

УДК 615.015.1:616.8-001.5

*О.Н. САВАНЕЦ, Е.В. КРАВЧЕНКО*

## PRO-GLY МОДИФИЦИРУЕТ РИТМЫ ЛОКОМОТОРНОЙ АКТИВНОСТИ КРЫС WISTAR, ПОДВЕРГШИХСЯ НЕИЗБЕЖАЕМОМУ СТРЕССУ

*Институт биоорганической химии НАН Беларуси, Минск, Беларусь*

У крыс линии Wistar с пассивным фенотипом реакции на стресс, подвергшихся принудительному плаванию (ПП), Pro-Gly (0,5 мг/кг, и/г) приближал параметры ритма горизонтальной двигательной активности к таковым у животных без ПП: нивелировал 12-часовые ритмы, противодействовал миграции акрофазы 24-часовых ритмов вправо; в «светлый» период на фоне «новизны» обстановки элиминировал 24-минутные ритмы, облегчал процессы габитуации, нарушенные стрессом.

*Ключевые слова:* Pro-Gly, стресс, циркадианный ритм, ультрадианный ритм, крысы

**Введение.** Известно, что нарушения ритмической организации физиологических функций развиваются на фоне неврозов, стрессовых реакций [3]. Нонапептид окситоцин (ОТ) характеризуется нейротрансмиттерной, модуляторной и регуляторной активностью в отношении центральной нервной системы, обладает хронотропным действием [11], что обуславливает изучение производных указанного нейрогомона в качестве перспективных соединений с соответствующей активностью. В недавних исследованиях выявлено, что синтетические дипептиды, структурно родственные С-концевому фрагменту ОТ, в частности, пролинсодержащие дипептиды Pro-Gly и Pro-Leu, модулируют короткопериодные биоритмы горизонтальной двигательной активности (ГДА) мышей в условиях слабого стресса «новизны» [5]. Pro-Leu корригирует нарушения циркадианных ритмов подвижности, вызванных хроническим инъекционным стрессом, у крыс SHR [4]. Вместе с тем, хронотропное влияние соединения Pro-Gly в отношении циркадианных ритмов активности, в условиях умеренного стресса не изучено.

Немаловажной проблемой остается изучение и анализ индивидуальной вариабельности действия Pro-Gly. Известно, что животные разных линий характеризуются неодинаковой организацией хронобиологических процессов [4]. Описаны индивидуальные различия «ответа» аутбредных крыс-самцов на хронофармакологическое действие антидепрессантов (амитриптилин, имипрамин) [1], анксиолитиков (тофизопам) [3], а также – резерпина [1], кофеина [2], мелатонина [3].

Цель работы – изучение влияния дипептида Pro-Gly на циркадианные и ультрадианные ритмы локомоторной активности аутбредных крыс-самцов Wistar (животных с пассивным фенотипом реакции на стресс и особой не ранжированной популяции), подвергшихся неизбежному стрессу.

**Материалы и методы.** Исследования проводили с использованием 23 половозрелых крыс-самцов Wistar с массой тела 250 – 350 г, полученных в секторе биоиспытаний Института биоорганической химии НАН Беларуси.

По данным литературы, между степенью синхронизированности колебательных процессов и чувствительностью к стрессированию существует прямая зависимость [2, 3]. Среди крыс неранжированной популяции выявляли животных, характеризовавшихся отсутствием активных перемещений (freezing-реакция либо отсутствие локомоции или вертикальных стоек) в ответ на стрессирующее воздействие – акустический стимул (100-110 дБ; уровень звукового давления определяли с использованием аппарата RadioShack, China). Спустя 15 мин животные подвергались неизбежному стрессу в условиях «принудительного плавания» (ПП) [10]. Грызунов помещали двукратно на 16 мин в цилиндрический бассейн (диаметр сосуда – 30 см, высота – 66 см), наполненный водой. Уровень воды в бассейне составлял 38 см, температура – 25 °С [10]. Интервал между сеансами 1 и 2 составлял 24 ч. По окончании сеанса 2 животных обсушивали, обогревали и после 20 мин перерыва поодиночке помещали в боксы актометра «Универсал 22–32» (РБ).

Животные, не подвергавшиеся «инъекционному» стрессу и ПП, вошли в группу КГ-1А (n=7). Особям контрольной группы КГ-2А (n=10) за 15 мин до начала сеанса 2 ПП вводили растворитель (дистиллированная вода) интраназально, а крысам основной группы ОГ (n=6) – дипептид Pro-Gly (Sigma-Aldrich, США) в дозе 0,5 мг/кг интрагастрально (и/г). В процессе ранжирования среди 23 крыс

Wistar выявлено 19 особей с пассивным фенотипом поведенческой реакции на интенсивное акустическое воздействие: таких грызунов из числа крыс группы КГ-1А отнесли к группе КГ-1Б (n=5), из группы КГ-2А – к группе КГ-2Б (n=8). У всех животных ОГ (n=6) был выявлен пассивный тип поведения.

Исследования осуществлялись в осенний период года (сентябрь-ноябрь) в режиме «день»/«ночь»: «день» – с 16:45 до 20:40 и с 08:40 до 10.45 (для стрессированных крыс); с 17:15 до 20:40 и с 08:40 до 11:15 (для особей, не подвергшихся ПП); «ночь» – с 20:40 до 08:40; средняя освещенность на дне боксов составила 14.8±1.8 лк.

Оценку ультрадианных ритмов проводили в условиях искусственного освещения (с 16:45 до 18:45 у крыс после ПП и с 17:15 до 19:15 – у грызунов без ПП) и в период полной темноты (20.45-22.45). Эксперименты выполнены в соответствии с Хельсинкской Декларацией о гуманном обращении с животными.

Регистрировали уровень ГДА грызунов; полученные данные выражали в усл. ед., соответствующих числу пересечений инфракрасных лучей в горизонтальной плоскости. Посредством компьютерной программы методом косинор-анализа определяли амплитуду ритма (A) и акрофазу (φ), как описано ранее [4]. При обработке результатов методом Cosinor-анализа в расчёты не включали данные за первый час (для циркадианных ритмов) и за первую мин регистрации (для ультрадианных ритмов), поскольку в указанный период изменения ГДА связаны преимущественно не с колебательным процессом, а с реакцией на «новизну» обстановки. Кроме того, определяли уровень активности животных в центральной зоне (ЦЗ; доля от суммарной горизонтальной и вертикальной активности, %). Обработку результатов осуществляли с помощью программного обеспечения Cosinor 2.5, CorelDRAW, Biostat 4.03, Origin 6.1.

**Результаты и их обсуждение. Циркадианные биоритмы.** У животных групп КГ-1А и КГ-1Б, не подвергшихся ПП, отмечена типичная для ночных животных хронограмма с акрофазой ритма, приходившейся на вечернее время суток (табл. 1). Имел место подъём активности в вечерний период (18:21 и 18:39) и в утренние часы (начало «светлого» периода) (рис.1).

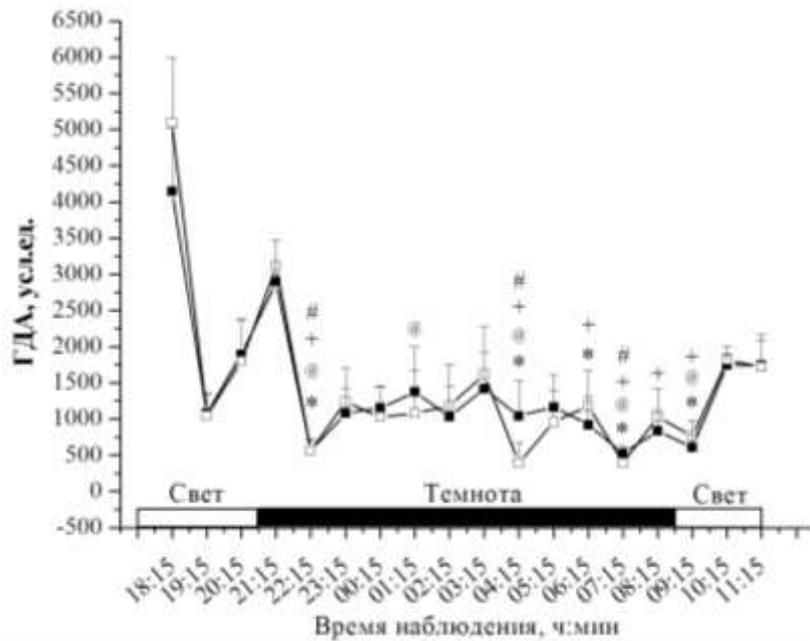
У крыс неранжированной популяции (КГ-1А) отмечался чётко выраженный высокоамплитудный ритм с превалирующей в спектрограмме 24-часовой составляющей (p<0,05); у грызунов группы КГ-1Б отсутствовали значимые ритмы 24-часовой гармоник (табл. 1). Акрофаза у особей обеих сопоставляемых групп приходилась на начало 2 часа актометрии (табл. 1).

**Табл. 1.** Параметры 24- и 12-часовых ритмов ГДА крыс Wistar, не подвергавшихся ПП

Группа/число животных	Ритмы ГДА					
	24 ч			12 ч		
	А, усл.ед.	φ, ч:мин	p	А, усл.ед.	φ, ч:мин	p
КГ-1А (N=7)	428,9	18:21	p<0,05	195,0	00:03	-
КГ-1Б (N=5)	517,1	18:39	-	302,3	23:27	-

Примечание: здесь и далее КГ-1А – грызуны неранжированной популяции; КГ-1Б – особи с пассивным типом реагирования на стресс; ГДА – горизонтальная двигательная активность; ПП – принудительное плавание

Статистически значимое снижение активности в сравнении с периодом наиболее высокого уровня локомоции (1 час регистрации) отмечалось в КГ-1А в 5, 11, 13, 14, 16 час, для КГ-1Б – в 5, 8, 11, 14, 16 час; со значениями в 4 час наблюдения – для КГ-1А в 5, 11, 13, 14, 15, 16 час, для КГ-1Б – в 5, 11, 14 час (рис. 1). Таким образом, для животных КГ-1А и КГ-1Б по истечении 10 часов с начала актометрии в условиях снижения стрессогенности обстановки с периодичностью 2-3 часа (рис. 1) отмечались пики активности. По данным [3], 2-4 часовые ритмы были отмечены у интактных крыс и расцениваются как компоненты «нормального» ритма.



**Рис. 1.** Динамика ГДА крыс Wistar, не подвергавшихся ПП. —■— — неранжированная популяция – КГ-1А; —□— — особи с пассивным фенотипом поведения КГ-1Б; различия статистически значимы: \* – в сравнении с 1 часом для КГ-1А; @ – то же для КГ-1Б; + – в сравнении с 4 часом для КГ-1А, # – то же для КГ-1Б:  $p < 0,05$ , критерий Фридмана с последующей обработкой данных по критерию Даннета

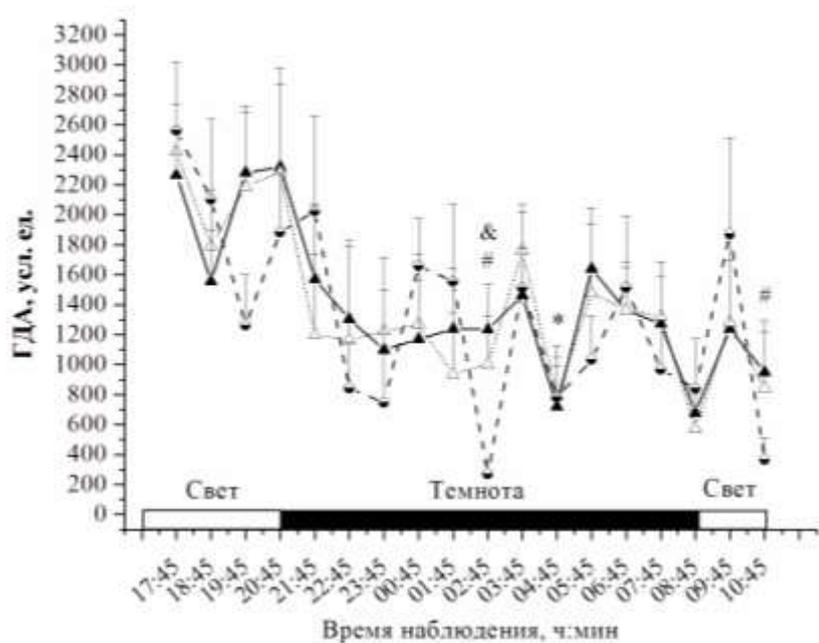
Известно, что «инъекционный» стресс отражается на циркадианном ритме локомоции крыс и его динамике, вызывая снижение ночной активности и миграцию акрофазы вправо [2]. ПП индуцировало сдвиг акрофазы у грызунов вправо на 1 час и более в сравнении с крысами без ПП: значения  $\phi$  были равны 19:27 в группе КГ-2А и 19:09 – у особей КГ-2Б (табл. 1 и 2); Pro-Gly способствовал менее выраженному сдвигу акрофазы вправо (18:51) (табл. 2). Неизбегаемый стресс «вытеснял» 24-часовые и вызывал формирование статистически значимых «патологических» [2] ультрадианных 12-часовых ритмов ГДА в группах КГ-2А и КГ-2Б ( $p < 0,05$ ); биоритмы указанной гармоникой отсутствовали у нестрессированных грызунов (табл. 1) и у крыс, получавших Pro-Gly (табл. 2).

**Табл. 2.** Влияние Pro-Gly (0,5 мг/кг, и/г) на параметры 24- и 12-часовых ритмов ГДА крыс Wistar, подвергшихся ПП

Группа/число животных	Ритмы ГДА					
	24 ч			12 ч		
	А, усл.ед.	$\phi$ , ч:мин	$p$	А, усл.ед.	$\phi$ , ч:мин	$p$
КГ-2А (N=10)	372,2	19:27	-	237,6	20:27	$p < 0,05$
КГ-2Б (N=8)	368,1	19:09	-	273,0	19:57	$p < 0,05$
ОГ (N=6)	351,8	18:51	-	221,5	20:57	-

Примечания: здесь и далее КГ-2А – особи неранжированной популяции; КГ-2Б и ОГ (Pro-Gly) – грызуны с пассивным фенотипом поведения

У особей КГ-2Б на всём протяжении актометрии не было выявлено статистически значимых различий локомоции в сравнении с 1 и 4 часом, а у животных всех групп, подвергшихся неизбежному плаванию, – различий с 4 часом регистрации (рис. 2). Таким образом, стресс индуцировал не только нарушения 24-часовой ритмики (табл. 2), но и элиминацию «физиологических» 2-3 часовых волн, хорошо представленных у крыс без ПП (рис. 1). Наличие на хронограмме крыс ОГ двух периодов со статистически значимым снижением локомоции и отсутствие соответствующих «минимумов» активности в КГ-2Б может говорить о приближении биоритмов к условной «норме» под действием Pro-Gly (рис. 2).



**Рис. 2.** Динамика ГДА крыс Wistar, подвергшихся ПП; —▲— — неранжированная популяция КГ-2А; ···△··· — особи с пассивным фенотипом поведения - КГ-2Б; —●— — Pro-Gly, 0,5 мг/кг — ОГ; различия статистически значимы: \* — в сравнении с 1 часом для КГ-2А; # — то же для ОГ:  $p < 0,05$ , критерий Фридмана с последующей обработкой данных по критерию Даннета; & — для ОГ в сравнении с КГ-2А,  $p < 0,05$ , критерий Крускала-Уоллиса

*Ультрадианные биоритмы.* В условиях искусственного освещения статистически достоверные 24-минутные ритмы локомоторной активности наблюдались в группах КГ-1А, КГ-1Б, КГ-2А и КГ-2Б (табл. 3). Pro-Gly нивелировал достоверные ритмы 24-минутной гармоник (табл. 3), что может быть расценено как проявление антистрессорного действия дипептида в начальном периоде пребывания в боксе (обстановка «новизны») (табл. 3). Снижением стрессогенности обстановки можно объяснить отсутствие статистически достоверных 24-минутных ритмов в КГ-1А и КГ-1Б в условиях темноты (предпочтительной для грызунов) в более отдаленные сроки эксперимента (с 4 по 6 часы актометрии), когда ситуация представлялась животному менее опасной. Это подтверждает предположение об ускорении Pro-Gly процесса адаптации к «новизне» (табл. 3).

В «темный» период у животных группы КГ-2А, в отличие от крыс, не подвергшихся ПП, отмечены «патологические» ритмы 6-минутной гармоник, что указывает на десинхронизационные явления (высокая представленность высокочастотных колебаний) [2]; у крыс КГ-2Б и ОГ отмечены биоритмы 24-минутной гармоник, сопоставимые с ритмикой грызунов в незнакомой ситуации в «светлый» период (табл. 3).

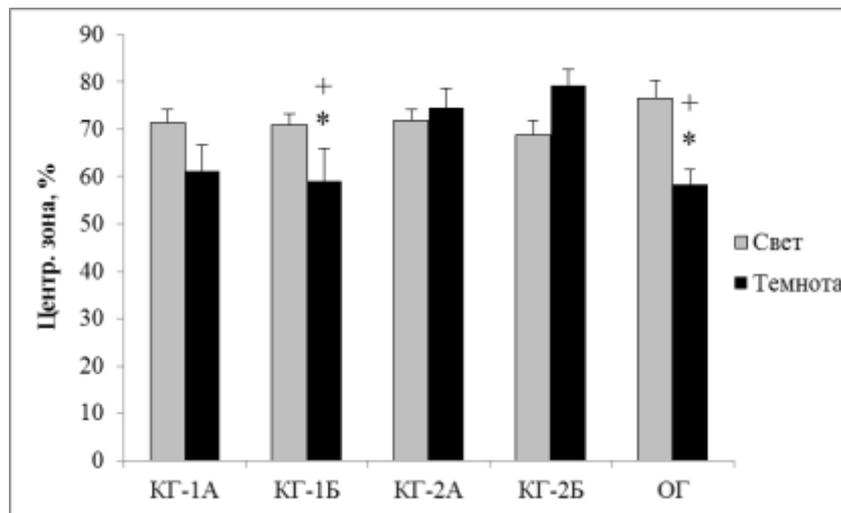
Согласно данным литературы, по мере стабилизации ритма в условиях стресса, связанного с изоляцией [3], и в условиях «инъекционного» стресса [2], амплитуда ритма локомоторной активности крыс снижалась. В наших экспериментах в условиях искусственного освещения следствием ПП явилось снижение А 24-минутной гармоник как в КГ-2А в сравнении с КГ-1А, так и в КГ-2Б в сравнении с КГ-1Б (в 1,7 раза в обеих группах,  $p < 0,05$ ); применение Pro-Gly сопровождалось повышением А ритмов 6-, 12-, но не 24-минутной гармоник ( $p > 0,05$ ). В «темный» период у крыс групп КГ-2А и КГ-2Б, подвергшихся ПП, показатели амплитуды снижались относительно таковых у особей КГ-1А и КГ-1Б для 24- и 6-минутной гармоник; введение Pro-Gly способствовало повышению относительно уровня КГ-2Б А всех исследуемых гармоник, в том числе амплитуды 24-минутной гармоник — в 1,7 раза ( $p < 0,05$ ), приближая значения соответствующего показателя к уровню «нормы» (табл. 3).

**Табл. 3.** Влияние однократного введения Pro-Gly (0,5 мг/кг, и/г) на параметры ГДА ультрадианных ритмов крыс Wistar

Группа/число животных	Режим освещения	Ультрадианные ритмы ГДА					
		24 мин		12 мин		6 мин	
		А, усл.ед.	<i>p</i>	А, усл.ед.	<i>p</i>	А, усл.ед.	<i>p</i>
КГ-1А (N=7)	искусственное освещение – «светлый» период	49,3	<i>p</i> <0,05	19,9	-	20,2	-
КГ-1Б (N=5)		58,6	<i>p</i> <0,05	17,5	-	19,9	-
КГ-2А (N=10)		28,8	<i>p</i> <0,05	9,4	-	3,3	-
КГ-2Б (N=8)		33,8	<i>p</i> <0,05	5,1	-	4,0	-
ОГ (N=6)		13,2	-	9,7	-	12,0	-
КГ-1А (N=7)	отсутствие искусственного освещения – «тёмный» период	15,3	-	4,1	-	8,1	-
КГ-1Б (N=5)		21,5	-	1,8	-	9,6	-
КГ-2А (N=10)		11,0	-	4,9	-	3,3	<i>p</i> <0,05
КГ-2Б (N=8)		10,0	<i>p</i> <0,05	3,9	-	1,8	-
ОГ (N=6)		16,8	<i>p</i> <0,05	10,3	-	4,7	-

Снижение времени пребывания в ЦЗ при повторном помещении в бокс актометра расценивается как процесс неассоциативного обучения (габитуация) [8]. Так, габитуация в ЦЗ была хорошо выражена у мышей С3Н и отсутствовала у мутантов С3Sn.Cg-Cm /J (модель синдрома дефицита внимания/гиперактивности) [8]. По мере привыкания к боксу актометра подвижность в ЦЗ у животных группы КГ-1Б (но не КГ-1А) статистически значимо снижалась (на 16,8% от исходного уровня, *p*<0,05) (рис.3), что указывает на хорошо выраженные процессы неассоциативного обучения у крыс с пассивным типом реагирования на стресс в отсутствие негативных воздействий.

Активность в ЦЗ у стрессированных грызунов по прошествии 4 часов повышалась на 3,9 % – в КГ-2А, на 15,1 % – в КГ-2Б (*p*>0,05). Pro-Gly стимулировал процесс неассоциативного обучения у крыс, подвергшихся ПП: уровень подвижности в ЦЗ статистически достоверно снижался относительно исходных значений, существенно отличался от такового в группе КГ-2Б и был сопоставим с габитуацией у особи соответствующего фенотипа без ПП (группа КГ-1Б) (рис.3).



**Рис. 3.** Двигательная активность в центральной зоне (доля от суммарной двигательной активности) крыс-самцов Wistar на протяжении первых 10 мин «светлого» и «темного» периодов: \* – *p*<0,05, статистически значимые изменения в сравнении с показателями в «светлый» период, критерий Уилкоксона; + – *p*<0,05, статистически значимое снижение в сравнении с показателями в группе КГ-2Б в «темный» период

Увеличение доли активности в ЦЗ в первые минуты экспозиции указывает на снижение уровня тревожности [7]. Некоторое увеличение подвижности в ЦЗ под действием Pro-Gly в «светлый» период относительно таковой в других экспериментальных группах (рис. 3) хорошо согласуется с данными о наличии у дипептида статистически значимого анксиолитического влияния на поведение

высокотревожных мышей в тесте «приподнятого крестообразного лабиринта» [6]. Известно, что стресс оказывает повреждающее действие на процессы памяти [9]. Нормализующее действие Pro-Gly на неассоциативное обучение на фоне стресса является несомненным преимуществом дипептида перед бензодиазепиновыми анксиолитиками, нарушающими мнестические функции.

**Заключение.** Pro-Gly (0,5 мг/кг, и/г), вводимый крысам Wistar с пассивным фенотипом реакции на стресс, подвергшихся принудительному плаванию (ПП), способствовал приближению параметров ритма к таковым у животных без ПП: нивелировал «патологические» 12-часовые ритмы ГДА, противодействовал миграции акрофазы 24-часовых ритмов вправо. В «светлый» период на фоне «новизны» обстановки Pro-Gly элиминировал 24-минутные ритмы ГДА.

**Благодарности.** Авторы выражают благодарность научному сотруднику Ольгомец Л.М. и заведующей виварием Крупской З.И. за содействие в проведении экспериментов.

### Литература:

- [1]. Арушанян Э.Б., Батурин В.А. Изменение циркадного ритма двигательной активности у «депрессивных» крыс под влиянием трициклических антидепрессантов // Фармакол. и токсикол. 1988. Т. 51, № 3. С. 5–8.
- [2]. Арушанян Э.Б., Попов А.В. Особенности временной организации поведенческого ответа на кофеин // Эксп. и клин. фармакология. 2005. Т. 68, № 1. С. 10–12.
- [3]. Арушанян Э.Б., Попов А.В. Тофизопам и мелатонин ослабляют перестройку ритма суточной подвижности крыс при инъекционном стрессе // Эксп. и клин. фармакология. 2006. Т. 69, №2. С. 14–17.
- [4]. Кравченко Е.В., Ольгомец Л.М. Влияние изменений состояния нейромедиаторных и пептидергических систем мозга на циркадные ритмы и поведение крыс // Ж. высш. нервн. деят. им. И. П. Павлова. 2012. Т. 62, № 4. С. 453–464.
- [5]. Кравченко Е.В., Бизунок Н.А., Дубовик Б.В. Регуляция ультрадианных ритмов двигательной активности олигопептидами, структурно родственными окситоцину // Докл. Нац. акад. наук Беларуси. 2021. Т.65, № 2. С. 191–198.
- [6]. Кравченко Е.В., Жебракова И.В., Насек В.М. и др. Влияние пролил-глицина и лейцил-пролина гидрохлорида на уровень тревожности лабораторных мышей // Новости мед.-биол. наук. 2020. Т. 20, № 3. С. 84–90.
- [7]. Avgustinovich D.F., Lipina T., Bondar N. et al. Features of the Genetically Defined Anxiety in Mice// Behav. Genetics. 2000. Vol. 30, № 2. P. 101–109.
- [8]. Gunn R.K., Keenan M.-E., Brown R.E. Analysis of sensory, motor and cognitive functions of the coloboma (C3Sn.Cg- Cm /J) mutant mouse Genes, Brain and Behav. 2011. Vol. 10. P. 579–588.
- [9]. Luethi M., Meier B., Sandi, C. Stress effects on working memory, explicit memory, and implicit memory for neutral and emotional stimuli in healthy men // Front. Behav. Neurosci. 2009. Vol. 2, № 5. P. 1–9.
- [10]. Neumann I.D., Landgraf R. Balance of brain oxytocin and vasopressin: implications for anxiety, depression, and social behaviors // Trends in neurosc. 2012. Vol. 35, № 11. P. 649–659.
- [11]. Zhang G., Cai D. Circadian intervention of obesity development via resting-stage feeding manipulation or oxytocin treatment // Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab. 2011. Vol. 301, № 5. P. 1004–1012.

O.N. SAVANETS, E.V. KRAVCHENKO

## PRO-GLY MODIFIES THE RHYTHMS OF LOCOMOTOR ACTIVITY IN WISTAR RATS IN THE CONDITIONS OF INESCAPABLE STRESS

*Institute of Bioorganic Chemistry of the National Academy of Sciences of Belarus, Minsk, Belarus*

### Summary

In Wistar rats with a passive stress response phenotype subjected to forced swimming (FS) Pro-Gly (0.5 mg/kg, i/g) contributed to the approximation of rhythm parameters to those in animals without FS: leveled the "pathological" 12-hour rhythms of HMA, counteracted the migration of acrophase of 24-hour rhythms to the right. In the "bright" period, in the novelty situation, Pro-Gly eliminated 24-minute HMA rhythms. Pro-Gly facilitated habituation disrupted by stress.

**Key words:** Pro-Gly, stress, circadian rhythm, ultradian rhythm, rats