

ДИПЕПТИД Pro-Gly ОБЛЕГЧАЕТ АДАПТИВНУЮ РЕАКЦИЮ У КРЫС WISTAR, ПОДВЕРГШИХСЯ ДЕПРИВАЦИИ ПАРАДОКСАЛЬНОЙ ФАЗЫ СНА

Кравченко Е. В.¹, Саванец О. Н.¹, Бизунок Н. А.², Дубовик Б. В.²

¹ Государственное научное учреждение «Институт биоорганической химии НАН Беларуси»,
г. Минск, Республика Беларусь;

² Учреждение образования «Белорусский государственный медицинский университет»,
г. Минск, Республика Беларусь

Реферат. Проведено исследование влияния Pro-Gly на адаптивное поведение крыс Wistar в условиях депривации парадоксальной фазы сна (ДПФС). Крыс помещали поодиночке внутрь цилиндра, погруженного вертикально в воду. Задача животного состояла в том, чтобы найти выход из стрессовой ситуации, поднырнув под нижний край цилиндра, и выбраться на бортик бассейна. ДПФС препятствовала реализации адаптивной реакции избавления у лабораторных грызунов ($p < 0,05$). Дипептид Pro-Gly оказывал статистически значимое нормализующее действие на адаптивное поведение грызунов (различия с контролем без ДПФС были статистически недостоверными, $p > 0,05$). Применение Pro-Gly было более эффективным, когда дипептид применялся в режиме «профилактика» (непосредственно перед ДПФС, за сутки до оценки адаптивного поведения), нежели когда дипептид применялся после лишения парадоксальной фазы сна в той же парадигме.

Ключевые слова: парадоксальная фаза сна, крысы, дипептид Pro-Gly, адаптивное поведение.

Введение. Проблема управления поведением профессиональных спортсменов, сотрудников МЧС, военнослужащих в не поддающихся прогнозированию, неожиданно возникших ситуациях, на фоне недосыпания и экстремальных стрессовых воздействий относится к числу актуальных задач современной фармакологической науки. Поддержание «нормальных» биоритмов активности обеспечивает максимальную экономизацию ресурсов организма в постоянно меняющихся условиях внешней среды. Известно, что нейрогормон окситоцин регулирует циркадианные ритмы организма [1]. Ранее нами были выявлены выраженные хронотропные свойства у дипептидного фрагмента окситоцина Pro-Leu [2]. Дипептид Pro-Gly является структурным аналогом

Pro-Leu, при этом в Pro-Gly остаток лейцина заменен на конформационно важную аминокислоту глицин.

Цель работы — поиск высокоактивного соединения — дипептида, структурно родственного окситоцину, характеризующегося способностью облегчать адаптивную реакцию избавления из стрессовой ситуации у крыс Wistar, подвергшихся депривации парадоксальной фазы сна.

Материалы и методы. Хронофармакологическую активность Pro-Gly изучали в опытах на крысах самцах Wistar, содержащихся 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)». Половозрелые аутбредные крысы Wistar были получены из питомника вивария Института биоорганической химии НАН Беларуси (сектор биоиспытаний). После доставки из сектора биоиспытаний крыс метили водостойким маркером, помещали группами по 4–7 особей в клетки размером 40×33,5×16,5 см.

Адаптивное поведение крыс исследовали в тесте экстраполяционного избавления (ТЭИ) следующим образом: крыс поодиночке помещали внутрь цилиндра, погруженного вертикально в воду на глубину 1–2,5 см. Задача животного состояла в том, чтобы за 120 с найти выход из стрессирующей ситуации, поднырнув под нижний край цилиндра, и выбраться на бортик бассейна по металлической сетке. Регистрировали число безуспешных попыток избавления (N); время подныривания под край цилиндра ($ЛП_{\text{подн}}$); время выхода по сетке ($ЛП_{\text{вых}}$) [3]. Применение указанной методики позволяет осуществлять поиск фармакологических средств, повышающих способность к решению новых задач при первом их предъявлении (в отсутствие предварительного обучения и соответствующей наследственной программы, на основе активного овладения закономерностями окружающей среды).

Немедленно по окончании тестирования в ТЭИ осуществляли актометрию с целью выявления возможного стимулирующего либо седативного действия исследуемого соединения. Показатели горизонтальной (ГДА) и вертикальной (ВДА) двигательной активности регистрировались в отсутствие экспериментаторов автоматически в актометре с горизонтальными и вертикальными инфракрасными сенсорами «Универсал 22-32» (Республика Беларусь) на протяжении 3 мин при тестировании поодиночке [2]. Полученные данные выражали в условных единицах (усл. ед. — units), соответствующих числу пересечений лучей в горизонтальной (вертикальной) плоскости. Актометр «Универсал 22-32» — система экспериментальных установок, объединенных беспроводной сетью передачи данных, работающая под управлением ПЭВМ с использованием пакета программ Mouse Statistic; разрешение сетки сканирования — 12×8; шаг сетки — 2,54 см, периодичность съема информации — 0,1 с [2]. Боксы актометра размещались в отдельном помещении со свето- и звукоизоляцией, специально предназначенном для за-

писи биоритмов двигательной активности. Освещенность в помещении, где располагался актометр, поддерживалась с помощью шести потолочных ламп дневного света мощностью 36 Вт (SL 36/26-735, Россия). Учитывая стремление грызунов избегать открытых, неизвестных и потенциально опасных мест, актометрию проводили в небольшой камере, близкой по размеру к «домашней» клетке, обогащенной привычными элементами, — поилкой, кормушкой, подстилкой [2].

Исследования осуществляли в 2 этапа.

На этапе 1 (*серия 1*) животные контрольной группы К 1 до ТЭИ подвергались слабому стрессу «новизны», связанному с круглосуточным нахождением грызунов в незнакомом помещении. Крысам группы К 1 вводили растворитель — дистиллированную воду.

На этапе 1 (*серии 2 и 3*) до ТЭИ в качестве повреждающего фактора использовали 24-часовую ДПФС по D. Jouvet с соавт. [3], сопровождающуюся «острым» стрессом, индуцированным иммобилизацией и переохлаждением на протяжении 24 ч [3]. Грызунам контрольных групп К 2а и К 3а вводили внутрибрюшинно (в/б) растворитель, особям групп «Pro-Gly 2б» и «Pro-Gly 3б» применяли дипептид Pro-Gly (Sigma, США) в дозе 0,5 мг/кг, в/б. В *серии 2* растворитель или дипептид Pro-Gly назначали сразу после ДПФС, в *серии 3* — перед ДПФС.

Этап 2 включал актометрию с участием особей групп К 1, К 3а и «Pro-Gly 3б».

Анализ данных проводили с использованием общепринятых статистических методов и программного обеспечения Origin 6.1 (Origin Lab Corporation, США, 2000), Biostat 4.03 (Glantz S.A., 1998). При определении уровня статистической значимости различий в вариационных рядах использовали методы непараметрической статистики: для сравнения двух независимых выборок применяли критерий Манна — Уитни, зависимых — критерий Уилкоксона. При наличии трех и более групп использовали критерий Крускала — Уоллиса для независимых выборок или ранговый дисперсионный анализ Фридмана для зависимых выборок с последующей обработкой данных методом апостериорных сравнений по Данну. Для анализа качественных признаков был применен точный критерий Фишера.

Результаты и их обсуждение. Влияние Pro-Gly на реакцию избавления крыс Wistar, подвергшихся ДПФС, из стрессовой ситуации представлено на рисунках 1–3.

У животных контрольной группы 2а (введение растворителя непосредственно накануне тестирования в ТЭИ) не было выявлено статистически достоверных различий с грызунами контрольной группы 1 (не подвергшихся ДПФС) по всем исследованным показателям. Отсутствие существенных сдвигов объясняется «пробуждающим» эффектом, связанным с усилением эмоционально-поведенческой реактивности на фоне «инъекционного стресса» накануне помещения в экспериментальную установку. Назначение дипептида животным группы «Pro-Gly 2б» в тех же условиях не вызвало статистически значимого улучшения в осуществлении адаптивной реакции, что может объясняться отсутствием позитивных сдвигов под действием ноотропов в условиях нормы [4].

Вместе с тем в случае введения растворителя особям К 3а за сутки до тестирования в ТЭИ (до ДПФС) были отмечены статистически значимые нарушения адаптивного поведения (см. рисунки 1–3). В частности, у контрольных особей группы 3а имело место статистически достоверное повышение значений показателя ЛП_{подн} в сравнении с таковым в К 1 — в 2,3 раза ($p < 0,05$) (рисунок 1, б). Отмечалась тенденция к увеличению показателей N , ЛП_{вых} (рисунок 1, а; рисунок 2, а).

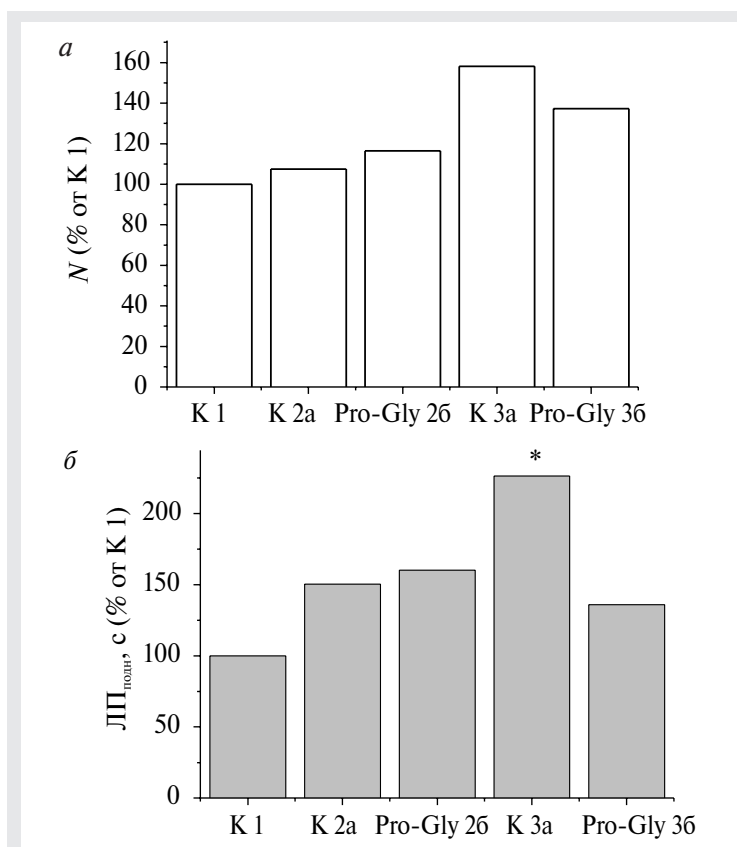


Рисунок 1 — Влияние Pro-Gly в дозе 0,5 мг/кг (в/б, однократно) на число безуспешных попыток избавления (N) (а) и латентный период подныривания (ЛП_{подн}) (б) в тесте экстраполяционного избавления у крыс Wistar, подвергшихся депривации парадоксальной фазы сна (* Различия статистически значимы по сравнению с К 1, критерий Крускала — Уоллиса с последующей обработкой данных групп К 1, Pro-Gly 3а, Pro-Gly 3б методом апостериорных сравнений по критерию Данна, $p < 0,05$.)

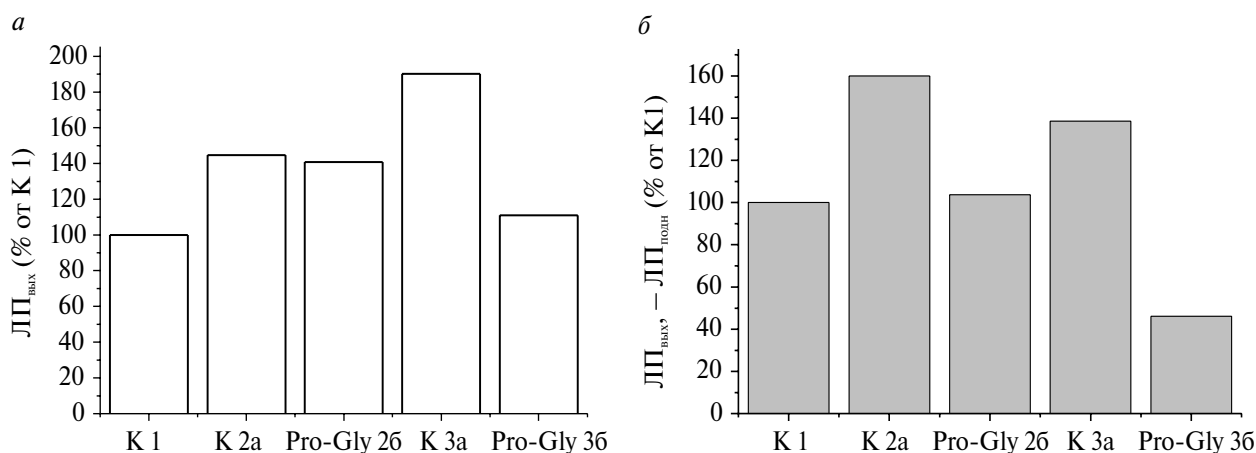


Рисунок 2 — Влияние Pro-Gly в дозе 0,5 мг/кг (в/б, однократно) на латентный период выхода на сетку (ЛП_{вых}) (а) и интервал между подныриванием и выходом на сетку (б) в тесте экстраполяционного избавления у крыс Wistar, подвергшихся ДПФС

Кроме того, в К 3а в сравнении с К 1 выявлено резкое (на 80 %) снижение числа животных, способных быстро (до 90 с) осуществить реакцию подныривания и выбраться по сетке на бортик установки ($p < 0,05$) (см. рисунок 3).

У животных группы Pro-Gly 3б, котрым дипептид назначали до ДПФС, статисти-

чески значимые различия с К 1 были нивелированы — значения ЛП_{подн} и доля в популяции животных, быстро избавлявшихся из стрессовой ситуации, статистически значимо не отличались от уровня контроля в группе К 1 (без ДПФС) — (см. рисунок 1, б; рисунок 3).

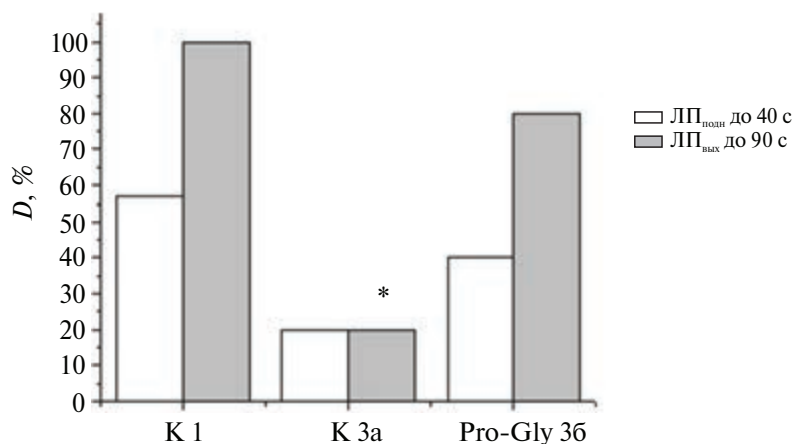


Рисунок 3 — Влияние Pro-Gly в дозе 0,5 мг/кг (в/б, однократно, перед ДПФС) на число животных, быстро решивших задачу избавления (D — доля животных с ЛП_{подн} до 40 с или с ЛП_{вых} до 90 с (%)); * Различия статистически значимы по сравнению с группой 1, точный критерий Фишера, $p = 0,01$)

Таким образом, дезадаптация, вызванная «острым» десинхронозом, моделируемая посредством 24-часовой селективной депривации парадоксальной фазы сна, успешно подавлялась коррекцией Pro-Gly, применяемым накануне нарушений цикла «сон-бодрствование».

По данным научной литературы, введение соединений с дофамин-позитивным (L-ДОФА) действием [5], а также бензодиазепиновых транквилизаторов в сравнительно высоких дозах [6] вызывало нарушение адаптивной реакции в ТЭИ, что может объясняться в первом случае индукцией стереотипии (однообразная *climbing*-реакция — повторяющиеся попытки вскарабкивания вверх по гладкой стенке цилиндра, без поиска других вариантов избавления из стрессовой ситуации), а во втором случае — седативным эффектом.

Полученные нами в результате актометрии данные указывают на отсутствие угнетающего или статистически значимого стимулирующего действия соединения Pro-Gly на горизонтальную и вертикальную двигательную активность крыс Wistar группы «Pro-Gly 3б» в сравнении с таковой у особей с ненарушенным поведением (группа К 1) (рисунок 4, а, б).

В условиях «нормы» после помещения животного в актометр отмечают следующие изменения двигательной активности: в первую

минуту подвижность невысока в связи с «острым» стрессом «новизны», в последующем поведение животных характеризуется активным обследованием камеры актометра на протяжении 5–10 мин. У животных группы К 3а, подвергшихся ДПФС, выявлено нарушение «рисунка» подвижности — отсутствие стрессиндуцированного снижения ГДА и ВДА (по-видимому, вследствие неадекватного восприятия обстановки на фоне ДПФС). Известно, что многие авторы рассматривают депривацию парадоксальной фазы сна у крыс как животную модель мании в связи с наблюдающимися у экспериментальных животных поведенческими отклонениями, включая гиперактивность [7]. В условиях нашего исследования уровень подвижности (ГДА и ВДА) в первую минуту регистрации у особей группы К 3а превышал таковую в К 1 в 2,8–2,9 раза (см. рисунок 4, а, б). Кроме того, у особей К 3а отсутствовал подъем активности во вторую минуту актометрии (см. рисунки 4а, 4б). У животных группы Pro-Gly 3б на фоне введения дипептида «рисунок» актограммы соответствовал «норме» и повторял таковой в К 1 (см. рисунок 4, а, б). Активация ГДА в первую минуту наблюдения отсутствовала, а во вторую минуту уровень ГДА повышался ($p < 0,05$) в сравнении с таковой в первую минуту наблюдения (см. рисунок 4, а).

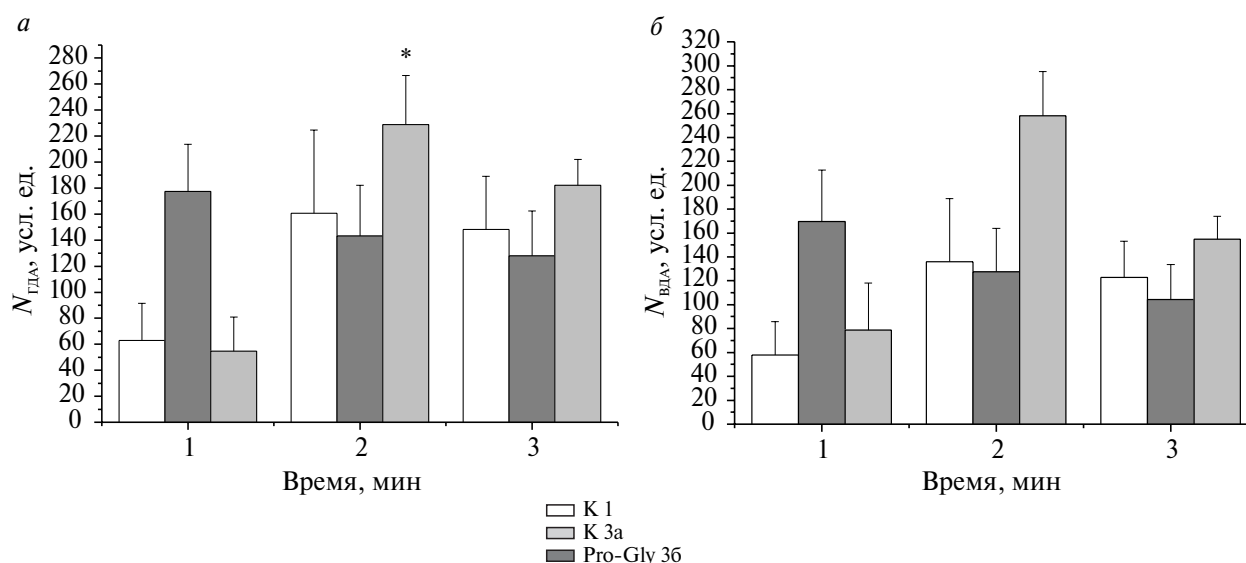


Рисунок 4 — Влияние Pro-Gly в дозе 0,5 мг/кг (в/б, однократно, перед ДПФС) на уровень горизонтальной (а) и вертикальной (б) активности крыс Wistar в условиях 3-минутной актометрии

Заключение. Проведенные исследования продемонстрировали корректорное влияние Pro-Gly на адаптивное поведение крыс Wistar в условиях депривации парадоксальной фазы сна. ДПФС препятствовала реализации адаптивной реакции избавления у крыс Wistar (различия между контрольными группами К 1 и К 3а были статистически значимыми, $p < 0,05$). Дипептид Pro-Gly (0,5 мг/кг, в/б) оказывал статистически значимое нормализующее дей-

ствие на адаптивное поведение грызунов (различия между основной группой К 3б и контрольной группой К 1 были статистически недостоверными, $p > 0,05$). Применение Pro-Gly было более эффективным, когда дипептид применялся в режиме «профилактики» (непосредственно перед ДПФС, за сутки до оценки адаптивного поведения), чем когда дипептид применялся после лишения парадоксальной фазы сна в той же парадигме.

Список цитированных источников

1. Zhang, G. Circadian intervention of obesity development via resting-stage feeding manipulation or oxytocin treatment / G. Zhang, D. Cai // *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* — 2011. — Vol. 301, № 5. — P. 1004–1012.
2. Кравченко, Е. В. Влияние изменений состояния нейромедиаторных и пептидергической систем мозга на циркадианные ритмы и поведение крыс / Е. В. Кравченко, Л. М. Ольгомец // *Журнал высшей нервной деятельности им. И. П. Павлова.* — 2012. — Т. 62, № 4. — С. 453–464.
3. Воронина, Т. А. Методические указания по изучению снотворной активности фармакологических веществ / Т. А. Воронина, Л. Н. Неробкова ; под ред. В. П. Фисенко [и др.] // *Руководство по экспериментальному (доклиническому) изучению новых фармакологических веществ.* — М. : Минздрав РФ, ЗАО «ИИА «Ремедиум», 2000. — С. 131–137.
4. Действие фармакологических препаратов на синаптическую активность гиппокампа / В. Г. Скребицкий [и др.] // *Анналы неврологии.* — 2008. — Т. 2, № 2. — С. 23–26.
5. Бондаренко, Н.А. Избирательное влияние нейролептиков на дофаминзависимое нарушение поведения крыс в тесте экстраполяционного избавления / Н. А. Бондаренко // *Бюл. эксперим. биол. и медицины.* — 1990. — № 11. — С. 506–508.
6. Савченко, Н. М. Нормализация адаптивной реакции избавления у крыс веществами с ноотропной активностью / Н. М. Савченко, Р. У. Островская, Ю. В. Буров // *Бюл. эксперим. биол. и медицины.* — 1988. — № 8. — С. 170–172.
7. Young, J. W. Predictive animal models of mania: hits, misses and future directions / J. W. Young, B. L. Henry, M. A. Geyer // *Br. J. Pharmacol.* — 2011. — Vol. 164, № 4. — P. 1263–1284.



Dipeptide Pro-Gly facilitates the adaptive response of wistar rats subjected to deprivation of the paradoxical sleep phase

Kravchenko E. V.¹, Savanets O. N.¹, Bizunok N. A.², Dubovik B. V.²

¹ State Scientific Institution «Institute of Bioorganic Chemistry of the National Academy of Sciences of Belarus», Minsk, Republic of Belarus;

² Belarusian State Medical University, Minsk, Republic of Belarus

To study of the effect of Pro-Gly on the adaptive behavior of rats in conditions of deprivation of the paradoxical sleep (DPS), was studied as follows: rats were placed singly inside a cylinder immersed vertically in water. The task of the animal was to find a way out of a stressful situation, diving under the bottom edge of the cylinder, and get out on the side. DPS in Wistar rats prevented the implementation of an adaptive response of disposal (differences between control groups 1 and 3a were statistically significant, $p < 0.05$), and Pro-Gly contributed to the normalization of adaptive behavior (differences between the main group 3b and control group 1 were insignificant, $p > 0.05$). The use of Pro-Gly was more effective when dipeptide was used in the “prevention” mode (immediately before DPS, a day before the assessment of adaptive behavior) than when dipeptide was applied after deprivation of the paradoxical sleep phase in the same paradigm.

Keywords: paradoxical sleep, rat, dipeptide Pro-Gly, adaptive behavior.

Поступила 13.06.2022