

УДК: 615.015.1:599.323.4

## ХРОНОТРОПНЫЕ ЭФФЕКТЫ PRO-LEU В УСЛОВИЯХ 24-ЧАСОВОЙ АКТОМЕТРИИ

Кравченко Е.В.<sup>2,1</sup>, Ольгомец Л.М.<sup>1</sup>, Саванец О.Н.<sup>1</sup>, Бизунок Н.А.<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Институт биоорганической химии Национальной академии наук Беларуси,  
Минск, Республика Беларусь

<sup>2</sup>УО «Белорусский государственный медицинский университет», Минск, Республика Беларусь

**Реферат.** Изучено влияние дипептида Pro-Leu на динамику ориентировочно-исследовательской и локомоторной активности мышей ICR в условиях 24-часовой актометрии на фоне неизбежного стресса, вызванного принудительным плаванием (ПП) и на паттерны поведения в первую минуту ПП. Дипептид Pro-Leu оказывал корректорные эффекты в отношении стресс-индуцированных нарушений динамики суточной подвижности грызунов. Дипептид характеризовался отсутствием седативного действия, не снижал активности в условиях неизбежного стресса в сравнении с контролем.

**Ключевые слова:** Pro-Leu; мышцы; принудительное плавание; актометрия

**Введение.** Хроническая бессонница и нарушения сна широко распространены: эпидемиологические исследования показывают, что примерно у трети взрослого населения в различные периоды жизни отмечены инсомнии, а у 10–15 % населения нарушения сна соответствуют диагностическим критериям хронической бессонницы [1; 2]. Распространенность жалоб на низкое качество сна высока и колеблется, по одним оценкам, от 26 до 66,2 % [1], по другим – от 30 до 55 % [2]; наиболее распространены жалобы на трудности с засыпанием, легкое пробуждение из-за фрагментарности сна и частые сновидения [1]. Психологический стресс, повышенные нагрузки (длительный рабочий день), заболевания (более 120 заболеваний указываются как наиболее вероятные причины данной патологии [2]) способствуют бессоннице, короткой продолжительности сна и нарушениям пробуждения [1]. Опубликованы данные о связи между короткой и увеличенной продолжительностью сна и неблагоприятных последствиях для здоровья, увеличении смертности [1]. В частности, более высокий риск смерти обнаружен у лиц, которые спали менее 4 часов или более 8 часов в сутки [1]. Учитывая высокую распространенность нарушений сна, его низкое качество, широко распространено применение снотворных/седативных лекарственных средств (ЛС) для инициации и поддержания сна или улучшения его качества [1]. Вместе с тем длительное применение ЛС, относящихся к указанным классам, связано с увеличенным риском смертности от всех причин [1]. Мета-анализ

25 исследований, в котором приняли участие 2 350 093 пациента, показал, что у лиц, принимающих снотворные, седативные или анксиолитические средства, риск смертности на 43 % выше, чем у тех, кто ими не пользовался [1]. При ежедневном сне в 6–8 часов у лиц, не принимавших снотворные, отмечен самый низкий риск смертности [1]. У тех, кто принимал препараты вышеперечисленных классов, даже при таком оптимальном количестве сна риск смертности на 55 % ( $p < 0,001$ , 95 % ДИ 1,38–1,73) выше, чем у тех, кто их не принимал [1]. Стресс и инсомнии тесно связаны, ведут к ухудшению когнитивных функций, повышают эмоциональную реактивность и подрывают способность принимать решения.

Для коррекции бессонницы и нарушений сна применяют мелатонин, способный эффективно улучшать качество сна, особенно у пациентов старше 55 лет с первичной бессонницей и при нарушениях, связанных с циркадными ритмами [3]. В целом введение экзогенного мелатонина требуется при дефиците эндогенного гормона мелатонина. Согласно действующей «Инструкции по применению лекарственного средства МЕЛАСОН» (информация для специалистов), согласованной Министерством здравоохранения Республики Беларусь 31-10-2019 № 1299: а) поскольку мелатонин имеет гормональную природу, при длительном введении он может оказывать влияние на гормональный фон и не назначается длительными курсами; б) мелатонин может выводиться из организма у пожилых людей дольше, чем у молодых, и вызывать дневную сонливость;

в) мелатонин не следует принимать одновременно с алкоголем, а также с ингибиторами моноаминоксидазы, глюкокортикоидами, циклоспорином; г) мелатонин обладает слабым контрацептивным действием. Официальные рекомендации не включают применение мелатонина при расстройствах сна, связанных со стрессом. Использование анксиолитиков ограничено в связи с развитием побочных эффектов (развитие толерантности и зависимости, спутанность сознания по ночам и падения, негативное воздействие на когнитивные функции, включая ухудшение памяти, последствия приема с сопутствующими нарушениями способности управлять автомобилем, бессонница после отмены) [3]. Роль фитотерапии/психотерапевтических вмешательств в последние годы имеет тенденцию к снижению [3]. В связи с вышесказанным актуален поиск новых фармакологических средств для регуляции процессов сна и активного бодрствования.

циальной активностью) в условиях 24-часовой актометрии, а также оценка возможных негативных эффектов дипептида на активность грызунов неранжированной популяции в условиях «острого» неизбежного стресса (принудительное плавание – ПП).

Задачи: 1) изучить влияние дипептида Pro-Leu на подвижность стрессированных мышей ICR (отобранных по признаку отсутствия агрессивности либо «тимидности») в условиях 24-часовой актометрии; 2) исследовать возможное побочное влияние дипептида на поведение мышей-самцов ICR неранжированной популяции в условиях ПП.

**Материалы и методы.** Схема исследования приведена в табл. 1. Формировали три группы: К-1 (группа интактного контроля), К-2 (контрольная группа, грызуны получали растворитель), основная группа (ОГ) – животным применяли Pro-Leu (субстанция производства фирмы Sigma–Aldrich, США, P1130-1G, сер. номер BCCB0437, purity  $\geq 98\%$ ).

Таблица 1 – Формирование групп и схема проведения экспериментов

Группа/ образец	Введение образцов (однократно, перед ПП)	Этап эксперимента/процедура; популяция/n	
		1	2
		ПП (неранжированная популяция)	24-часовая актометрия (мыши, характеризующиеся умеренной зоосоциальной активностью)
Контроль-1 (К-1, интактный)	без введения	–	n = 5
Контроль-2 (К-2)	ДВ	n = 10	n = 8
Основная группа (ОГ)	Pro- Leu (0,5 мг/кг, в/б)	n = 10	n = 7

*Примечания.* Здесь и ниже: ПП – принудительное плавание; растворитель (дистиллированная вода – ДВ) и исследуемое соединение вводили в/б, однократно; n – число животных в группе

Индивидуально-типологические характеристики центральной нервной системы играют решающую роль в условиях действия стрессирующих факторов, когда необходимы «экстренные» изменения функционального состояния организма. У особей, отличающихся статусом в зоосоциальной иерархии, отмечаются индивидуальные особенности реакции на нейротропные вещества (Дубровина и др., 2004). Использование предварительного ранжирования грызунов обеспечивает воспроизводимость результатов, реализацию современных подходов к персонализированной медицине и фармации.

Целью данного исследования явилось изучение влияния дипептида Pro-Leu на паттерны поведения стрессированных мышей ICR (характеризующихся умеренной зоосо-

До введения образцов на протяжении пяти минут учитывали число спонтанных контактов (обнюхивание, аллогруминг, атаки, определяемые визуально согласно этологическому атласу).

Животных делили на три группы: «тимидные» (timid), избегавшие зоосоциальных взаимодействий с «интродером» или осуществлявших 1-2 контакта; с умеренной зоосоциальной активностью, совершавшие три и более контактов (однако не атаковавшие «интродера» или особей ICR из «домашней клетки»); агрессивные – осуществлявшие одну или более атак. Типизацию проводили в «естественных» для лабораторных животных условиях (в помещении вивария, при неярком электрическом освещении) в 12.00–13.00 ч.

На первом этапе моделировали неизбежный стресс посредством ПП и исследовали влияние дипептида Pro-Leu на поведенческую активность в умеренной зоосоциальной активностью тесте ПП. Использовали установку «Kinder Scientific Company LLC Forced Swim Systems, Motor Monitor» (фирма «Kinder Scientific Company LLC», США). При проведении эксперимента животное помещали на 6 мин в цилиндр с водой (25 °С); грызуны не могли выбраться из сосуда или найти опору, касаясь дна лапками или хвостом. Поведение в первую минуту в указанных условиях связывают с адаптацией к новой, незнакомой обстановке (ранее животные никогда не попадали в условия, требующие плавания). Показатели, характеризующие поведение мышей, регистрировались автоматически. В первые 60 с регистрации оценивали интенсивность активного плавания в вариантах «climbing» (с вертикальным движением передних лап в направлении стенок цилиндра) и «swimming» (мышь совершает энергичные движения всеми лапами в горизонтальной плоскости, активно перемещаясь внутри емкости; мышь переплывает в другой квадрант). Результаты выражали в условных единицах (усл. ед.). Соединения с норадренергическими механизмами избирательно улучшают поведение «climbing», а улучшение поведения «swimming» отмечено при применении веществ, влияющих преимущественно на серотонинергическую нейротрансмиссию [5].

За 20–45 мин до ПП животным контрольной группы внутрибрюшинно (в/б) вводили растворитель (здесь и далее – вода дистиллированная). Мышам основной группы в/б применяли Pro-Leu в дозе 0,5 мг/кг. В каждую экспериментальную группу включали по 10 особей. Тестирование проводили в дневные часы.

Исследуемое соединение вводили животным в объеме 0,1 мл на 10 г массы тела; растворитель назначали животным контрольной группы в том же объеме.

На втором этапе, по окончании тестирования в условиях ПП, животных обсушивали 20 мин. Мышей с умеренным уровнем зоосоциальной активности, отобранных до начала экспериментов на основании поведенческих паттернов в тесте «резиденты-интродер», помещали в актометр на 24 часа.

Освещение в боксах осуществлялось лампами подсвета Я – 100 Л -12 В ( $\lambda = 670\text{--}680$  нм, красный свет) в одном из двух режимов: отсутствие освещения (0 лк) в период 20:30–08:30, слабая освещенность ( $6,6 \pm 0,6$  лк) – в периоды 14:30–20:30 («светлый период-1») и 08.30–14.30 («светлый период-2»).

Определяли уровень локомоторной (горизонтальной) двигательной активности (ГДА, усл. ед.) и вертикальной двигательной активности грызунов (ВДА; усл. ед.). Число животных в группах, соответствующих типу «умеренная реакция на зоосоциальный стресс», составляло 5–8 особей.

Статистическую обработку цифровых показателей проводили с использованием программного обеспечения Biostat 4.03. При определении уровня статистической значимости различий в вариационных рядах использовали критерий Фридмана для зависимых выборок, с последующей обработкой результатов методом апостериорных сравнений по критерию Ньюмена–Кейлса. Анализ качественных признаков проведен с использованием точного критерия Фишера и критерия z. Данные представляли в виде  $X \pm S_x$ .

**Результаты и их обсуждение.** Результаты исследования приведены в табл. 2 и на рис. 1, 2.

Таблица 2 – Влияние Pro-Leu на активное плавание мышей-самцов ICR (неранжированная популяция) в первую минуту ПП

Показатель	Группа, доза (мг/кг; внутрибрюшинно)	
	Контроль (n = 10)	Pro-Leu 0,5 (n = 10)
<i>Swimming</i>		
Активность, усл.ед.	132,5 $\pm$ 5,3	146,1 $\pm$ 10,1
Доля (%) мышей с активностью выше 120 усл. ед. от общего числа животных в группе	80,0	90,0
<i>Climbing</i>		
Продолжительность, с	0,5 $\pm$ 0,2	0,8 $\pm$ 0,4
Доля (%) мышей, совершавших climbing, от общего числа в группе	20,0	30,0

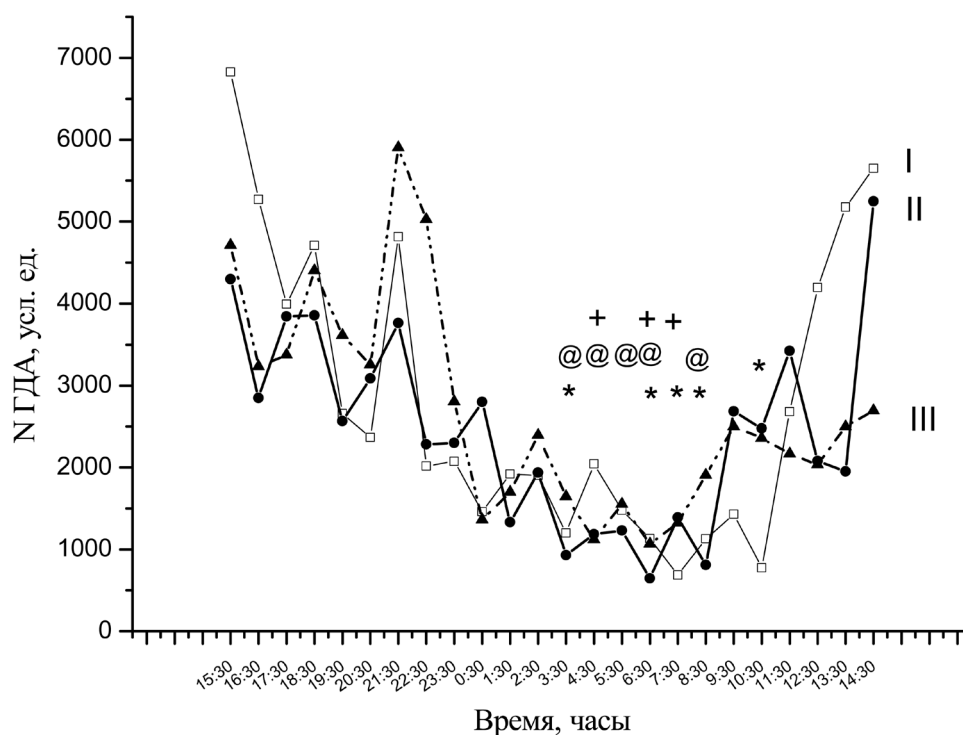


Рис. 1. Влияние Pro-Leu (0,5 мг/кг, в/б) на показатели горизонтальной двигательной активности (ГДА) мышей-самцов ICR (с умеренной зоосоциальной активностью) в условиях 24-часовой актометрии: *I* и *II* – введение растворителя, *III* – введение Pro-Leu; *I* – интактные грызуны; *II* и *III* – подвергшиеся стрессу в FST; различия статистически значимы: в сравнении с первым часом – \* – в группе *I*, @ – то же, *II*; + – то же, *III*,  $p < 0,05$ , критерий Фридмана с апостериорным анализом методом Ньюмена–Кейлса; 14-30-20:30 и 08:30-14:30 – слабое освещение красным светом; 20:30-08:30 – темнота

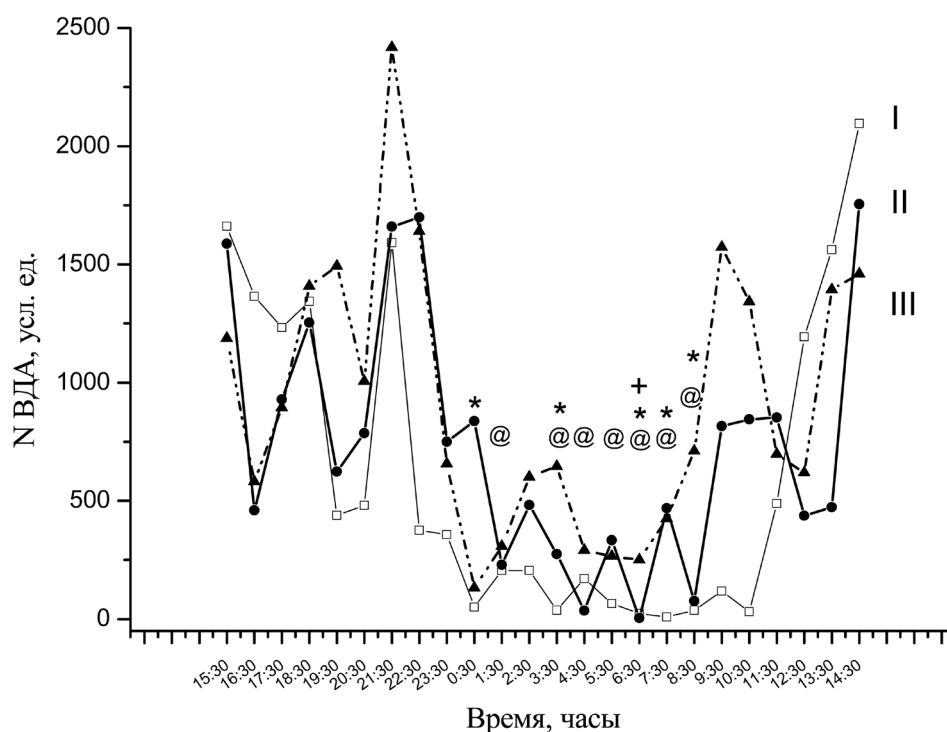


Рис. 2. Влияние Pro-Leu (0,5 мг/кг, в/б) на показатели вертикальной двигательной активности (ВДА) мышей-самцов ICR (с умеренной зоосоциальной активностью) в условиях 24-часовой актометрии

*Этап 1.* Известно, что помещение животных в новую, незнакомую обстановку провоцирует тревожно-фобическую реакцию, проявляющуюся снижением подвижности. Активация поведения в этих условиях свидетельствует об активном поиске выхода из непредвиденной ситуации. Введение грызунам основной группы дипептида в дозе 0,5 мг/кг повышало активность в условиях «острого» стресса, что проявлялось усилением плавания в вариантах «climbing» и «swimming» – на 60,0 % и 10,3 % относительно такой у особей контрольной группы – табл. 2. Данные позволяют с уверенностью утверждать, что дипептид не оказывал седативного действия, не снижал активности в условиях неизбежного стресса в сравнении с контролем.

*Этап 2.* Изменения подвижности животных в первые часы актометрии связаны с процессами адаптации в большей степени, нежели с циркадными ритмами. В группе К-1 ГДА мышей была выше, чем в группах грызунов, подвергшихся стрессу ПП («классическое» снижение двигательной активности на фоне стрессирующего воздействия, являющееся приспособительной реакцией). По истечении двух часов подвижность животных всех экспериментальных групп в целом была сопоставимой. Наступление темноты сопровождалось резким повышением ГДА. Локомоция особей группы К-2, подвергшихся стрессу, в 21:30 была ниже, чем у мышей группы К-1 (что указывало на сниженную способность к адаптации после ПП). Наиболее высокий уровень ГДА достигался у грызунов основной группы – число движений превосходило даже уровень интактного контроля, что могло объясняться анксиолитическим эффектом Pro-Leu, описанным ранее (Кравченко и соавт., 2022).

В группе К-1 отмечено статистически значимое снижение ГДА относительно исходного уровня в пяти интервалах (03:30; 06:30; 07:30; 08:30; 10:30). В целом это нехарактерно для грызунов, ведущих преимущественно ночной образ жизни и может объясняться, с одной стороны, стрессом «новизны», с другой стороны – миграцией акрофазы циркадных ритмов животных в условиях вивария. Последнее подтверждается повышением подвижности в утренние часы, что приурочено ко времени утреннего кормления в виварии. Статистически значимое снижение активности начи-

налось в 03:30 и продолжалось с перерывами до 10:30. В 14:30 (дневное время суток, при освещении слабым красным светом) уровень ГДА достигал максимума, приближаясь к исходным значениям названного показателя – рис. 1.

В группе К-2 локомоторная активность снижалась относительно исходного уровня в пяти интервалах (03:30; 04:30; 05:30; 06:30; 08:30). В «темный» период у грызунов группы К-2 отмечались пики активности в 0:30, 02:30, 05:30, 07:30, указывающие на наличие ультрадианных ритмов, маркеров стресса. Особи группы К-2 в сравнении с нестрессированными грызунами группы К-1 демонстрировали более выраженную чувствительность к смене режима темноты на слабую освещенность боксов красным светом: подъем активности отмечался в 08:30–11:30 и сохранялся на высоком уровне в конце регистрации, незначительно уступая К-1 (см. рис. 1).

Введение Pro-Leu приближало поведение мышей к уровню «нормы» для этого вида грызунов. Хронограмма в темный период носила сглаженный характер (число пиков активности не превышало такое в группе интактного контроля), уровень подвижности превосходил К-2 и даже в К-1. Статистически значимое снижение активности в ночные часы носило эпизодический характер (три интервала продолжительностью 1 час – 04:30, 06:30, 07:30). В 14:30 уровень ГДА был наиболее низким среди групп сравнения, что отражает позитивные изменения – снижение «дневной» активности естественно для грызунов – рис. 1.

24-часовая динамика ВДА мышей групп К-1, К-2 и ОГ напоминала изменения ГДА на протяжении того же отрезка времени. Вместе с тем межгрупповые различия носили еще более выраженный характер. Так, в группе К-1 статистически значимое снижение относительно исходного уровня отмечено в пяти интервалах продолжительностью 1 час (0:30; 03:30; 06:30–08:30), в группе К-2 – в 7 интервалах (01:30; 03:30–08:30), а в группе особей, которым вводили Pro-Leu – лишь в одном интервале (06:30) – различия с К-2 статистически значимы,  $p < 0,05$ , точный критерий Фишера. Доля интервалов со сниженной активностью в ночные часы составила с групп К-1, К-2 и ОГ 20,8; 29,2 и 4,2 % соответственно; различия с контролем-2 существенны,  $p = 0,05$ , критерий z. Менее выраженное в сравнении с К-1



и К-2 снижение ВДА в вечерние и ночные часы у животных основной группы отражает позитивные сдвиги в организации циркадной ритмики, поскольку в указанный период времени в условиях «нормы» подвижность возрастает в сравнении с дневной активностью. Смена уровней освещенности в 21:30 и 08:30 у мышей ОГ сопровождалась появлением резко выраженных максимумов активности. Впоследствии, в конце регистрации, ВДА грызунов основной группы ниже значений соответствующего показателя у особей обеих контрольных групп, что характеризует близость ОГ к «естественному» преобладанию покоя в дневные часы – см. рис. 2.

Индивидуальная чувствительность к действию пролинсодержащих дипептидов продемонстрирована нами ранее: Leu-Pro (0,5 мг/кг, однократно, интрагастрально) облегчал внутрисессионную габитуацию у мышей ICR, осуществлявших один-два контакта с «интродером», но тормозил процессы габитуации у особей, часто (три и более раз) вступавших в контакт с «чужаком» [4]. В условиях приподнятого крестообразного лабиринта выявлено наличие

статистически достоверного анксиолитического действия у Pro-Gly, которое статистически незначимо у мышей неранжированной популяции, однако достигало уровня статистической значимости у особей с высоким уровнем зоосоциального контактирования [6]. Результаты позволяют сделать вывод: у мышей с умеренным уровнем зоосоциальной активности (эта когорта преобладает в популяциях грызунов) Pro-Leu оказывает статистически значимое корректорное влияние на десинхронизацию, спровоцированный «острым» неизбежным стрессом.

**Заключение.** Изучено влияние дипептида Pro-Leu на динамику ориентировочно-исследовательской и локомоторной активности мышей ICR в условиях 24-часовой актометрии на фоне неизбежного стресса, вызванного принудительным плаванием (ПП) и на паттерны поведения в первую минуту ПП. Дипептид Pro-Leu оказывал корректорные эффекты в отношении стресс-индуцированных нарушений динамики суточной подвижности грызунов. Дипептид не оказывал седативного действия, не снижал активности в условиях неизбежного стресса в сравнении с контролем.

### Список цитированных источников

1. Association of sleep duration and sleeping pill use with mortality and life expectancy: A cohort study of 484,916 adults / Y. Sun, M.K. Tsai, C.P. Wen. // *Sleep Health*. – 2023. – Vol. 9, No 3. – P. 354–362.
2. Жунусова, Г.С. Синдром диссомнии / Г.С. Жунусова // *Вестник КазНМУ*. – 2016. – № 4. – P. 139–142.
3. The European Insomnia Guideline: An update on the diagnosis and treatment of insomnia 2023 [Electronic resource] / D. Riemann [et al.] // *J. Sleep Res.* – 2023. – V. 32, No 6. – Art. 14035. – Mode of access: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/38016484>. – Date of access: 02.06.2025.
4. Особенности «острого» угашения исследовательско-ориентировочной активности у мышей с различным зоосоциальным поведением и влияние лейцил-пролина гидрохлорида / Е. В. Кравченко, В. М. Насек, И. В. Жебракова // *Новости мед. – биол. наук*. – 2019. – Т. 19, № 2. – С. 24–28.
5. Carr, G.V. Chapter 4.2. The Role of Serotonin in Depression / G. V. Carr, I. Lucki // *Handbook of Behavioral Neuroscience*. Editor(s): Ch. P. Müller, B. L. Jacobs. 1st ed. – Elsevier. – 2010. – V. 21. – P. 493505.
6. Влияние пролил-глицина и лейцил-пролина гидрохлорида на уровень тревожности лабораторных мышей / Е. В. Кравченко, И.В. Жебракова, В.М. Насек и [др.] // *Новости мед. – биол. наук*. – 2020. – Т. 20. – № 3. – С. 85–90.

### CHRONOTROPIC EFFECTS OF PRO-LEU IN CONDITIONS OF 24-HOUR ACTIMETRY

Kravchenko E.V.<sup>2,1</sup>, Savanets O.N.<sup>1</sup>, Olgomets L.M.<sup>1</sup>, Bizunok N.A.<sup>2</sup>

<sup>1</sup>*Institute of Bioorganic Chemistry of the National Academy of Sciences of Belarus, Minsk, Republic of Belarus*

<sup>2</sup>*Belarusian State Medical University, Minsk, Republic of Belarus*

The effect of the Pro-Leu dipeptide on the dynamics of exploratory and locomotor activity of ICR mice under 24-hour actimetry conditions against the background of persistent stress caused by forced swimming (FS) and on behavior patterns in the first minute of FS was studied. Dipeptide Pro-Leu had corrective effects against stress-induced disturbances in the dynamics of daily mobility of rodents. The dipeptide did not have a sedative effect, did not reduce activity under conditions of persistent stress in comparison with the control.

**Keywords:** Pro-Leu; mice; forced swimming; actimetry