

ВЛИЯНИЕ ДИПЕПТИДА PRO-GLY НА РИТМИЧЕСКИЕ ПРОЦЕССЫ ЛОКОМОТОРНОЙ АКТИВНОСТИ КРЫС WISTAR С ПАССИВНЫМ ФЕНОТИПОМ РЕАГИРОВАНИЯ НА СТРЕСС

Саванец О.Н.¹, Кравченко Е.В.¹, Ольгомец Л.М.¹, Зильберман Р.Д.¹,
Дубовик Б.В.²

¹ГНУ «Институт биоорганической химии НАН Беларуси»,
²Белорусский государственный медицинский университет, г. Минск

Ключевые слова: ультрадианные биоритмы, горизонтальная двигательная активность, крысы, стресс, индивидуальная чувствительность

Резюме: особи неранжированной популяции и крысы с пассивным фенотипом реагирования на стресс характеризуются различиями хронобиологического «ответа» на смену режима освещения. Применение Pro-Gly (0,5 мг/кг, внутрижелудочно) грызунам с пассивным фенотипом реагирования на стресс вызывало статистически достоверный модулирующий эффект на биоритмы горизонтальной двигательной активности 24-минутной гармонике.

Resume: animals of an unranked population and rats with a passive phenotype of response to stress are characterized by differences in the chronobiological "response" to a change in the lighting regime. The use of Pro-Gly (0,5 mg/kg, intragastrically) in rodents with a passive stress response phenotype caused a statistically significant modulating effect on the biorhythms of the locomotor activity of the 24-minute harmonic.

Актуальность. Нейропептиды – эндогенные регуляторы синаптической передачи в центральной нервной системе – идентифицируют как безопасные и эффективные средства, влияющие на нейрометаболические процессы организма [1]. Мелатонин (гормон эпифиза, регулятор циркадного ритма живых организмов) в настоящее время применяется в медицинской практике в качестве снотворного средства и в качестве адаптогена для нормализации биологических ритмов. Вместе с тем, мелатонин имеет широкий ряд противопоказаний (гиперчувствительность, выраженные нарушения функции почек, аутоиммунные заболевания, лейкоз, лимфома, аллергические реакции, лимфогранулематоз, миелома, эпилепсия, сахарный диабет, хроническая почечная недостаточность, беременность и период лактации). Все вышесказанное диктует необходимость поиска альтернативных средств, направленных на регуляцию процессов сна и бодрствования, циклические изменения активности. В числе перспективных соединений с хронотропным действием могут рассматриваться аналоги С-концевых фрагментов гипофизарных гормонов (вазопрессина и окситоцина), в том числе – дипептид Pro-Gly.

Немаловажной проблемой остается изучение и анализ индивидуальной вариативности действия лекарственных средств, обладающих психотропным действием. При проведении многочисленных исследований была выявлена связь эффектов бензодиазепиновых анксиолитиков, антидепрессантов, психостимуляторов с фенотипом эмоционально-стрессовой реакции [2]. Индивидуальные фенотипические особенности были установлены у линейных мышей C57Bl/6 и BALB/c, крыс MR и MNRA [3].

При изучении психостимулирующих средств на мнестические функции здоровых добровольцев, с учётом типирования испытуемых по особенностям работоспособности и времени суток, было показано улучшение кратковременной памяти при применении кофеина в вечерние часы у «жаворонков», и в утренние – у «сов», что подтвердило индивидуальные особенности функционирования циркадианной системы в регуляции мнестических процессов [4]. Было показано, что инбредные мыши линии BALB/c более чувствительны к нарушениям циркадного ритма, нежели инбредные особи C57Bl/6, что согласуется с данными восприимчивости первых к стрессу [5]. Имеются сведения о более высокой чувствительности крыс линии SHR к циркадным колебаниям биологических ритмов, регулирующих метаболические процессы, в сравнении с особями Wistar [6].

Таким образом, актуальным является исследование влияния дипептида Pro-Gly на ритмические процессы локомоторной активности лабораторных грызунов с учетом индивидуальных особенностей поведения последних.

Цель: изучение хронотропных свойств дипептида Pro-Gly у крыс Wistar с пассивным типом реагирования на стрессовое воздействие.

Задачи: изучить особенности хронотропного действия пептида Pro-Gly на: 1. 24-минутные ритмы; 2. 12-минутные ритмы; 3. 6-минутные ритмы локомоторной двигательной активности грызунов.

Материалы и методы. Эксперименты проведены с использованием половозрелых крыс-самцов Wistar, которые содержались в стандартных условиях вивария со свободным доступом к пище и воде в соответствии с требованиями Санитарных правил и норм 2.1.2.12-18-2006 «Устройство, оборудование и содержание экспериментально-биологических клиник (вивариев)».

В ходе ранжирования выявляли животных, характеризовавшихся отсутствием активных перемещений (freezing-реакция либо отсутствие локомоции или вертикальных стоек) в ответ на предъявляемый акустический стимул (100-110 дБ; измерения выполнены с применением аппарата RadioShack, China). Таких крыс относили к числу особей с пассивным фенотипом реагирования на стрессовое воздействие.

Спустя 15 мин после типирования животные подвергались неизбежному стрессу в условиях «принудительного плавания» (ПП) (Forced Swimming Test) по модифицированному методу R. D. Porsolt [7]. Крыс помещали в цилиндрический бассейн с водой на 16 мин дважды с интервалом 24 ч. По истечении второго сеанса ПП животных обсушивали полотенцем, обогревали в течение 20 мин и помещали поодиночке в камеры многоканального актометра «Универсал 22–32» (Республика Беларусь; размерами боксов – 32 см × 22 см × 19 см). Регистрацию показателя «горизонтальная двигательная активность» (ГДА) осуществляли на протяжении 120 мин при искусственном освещении (16.45-18.45; источник света – 6 ламп дневного света SL 36/26-735, расположенных на высоте 2,59 м над поверхностью бокса) или в условиях полной темноты (20.45-22.45). Эксперименты проводили в осенне-зимний период года (ноябрь-январь).

В процессе ранжирования среди 16 крыс Wistar выявлено 14 особей с пассивным фенотипом поведенческой реакции на интенсивное акустическое воздействие (8 из них были включены в контрольную группу, КГ; 6 – в основную группу, ОГ). 10

животным (2 крысы с активным фенотипом поведения и 8 животных КГ с пассивным фенотипом реагирования на звуковой сигнал) за 15 мин до начала второго сеанса ПП вводили растворитель (дистиллированная вода). Крысам ОГ применяли внутривенно (в/ж) Pro-Gly (Sigma-Aldrich, США) в дозе 0,5 мг/кг.

Сопоставляли ультрадианные биоритмы ГДА крыс неранжированной популяции (НП; n=10) и особей с пассивным фенотипом поведения.

Статистическую обработку результатов проводили методом косинор-анализа: определяли амплитуду ритма (А). Статистически достоверные ритмы (6 мин, 12 мин, 24 мин) определяли графически: существование ритмов считали доказанным, если эллипс ошибок не перекрывал начало системы координат. Обработку результатов осуществляли с помощью программного обеспечения Cosinor 2.5 для Excel, CorelDRAW.

Результаты и их обсуждение. Данные об особенностях ультрадианных биоритмов крыс НП и особей с пассивным фенотипом поведения КГ и ОГ приведены в табл. 1-4.

Статистически достоверные 24-минутные ритмы ГДА наблюдались у животных КГ с пассивным фенотипом поведения как в темноте, так и при наличии искусственного освещения, а у крыс НП – только в условиях освещенности (табл. 1 и 4). Таким образом, освещение (которое может расцениваться как стрессирующий фактор у грызунов, ведущих преимущественно ночной образ жизни) индуцировало 24-минутные ритмы активности у крыс НП и особей КГ с пассивным фенотипом поведения.

Пептид Pro-Gly нивелировал статистически достоверные ритмы 24-минутной гармоникой в отсутствие темноты (табл. 4), что хорошо соотносится с ранее высказанным предположением о наличии у названного соединения антистрессорного эффекта [8]. Короткопериодные ритмы более высоких частот (6- и 12-минутные) отсутствовали у особей всех исследуемых групп при освещении лампами дневного света (период наблюдения с 16.45 по 18.45) – табл. 2 и 3.

Табл. 1. Параметры ультрадианных (6-, 12-, 24-минутных) ритмов ГДА у особей неранжированной популяции (N=10), подвергшихся процедуре «принудительного плавания»

Условия эксперимента	Гармоника ритма	А, усл.ед.	Р
Искусственное освещение/ 16.45-18.45	6-минутные	3,3	-
	12-минутные	9,4	-
	24-минутные	28,8	P<0,05
Отсутствие освещения/ 20.45-22.45	6-минутные	3,3	P<0,05
	12-минутные	4,9	-
	24-минутные	11,0	-

Примечание: здесь и далее А – амплитуда ритма локомоторной активности крыс, ГДА – горизонтальная двигательная активность

Табл. 2. Влияние однократного введения Pro-Gly (0,5 мг/кг, в/ж) на параметры ГДА 6-минутных ритмов в актометре у крыс Wistar (0-120 мин) с пассивным фенотипом поведения, подвергшихся процедуре «принудительного плавания»

Условия эксперимента	Группа	Образец/число животных	А, усл.ед.	Р
Искусственное освещение / 16.45-18.45	КГ	Растворитель (N=8)	4,0	-
	ОГ	Pro-Gly (N=6)	12,0	-
Отсутствие освещения / 20.45-22.45	КГ	Растворитель (N=8)	1,8	-
	ОГ	Pro-Gly; 0,5 (N=6)	4,7	-

Табл. 3. Влияние однократного введения Pro-Gly (0,5 мг/кг, в/ж) на параметры ГДА 12-минутных ритмов в актометре у крыс Wistar (0-120 мин) с пассивным фенотипом поведения, подвергшихся процедуре «принудительного плавания»

Условия эксперимента	Группа	Образец/число животных	А, усл.ед.	Р
Искусственное освещение / 16.45-18.45	КГ	Растворитель (N=8)	5,1	-
	ОГ	Pro-Gly; 0,5 (N=6)	9,7	-
Отсутствие освещения / 20.45-22.45	КГ	Растворитель (N=8)	3,9	-
	ОГ	Pro-Gly; 0,5 (N=6)	10,3	-

В отсутствие освещения у животных с пассивным фенотипом поведения ОГ, как и у крыс КГ, были отмечены ритмы двигательной активности 24-минутной гармонике (табл. 1 и 4). 12-минутные ритмы не наблюдались ни у одной из исследуемых групп (табл. 3).

6-минутные ритмы, выявленные у крыс НП, отсутствовали у грызунов КГ и ОГ (табл. 1 и 2). Вероятно, указанные различия объясняются особенностями ультрадианной ритмики крыс с активным фенотипом поведения (характеризующихся быстрой реакцией в условиях стрессовой ситуации), входящих в число особей НП.

Табл. 4. Влияние однократного введения Pro-Gly (0,5 мг/кг, в/ж) на параметры ГДА 24-минутных ритмов в актометре у крыс Wistar (0-120 мин) с пассивным фенотипом поведения, подвергшихся процедуре «принудительного плавания»

Условия эксперимента	Группа	Образец/число животных	А, усл.ед.	Р
Искусственное освещение / 16.45-18.45	КГ	Растворитель (N=8)	33,8	P<0,05
	ОГ	Pro-Gly (N=6)	13,2	-
Отсутствие освещения / 20.45-22.45	КГ	Растворитель (N=8)	10,0	P<0,05
	ОГ	Pro-Gly (N=6)	16,8	P<0,05

Применение Pro-Gly сопровождалось повышением А ритма 6-минутной (на 200 % и 161 % при наличии и в отсутствие освещения соответственно, P>0,05); 12-минутной (на 90 % и 164 % при наличии и в отсутствие освещения соответственно, P>0,05) и 24-минутной гармонике (на 68 %; только в темноте, P<0,05), что в контек-

сте применения выраженного стрессового воздействия (процедура ПП) можно трактовать как позитивные изменения.

По данным литературы, у животных с исходно низкой подвижностью на фоне длительного «инъекционного стресса» в ночные часы отмечался сглаженный низкоамплитудный ритм [9]. Введение кофеина препятствовало вышеописанным изменениям А, способствовало нарастанию крутизны переднего фронта подвижности, совпадающему с введением вещества или с выключением света у крыс с активным фенотипом поведения, тогда как у особей с низким уровнем подвижности эффект психостимулятора был слабым, напоминающим реакцию на физиологический раствор [9]. С учётом этих данных, повышение А под действием Pro-Gly в ночные часы может трактоваться как активирующий эффект, проявлявшийся, в отличие от кофеина, у особей с пассивным фенотипом реакции.

Выводы: 1. У крыс НП ультрадианные 24-минутные ритмы локомоторной активности присутствовали только в условиях искусственного освещения, 6-минутные биоритмы наблюдались в отсутствие освещенности, а ритмы 12-минутной гармоничности не были выявлены при обоих использованных режимах освещения. У крыс-самцов Wistar КГ с пассивным фенотипом поведения 24-минутные биоритмы ГДА имели место как при наличии, так и в отсутствие освещения, а ритмы 6- и 12-минутной гармоничности отсутствовали. Таким образом, смена режима освещения у особей с пассивным фенотипом поведения вызывает менее выраженный хронобиологический «ответ», нежели у крыс НП. Следовательно, особи НП и крысы с пассивным фенотипом реагирования на стресс характеризуются различиями хронобиологического «ответа» на смену режима освещения; 2. Применение Pro-Gly (0,5 мг/кг, в/ж) грызунам с пассивным фенотипом реагирования на стресс не оказывало влияния на 6- и 12-минутные биоритмы активности и вызывало статистически достоверный модулирующий эффект на биоритмы ГДА 24-минутной гармоничности: а) нивелировало достоверные ритмы в условиях искусственного освещения; б) способствовало возрастанию амплитуды ритма в отсутствие освещённости; 3. Перспективно дальнейшее изучение Pro-Gly в качестве средства с потенциальным хронофармакологическим действием.

Литература

1. Максимова, Л. В. Изучение эффектов нейротропных олигопептидов на модели неассоциативного обучения : автореф. дис. ... канд. биол. наук : 14.03.06 / Л. В. Максимова ; Ин-т фармакологии и биохимии НАН Беларуси. – Минск, 2011. – 22 с.
2. Козловская, М. М. Влияние гептапептида селанка на депрессию поведения высоко и низкотрещивных мышей Balb/c и C57Bl/6 и крыс с наследуемой депрессивностью поведения WAG/Rij / М. М. Козловская, К. Ю. Саркисова, И. И. Козловский // Психофарм. и биол. наркологи. – 2005. – Т. 5, № 3. – С. 989–996.
3. Garcia, Y. Comparison of the Response of Male BALB/c and C57BL/6 Mice in Behavioral Tasks to Evaluate Cognitive Function / Y. Garcia, N. Esquivel // Behav. Sci. – 2018. – Vol. 8, № 1. – P. 1–10.
4. Факторы, влияющие на способность кофеина улучшать кратковременную память человека / Э. Б. Арушанян [и др.] // Эксп. и клин. фармакология. – 2003. – Т. 66, № 1. – С. 17–19.
5. Differential susceptibility of BALB/c, C57BL/6N, and CF₁ mice to photoperiod changes / L.K. Pilz [et al.] // Braz. J. Psychiatry. – 2015. – Vol. 37, № 3. – P. 185–190.

6. Increased sensitivity of the circadian system to temporal changes in the feeding regime of spontaneously hypertensive rats a potential role for Bmal2 in the liver / L. Polidarova [et al.] // PLoS One. – 2013. – Vol. 25, № 8. – P. 756–790.
7. Slattery, D. A. Using the rat forced swim test to assess antidepressant-like activity in rodents / D. A. Slattery, J. F. Cryan // Nature protocols. – 2012. – Vol. 7, № 6. – P. 1009–1014.
8. Кравченко, Е. В. Регуляция ультрадианных ритмов двигательной активности олигопептидами, структурно родственными окситоцину / Е. В. Кравченко, Н. А. Бизунок, Б. В. Дубовик // Докл. Нац. академии наук Беларуси. – 2021. – Т. 65, № 2. – С. 191–198.
9. Арушанян, Э. Б. Особенности временной организации поведенческого ответа крыс на кофеин / Э. Б. Арушанян, А. В. Попов // Эксп. и клин. фармакология. – 2005. – Т. 68, № 1. – С. 10–12.