

УДК: 615.015.1:599.323.4

ВЛИЯНИЕ ДИПЕПТИДОВ PRO-GLY, PRO-LEU НА ДИНАМИКУ ОРИЕНТИРОВОЧНО-ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКОЙ И ЛОКОМОТОРНОЙ АКТИВНОСТИ В УСЛОВИЯХ ГРУППОВОЙ АКТОМЕТРИИ И МОДИФИКАЦИЯ ИХ ЭФФЕКТОВ ДИЗОЦИЛПИНОМ

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

¹ Государственное научное учреждение «Институт биоорганической химии Национальной академии наук Беларуси», г. Минск, Республика Беларусь

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

Реферат. Изучено влияние дипептидов Pro-Gly, Pro-Leu на динамику ориентировочно-исследовательской (вертикальной; ВДА) и локомоторной (горизонтальной; ТДА) двигательной активности субмиссивных мышей ICR в условиях групповой актометрии, проведена оценка модификации их эффектов дизоцилпином (МК-801, неконкурентный антагонист N-метил-D-аспартатных рецепторов). Дипептид Pro-Leu (но не Pro-Gly) способствовал облегчению процесса габитуации ГДА в условиях групповой актометрии в первом (но не повторном) сеансе измерения локомоторной активности.

Существенного влияния на уровень тревожности (УТ) субмиссивных мышей ICR, оцениваемый по ВДА в первые 5 мин регистрации, у тестируемых дипептидов не выявлено.

Ключевые слова: Pro-Gly, Pro-Leu, дизоцилпин, мышцы, актометрия.

Введение. Выявление связи когнитивной дисфункции и различных психических расстройств, в том числе тревожных, относится к числу приоритетных проблем в современной психиатрии и нейробиологии [1].

Различные тревожные состояния сопровождаются нарушениями мнестических и когнитивных функций (КФ) [2]. Когнитивные нарушения при тревожных расстройствах (ТР) делятся на три основные группы: 1) нарушения внимания и исполнительных функций; 2) расстройства памяти; 3) когнитивный и метакогнитивный дефицит и уязвимости [1]. Известно, что лекарственные средства (ЛС), эффективные при ТР, не оказывают значимого воздействия на когнитивный дефицит или даже усиливают его. Наиболее выраженным негативным влиянием на КФ обладают ЛС группы бензодиазепинов, особенно — лоразепам и оксазепам, а также миансерин и оланзапин [1]. Актуальным является поиск новых эффективных соединений, улучшающих КФ и способствующих нормализации поведения в условиях стресса.

Окситоцин (ОТ) — Cys-Tyr-Ile-Gln-Asn-Cys-Pro-Leu-Gly-NH₂ — нейропептид, оказывающий регуляторное влияние на важнейшие

биологические функции мозга, включая процессы социального распознавания и социального взаимодействия [3, 4]. Модуляция окситоцином КФ, осуществляется посредством влияния на рабочую память и исполнительные функции [4].

По данным литературы, ОТ уменьшал УТ [5]. В экспериментах *in vitro* установлено снижение активности рецепторов глутамата N-метил-D-аспартатного (NMDA) типа под действием ОТ (S. Caruso [et al.], 1993). По ранее опубликованному нами данным, дипептиды Pro-Gly и Pro-Leu, структурно родственные фрагменту ОТ (Pro-Leu-Gly-NH₂), облегчали КФ в тесте габитуации и снижали УТ [6].

Учитывая интеграцию эмоциональности и когнитивных процессов, влияние дипептидов на КФ и УТ может быть взаимосвязанным.

Для выяснения возможных нейротрансмиссерных механизмов фармакологического действия целесообразно было проведение поведенческих экспериментов по оценке возможного взаимодействия дипептидов Pro-Gly, Pro-Leu с МК-801 (дизоцилпин, неконкурентный селективный антагонист N-метил-D-аспартатных (NMDA) рецепторов) в отношении КФ и УТ лабораторных грызунов.

Одной из форм неассоциативного обучения является габитуация (*habituation* – привыкание) [7]: многократное систематическое предъявление одного и того же стимула вызывает постепенное ослабевание реакции, которая со временем может исчезнуть совсем, то есть происходит привыкание к раздражителю. С целью оценки механизмов модуляции КФ дипептидами вводили Pro-Gly, Pro-Leu без дизоцилпина и совместно с указанным соединением, сопоставляя способность мышей к габитуации на фоне введения исследуемых образцов.

Известно, что NMDA-рецепторы вовлечены в регуляцию КФ и эмоциональной реактивности. Нарушения функционирования NMDA-рецепторов влечет за собой статистически достоверный когнитивный дефицит, сопровождающий такие заболевания, как шизофрения, депрессия, ишемические нарушения, хронические нейродегенеративные болезни. Примером повреждающего влияния дизоцилпина (0,01 и 0,1 мг/кг, внутривентриально) на процессы памяти в эксперименте является дефицит КФ у мышей в тесте *object recognition*. С учетом вышесказанного, можно было бы ожидать нарушения процесса габитуации на фоне введения дизоцилпина. Вместе с тем, поскольку стресс резко нарушает КФ, в том числе неассоциативное обучение, повреждающий эффект дизоцилпина может компенсироваться его анксиолитическим влиянием. В связи с этим для всестороннего анализа влияния тестируемых образцов на различные виды поведенческой активности параллельно с габитуацией определяли УТ с использованием данных актометрии в одних и тех же сеансах.

Сведения об уровне ГДА и ВДА в первые 5 мин нахождения в незнакомой обстановке (наиболее «опасный» период) позволяет дать предварительную оценку влияния соединений на УТ. Исследовательская активность существенно тормозится тревожностью, поэтому регистрация подвижности животных представляет собой не прямой метод оценки УТ. Использование нами экспериментальных камер с большими размерами боксов без привычных элементов (подстилка, поилка, кормушка) является стрессогенным фактором, аггравирующим эмоциональную реакцию на «новизну» у субмиссивных мышей ICR. В этих условиях возникает конфликт между стремлением исследовать незнакомую территорию и мотивацией избежать потенциальной опасности. Анксиолитики оказывают отчетливый противотревожный эффект у грызунов с пассивным типом реакции, выражающийся в активации поведения в условиях стресса.

Вертикальные стойки рассматриваются в контексте оценки риска окружающей обстановки. Выявлена инвертированная U-образная зависимость между числом вертикальных стоек и интенсивностью потенциальной опасности: при высоком уровне потенциальной угрозы число вертикализаций снижено (и может быть повышено путем применения анксиолитиков), тогда как при промежуточном уровне возможной опасности число вертикальных стоек возрастало и снижалось анксиолитиками; при низком уровне опасности в «открытом поле» анксиолитики снижали число вертикальных стоек (D. C. Blanchard, R. J. Blanchard, R. J. Rodgers, 1983). Анксиолитики повышали число вертикальных стоек в первые несколько минут тестирования, когда тревожность была наиболее высокой («стресс новизны»), а впоследствии, когда уровень тревожности становился умеренным, снижали указанный показатель (R. J. Rodgers, J. K. Shepherd, 1993).

Известно, что блокада NMDA-рецепторов способствует снижению нейрональной активности, оказывая влияние на высвобождение ГАМК и моноаминов, которые, в свою очередь, вовлечены в регуляцию УТ. Дизоцилпин характеризовался анксиолитическим действием в экспериментах на крысах и мышах, индуцировал локомоторную гиперактивность в дозе 0,1 мг/кг (в/б), но не 0,01 мг/кг (в/б) и препятствовал анксиогенному влиянию длительного введения токсина ди-2-этилгексилфталата.

Цель работы – данного исследования являлось изучение влияния дипептидов Pro-Gly, Pro-Leu на габитуацию и УТ, определяемые по динамике ориентировочно-исследовательской и локомоторной активности субмиссивных мышей ICR в условиях групповой актометрии, и оценка модификации их эффектов дизоцилпином.

Задачи: 1) изучить влияние дипептидов Pro-Leu и Pro-Gly на процессы внутри- и межсессионной габитуации (по данным динамики двигательной активности) и на УТ (оцениваемый по подвижности в первые 5 мин актометрии); 2) исследовать фармакологическую активность дизоцилпина в отношении неассоциативного обучения; 3) дать оценку поведенческим эффектам дипептидов при совместном введении с дизоцилпином.

Материалы и методы. В эксперименты включали 350 аутбредных мышей-самцов ICR, не относящихся к числу доминантов. Формировали 35 экспериментальных групп, число животных в каждой группе составляло 10 особей. В их числе: контроль-1 (К-1), интактный – 12 групп;

контроль-2 (К-2; «инъекционный» стресс: введение растворителя, здесь и ниже – дистиллированная вода (ДВ), в/б + введение растворителя, в/б) – 4 группы; основные группы 1–5: Pro-Gly (0,5 мг/кг, в/б) + растворитель – 4 группы; Pro-Gly (0,5 мг/кг, в/б) + дизоцилпин (0,05 мг/кг, в/б) – 4 группы; Pro-Leu (0,5 мг/кг, в/б) + растворитель – 3 группы; Pro-Leu (0,5 мг/кг, в/б) + дизоцилпин (0,05 мг/кг, в/б) – 4 группы; дизоцилпин (0,05 мг/кг, в/б) + растворитель – 4 группы. Исследуемые соединения вводили однократно в объеме 0,1 мл на 10 г массы тела мыши. Pro-Gly вводили за 20–35 мин до высадки мышей в камеру актометра, а дизоцилпин – за 5–20 мин до начала опыта.

Горизонтальную (локомоторную) и вертикальную (исследовательско-ориентировочную)

двигательную активность (ГДА и ВДА соответственно) измеряли дважды с интервалом 24 ч. Каждый сеанс продолжительностью 30 мин осуществляли с использованием многоканального актометра Activity Cages (Ugo Basile, Италия) в условиях размещения мышей группами по 10 грызунов в камерах размером 41 см × 44 × 32 см в условиях небогатой среды. Сопоставляли подвижность в первые и последние 5 мин актометрии (внутрисессии габитуация), а также в начальные 5 мин при первой и повторной высадках в боксы актометра (межсессионная габитуация).

Эксперименты проводили в условиях искусственного освещения в утренние и дневные часы (09:00–15:00 ч).

Схема исследования приведена в таблице 1.

Таблица 1 – Формирование групп и схема проведения экспериментов

Группа / образец	Введение образцов (однократно, перед первой актометрией)	Сутки эксперимента/ процедура/число высадок	
		1	2
		Групповая актометрия (30 мин) на фоне введения образцов / N; n	Групповая актометрия (30 мин), без введения образцов/N; n
К-1 (интактный)	без введения	N=12; n=10	N=12; n=10
К-2 (растворитель)	ДВ+ДВ	N=4; n=10 (10+10+10+10)	N=4; n=10 (10+10+10+10)
Pro-Gly + растворитель	Pro-Gly (0,5 мг/кг) + ДВ	N=4; n=10 (10+10+10+10)	N=4; n=10 (10+10+10+10)
Pro-Gly + дизоцилпин	Pro-Gly (0,5 мг/кг) + дизоцилпин (0,05 мг/кг)	N=4; n=10 (10+10+10+10)	N=4; n=10 (10+10+10+10)
Дизоцилпин + растворитель	ДВ + дизоцилпин (0,05 мг/кг)	N=4; n=10 (10+10+10+10)	N=4; n=10 (10+10+10+10)
Pro-Leu + растворитель	Pro-Leu (0,5 мг/кг) + ДВ	N=3; n=10 (10+10+10)	N=3; n=10 (10+10+10)
Pro-Leu + дизоцилпин	Pro-Leu (0,5 мг/кг) + дизоцилпин (0,05 мг/кг)	N=4; n=10 (10+10+10+10)	N=4; n=10 (10+10+10+10)

Примечание. Растворитель (ДВ) и исследуемые соединения вводили в/б, однократно, перед первой актометрией; n — число животных; N — число высадок (например, N=4; n=10: оценено поведение 10+10+10+10 мышей).

Использовали субстанции дипептидов Pro-Leu (P1130-1G, серийный номер BCCB0437, purity ≥ 98 %, Sigma-Aldrich, США), Pro-Gly (P0880-1G), серийный номер BCBV9787 и субстанцию дизоцилпин — МК-801 hydrogen maleate (M107-50MG), серийный номер 078K4606 производства Sigma-Aldrich, США.

Тестируемые соединения вводили животным основных групп 1–5 в объеме 0,1 мл на 10 г массы тела; растворитель назначали

животным К-2 в том же объеме. Статистическую обработку цифровых показателей проводили с использованием программного обеспечения Biostat 4.03.

При определении уровня статистической значимости различий в вариационных рядах использовали критерий Краскела–Уоллиса для независимых выборок, Фридмана — для зависимых выборок, с последующей обработкой результатов методом апостериорных сравнений

по критериям Данна, Даннета и Ньюмена–Кейлса. Данные представляли в виде $X \pm S_x$.

Результаты и их обсуждение. Результаты исследования приведены в таблицах 2–4. При первой групповой высадке у особей интактного контроля (К-1) были отмечены хорошо выраженные процессы привыкания: в 5, 26–30-ю минуты наблюдения отмечено статистически значимое ($p < 0,05$) снижение числа движений в горизонтальной плоскости по сравнению с первыми минутами актометрии (таблица 2).

В условиях слабого «инъекционного» стресса, вызванного процедурой в/б введения растворителя, у мышей из К-2 отмечены нарушения процесса угашения ИОР – статистически значимое снижение ГДА не было выявлено в 5-ю минуту наблюдения и проявлялось лишь на последних этапах регистрации (на 26–30-й минуте).

Статистически значимое внутрисессионное угашение ГДА в 30-ю минуту актометрии, более выраженное в сравнении с К-2, было отмечено в случае введения Pro-Leu. Отсутствие статистически достоверного снижения локомоции в последние минуты актометрии в сравнении с исходным уровнем на фоне дизоцилпина можно расценивать как нарушения процессов внутрисессионной габитуации при первой актометрии (таблица 2). Применение дизоцилпина совместно с Pro-Leu препятствовало развитию облегчающего эффекта дипептида: различия с исходным уровнем в 30-ю минуту наблюдения утрачивали статистическую достоверность.

Вместе с тем, назначение дизоцилпина совместно с Pro-Gly приводило к появлению статистически достоверной внутрисессионной габитуации, отсутствовавшей в случае применения указанного дипептида без блокатора NMDA-рецепторов (таблица 2). Полученные результаты являются убедительным подтверждением глутаматергических механизмов регуляции КФ у Pro-Leu и Pro-Gly.

В условиях повторной актометрии (без введения тестируемых образцов), как и ожидалось, статистически значимый эффект отмечался лишь в группе интактного контроля. При повторном помещении в те же самые экспериментальные условия статистически значимая внутрисессионная габитуация в группе К-1 началась раньше в сравнении с предшествующей высадкой (не в 5-ю, а в 4-ю минуту опыта), что указывало на хорошо выраженные мнестические процессы в первом сеансе актометрии.

«Инъекционный» стресс накануне первого тестирования препятствовал формированию следа памяти в группе К-2, что выразилось в отсутствии статистически значимой габитуации при повторном тестировании.

Как и предполагалось, в отсутствие введения образцов особям групп 1–5 поведение мышей основных групп существенно не отличалось от К-2. Эти данные показали, что: а) межгрупповые различия в первом сеансе актометрии были связаны именно с назначением тестируемых образцов; б) отмечалось отсутствие «отложенного» (позитивного либо негативного) эффекта дипептидов на поведение грызунов по истечении суток с момента введения.

Межсессионная габитуация ГДА и ВДА за первые минуты актометрии в целом не претерпела существенных изменений под влиянием дипептидов, дизоцилпина и их комбинации (таблица 4).

Данные, представленные в таблице 4, показали статистически значимое снижение ГДА в исходные 5 минут первого сеанса актометрии у стрессированных особей (К-2), а также у мышей, получавших дизоцилпин с растворителем, относительно интактного контроля.

Таким образом, «инъекционный» стресс вызвал снижение подвижности в К-2, а дизоцилпин в использованной нами дозе не обладал анксиолитическим эффектом, не препятствовал стресс-индуцированному снижению локомоции.

В случае введения дипептидов статистически значимые различия с интактным контролем отсутствовали: тестируемые соединения (предположительно, вследствие стресс-протекторного эффекта) способствовали более выраженной локомоции в «опасный» период ознакомления с боксом, и этот их эффект (в отличие от габитуации) не ослаблялся и не потенцировался дизоцилпином (таблица 4).

На фоне «инъекционного» стресса в группе К-2 в первом сеансе актометрии отмечалось более чем двукратное статистически значимое снижение уровня ВДА в сравнении с группой интактного контроля.

Аналогичное статистически достоверное уменьшение исследовательско-ориентировочной реакции отмечалось и в остальных группах сравнения, что указывало на отсутствие существенного анксиолитического влияния образцов в отношении «оценки риска» субмиссивными мышами ICR в условиях групповой актометрии.

Таблица 2 – Влияние дипептидов Pro-Gly (0,5 мг/кг, в/б) и Pro-Leu (0,5 мг/кг, в/б) на динамику локомоторной активности у мышей ICR в условиях групповой актометрии продолжительностью 30 мин, и модификация их эффектов дизоциллином (0,05 мг/кг, в/б) на этапе первого тестирования («обучение»)

Группа	ГДА, усл. ед. / Время					
	1-я минута 2	2-я минут 3	3-я минута 4	4-я минута 5	5-я минута 6	5 минут суммарно 7
1						
K-1 (интактный, N=12; n=10)	390,6±19,6	322,7±13,0	315,3±9,7	285,0±15,5	275,4±20,2 ^{1,5}	1589,0±60,4
K-2 (P+P; N=4; n=10)	271,5±30,8	257,8±27,9	201,8±12,1	225,2±26,6	185,0±19,3	1141,0±103,1 ⁶
Pro-Gly + P (N=4; n=10)	230,0±42,0	192,8±27,9	248,5±39,6	216,3±37,2	220,0±35,5	1107,5±160,6
Pro-Gly + Д (N=4; n=10)	345,8±22,3	318,2±45,9	291,3±32,0	281,3±36,1	223,8±44,6	1460,3±174,8
Д + P (N=4; n=10)	297,8±33,1	227,2±11,8	235,5±19,3	245,5±11,4	204,8±22,0	1210,8±56,1 ⁶
Pro-Leu + P (N=3; n=10)	301,3±53,9	278,3±66,7	250,3±46,8	244,3±17,1	239,0±13,3	1313,3±171,4
Pro-Leu + Д (N=4; n=10)	316,3±31,0	286,8±28,2	256,5±19,7	224,3±10,2	229,8±15,1	1313,5±34,0
	26-я минута	27-я минута	28-я минута	29-я минута	30-я минута	26–30-я минута суммарно
K-1 (интактный, N=12; n=10)	190,2±18,3 ¹⁻⁵	187,3±18,5 ¹⁻⁵	202,3±10,9 ¹⁻⁵	195,5±13,7 ¹⁻⁵	194,2±12,4 ¹⁻⁵	969,6±58,1
K-2 (P+P; N=4; n=10)	77,8±10,2 ⁵	96,3±28,6 ⁵	104,5±48,2 ⁵	103,0±40,4 ⁵	88,8±27,6 ⁵	470,3±150,2 ⁶
Pro-Gly + P (N=4; n=10)	134,5±29,0	143,8±13,8	121,0±18,0 ⁵	137,8±19,7	165,5±17,8	702,5±73,1
Pro-Gly + Д (N=4; n=10)	168,3±33,1	158,0±48,8 ^{1,5}	154,3±38,8 ^{1,5}	162,5±27,1 ^{1,5}	128,0±33,0 ^{1,2,5}	771,0±170,7
Д + P (N=4; n=10)	108,8±12,7 ⁵	93,8±19,9 ^{1,5}	108,3±40,6 ⁵	117,5±39,5	121,0±39,1	549,3±155,7
Pro-Leu + P (N=3; n=10)	95,0±6,1	67,3±13,6	100,3±17,7	50,3±16,8 ⁵	47,3±4,7 ⁵	360,3±33,2 ⁶
Pro-Leu + Д (N=4; n=10)	163,5±19,6 ⁵	149,8±7,7 ^{1,5}	145,0±15,8 ^{1,5}	142,3±12,6 ^{1,5}	164,0±23,6	764,5±29,5

Примечание. ¹ — различия с уровнем в 1-ю минуту статистически значимы, $p < 0,05$, критерий Фридмана с апостериорным анализом по критерию Ньюмена-Кейлса; ² — то же; различия с уровнем во 2-ю минуту статистически значимы, $p < 0,05$; ³ — то же; различия с уровнем в 3-ю минуту статистически значимы, $p < 0,05$; ⁴ — то же; различия с уровнем в 4-ю минуту статистически значимы, $p < 0,05$; ⁵ — различия с уровнем в 1-ю минуту статистически значимы, $p < 0,05$, критерий Фридмана с апостериорным анализом по критерию Даннета; ⁶ — различия с уровнем в интактном контроле статистически значимы, $p < 0,05$, критерий Краскела-Уоллиса с апостериорным анализом по критерию Данна; P — растворитель; D — дизоциллин.

Таблица 3 — Влияние дипептидов Pro-Gly (0,5 мг/кг, в/б) и Pro-Leu (0,5 мг/кг, в/б) на динамику локомоторной активности у мышей ICR в условиях групповой актометрии продолжительностью 30 мин и модификация их эффектов диэтилпином (0,05 мг/кг, в/б) на этапе повторного тестирования («воспроизведение»)

Группа	ГДА, усл. ед. / Время					
	1-я минута	2-я минута	3-я минута	4-я минута	5-я минута	1-5-я минута суммарно
1	2	3	4	5	6	7
K-1 (интактный, N=12; n=10)	311,3±16,2	277,6±11,6	255,9±9,6	217,8±13,4 ^{1,5}	214,1±16,1 ^{1,5}	1276,7±45,9
K-2 (P+P; N=4; n=10)	176,8±29,0	186,0±28,9	207,3±17,4	214,3±22,8	216,8±18,1	1001,0±53,3
Pro-Gly + P (N=4; n=10)	208,5±24,7	183,5±27,0	188,2±13,9	195,0±7,7	165,5±19,1	940,8±66,9
Pro-Gly + D (N=4; n=10)	235,8±48,0	256,8±39,7	214,8±37,7	220,8±21,5	257,0±33,8	1185,0±167,2
D + P (N=4; n=10)	202,0±21,4	215,2±31,4	192,8±19,0	202,5±29,5	156,8±41,3	969,3±127,9
Pro-Leu + P (N=3; n=10)	187,3±45,9	192,3±83,5	202,3±37,4	223,7±39,0	228,3±70,6	1034,0±252,1
Pro-Leu + D (N=4; n=10)	200,3±22,5	168,8±28,9	209,5±31,7	176,5±31,7	174,8±17,3	929,8±97,5 ⁶
	26-я минута	27-я минута	28-я минута	29-я минута	30-я минута	26-30-я минута суммарно
K-1 (интактный, N=12; n=10)	168,2±10,4 ^{1-3,5}	159,8±13,8 ^{1-3,5}	174,6±13,0 ^{1-3,5}	175,2±14,5 ^{1-3,5}	178,7±13,6 ^{1-3,5}	856,3±45,9
K-2 (P+P; N=4; n=10)	203,5±23,0	137,5±35,3	143,0±31,3	154,0±46,9	174,5±24,9	812,5±116,4
Pro-Gly + P (N=4; n=10)	161,5±25,2	155,8±24,7	165,3±24,8	138,0±10,9	170,0±8,8	790,5±69,0
Pro-Gly + D (N=4; n=10)	118,0±28,4	137,8±19,8	140,0±16,1	118,8±7,5	108,5±20,0	623,0±71,9
D + P (N=4; n=10)	154,8±6,0	152,8±13,4	145,0±29,2	134,3±33,0	104,5±32,9	691,3±97,0
Pro-Leu + P (N=3; n=10)	195,0±22,6	193,7±25,6	161,7±34,9	119,0±7,8	103,7±15,6	773,0±27,6
Pro-Leu + D (N=4; n=10)	142,5±25,3	164,8±23,7	187,2±23,4	166,5±18,2	143,8±19,7	804,8±81,9

Примечание. ¹ различия с уровнем в 1-ю минуту статистически значимы, $p < 0,05$, критерий Фридмана с апостериорным анализом по критерию Ньюмена-Кейлса; ² то же; различия с уровнем во 2-ю минуту статистически значимы, $p < 0,05$; ³ то же; различия с уровнем в 3-ю минуту статистически значимы, $p < 0,05$; ⁴ то же; различия с уровнем в 4-ю минуту статистически значимы, $p < 0,05$; ⁵ — различия с уровнем в 1-ю минуту статистически значимы, $p < 0,05$, критерий Фридмана с апостериорным анализом по критерию Даннета; ⁶ различия с уровнем в интактном контроле статистически значимы, $p < 0,05$, критерий Краскела-Уоллиса с апостериорным анализом по критерию Данна, P — растворитель, D — диэтилпипин.

Таблица 4 – Влияние дипептидов Pro-Gly (0,5 мг/кг, в/б) и Pro-Leu (0,5 мг/кг, в/б) на динамику локомоторной и исследовательско-ориентировочной активности у мышей ICR в условиях первой и повторной групповой актометрии и модификация их эффектов дизоциллином (0,05 мг/кг, в/б)

Группа / образец	ГДА, усл. ед.		ГДА во 2-е сутки (относитель-но 1-х суток), %	ВДА, усл. ед.		ВДА во 2-е сутки (относитель-но 1-х суток), %
	1-е сутки	2-е сутки		1-е сутки	2-е сутки	
	с 1-й по 5-ю минуту актометрии суммарно	с 1-й по 5-ю минуту актометрии суммарно		с 1-й по 5-ю минуту актометрии суммарно	с 1-й по 5-ю минуту актометрии суммарно	
K-1 (интактный) к уровню K-2, %	1589,0±60,4 139,3	1276,7±45,9	80,3	574,8±36,3 211,3	371,1±22,7	64,6
K-2 (растворитель)	1141,0±103,1 ¹ 100,0	1001,0±53,3	87,7	272,0±53,1 ¹ 100,0	270,0±48,5	99,3
Pro-Gly + растворитель к уровню K-2, %	1107,5±160,6 97,1	940,8±66,9	84,9	253,8±65,5 ¹ 93,3	270,0±58,2	106,4
Pro-Gly + дизоциллин к уровню K-2, %	1460,3±174,8 128,0	1185,0±167,2	81,1	268,5±11,7 ¹ 98,7	311,5±24,1	116,0
Дизоциллин + растворитель к уровню K-2, %	1210,8±56,1 ¹ 106,4	969,3±127,9	80,1	273,0±36,8 ¹ 100,4	296,8±26,5	108,7
Pro-Leu + растворитель к уровню K-2, %	1313,3±171,4 115,1	1034,0±252,1	78,7	252,0±54,5 ¹ 92,6	234,0±61,3	92,9
Pro-Leu + дизоциллин к уровню K-2, %	1313,5±34,0 115,1	929,8±97,5 ¹	70,8	274,5±35,4 ¹ 100,9	289,3±71,2	105,4

Примечание. ¹ различия с уровнем в интактном контроле статистически значимы, $p < 0,05$, критерий Краскела–Уоллиса с апостериорным анализом по критерию Данна.

Как и следовало ожидать, высокий УТ по критерию ВДА в группе К-2, основных группах 1–5 сопровождался нарушениями КФ. Так, межсессионная габитуация ВДА была хорошо выражена в группе К-1 (ВДА за первые 5 мин регистрации при повторной актометрии составила 64,6 % от исходного уровня); в остальных группах сравнения указанные показатель не опускался ниже 92,9 % (таблица 4).

Известно, что в образовании β -поворота пептидной цепи участвуют остатки пролина; при этом создаются участки складчатых β -структур в белках, в которых сосредоточены активные центры (Назарова Г.А., 2008). К числу часто встречающихся пролинсодержащих дипептидных фрагментов принадлежит –Pro–Leu–, который является частью ОТ, меланотропинингибирующего фактора 1, урокортина, адренотропного гормона, орексина А, α -, β -, γ -эндорфинов. Все вышеперечисленные пептиды обладают мнемоторным действием (Wagner U., Echterhoff G., 2018; Khan R. S. [et al.], 2010; Pan W., Kastin A. J., 2007; Scantlebury M.H. [et al.], 2017; Abounoori M. [et al.], 2021; Netto C. A., 2022). Тот факт, что мощный селективный антагонист рецепторов ОТ L-368,899 с $IC_{50}=8,9$ нМ (King Sh. K. M. V. [et al.], 2019) статистически значимо нарушал процессы долговременной памяти мышей, а Pro-Leu устранял комплексные длительно сохраняющиеся нарушения мнемоторных функций, спровоцированные L-368,899 (Кравченко Е. В. и соавторы, 2023), указывает на наличие у Pro-Leu окситоцинергических механизмов действия и позволяет рассматривать Pro-Leu в качестве дипептида — миметика ОТ. ОТ связывается с окситоциновым рецептором (ОР), который обладает уникальной способностью инициировать различные сигнальные пути, передавая сигнал от рецепторов к представителям многочисленного семейства G-белков. Представленные нами материалы посвящены изучению поведенческих эффектов пролинсодержащих дипептидов при совместном введении с дизоцилином. Известно, что NMDA-рецепторы участвуют в стимуляции высвобождения ОТ *in vivo*; одномоментное применение агонистов глутаматных рецепторов AMPA (α -амино-3-гидрокси-5-метил-4-изоксазолпропионовой кислоты) и агонистов глутаматных NMDA-рецепторов стимулировало повышение уровня ОТ в плазме крови, и это повышение впоследствии блокировалось введением антагонистов AMPA- либо NMDA-рецепторов (CNQX и 3-[2-карбокси-пиперазин-4-ил]пропил-1-фосфоновая кислота соответственно) (Leithead A. B. и другие, 2021). В экспериментах *in vivo* ОТ и агонист ОР

карбетоцин (в отличие от антагониста ОР L-368,899) устраняли негативное влияние дизоцилина на зоосоциальное поведение. Нами получены результаты, сходные с цитированными выше. В первые сутки эксперимента при введении дизоцилина было отмечено статистически значимое снижение ГДА относительно уровня интактного контроля, а на фоне введения дизоцилина совместно с Pro-Leu указанные нарушения отсутствовали (таблица 4), следовательно, Pro-Leu (предполагаемый дипептид — миметик ОТ), как ОТ и агонист ОР карбетоцин (Zimmermann F. F. и другие 2016), противодействовал дезорганизации поведения, вызванной дизоцилином. В свою очередь, дизоцилин в первые сутки исследований препятствовал развитию облегчающего эффекта дипептида на габитуацию: на фоне Pro-Leu различия ГДА с уровнем соответствующего показателя в интактном контроле в 30-ю минуту наблюдения были статистически значимы, но при совместном применении дипептида с дизоцилином снижение ГДА относительно интактного контроля утрачивало статистическую достоверность (таблица 2). Учитывая, что дизоцилин применяется для моделирования психопатологии, связанной с аутизмом и шизофренией (Leithead A. B., 2021), полученные данные позволяют определить возможные «мишени» фармакологического действия Pro-Leu. Результаты наших исследований указывают на взаимодействие Pro-Gly с глутаматными NMDA-рецепторами на поведенческом уровне. Механизмы действия Pro-Gly, по-видимому, не дублируют таковые у Pro-Leu. По данным научной литературы, изучение первичных взаимодействий структурно родственного фармакологического вещества «ноопепт», который является производным Pro-Gly (этиловый эфир N-фенилацетил-L-пролилглицина) более чем со 100 известными рецепторными образованиями, выполненное согласно протоколу компанией CEREP (Франция), не привело к ожидаемому выявлению первичных мишеней (Вахитова Ю. В. и другие, 2016). Неизвестно, было ли изучено CEREP взаимодействие ноопепта с глициновыми рецепторами; соответствующие данные для Pro-Gly не выявлены нами в доступной научной медицинской литературе.

Заключение. Дипептид Pro-Leu (но не Pro-Gly) способствовал усилению габитуации ГДА в условиях групповой актометрии в первом (но не повторном) сеансе измерения локомоторной двигательной активности. Существенного влияния на уровень тревожности, оцениваемый по ВДА в первые 5 минут регистрации, у тестируемых дипептидов не выявлено.

Список цитированных источников

1. Особенности когнитивных процессов у больных с различной структурой тревожных расстройств / А.А. Чепелюк [и др.] // Журнал неврологии и психиатрии. – 2018. – № 3. – С. 4–9.
2. Отдаленные последствия длительного неконтролируемого употребления анксиолитических и снотворных препаратов в пожилом возрасте: когнитивные расстройства / Н. Н. Иванец [и др.] // Журнал неврологии и психиатрии им. С.С. Корсакова. – 2015. – Т. 115, № 12. – С. 50–64.
3. Effects of oxytocin on fear memory and neuroinflammation in a rodent model of posttraumatic stress disorder / S.-Ch. Wang [et al.] // Int. J. Mol. Sci. – 2018. – V. 19, N 12. – P. 3848–3863.
4. Ophir, A. G. Navigating monogamy: nonapeptide sensitivity in a memory neural circuit may shape social behavior and mating decisions / A. G. Ophir // Front. Neurosci. – 2017. – Vol. 11. – a397.
5. Local oxytocin tempers anxiety by activating GABAA receptors in the hypothalamic paraventricular nucleus / A. S. Smith [et al.] // Psychoneuroendocrinology. – 2016. – Vol. 63. – P. 50–58.
6. Кравченко, Е. В. Регуляция ультрадианных ритмов двигательной активности олигопептидами, структурно родственными окситоцину / Е. В. Кравченко, Н. А. Бизунок, Б. В. Дубовик // Доклады Национальной академии наук Беларуси. – 2021. – Т. 65, № 2. – С. 191–198.
7. McDiarmid, T. A. Habituation is more than learning to ignore: multiple mechanisms serve to facilitate shifts in behavioral strategy / T. A. McDiarmid, A. J. Yu, C. H. Rankin // BioEssays. – 2019. – Vol. 41, N 9. – e1900077.

**The effect of Pro-Gly and Pro-Leu dipeptides
on the dynamics of exploratory and locomotor activity in group
actimetry, and modification of their effects with dizocilpine**

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

¹ *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*

The effect of the dipeptides Pro-Gly, Pro-Leu on the dynamics of exploratory and locomotor activity of submissive ICR mice under group actimetry was studied, and the modification of their effects with dizocilpine was evaluated. The dipeptide Pro-Leu (but not Pro-Gly) facilitated the process of habituation of the locomotor activity in the conditions of group actimetry in the first (but not repeated) session of measuring.

The tested dipeptides did not have a significant effect on the anxiety level of submissive ICR mice, estimated by verticalizations in the first 5 minutes of registration.

Keywords: Pro-Gly, Pro-Leu, dizocilpine, mice, actimetry.

Поступила 05.06.2024