

УДК: 615.015.1:599.323.4

ВЛИЯНИЕ ТРИПЕПТИДА 745-В-40 НА ПОВЕДЕНЧЕСКИЕ ПАТТЕРНЫ КРЫС WISTAR, ПОДВЕРГШИХСЯ ДПФС

Степанова Е.В.^{1,2}, Кравченко Е.В.², Ольгомец Л.М.²,
Саванец О.Н.², Каранкевич Е.Г.³, Куваева З.И.³, Найденов В.Э.³,
Бизунок Н.А.¹, Дубовик Б.В.¹

¹Белорусский государственный медицинский университет, Минск, Республика Беларусь

²Институт биоорганической химии Национальной академии наук Беларуси,
Минск, Республика Беларусь

³Институт физико-органической химии Национальной академии наук Беларуси,
Минск, Республика Беларусь

Предметом исследования явилась оценка влияния трипептида 745-В-40, в структуру которого входят остатки пролина, лейцина и глицина, на поведенческие паттерны крыс Wistar, подвергшихся депривации парадоксальной фазы сна. Исследования проводили на фоне депривации парадоксальной фазы сна. В опыты включали половозрелых крыс-самцов Wistar.

В тесте экстраполяционного избавления показано, что соединение 745-В-40 способствовало эффективно-му принятию решения в условиях стрессующей ситуации на фоне ДПФС. Эффект проявлялся в статистически значимом уменьшении латентного периода подныривания под край цилиндра; кроме того трипептид препятствовал вызванному ДПФС увеличению числа неэффективных попыток избавления.

Ключевые слова: депривация сна; крысы; крысы Wistar; трипептид.

Введение. Расстройства сна являются од-ними из наиболее распространенных экстра-кардиальных симптомов у пациентов с арте-риальной гипертензией. При этом клинически и эпидемиологически подтверждено, что ин-сомния, редуцированная продолжительность сна и обструктивное апноэ сна представляют собой независимые и значимые факторы ри-ска развития артериальной гипертензии.

В нормофизиологических условиях сон сопровождается снижением системного арте-риального давления, как правило, на 20–30 мм ртутного столба, что отражает координи-рованное торможение симпатической ак-тивности и усиление парасимпатических влияний [1].

Церебральная ренин-ангиотензиновая си-стема (РАС), и, в частности, ангиотензин II с его специфическими рецепторами первого типа (AT1R), признана одним из ключевых медиаторов центральной регуляции артериаль-ного давления и симпатического возбужде-ния [2]. Современные данные свидетельствуют о том, что ангиотензин II потенцирует симпа-тические эфферентные потоки через стимуля-цию AT1R на глутаматергических нейронах, активируя прессорные пути и усиливая вазо-констрикторные эффекты.

Ангиотензин-І-превращающий фермент (АПФ; также известный как пептидилдипеп-тидгидролаза) представляет собой металлоп-ротезу, функциональная активность которой зависит от наличия ионов цинка и хлорида. Данный фермент катализирует превращение неактивного ангиотензина І в биологически активный ангиотензин II, обладающий выра-женными сосудосуживающими свойствами, посредством отщепления С-концевого ди-пептида от исходного декапептида. АПФ осу-ществляет и инактивацию брадикинина – вазоактивного пептида, обладающего гипотен-зивным эффектом.

Согласно данным литературы, большин-ство биоактивных пептидов, ингибирующих АПФ, короткие олигопептиды, состоящие из 2–12 аминокислотных остатков [3]. Ингибито-рами АПФ с умеренной эффективностью явля-ются пептиды, имеющие пролин в С-концевой позиции, для них характерны значения IC₅₀ в диапазоне 0,7–82 мкМ: LGP (0,72), LKP (0,32), LRP (1,0), GPP (6,25), GPPP (0,86), VYAP (6,1), VAP (5,34), VPP (9,13), IPP (5,15), VWP (4,5) [3].

Ввиду своей способности модулировать ренин-ангиотензиновую систему, указанные соединения представляют значительный ин-терес в контексте разработки функциональ-

ных пищевых продуктов и возможного использования этих природных антигипертензивных агентов в качестве потенциальных лекарственных соединений, способствующих терапии АГ [4].

В настоящее время широкое распространение получили иАПФ на основе пролина (каптоприл), пролин-содержащих дипептидов (лизиноприл, эналаприл) и их синтетических аналогов.

Несмотря на эффективность, препараты обладают рядом нежелательных эффектов, таких как кашель, нарушение вкуса, нарушения функции почек и ангионевротический отек [3].

Отмечено, что каптоприл (который содержит только один остаток АК – пролин) по эффективности уступает иАПФ на основе дипептидов. Так IC_{50} в отношении АПФ у дипептидов в разы превышает данный показатель у трипептидных соединений: так, IC_{50} (мкМ) Gly-Pro равен 252.63, Pro-Leu 337.2, а у трипептидов Pro-Gly-Leu достигало и было равно 13.93, Gly-Leu-Pro 1.62.

Известно, что применение иАПФ снижает когнитивные нарушения, индуцированные недостатком сна, посредством регуляции синаптической пластичности, что ведет к улучшению функций обучения и запоминания. По данным ограниченных клинических исследований почти у половины лиц с артериальной гипертензией диагностированы расстройства сна (48,3 % – апноэ, 20,3 % – ночное обструктивное апноэ; 27,9 % – нарушения циркадного ритма, 7,6 % – др.).

Также результаты исследований свидетельствуют, что терапия ингибиторами АПФ (OR 0.26 (0,06–0,95; $p = 0,04$) способствовала улучшению сна.

Учитывая что трипептид, структурно родственный Pro-Leu-Gly, для которого IC_{50} (мМ) найден равным 4,74, ранее не был изучен *in vivo* в условиях экспериментальной инсомнии, целесообразно провести экспериментальные доклинические исследования в условиях модельной депривации сна на крысах по методике Jouvet.

Материалы и методы. Эксперименты выполнены на 52 половозрелых аутбредных крысах-самцах Wistar, массой 180–380 г.

Крыс содержали в стандартных условиях вивария, по 4–5 особей в клетке. Корм и воду грызуны получали без ограничений. На время экспериментов животных переносили в лабо-

раторное помещение с постоянной температурой 21–21,5 °С. Опыты проводили в осенний и зимние периоды года.

Формировали три экспериментальные группы животных: 1) контрольная 1 (К-1; $n = 36$) – вводили растворитель интраназально (и/н), 2) контрольная 2 (К-2; $n = 8$) – растворитель интраназально +ДПФС, 3) опытная группа (ОГ; $n = 8$) – 745-В-40 интраназально в дозе 10 мкг/кг. Растворитель и 745-В-40 вводили 5-кратно в утренние часы. Трипептид 745-В-40 синтезирован в Институте физико-органической химии НАН Беларуси.

Депривацию парадоксальной фазы сна (ДПФС) проводили по методике Жуве (Jouvet) в бассейне с водой. В бассейн на площадке диаметром 6–6,5 см, выступающие на 2 см над уровнем воды ($t = 25$ °С), высаживали экспериментальных животных. Во время бодрствования, дремоты и медленноволнового сна напряжение мускулатуры позволяет крысе удержаться на площадке, при наступлении парадоксальной фазы сна мышцы расслабляются и животное падает в воду. В условиях этой модели в результате иммобилизации, изоляции, падений в воду и охлаждения у животных возникает сильный стресс.

Характер поведенческих изменений зависит от длительности депривации парадоксальной фазы сна. Показано, что 24-часовая депривация не вызывает заметных изменений в поведении животных. Семидневная депривация парадоксальной фазы сна вызывает стабильное нарушение структуры сна и существенные поведенческие нарушения, которые выражаются в растормаживании эмоционально-мотивационного поведения, усилении агрессивности, нарушении памяти.

В эксперименте была использована 72-часовая модель ДПФС. При 72-часовом варианте животных дважды в сутки снимают с площадок в бассейне для кормления на короткий период (15–20 мин), не давая им спать в это время.

Во время кормления определяли массу потребляемого корма и проводили анализ динамики массы тела животного.

По истечении 72 часов крыс снимали с площадок, установленных для моделирования ДПФС в 9:00 утра и вводили образцы. Вплоть до начала тестирования (12:30) препятствовали засыпанию грызунов. Адаптивное

поведение крыс исследовали в тесте экстраполяционного извлечения (ТЭИ). Тест экстраполяционного извлечения общепринят в том числе и для изучения влияния антигипертензивного средства на психоэмоциональное состояние и когнитивную функцию. Установка для ТЭИ состоит из бассейна, заполненного водой. В центр на глубину 1–1,5 см погружают вертикально цилиндр. Крысу помещают в цилиндр хвостом вниз. Задача животного в том, чтобы поднырнуть под нижний край цилиндра и выбраться на сетчатый трап. На протяжении 120 с регистрировали значения показателей, характеризующих когнитивные функции: латентный период первой попытки извлечения (ЛП₁), число безуспешных (стереотипных) попыток извлечения (N), время подныривания под край цилиндра (Т_{подн.}), время выхода на сетчатый трап (Т_{вых.}), число животных, решивших задачу извлечения.

Оценивали способность препятствовать нарушению когнитивных функций, вызываемых ДПФС. Соответствующую активность оценивали по формуле (1) с использованием коэффициента $K_{\text{когн.}}$ по формуле:

$$K_{\text{когн.}} = \frac{\text{ЛатП}_{\text{оп}} - \text{ЛатП}_{\text{К-2}}}{\text{ЛатП}_{\text{К-1}} - \text{ЛатП}_{\text{К-2}}} \times 100\%, \quad (1)$$

где $K_{\text{когн.}}$ – коэффициент, рассчитанный с учетом ЛатП подныривания/выхода на сетку и отражающий способность к решению задачи экстраполяционного извлечения, %; ЛатП_{оп} – среднее значение латентного периода подныривания под край цилиндра/выхода на сетку в основной группе, с; ЛатП_{К-2} – то же для контрольной группы К-2, с; ЛатП_{К-1} – то же для контрольной группы К-1, с.

Чем сильнее соединение усиливает когнитивные функции, тем выше $K_{\text{когн.}}$.

Отрицательные значения $K_{\text{когн.}}$ указывают на ухудшение когнитивных функций.

На стереотипные попытки извлечения по формуле (2) рассчитывали коэффициент $K_{\text{когн.}}$:

$$K_{\text{когн.}} = \frac{N_{\text{попыт.оп}} - N_{\text{попыт.К-2}}}{N_{\text{попыт.К-1}} - N_{\text{попыт.К-2}}} \times 100\%, \quad (2)$$

где K_s – коэффициент, рассчитанный с учетом числа стереотипных попыток избегания, реализуемых в форме прыжков, и отражающий изменения уровня стереотипной активности, %;

ЛП_{оп} – среднее значение числа стереотипных попыток избегания, реализуемых в форме прыжков, в основной группе; ЛП_{К-2} – то же для контрольной группы К-2; ЛП_{К-1} – то же для контрольной группы К-1.

Чем выше $K_{\text{когн.}}$, тем сильнее снижается стереотипная активность под действием трипептида.

Также с целью оценки возможного метаболического механизма действия трипептида 745-В-40 проанализированы показатели массы тела подопытных животных до и после ДПФС.

Результаты и обсуждение. Известно, что депривация сна оказывает разностороннее влияние на когнитивные функции и процессы памяти, зависящее от его интенсивности, продолжительности и контекстуальных факторов. Кратковременное воздействие стрессоров умеренной силы индуцирует острое активационное состояние симпатической нервной системы, сопровождающееся повышенной глюкозной метаболической активностью в мозге и активацией механизмов консолидации памяти.

В то же время чрезмерно выраженное либо хроническое стрессовое воздействие приводит к системной дезадаптации, обусловленной устойчиво повышенной концентрацией циркулирующих глюкокортикоидов, которые модулируют нейрофизиологические процессы в структурах, критически вовлеченных в когнитивную регуляцию — гиппокампе, миндалевидном теле и префронтальной коре.

Применение 745-В-40 в дозе 10 мкг/кг и/н препятствовал проявлениям дезадаптивных реакций, вызванных депривацией сна

Так, доля животных, сумевших поднырнуть под край цилиндра за первые 30 с в К-1 составила 75,0 %, а под влиянием ДПФС этот же параметр в группе К-2 снизился 3 раза, а введение трипептида предотвращало статистически значимое снижение способности к подныриванию: число способных к решению задачи подныривания животных увеличилось вдвое в сравнении с К-2, и лишь на 255 уступали К-1 (табл. 1).

Данные, приведенные в табл. 1, показали, что трипептид способствовал более быстрому принятию «правильного» решения в условиях стрессирующей ситуации. ЛП подныривания снижался относительно К-2 у крыс группы ОГ на 16,5 %. $K_{\text{когн.}}$ составил 23,0 % (табл. 1). В отношении показателя «выход на сетку» статистически значимых облегчающих эф-

Таблица 1 – Влияние 745-В-40 на поведение крыс в тесте экстраполяционного извлечения

Группа, вещество, доза	Условия эксперимента	Подныривание				Выход на сетку	
		ЛП _{подн} , с	Число поднырнувших животных, абсол. %			Т выхода на сетку, с	Число вышедших на сетку животных
К-1, Р и/н	Стандартные сон без ограничения; ежедневно: введение Р, и/н, взвешивание, двукратное кормление	20,4 ± 13,7	0–30 с 27/36 75,0	0–60 с 35/36 97,0	0–120 с 336/36 1100,0 1	54,3 ± 15,5	36/36
К-2, Р и/н	72-часовая ДПФС; ежедневно: введение Р, и/н, взвешивание двукратное кормление	71,6 ± 30,8	2/8 ¹ 25,0	2/8 ¹ 25,0	6/8 75,0	78,75 ± 30,8	6/8
ОГ, 745-В-40, 10 мкг/кг и/н	72-часовая ДПФС; ежедневно: введение Р, и/н, взвешивание, двукратное кормление	59,8 ± 37,6	4/8 ¹ 50,0	4/8 ¹ 50,0	7/8 87,5	60,5 ± 28,7	6/8

¹ Различия с К-1 статистически значимы, $p < 0.05$, критерий Z.

² Различия с К-1 статистически значимы, $p < 0.05$, точный критерий Фишера.

эффектов 745-В-40 не выявлено (табл. 1). Рассчитанное значение по формуле (1) для ЛП на сетку составило 45,8 %. Показатель «ЛП выхода на сетку» в контрольной группе превышал ЛП подныривания, что указывало на длительный поиск животным соответствующего решения, и указанный показатель существенно не был нарушен вследствие ДПФС.

В отношении показателя «выход на сетку» статистически значимых облегчающих эффектов 745-В-40 не выявлено (табл. 1). Рассчитанное значение по формуле (1) для ЛП на сетку составило 45,8 %. Показатель «ЛП выхода на сетку» в контрольной группе превышал ЛП подныривания, что указывало на длительный поиск животным соответствующий

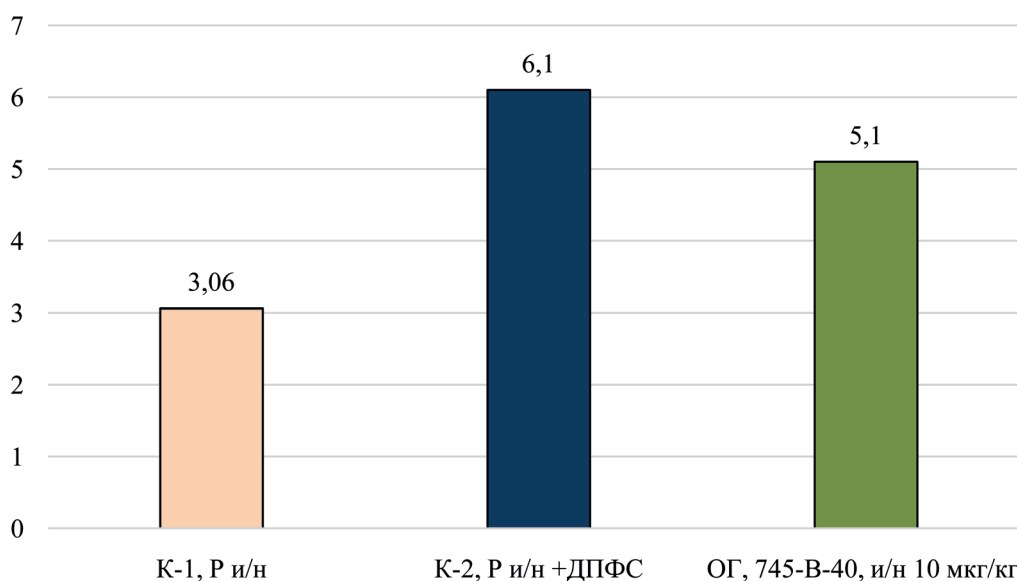


Рис. 1. Число неэффективных попыток извлечения у крыс в тесте экстраполяционного извлечения

Таблица 2 – Влияние трипептида 745-B-40 (10 мкг/кг, и/н, 5-кратно) на массу тела у крыс Wistar, подвергшихся ДПФС

Среднее значение потери массы, гр		
К-1, Р и/н	К-2, Р и/н + ДПФС	ОГ, 745-B-40, 10 мкг/кг и/н +ДПФС
35,7 ± 6,2	47,2 ± 6,4 ¹	45,7 ± 10,2

¹ Различия К-1 статистически значимы, $p < 0,05$, критерий Z.

шего решения, и указанный показатель существенно не был нарушен вследствие ДПФС.

Возрастание числа неэффективных попыток связано с активацией дофаминергической нейротрансмиссии (Бондаренко). Так, в тесте экстраполяционного избавления в группе К-2 происходило статистически значимое увеличение числа неэффективных попыток избавления в сравнении с К-2 ($p < 0,05$, критерий Крускала-Уоллиса). В ОГ не было статистически значимых различий с К-1, что свидетельствует о корректорном влиянии трипептида на данный показатель. Число неэффективных попыток в ОГ снижалось в сравнении с К-2. $K_{\text{когн.}}$ составил 33,0 %.

Известно, что депривация сна приводит к гиперсекреции кортизола и активации стресс-реакций, что приводит к нарушению сигнальных путей обмена лептина и грелина, ответственных за контроль аппетита и пищевого поведения. Так, в условиях ДПФС в К-2 происходила статистически значимая большая потеря массы тела ($p < 0,05$, критерий Z) в сравнении с К-1 ($47,2 \pm 6,4$ и $35,7 \pm 6,2$ соответственно). Применение 745-B-40 в дозе 10 мкг/кг и/н оказывало корректирующее действия на механизмы стресс-реакций, что приводило к меньшей потере массы тела, чем в К-2 ($45,7 \pm 10,2$ и $47,2 \pm 6,4$ соответственно).

Также отсутствовали статистически значимые различия в потере массы тела у животных ОГ и К-1.

Известно, что депривация сна приводит к гиперсекреции кортизола и активации стресс-реакций, что приводит к нарушению сигнальных путей обмена лептина и грелина, ответственных за контроль аппетита и пищевого поведения. Так, в условиях ДПФС в К-2 происходила статистически значимая большая потеря массы тела ($p < 0,05$, критерий Z) в сравнении с К-1 ($47,2 \pm 6,4$ и $35,7 \pm 6,2$ соответственно). Применение 745-B-40 в дозе 10 мкг/кг и/н оказывало корректирующее действия на механизмы стресс-реакций, что приводило к меньшей потере массы тела, чем в К-2 ($45,7 \pm 10,2$ и $47,2 \pm 6,4$ соответственно). Также отсутствовали статистически значимые различия в потере массы тела у животных ОГ и К-1.

Заключение. У аутбредных крыс-самцов Wistar применение трипептида 745-B-40 в дозе 10 мкг/кг и/н устраняло астенические и дезадаптивные явления, вызванные депривацией парадоксальной фазы сна, что проявлялось в улучшении показателей теста экстраполяционного избавления, а также в статистически значимой меньшей потере массы тела животного.

Список цитированных источников

1. Alexander, W. Hypertension: Is it time to replace drugs with nutrition and nutraceuticals / Alexander, W // *Phar. Ther.* – 2014 – 39(4). – P. 291–295.
2. Бондаренко, Н.А. Избирательное влияние нейролептиков на дофаминзависимое нарушение поведения крыс в тесте экстраполяционного избавления / Н.А. Бондаренко // *Бюл. экспериментал. биол. и медицины.* – 1990. – № 11. – С. 506–508
3. Ling-feng L., Sleep deprivation reduces the baroreflex sensitivity through elevated angiotensin (Ang) II subtype 1 receptor expression in the nucleus tractus solitarii/ L-f. Liu, Y-w. Wang, J-c. Sun // *Frontiers in Neuroscience* – 2024. – Vol. 18. – P. 23–25.
4. Manoharan, S. Structural characteristics and antihypertensive effects of angiotensin-I-converting enzyme inhibitory peptides in the renin-angiotensin and kallikrein kinin systems / S. Manoharan, N. Abdullah // *African J. of Traditional, Complementary and Alternative Medicines* – 2017. – Vol. 14. – P. 383–406.

EFFECT OF TRIPEPTIDE 745-V-40
ON BEHAVIORAL PATTERNS OF WISTAR RATS SUBJECTED TO DPFS

E.V. Stepanova^{1,2}, E.V. Kravchenko², L.M. Olgomets², O.N. Savanets²,
E.G. Karankevich³, Z.I. Kuvaeva³, V.E. Naidenov³,
N.A. Bizunok¹, B.V. Dubovik¹

¹*Belarusian State Medical University, Minsk, Republic of Belarus*

²*Institute of Bioorganic Chemistry, National Academy of Sciences of Belarus, Minsk, Republic of Belarus*

³*Institute of Physico-Organic Chemistry, National Academy of Sciences of Belarus, Minsk, Republic of Belarus*

The subject of the study was to evaluate the effect of tripeptide 745-B-40, the structure of which includes proline, leucine and glycine residues, on the behavioral patterns of Wistar rats subjected to deprivation of the paradoxical sleep phase. The studies were conducted against the background of deprivation of the paradoxical phase of sleep. Sexually mature male Wistar rats were included in the experiments.

In the extrapolative escape test it was shown that compound 745-B-40 promoted effective decision making in the conditions of stressful situation on the background of DPFS. This effect was manifested by a statistically significant decrease in the latency period of diving under the edge of the cylinder; in addition, the tripeptide prevented the DPFS-induced increase in the number of ineffective escape attempts.

Keywords: rats; sleep deprivation; tripeptide; Wistar rats