИОНАЛЬНЫХ СОСТОЯНИЙ ПРИ МОДЕЛИРОВАНИИ ОСТРОГО СТРЕССОВОГО РАССТРОЙСТВА В РЯДУ ПОЗВОНОЧНЫХ

© 2025 г. В. А. Гольц¹, А. А. Лебедев^{1,*}, С. С. Пюрвеев^{1,2}, А. П. Перова^{1,4}, Е. Р. Бычков^{1,3}, И. Ю. Тиссен¹, С. Г. Цикунов¹, П. Д. Шабанов¹

¹Институт экспериментальной медицины, Санкт-Петербург, Россия

²Санкт-Петербургский государственный педиатрический медицинский университет Минздрава России, Санкт-Петербург, Россия

³Военно-медицинская академия им. Кирова, Санкт-Петербург, Россия

⁴Санкт-Петербургский государственный университет, Санкт-Петербург, Россия

*e-mail: aalebedev-iem@rambler.ru

Поступила в редакцию 17.02.2025 г.

После доработки 07.04.2025 г.

Принята к публикации 14.04.2025 г.

При острых стрессовых расстройствах наблюдаются депрессивные, тревожно-фобические состояния и половые дисфункции, которые плохо поддаются лечению. Для коррекции этих нарушений предложены нейропептиды группы кисспептина. Ранее мы показали действие аналогов кисспептина на активацию полового поведения при моделировании острых стрессовых расстройств. Целью настоящей работы было определить роль кисспептина в регуляции эмоционального поведения после острого стресса предъявления хищника в ряду позвоночных. Исследовали последствия предъявления рыбы хищника *Hypsophrys nicaraguensis* у *Danio rerio* и предъявления тигрового питона крысам Wistar. Аналогично поведению грызунов у рыб наблюдались проявления отрицательных эмоциональных состояний: фризинг на дне и снижение двигательной активности. Введение феназепама, пароксетина или кисспептина 10 снимали эффекты от предъявления хищника у *Danio rerio*: увеличивалось число перемещений в верхнюю часть аквариума; снижалось время в нижней части аквариума. В отличие от феназепама кисспептин 10 не снижал тревожно-фобических реакций в приподнятом крестообразном лабиринте при моделировании острого стрессового расстройства у крыс, проявляя при этом растормаживающий и антидепрессантный эффекты в тесте Порсолта подобно действию ингибитора обратного захвата серотонина пароксетина. Данные об однонаправленных эффектах кисспептина 10 и пароксетина у *Danio rerio* и крыс Wistar подтверждают роль кисспептина в модуляции серотонин-зависимого поведения при моделировании острого стрессового расстройства. Данные подтверждают гипотезу участия кисспептинов для снятия тревожно-фобических состояний при поддержании эмоциональных аспектов репродуктивного поведения, таких как половая мотивация, территориальное поведение и возбуждение в ряду позвоночных. Работа показывает перспективы внедрения *Danio Rerio* в протоколы доклинических и трансляционных исследований при изучении острых стрессовых расстройств.

Ключевые слова: кисспептин, *Danio rerio*, крысы Wistar, хищник, поведение

DOI: 10.31857/S0044452925020063, **EDN:** IFODHX

ВВЕДЕНИЕ

Кисспептин и его рецепторы (kiss-r) обнаружены у низших и высших позвоночных [1]. Его рассматривают как пептидный гормон, который влияет на лимбическую систему, гипоталамо-гипофизарно-гонадную и гипоталамо-гипофизарно-надпочечниковую нейроэндокринные оси [2], которые соответственно регулируют функции нейромедиаторов, половых стероидов и гормонов стресса [3]. Известно, что в ЦНС кисспептин выступает в роли эндокринного регулятора полового развития и репродуктивных функций [4]. По структуре он

представляет собой пептид, состоящий из 145 аминокислотных остатков, которые подвергаются протеолитическому расщеплению до состоящего из 54 остатков С-концевого активного пептида, который далее распадается на более короткие формы, а именно кисспептин 10, 13, 14 (рис. 1) [5]. Каноническим рецептором кисспептинов является связанный с G-белком рецептор Gpr54, который активируется всеми биологически активными продуктами гена Kiss1. Несмотря на то что Gpr54 изначально был описан в 1999 году как безлигандный рецептор, аналогичный рецепторам галанина, после его

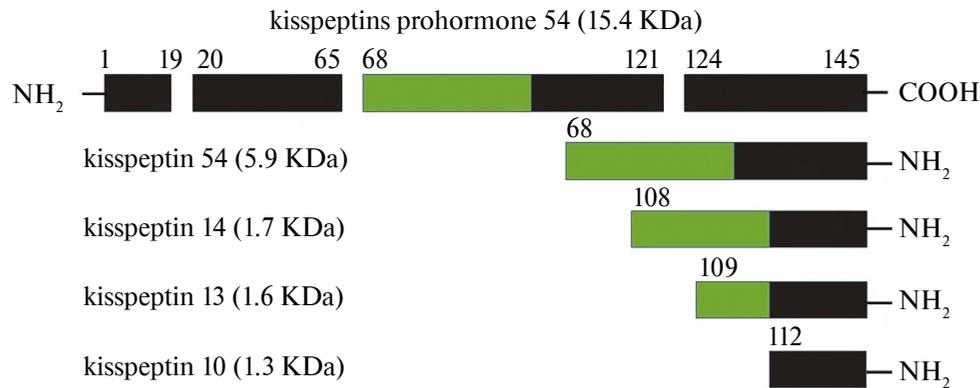


Рис. 1. Основные структурные особенности кисспептинов, образующихся в результате посттрансляционной модификации его прогормона [5].

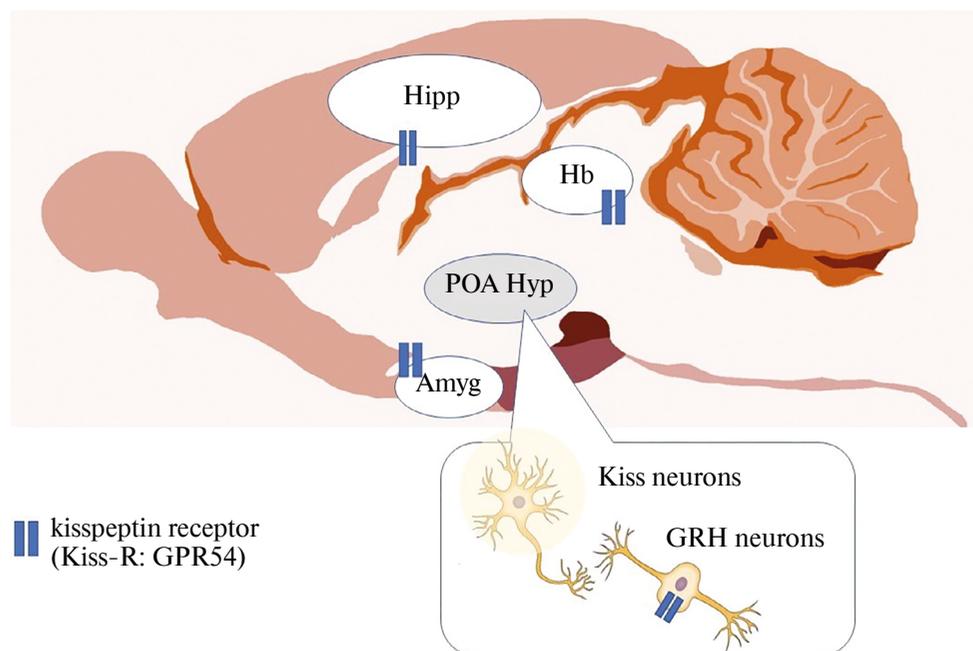


Рис. 2. Схематическая модель действия кисспептина в регуляции поведения млекопитающих: POA/Нур – ядра гипоталамуса; Amyg – миндалина; Hb – уздечка; Hipp – гиппокамп; GnRH – гонадотропин-рилизинг-гормон.

идентификации в 2001 году, он был назван рецептором кисспептина-1 (*kiss1r*). Известно, что кисспептин кодируется геном *kiss1*. К примеру, у костистых рыб идентифицированы два гомологичных гена (*kiss1* и *kiss2*), кодирующие кисспептин, при этом *kiss1* имеет более высокое сходство к *kiss-r1*, а *kiss2* имеет более высокое сходство к *kiss-r2* соответственно [6].

Рецепторы кисспептина экспрессируются в различных участках лимбической системы: ядрах гипоталамуса (дугообразном ядре, паравентрикулярном ядре), таламических ядрах, миндалине, гиппокампе, прозрачной перегородке, ядре ложа конечной полоски, полосатом теле, прилежащем ядре, уздечке, околосеротониновом сером веществе (рис. 2) [7].

Показано, что *kiss2* обладает большей активностью по сравнению с *kiss1*, особенно в отношении репродуктивного поведения. Результаты анализа Real Time PCR показали, что нейроны, содержащие *kiss1*, располагаются преимущественно в дорсомедиальной и вентромедиальной уздечке, причем их аксоны проецируются на вентральные части интерпедункулярного ядра и ядра шва. С другой стороны, экспрессия мРНК *kiss2r* широко распространена в мозге крыс, включая обонятельную луковицу, передний мозг, преоптическую область, средний мозг, гипоталамус, мозжечок и спинной мозг [8]. Исследования на *Danio rerio* показали, что нейроны *kiss1* расположены в уздечке, в то время как нейроны *kiss2* расположены в заднем бугре чет-

верохолмия и гипоталамусе [9, 10]. Нейроны kiss1 проецируются на межножковые ядра и ядра шва, где экспрессируется kiss1r; в то время как нейроны kiss2 проецируются на субпаллидум, преоптическую область (РОА), таламус, гипоталамус и средний мозг, где экспрессируется kiss2r. В вентральном комплексе ядер переднего мозга, РОА и гипоталамусе у костистых рыб локализуются нейроны, содержащие гонадолиберин, которые регулируют размножение [1].

У *Danio rerio* существует два лиганда (kiss1, kiss2) и три рецептора кисспептина (kiss1r, kiss2r и kiss3r). Локализация нейронов *Danio Rerio*, содержащих kiss1 или kiss2, позволяет предположить, что в то время, как kiss2 участвуют в половом созревании, kiss1 выполняет другие функции (например, регулирует реакции на стресс и территориальное поведение при размножении) [6].

Нейроны, синтезирующие kiss2, в основном присутствуют в дорсальном и вентральном гипоталамусе, а их проекции нервных клеток достигают нескольких областей мозга, включая преоптическую область и вентральный гипоталамус. Такое широкое распространение подразумевает, что kiss2 может обладать несколькими функциями [11]. Преоптическая область и гипоталамус играют важную роль в распределении гипофизотропных нейронов. Предполагалось, что нейроны kiss2 в вентральном гипоталамусе могут регулировать размножение, однако остается неясным, проецируются ли эти нейроны kiss2 на гипофиз [12]. Последующие физиологические исследования сыграли ключевую роль в определении роли кисспептина в репродуктивной системе: кисспептин стимулирует высвобождение эндогенного гонадотропин-рилизинг-гормона (ГнРГ), что приводит к высвобождению гонадотропинов — лютеинизирующего гормона (ЛГ) и фолликулостимулирующего гормона (ФСГ) из передней доли гипофиза и последующему высвобождению половых стероидов из половых желез [13, 14].

Показано взаимодействие между кисспептином и активностью гипоталамо-гипофизарно-надпочечниковой оси (ГГН). Повышение уровня кортикостерона в ответ на стресс может подавлять передачу сигналов кисспептина в гипоталамусе у грызунов [15]. Одним из факторов, вызывающих ПТСР, является витальный стресс предъявления хищника [24]. Действие стресса, вызванного хищником, влияет на половую мотивацию, гипоталамо-гипофизарно-надпочечниковую ось и на продукцию половых гормонов. Введение кисспептина повышает половую мотивацию у самцов крыс после хронического стресса. Это создает предпосылки для поиска новых механизмов, лежащих в основе влияния стрессовых факторов на регуляцию репродуктивного и эмоционального поведения [25].

Цель работы — сравнительное исследование участия кисспептина 10 в регуляции эмоциональных реакций на стресс предъявления хищника у рыб *Danio Rerio* и крыс Wistar.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Объект исследования. В работе использованы 60 половозрелых рыб *Danio rerio* (zebrafish) в возрасте 6–8 месяцев (молодые половозрелые животные, жизненный цикл до 5 лет), выращенных в ФГБНУ “ИЭМ”. Для тестирования использовали интактных животных после двухнедельного периода адаптации к помещению и аквариумам водоизмещением 40 литров по 20–30 животных в каждом. Температуру воды 25–27 °С поддерживали постоянно. Животных содержали в стандартных условиях светового режима (8.00–20.00) при температуре помещения 22 ± 2 °С, кормили дважды в день стандартным кормом “Tetramin tropical flakes”.

Также в работе использованы 36 половозрелых крыс-самцов линии Вистар массой около 200 г. Животные были получены из питомника РАН “Рапполово” (Ленинградская обл.) Условия содержания животных в виварии обеспечивали для них нормальный биологический фон и полностью соответствуют требованиям Санитарных правил по устройству, оборудованию и содержанию экспериментально-биологических клиник (вивариев) от 06.04.1973 г. Рацион животных соответствует Приказу МЗ No1179 от 1983 г. Кормление осуществлялось ad libitum.

Тест стресса новизны (незнакомого аквариума). Для оценки поведения рыб *Danio Rerio* использовали тест новизны: рыбу помещали сначала в мерный стакан с растворенным фармакологическим веществом или без него, а затем в просмотровый аквариум на 6 мин, где автоматически регистрировали траекторию движения, длину пути и число перемещений в верхнюю часть аквариума, а также время пребывания в нижней части аквариума, число и время паттерна “фризинг” [4]. Поведение регистрировали автоматически с помощью системы EthoVision XT7 (Noldus, Нидерланды).

Модель стресса с хищником у рыб. В экспериментах с хищником рыбу сначала помещали в мерный стакан водоизмещением 200 мл с растворенным фармакологическим веществом (или H₂O без вещества) на 5 мин, затем в предстартовый аквариум с хищником *Hypsophrys nicaraguensis* (10 × 10 × 10 см) на 5 мин и далее в просмотровый аквариум, который обычно используется для оценки новизны стимула, на 6 мин (рис. 3) [4, 6].

Модель стресса с хищником у крыс. Животных помещали в террариум к тигровому питону *Python molurus*, где одно из них становилось жертвой пи-

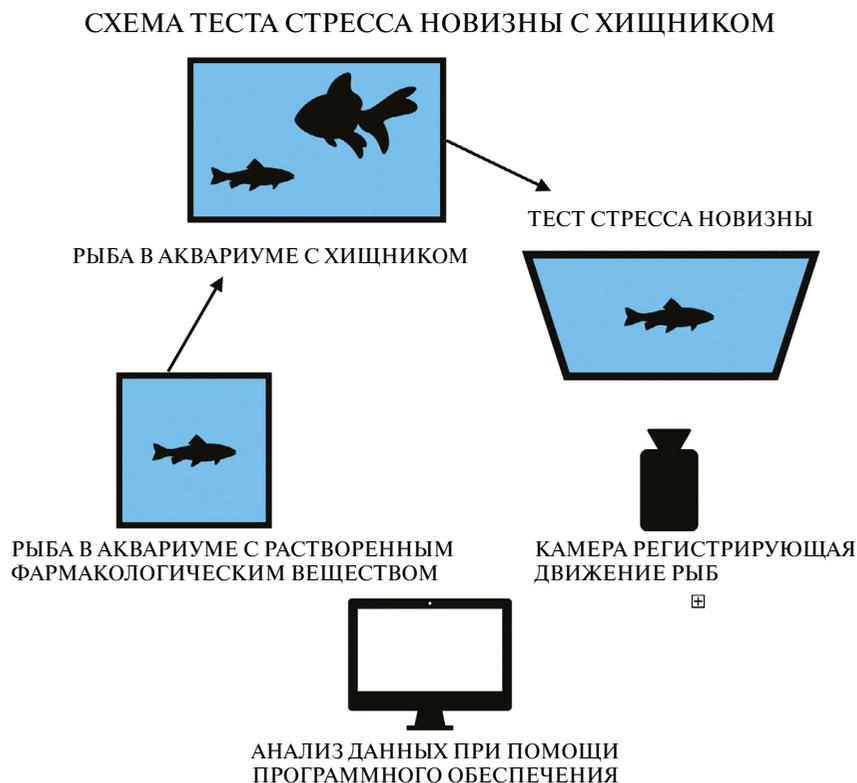


Рис. 3. Схема теста новизны с хищником.

щевых потребностей хищника. Пережившие гибель партнера животные далее находились в террариуме за прозрачной перегородкой в течение 30–40 мин. Во время нанесения психической травмы у крыс фиксировали выраженные реакции страха, проявившиеся у животных в виде таких поведенческих актов, как “фризинг”, сбивания в кучи, вертикальные стойки, продолжительный и измененный груминг. Отдельные животные могли осуществлять ажитированное бесконтрольное перемещение по террариуму. Контрольная группа крыс не подвергалась стрессорному воздействию ($n = 10$) [24, 25].

Тест принудительного плавания Порсолта. Его использовали для оценки выраженности депрессивноподобного состояния животных. Установка представляла собой стеклянный цилиндр диаметром 20 см и высотой 45 см, заполненный водой на 2/3. Длительность тестирования составляла 5 мин, регистрировали время неподвижности (иммобилизации) животного после помещения в воду 28°C, соответствующего его уровню депрессивноподобного поведения.

Тест “Приподнятый крестообразный лабиринт”. Крестообразная установка состояла из двух открытых рукавов 50 × 10 см и двух закрытых рукавов 50 × 10 см, расположенных перпендикулярно относительно друг друга. Высота лабиринта над полом 1 метр. Животное помещали в центр лабиринта.

Продолжительность теста для каждой отдельной крысы составляла 5 мин. Фиксировали время пребывания в открытых “рукавах”. Чем меньше время нахождения в открытых рукавах лабиринта, тем выше уровень тревожности.

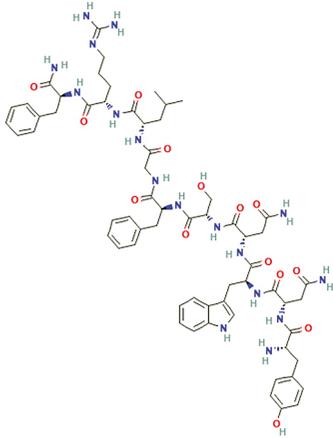
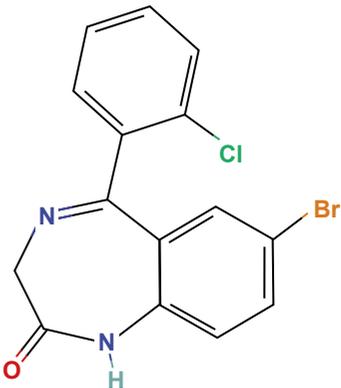
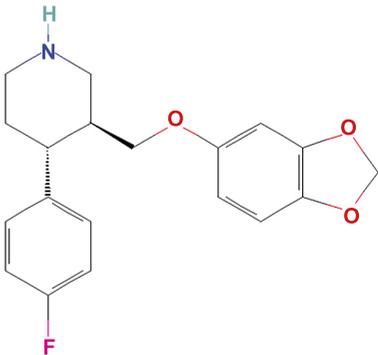
Фармакологические вещества. Используемые в работе фармакологические соединения представлены в таблице 1.

Статистическая обработка данных. Оценка статистической достоверности проводилась с помощью программы GraphPadPrism 10. Для оценки нормальности распределения использовался критерий Шапиро–Уилка. Для сравнения групп использовались однофакторный дисперсионный анализ ANOVA с последующим post-hoc анализом групп по критерию Tukey для сравнения групп с контролем. Различия считали статистически значимыми при значении $p < 0.05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

В ходе экспериментов нами были установлены типичные поведенческие реакции на новизну (то есть на помещение животного в просмотровый аквариум). Как правило, рыба находилась в это время в нижней части просмотрового аквариума и совершала перемещения вдоль него. На начальной стадии исследований была проведена оценка пове-

Таблица 1. Формула и дозы лекарственных препаратов

Препарат и производитель	Формула	Доза и способ введения	
		Для <i>Danio rerio</i>	Для крыс
Кисспептин 10 KS10 “Cloud Clone” (USA):		Растворяли в воде для аквариумов в дозе 0.1 мг/л	Внутрибрюшинно 0.5 мг/кг
Феназепам ОАО “Новосибхимфарм” (Россия)		Растворяли в воде для аквариумов в дозе 0.5 мг/л	Внутрибрюшинно 0.5 мг/кг
Пароксетин ООО “Озон” (Россия)		Растворяли в воде для аквариумов в дозе 1 мг/л	Внутрибрюшинно 1 мг/кг

Примечание. Для исследования эффектов предъявления хищника у *Danio Rerio* использовали наиболее эффективную дозу субстанций, выявленную в предварительных экспериментах по фармакологическому анализу действия кисспептина 10, анксиолитиков и антидепрессантов [4, 7]. Для исследования эффектов предъявления хищника у крыс также использовали эффективную дозу вещества и выявленную в предварительных экспериментах [4]. Исследуемые вещества вводили за 30 мин до тестирования.

денческих паттернов у рыб интактного контроля и изменение этих паттернов на фоне предъявления хищника у *Danio rerio*.

Общая траектория у *Danio rerio*, которая автоматически регистрировалась по продолжительности

трека, после предъявления хищника увеличилась почти в два раза относительно группы интактного контроля ($p < 0.001$, рис. 5a). Число и время паттерна “фризинг” автоматически регистрировались: при этом воздействие хищника достоверно не по-

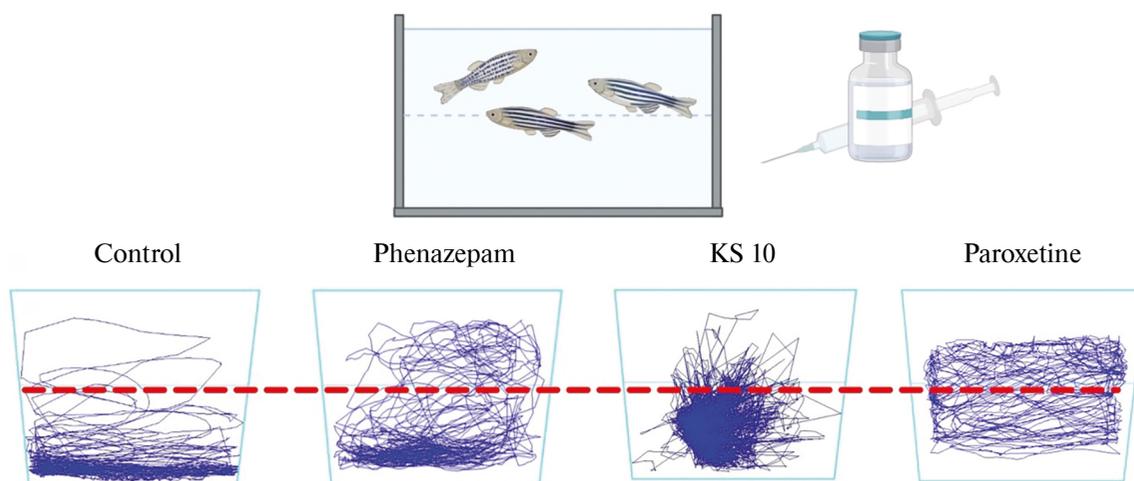


Рис. 4. Траектория движения рыб.

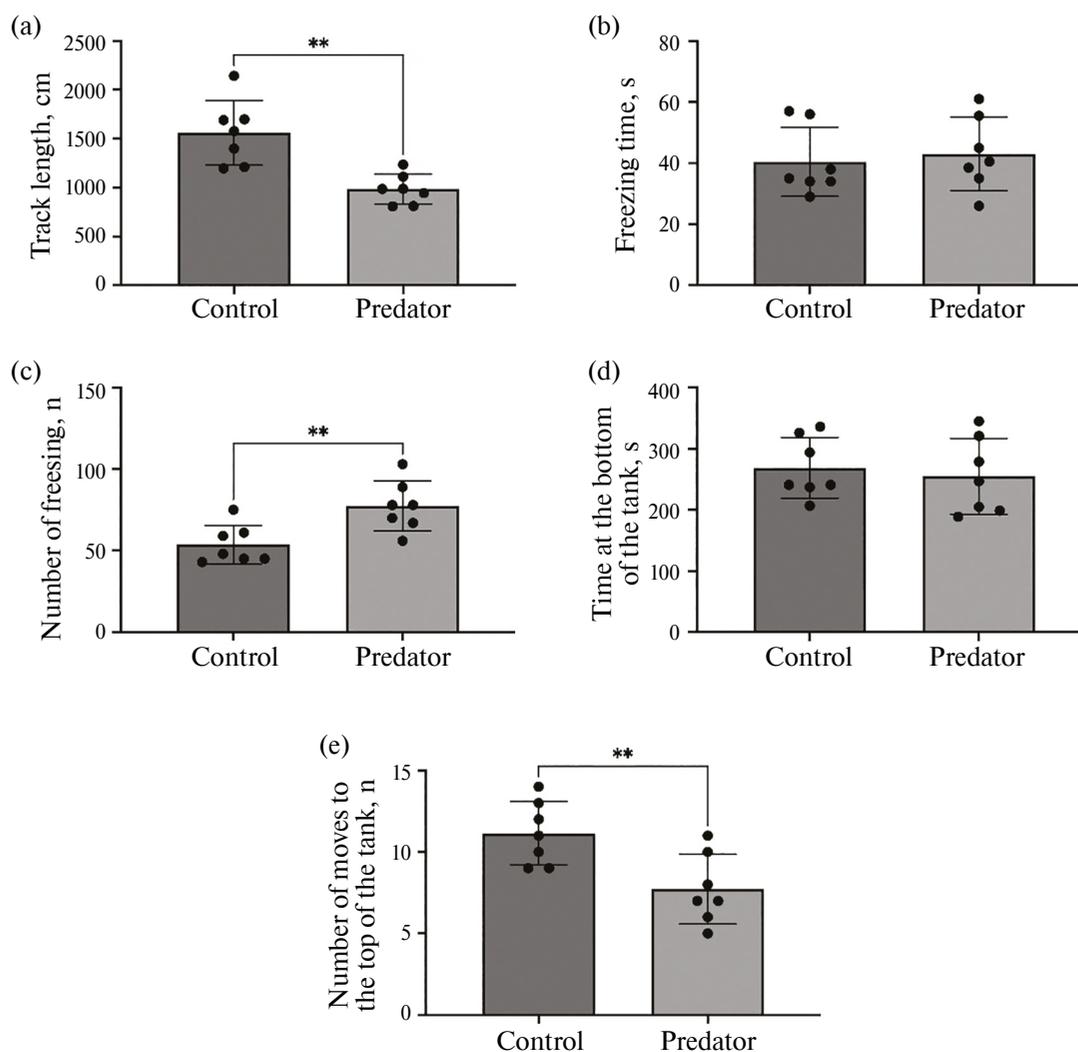


Рис. 5. Поведение рыб *Danio rerio* в тесте стресса новизны у интактного контроля и после предъявления хищника: (а) — длина траектории; (б) и (с) — время и число фризинга соответственно; (д) — время в нижней части аквариума; (е) — число перемещений в верхнюю часть аквариума. Данные представлены в виде среднего арифметического \pm ошибка среднего. Достоверность различий от контрольной группы: ** — $p < 0.001$. t-тест Стьюдента.

влияло на длительность фризинга, а число паттерна увеличилось почти в два раза относительно группы интактного контроля ($p < 0.001$, рис. 5b, 5c). Число перемещений рыб в верхнюю часть просмотрового аквариума после предъявления хищника снизилось в два раза относительно интактного контроля ($p < 0.001$, рис. 5e).

Далее нами было проведено изучение эффектов кисспептина-10 в модели острого стресса предъявления хищника у *Danio rerio*. В качестве препаратов сравнения нами был выбран анксиолитик бензодиазепинового ряда феназепам и антидепрессант селективный ингибитор обратного захвата серотонина пароксетин.

Для анализа влияния препаратов на среднюю траекторию движения был проведен однофакторный дисперсионный анализ ANOVA. Результаты показали статистически значимые различия между группами ($F(3, 24) = 3.477$, $p = 0.0316$). Дальнейший *post hoc* анализ с использованием теста Тьюки выявил, что на фоне феназепама 1 мг/л средняя траектория увеличивалась по сравнению с животными после предъявления хищника без введения транквилизатора ($p < 0.05$, рис. 6a), на фоне действия пароксетина 1 мг/л и KS10 1 мг/л средняя траектория рыб достоверно не изменялась по сравнению с животными после предъявления хищника без введения исследуемых препаратов (рис. 6).

При применении феназепама из группы транквилизаторов наблюдалось снижение времени адаптации к новой среде в тесте стресса новизны, снижение числа фризингов и увеличение времени в верхней части аквариума. Следует подчеркнуть, что при титровании оптимальной дозы отмечается характерный для бензодиазепиновых транквилизаторов выраженный дозозависимый анксиолитический и седативный эффект, что проявляется почти полным обездвиживанием. Применение гидроксизина полностью снимало эффекты острого стресса у *Danio rerio*, но в отличие от бензодиазепиновых транквилизаторов седативный эффект не наблюдали, при повышении доз противотревожный эффект снижался (рис. 6).

Вещества из группы антидепрессантов оказывали выраженное влияние на поведение рыб *Danio rerio* в тесте стресса новизны. Время в нижней части аквариума существенно снижается, причем большую часть времени рыбы проводят в верхней части аквариума. Антидепрессанты применяются у человека при хронических расстройствах длительными курсами. При введении исследуемых веществ мы наблюдали выраженное снижение тревожности уже после однократного применения, что проявлялось в увеличении исследовательского поведения. Наиболее сильное противотревожное действие оказал пароксетин, селективный ингибитор обрат-

ного захвата серотонина. Отмечали выраженный снотворный эффект, который был сравнительно не продолжительным, и уже через 5 мин рыба восстанавливала свое типичное поведение.

Результаты анализа числа фризингов: ANOVA выявил значимые различия между группами ($F(3, 24) = 6.000$, $p = 0.0034$). *Post hoc* анализ с использованием теста Тьюки выявил, что на фоне пароксетина число фризингов статистически значимо отличаются от контрольной группы ($p = 0.0021$), в то время как воздействие феназепама и KS10 не показали значимых различий (рис. 6b).

Результаты анализа времени фризинга: ANOVA выявил значимые различия между группами ($F(3, 24) = 4.240$, $p = 0.0153$). *Posthoc* анализ с использованием теста Тьюки выявил, что групп рыб на фоне феназепама ($p = 0.0199$) и пароксетина ($p = 0.0299$) демонстрировали сокращение времени фризинга по сравнению с контрольной группой, тогда как группа с KS10 значимо не отличалась от контроля (рис. 6c).

Результаты анализа времени проведенной рыбой в нижней части аквариума: ANOVA выявил значимые различия между группами ($F(3, 24) = 16.03$, $p < 0.0001$). *Post hoc* анализ с использованием теста Тьюки выявил, что рыбы на фоне феназепама ($p < 0.0001$), пароксетина ($p < 0.0001$) и KS10 ($p = 0.001$) демонстрировали сокращение времени проведенной рыбой в нижней части аквариума по сравнению с контрольной группой (рис. 6d).

Результаты анализа числа перемещений рыб верхней части аквариума: ANOVA выявил значимые различия между группами ($F(3, 24) = 36.40$, $p < 0.0001$). *Post hoc* анализ с использованием теста Тьюки выявил, что групп рыб на фоне феназепама ($p < 0.0001$), пароксетина ($p < 0.0001$) и KS10 ($p = 0.01$) демонстрировали увеличение перемещений рыб в верхнюю часть аквариума по сравнению с контрольной группой (рис. 6e).

При анализе влияния стресса представления хищника в тесте Порсолта был проведен однофакторный дисперсионный анализ ANOVA. Время иммобилизации существенно отличалось между группами ($F(3, 36) = 16.24$, $p < 0.0001$). Дальнейший *posthoc* анализ с использованием теста Тьюки выявил, что у животных, переживших стресс представления хищника, в течение 6 ч наблюдалось увеличение времени иммобильности в 4 раза по сравнению с контролем ($p < 0.001$). Введение антидепрессанта пароксетина в дозе 1 мг/кг в/б или KS10 0,1 мг/кг в/б после стресса предъявления хищника приводило к значительному снижению времени иммобилизации по сравнению с группой стресса представления хищника ($p < 0.0003$ и $p < 0.01$, соответственно) (рис. 7a).

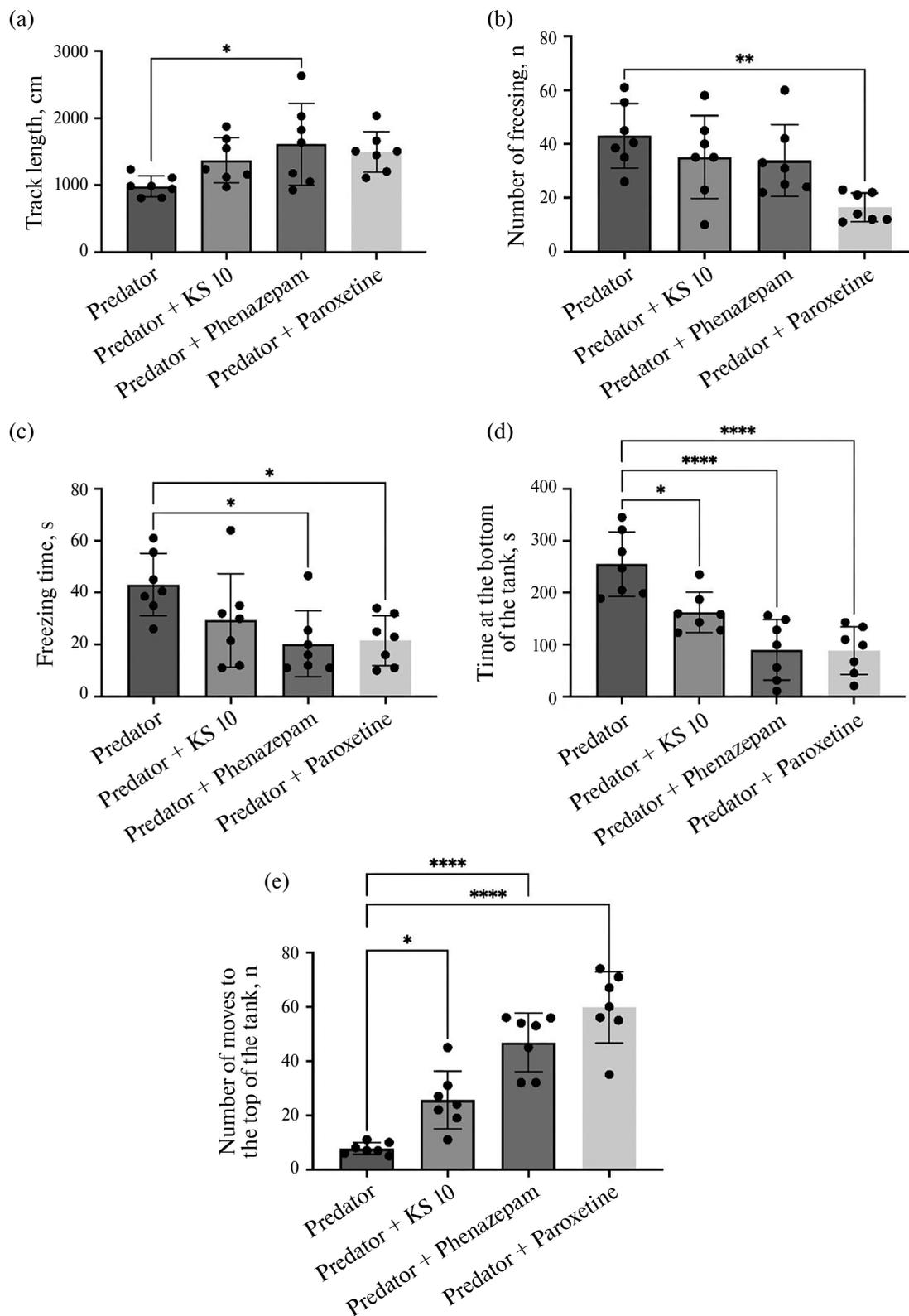


Рис. 6. Поведение рыб *Danio rerio* в тесте стресса новизны после предъявления хищника, при применении феназепам в дозе 1 мг на 1000 мл; KS 10 в дозе 1 мг на 1000 мл; пароксетина в дозе 1 мг на 1000 мл. (a) — длина траектории; (b) и (c) — время и число фризинга соответственно; (d) — время в нижней части аквариума; (e) — число перемещений в верхнюю часть аквариума. Данные представлены в виде среднего арифметического \pm ошибка среднего. Однофакторный ANOVA и тест Тьюки для множественного сравнения средних. * — $p < 0.05$; ** — $p < 0.01$; *** — $p < 0.001$; **** — $p < 0.0001$ после предъявления хищника.

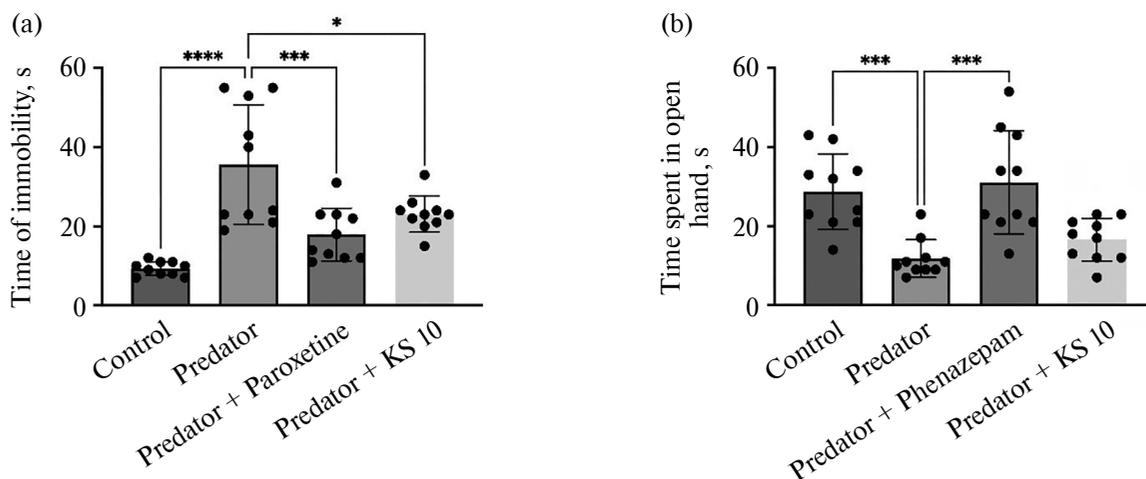


Рис. 7. Поведение крыс в тесте Порсолта (а) и тесте “Приподнятый крестообразный лабиринт” (б) после воздействия стресса представления хищника и при применении исследуемых фармакологических агентов.

При анализе влияния стресса представления хищника в тесте “Приподнятый крестообразный лабиринт” на формировании тревожности у исследуемых животных. Сравнение времени, проведенного в открытых рукавах, показало значимые различия между группами (ANOVA: $F(3, 35) = 11.05$, $p < 0.0001$). Животные после стресса представления хищника проводили меньше времени в открытых рукавах по сравнению с контрольной группой ($p = 0.0008$). Введение феназепама в дозе 0,1 мг/кг в/б увеличивало время пребывания в открытых рукавах ($p = 0.0001$), что свидетельствует о снижении уровня тревожности, введение KS10 в дозе 0,1 мг/кг в/б статистически достоверно не приводило к увеличению времени пребывания в открытых рукавах установки, однако наблюдалась явная тенденция на увеличение этого показателя (рис 7б).

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

В настоящей работе проведено сравнительное исследование действия кисспептина 10 на моделях ПТСР представления хищника у рыб *Danio rerio* и у крыс Вистар. В качестве препаратов сравнения использовали анксиолитик бензодиазепинового ряда феназепам и антидепрессант, селективный ингибитор обратного захвата серотонина, пароксетин. Показано, что стресс новизны с хищником у рыб является аналогом теста у грызунов при помещении их в клетку к хищнику (питону). Реагируя на дополнительный стресс, у рыб наблюдался выраженный фризинг на дне аквариума, типичной реакцией страха у *Danio rerio* [22] и снижение длины траектории движения. Применение транквилизатора, антидепрессанта и кисспептина 10 снимали эффекты от представления хищника: число перемещений в верхнюю часть аквариума за опыт существенно увеличивалось; снижалось время в нижней части

аквариума. Полученные результаты согласуются с данными литературы. Показано, что после предъявления хищника у *Danio rerio* повышался уровень кортизола и снижался до базальных значений после применения транквилизаторов и антидепрессантов. Предъявление хищника *Nandus nandus* вызывало у *Danio rerio* увеличение видоспецифических реакций повышения частоты и числа прыжков, а также вибрирующие движения [18]. В наших исследованиях анализировали поведение *Danio rerio* не в ответ на хищника, а после его предъявления в другом аквариуме. Поэтому мы не наблюдали увеличения числа прыжков, и рыбы проявляли повышенный фризинг на дне просмотрового аквариума и снижение локомоторного поведения. Полученные данные говорят в пользу суммации эффекта новизны аквариума и эффекта от предъявления хищника, что согласуется с данными о действии анксиолитиков бензодиазепинового ряда после предъявления хищника [5].

На фоне применения кисспептина 10 число паттернов “фризинг” достоверно снижалось, а длина траектории проявляла тенденцию к увеличению по сравнению с группой животных после представления хищника, но без введения вещества (рис. 4). На фоне кисспептина также снижалось время в нижней части аквариума и увеличивалось число перемещений в верхнюю часть аквариума (рис. 4) по сравнению с животными после представления хищника без введения вещества. Это согласуется с данными литературы. Показано, что после внутримозгового введения Kiss1 (10^{-11} моль на рыбу) наблюдалось увеличение числа перемещений из нижней половины аквариума в верхнюю его часть и повышение уровня мРНК гена *slc6a4a*, связанного с обменом серотонина. На фоне действия кисспептина 10 млекопитающих также наблюдался

подобный эффект у *Danio rerio* [4]. В то же время введение kiss2 в той же дозе не оказывало влияния на показатели тревожности в тесте новизны [12]. После внутримозгового введения kiss1 исследовали реакцию страха, вызванную раствором, выдержанным с трупом рыбки. При этом повышалось число паттернов “фризинг”, были значительно снижены в дозах от 10^{-15} до 10^{-9} моль на рыбу по сравнению с контрольной группой, которым вводили дистиллированную воду [12]. Необходимо отметить, что анксиолитические эффекты аналогов кисспептина 10, определяемые по снижению времени в нижней половине аквариума и увеличению числа переходов в верхнюю часть аквариума, оказались не такими высокими по сравнению с поведенческими эффектами, которые наблюдали после введения феназепам и пароксетина. Это подтверждается нашими ранее проведенными исследованиями. Аналоги кисспептина млекопитающих “Cloud Clone” (США) в дозе 0,01-1 мг на 1 л воды вызывали сходную картину поведения у рыб в ответ на новизну. В то же время эффекты аналогов кисспептина оказались ниже, чем у антидепрессантов [6]. Таким образом, введение кисспептина 10 после предъявления хищника у рыб *Danio Rerio* вызывало растормаживающий и умеренный анксиолитический эффект.

При исследовании эффектов кисспептина 10 у крыс установлено, что после предъявления хищника в тесте Порсолта время иммобилизации существенно отличалось между группами. У животных, переживших стресс предъявления хищника, спустя 6 ч наблюдалось увеличение времени иммобильности в 4 раза по сравнению с контролем. Введение антидепрессанта пароксетина или KS10 после стресса предъявления хищника приводило к значительному снижению времени иммобилизации по сравнению с группой стресса предъявления хищника без введения вещества. В приподнятом крестообразном лабиринте крысы после стресса хищника также проводили меньше времени в открытых рукавах по сравнению с контрольной группой. Введение феназепама увеличивало время пребывания в открытых рукавах, что свидетельствует о снижении уровня тревожности. Однако введение KS10 не выявило различий времени пребывания в открытых рукавах, наблюдалась лишь тенденция на увеличение этого показателя. Таким образом, наши данные, полученные у крыс в условиях стресса предъявления хищника, больше свидетельствуют в пользу действия кисспептина 10 на депрессивноподобное поведение подобно наблюдаемым эффектам пароксетина (рис. 7а). Это подтверждается и более отчетливыми эффектами действия антидепрессантов по сравнению с транквилизаторами у рыб [6, 8]. После введения феназепама из группы транквилизаторов у рыб наблюдалось снижение числа паттернов “фризинг” и увеличение времени

в верхней части аквариума. Антидепрессант пароксетин оказывал более выраженное влияние на поведение *Danio Rerio* в тесте стресса новизны. Время в нижней части аквариума существенно снижалось, причем большую часть времени рыбы проводили в верхней части аквариума (рис 7б). При введении пароксетина мы наблюдали выраженное снижение тревожно-фобического спектра уже после однократного применения, что проявлялось в увеличении исследовательского поведения.

Нейронные механизмы, лежащие в основе отрицательных эмоциональных состояний, высоко консервативны у разных видов в ряду позвоночных. Поскольку ген kiss1 у костистых рыб является консервативным ортологом гена KISS1/ Kiss1 млекопитающих и участвует в регуляции эмоционального поведения, мы предположили возможное антидепрессивное действие кисспептинов млекопитающих у *Danio rerio* и сравнили их с веществами серотонинового типа действия, в частности антидепрессантом пароксетином. Показано, что введение kiss1 увеличивает уровень мРНК генов *ret1* и *slc6a4a*, связанных с обменом серотонина, у рыб, подвергшихся действию раствора, выдержанного с трупом рыбки. Это предполагает потенциальную роль kiss1 в регуляции системы серотонина мозга [7]. Показано, что серотонин участвует в развитии страха и депрессивноподобного поведения [24]. Латеральная уздечка млекопитающих играет ключевую роль в поведении избегания, влияя на активность нейронов серотонина [25]. Эти результаты подтверждают потенциальную роль kiss1 в регуляции серотонин-зависимого поведения. В связи с этим была высказана гипотеза, что серотонинергические нейроны модулируются kiss1-нейронами уздечки через не серотонинергические интернейроны в ядрах шва [7]. Это согласуется с антидепрессантными эффектами кисспептина 10 у грызунов [24]. Экспрессия генов, связанных с серотонином, после введения kiss1 у *Danio rerio*, была выше уровня, наблюдаемого после действия раствора, выдержанного с трупом рыбы [21]. На это указывают и наши данные при сравнении действия аналогов кисспептина Kiss1 млекопитающих и антидепрессантов серотонинового типа действия. Эффекты аналогов кисспептина Kiss1 млекопитающих оказались менее значимыми, что может быть следствием опосредованного действия на систему серотонина [4].

У млекопитающих медиальные ядра шва проецируются в гиппокамп и миндалину и регулируют ответ на обстановочные эмоциональные сигналы среды [24]. Поскольку рыбы также обладают способностью реагировать на обстановочные сигналы, целесообразно предположить аналогичные механизмы поведения у рыб *Danio rerio*. В то же время такие структуры переднего мозга, как гиппокамп

и миндалина, у рыб четко не выявляются. Наличие kissr в уздечке рыб и млекопитающих [3] предполагает, что роль передачи сигналов кисспептина может быть эволюционно сохранена у позвоночных. У рыб медиальное скопления клеток в области миндалины анализирует химические стимулы водной среды и проецируется на гипоталамус и центральное серое вещество, которое модулирует страх, вызванный запахом хищника, возможно, через уздечку [21]. По мере развития переднего мозга у млекопитающих, в частности коры больших полушарий и гиппокампа, в ходе эволюции развивались также подкорковые связи и структуры, обеспечивающие реакцию врожденного узнавания, чтобы подготовить и реагировать на стимулы, потенциально опасные для жизни. Поскольку гипоталамус и миндалина экспрессируют кисспептин kiss1 и kiss-r [3], возможно, что передача сигналов кисспептина на kiss-r может участвовать в ответной реакции на обстановочные сигналы страха и у млекопитающих [24]. Таким образом, кисспептин, эволюционно консервативный нейропептид, может участвовать в регуляции тревожно-фобических состояний, необходимых для поддержания эмоциональных аспектов репродуктивного и территориального поведения, таких как половая мотивация и возбуждение. Известно, что страх и депрессивноподобные состояния вызывают снижение репродуктивной функции [24]. Ранее нами было показано снижение полового поведения после предъявления хищника у крыс [25]. Аналог кисспептина млекопитающих KS 10 у крыс повышал половую мотивацию. В данном случае мы отмечали не только увеличение числа подходов к самке, снижение латентного времени подхода, но и снижение кортикостерона в крови у животных, что может говорить о снижении тревожности [27]. Наши данные о характере действия аналогов кисспептина млекопитающих у *Danio rerio* также подтверждают потенциальную роль Kiss1 в модуляции серотонин-зависимого поведения [8].

Возникает вопрос, сходны ли механизмы, лежащие в основе наблюдаемых реакций у *Danio rerio*, с механизмами других позвоночных, включая человека. Сходство действия препаратов, относящихся к разным фармакологическим классам при использовании метода нового аквариума у *Danio rerio*, по-видимому, объясняется не недостаточным уровнем развития механизма отрицательных эмоций и его связи с гомеостатическими механизмами у низших позвоночных [28], вовлечение которого не позволяет в полной мере выявить их дискриминативные свойства. В то же время картина траектории рыб после применения кисспептина 10 визуально отличалась, что является специальным предметом наших будущих исследований. При использовании фармакологического подхода в работе с *Danio rerio* встают такие проблемы, как оптимизация спосо-

бов доставки вещества, адсорбции, распределения, метаболизма и секреции. Становится понятным, что представленная модель с хищником не является в полной мере “моделью” какого-либо расстройства у человека. Тем не менее результаты показывают, что *Danio rerio* может быть перспективным объектом доклинического и трансляционного исследований. Мы рассматриваем полученные результаты с хищником у рыб и грызунов как шаг в нужном направлении к исследованию и моделированию острых и посттравматических стрессовых расстройств человека.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Настоящие исследования показали, что стресс новизны с хищником у *Danio rerio* является аналогичным тесту у грызунов, когда их помещают в клетку к хищнику (питону) при моделировании острого стрессового расстройства. Реагируя на дополнительный стресс, у рыб наблюдалась направленность в сторону проявления отрицательных эмоциональных реакций, характерных для грызунов. Введение транквилизатора, антидепрессанта или кисспептина 10 снимали эффекты от предъявления хищника у *Danio rerio*: число перемещений в верхнюю часть аквариума за опыт существенно увеличивалось; снижалось время в нижней части аквариума. В то же время кисспептин 10 не снижал тревожно-фобических реакций в приподнятом крестообразном лабиринте после стресса предъявления хищника у крыс Вистар, проявляя универсальный растормаживающий и умеренный антидепрессантный эффект в тесте Порсолта. Данные об однонаправленных эффектах кисспептина 10 млекопитающих и антидепрессантов серотонинового типа действия на примере пароксетина у *Danio rerio* и крыс Вистар подтверждают потенциальную роль kiss1 в модуляции серотонин-зависимого поведения. Полученные данные подтверждают гипотезу, что кисспептины могут участвовать в регуляции тревожно-фобических состояний, по-видимому, для поддержания эмоциональных аспектов репродуктивного поведения, таких как половая мотивация, территориальное поведение и возбуждение. Результаты работы согласуются с данными литературы, согласно которым кисспептин способствует снижению тревожно-фобических реакций и стимулирует исследовательское поведение у различных видов животных в условиях стресса. Выполненная работа показывает перспективы внедрения *Danio rerio* в протоколы доклинических и трансляционных исследований при изучении острого стрессового расстройства.

ВКЛАДЫ АВТОРОВ

Идея работы и планирование эксперимента (А.А.Л. и П.Д.Ш.), сбор данных (В.А.Г., С.С.П., Е.Р.Б., И.Ю.Т.,

П.А.П.), обработка данных (В.А.Г., С.С.П.), написание и редактирование манускрипта (В.А.Г., С.С.П., А.А.Л., П.А.П.).

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Общий дизайн исследования, протоколы каждого экспериментального наблюдения, выбор фармакологических субстанций и индивидуальные карты наблюдения за лабораторным животным, метод эвтаназии одобрены локальным этическим комитетом СПбГПМУ (Протокол № 17/05 от 14.10.2022 г.).

ИСТОЧНИКИ ФИНАНСИРОВАНИЯ

Работа выполнена в рамках государственного задания Минобрнауки России ФГБНУ "ИЭМ" 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".

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Meczekalski B, Niwczyk O, Bala G, Szeliga A* (2022) Stress, kisspeptin, and functional hypothalamic amenorrhea. *Curr Opin Pharmacol* 67: 102288. <https://doi.org/10.1016/j.coph.2022.102288>
2. *Mills EGA, O'Byrne KT, Comninou AN* (2019) Kisspeptin as a behavioral hormone. *Semin Reprod Med* 37(2): 56–63. <https://doi.org/10.1055/s-0039-3400239>
3. *Mills EGA, Dhillon WS, Comninou AN* (2018) Kisspeptin and the control of emotions, mood and reproductive behavior. *J Endocrinol* 239(1): R1–R12. <https://doi.org/10.1530/JOE-18-0269>
4. *Гольц ВА, Лебедев АА, Ереско СО, Айрапетов МИ, Пюрвеев СС, Бычков ЕР, Байрамов АА, Лебедев ВА, Шабанов ПД* (2024) Влияние кисспептина костистых рыб KISS1 и аналогов кисспептина млекопитающих на коммуникативное поведение *Danio rerio*, вызванное социальной изоляцией. *Обз клин фармакол лек тер* 22(2): 191–203. <https://doi.org/10.17816/RCF625892>
5. *Tsukatsuma H, Ozawa H, Lehman MN* (2024) Kisspeptin and mammalian reproduction. *Peptides* 181: 171297. <https://doi.org/10.1016/j.peptides.2024.171297>
6. *Гольц ВА, Лебедев АА, Блаженко АА, Лебедев ВА, Казаков СВ, Байрамов АА, Хохлов ПП, Бычков ЕР, Пюрвеев СС, Шабанов ПД* (2023) Анксиолитическое действие аналогов кисспептина у *Danio rerio*. *Обз клин фармакол лек тер* 21(2): 159–169. <https://doi.org/10.17816/RCF321976>
7. *Comninou AN, Wall MB, Demetriou L, Jayasena CN, Colledge WH, Bassett P, Bloom SR, Venkitaraman R, Noreika V, Zeki S, Dhillon WS* (2017) Kisspeptin modulates sexual and emotional brain processing in humans. *J Clin Invest* 127(2): 709–719. <https://doi.org/10.1172/JCI89519>
8. *Гольц ВА, Лебедев АА, Блаженко АА, Лебедев ВА, Казаков СВ, Байрамов АА, Хохлов ПП, Бычков ЕР, Пюрвеев СС, Шабанов ПД* (2023) Сравнение анксиолитического действия кисспептинов млекопитающих и костистых рыб у *Danio rerio*. *Психофармакол биол наркол* 14(2): 85–96. <https://doi.org/10.17816/phbn501442>
9. *Somoza GM, Mechaly AS, Trudeau VL* (2020) Kisspeptin and GnRH interactions in the reproductive brain of teleosts. *Gen Comp Endocrinol* 298: 113568. <https://doi.org/10.1016/j.ygcen.2020.113568>
10. *Nie Z, Zhao N, Zhao H, Fu Z, Ma Z, Wei J* (2023) Cloning, expression analysis and SNP screening of the kiss1 gene in male *Schizothorax biddulphi*. *Genes* 14(4): 862. <https://doi.org/10.3390/genes14040862>
11. *Rønnekleiv OK, Qiu J, Kelly MJ* (2022) Hypothalamic kisspeptin neurons and the control of homeostasis. *Endocrinology* 163(2): bqab253. <https://doi.org/10.1210/endo/bqab253>
12. *Stincic TL, Qiu J, Connors AM, Kelly MJ, Rønnekleiv OK* (2021) Arcuate and preoptic kisspeptin neurons exhibit differential projections to hypothalamic nuclei and exert opposite postsynaptic effects on hypothalamic paraventricular and dorsomedial nuclei in the female mouse. *eNeuro* 8(4): ENEURO.0093-21.2021. <https://doi.org/10.1523/ENEURO.0093-21.2021>
13. *Rønnekleiv OK, Qiu J, Kelly MJ* (2019) Arcuate kisspeptin neurons coordinate reproductive activities with metabolism. *Semin Reprod Med* 37(3): 131–140. <https://doi.org/10.1055/s-0039-3400251>
14. *Пюрвеев СС, Деданишвили НС, Сексте ЭА, Лебедев АА, Бычков ЕР, Шабанов ПД* (2024) Влияние стресса ранней материнской депривации на экспрессию OX1R в лимбической системе головного мозга и развитие тревожно-депрессивных симптомов у крыс. *Обз клин фармакол лек тер* 22(2): 153–162. <https://doi.org/10.17816/RCF622940>
15. *Ogawa S, Parhar IS, Chau R, von Herten LS, Koide T, Soma M, Sawahata H, Yamamoto N, Ito Y, Kubo Y* (2014) Habenular kisspeptin modulates fear in the zebrafish. *Proc Natl Acad Sci U S A* 111(10): 3841–3846. <https://doi.org/10.1073/pnas.1314184111>
16. *Tanaka M, Csabafi K, Telegdy G* (2013) Neurotransmissions of antidepressant-like effects of kisspeptin-13. *Regul Pept* 180: 1–4. <https://doi.org/10.1016/j.regpep.2012.08.017>
17. *Csabafi K, Jászberényi M, Bagosi Z, Lipták N, Telegdy G* (2013) Effects of kisspeptin-13 on the hypothalamic-pituitary-adrenal axis, thermoregulation, anxiety and locomotor activity in rats. *Behav Brain Res* 241: 56–61. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2012.11.039>
18. *Blaser RE, Chadwick L, McGinnis GC* (2010) Behavioral measures of anxiety in zebrafish (*Danio rerio*). *Behav Brain Res* 208(1): 56–62. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2009.11.009>

19. Тиссен ИЮ, Чепик ПА, Лебедев АА (2021) Условная реакция предпочтения места кисспептина-10. Обз клин фармакол лек тер 19(1): 47–53. <https://doi.org/10.17816/RCF19147-53>
20. Бочарова ОА, Бочаров ЕВ, Кучеряну ВГ, Карпова РВ (2019) Дофаминергическая система: стресс, депрессия, рак (часть 1). Росс биотер журн 18(3): 6–14. <https://doi.org/10.17650/1726-9784-2019-18-3-6-14>
21. Shams S, Amlani S, Buske C (2018) Developmental social isolation affects adult behavior, social interaction, and dopamine metabolite levels in zebrafish. Dev Psychobiol 60(1): 43–56. <https://doi.org/10.1002/dev.21581>
22. Бычков ЕР, Карпова ИВ, Цикунов СГ (2021) Действие острого психического стресса на обмен моноаминов в мезокортикальной и нигростриатной системах головного мозга крыс. Педиатр 12(6): 35–42. <https://doi.org/10.17816/PED12635-42>
23. Блаженко АА, Хохлов ПП, Лебедев АА. (2022) Содержание грелина в разных отделах головного мозга у *Danio rerio* после стрессорного воздействия. Психофармакол биол наркол 13(3): 37–42. <https://doi.org/10.17816/phbn267375>
24. Перова АП, Гольц ВА, Лебедев АА, Бычков ЕР, Безнин ГВ, Косякова ГП, Шабанов ПД (2024) Кисспептин 10 уменьшает проявление половой дисфункции у крыс в моделях острого психогенного стресса. Патогенез 22(2): 76–80. <https://doi.org/10.25557/2310-0435.2024.02.76-80>
25. Тиссен ИЮ, Лебедев АА, Цикунов СГ, Шабанов ПД (2023) Кисспептин уменьшает проявления половой дисфункции у крыс в модели посттравматического стрессового расстройства. Психофармакол биол наркол 14(4): 237–244. <https://doi.org/10.17816/phbn623033>
26. Лебедев АА, Пшеничная АГ, Якушина НД, Бычков ЕР, Шабанов ПД (2017) Влияние антагониста рецепторов кортиколиберина астрессина на агрессию и тревожно-фобические состояния у самцов крыс, выращенных в социальной изоляции. Обзоры по клинической фармакологии и лекарственной терапии. 3.
27. Гольц ВА, Перова АП, Лебедев АА, Лизунов АВ, Надбитова НД, Бычков ЕР, Пюрвеев СС, Шабанов ПД (2024) Действие кисспептина на поведенческие паттерны в ответ на стресс новизны в ряду позвоночных. Эксп клин фармак 87(12): 3–7. <https://doi.org/10.30906/0869-2092-2024-87-12-3-7>
28. Вартамян ГА, Петров ЕС (1989) Эмоции и поведение — Ленинград: Наука, Ленинградское отделение 144 с.

THE ROLE OF KISSPEPTIN IN THE REGULATION OF EMOTIONAL STATES IN MODELING ACUTE STRESS DISORDER IN A VERTEBRATE SPECIES

V. A. Golts^a, A. A. Lebedev^{a, #}, S. S. Pyurveev^{a, b}, A. P. Perova^{a, d}, E. R. Bychkov^{a, c},
I. Yu. Tissen^a, S. G. Tsikunov^a, P. D. Shabanov^a

^aInstitute of Experimental Medicine, Saint Petersburg, Russia

^bSaint Petersburg State Pediatric Medical University, Saint Petersburg, Russia

^cKirov Military Medical Academy, Saint Petersburg, Russia

^dSaint Petersburg State University, Saint Petersburg, Russia

[#]e-mail: aalebedev-iem@rambler.ru

In acute stress disorders, depressive, anxiety-phobic states and sexual dysfunctions are observed, which are poorly amenable to treatment. Neuropeptides of the kisspeptin group have been proposed for the correction of these disorders. We have previously shown the effect of kisspeptin analogs on the activation of sexual behavior in a model of acute stress disorders. The aim of the present work was to determine the role of kisspeptin in the regulation of emotional behavior following the acute stress of predator presentation in a range of vertebrates. The effects of fish presentation of the predator *Hypsophrys nicaraguensis* to *Danio rerio* and of tiger python presentation to Wistar rats were investigated. Similarly to the behavior of rodents, fish showed manifestations of negative emotional states: frising on the bottom and decreased motor activity. Administration of phenazepam, paroxetine, or kisspeptin 10 ameliorated the effects of predator presentation in *Danio rerio*: increased movement to the top of the tank; decreased time at the bottom of the tank. Unlike phenazepam, kisspeptin 10 did not reduce anxiety-phobic reactions in the elevated plus maze in modeling of acute stress disorder in rats, while showing disinhibitory and antidepressant effects in the Porsolt test similar to the action of serotonin reuptake inhibitor paroxetine. Data on the unidirectional effects of kisspeptin 10 and paroxetine in *Danio rerio* and Wistar rats support a role for kisspeptins in modulating serotonin-dependent behavior in a model of acute stress disorder. The data support the hypothesis that kisspeptins are involved in relieving anxiety-phobic states while maintaining emotional aspects of reproductive behavior such as sexual motivation, territorial behavior, and arousal in a range of vertebrates. The work shows promise for the introduction of *Danio rerio* into preclinical and translational research protocols in the study of acute stress disorders.

Keywords: kisspeptin, *Danio rerio*, Wistar rats, predator, behavior