

ВЛИЯНИЕ ЦИКЛО-ПРОЛИЛ-АЛАНИНА НА ФИЗИЧЕСКУЮ АКТИВНОСТЬ И КОГНИТИВНЫЕ СПОСОБНОСТИ МЛЕКОПИТАЮЩИХ ПРИ ПЕРОРАЛЬНОМ ПРИЕМЕ

Колобов А.А.¹, Александров Г.В.², Захаров М.С.², Колобов А.А.(ст)¹

¹ ООО «Научно-производственная фирма Верта», РФ 197110, Санкт-Петербург,
Левашовский пр., дом 12, литера А, пом. 1Н, офис 307

indolicidin@mail.ru

² ФГУП «Государственный научно-исследовательский институт особо чистых
биопрепаратов» ФМБА России, РФ 197110 Санкт-Петербург, ул. Пудожская, д. 7

Резюме:

Цикло-пролил-аланин (ЦПА) – природный циклический дипептид (2,5-дикетопиперазин), входящий в состав многих богатых белком пищевых продуктов: мяса, рыбы, сыров, какао, дрожжей и др. Он, как и другие дикетопиперазины, устойчив к действию ферментов ЖКТ и активно абсорбируется в кишечнике. Человек получает в день с пищей в зависимости от особенностей рациона от сотен мкг до миллиграммов ЦПА. В данной работе было изучено его влияние на физическую активность и когнитивные способности млекопитающих при пероральном приеме.

В проведенных экспериментах ЦПА продемонстрировал ноотропную, актопротекторную и мнемоторную активности. Введение ЦПА ускорило время обучения крыс в тесте неассоциативного обучения «открытое поле», увеличило время плавания мышей и крыс в тесте плавания с нагрузкой, увеличило сохранность памятного следа у здоровых крыс и крыс с ишемией головного мозга в тесте сохранности условного рефлекса пассивного избегания (УРПИ). Эффективность ЦПА по ряду параметров значительно превосходила эффективность препарата сравнения «Ноопепт».

Таким образом, ЦПА проявил высокую биологическую активность при пероральном введении в концентрациях, сопоставимых с присутствующими в пище. Учитывая стимулирующий эффект ЦПА, его прием, вероятно, позволит увеличить работоспособность человека или поддерживать ее на нормальном уровне в условиях повышенных нагрузок или недостатка природного ЦПА в пище.

Ключевые слова: пептид; циклический пептид; дикетопиперазин; ноотроп

**INFLUENCE OF ORAL ADMINISTRATION OF CYCLO-PROLYL-ALANINE ON
PHYSICAL ACTIVITY AND COGNITIVE ABILITIES IN MAMMALS**

Kolobov A.A.¹, Aleksandrov G.V.², Zakharov M.S.², Kolobov A.A.¹

¹ Verta LLC, Russian Federation 197110, St. Petersburg, Levashovsky pr., 12, letter A, room 1H,
office 307

² FSUE "State Research Institute of Highly Pure Biopreparations" FMBA of Russia, Russian
Federation 197110 St. Petersburg, Pudozhskaya st., 7

Summary:

Cyclo-prolyl-alanine (CPA) is a natural cyclic dipeptide (2,5-diketopiperazine), widely occurring in many protein-rich foods, including meat, fish, cheese, cocoa, yeast, and many more. Like other diketopiperazines, it is resistant to gastrointestinal enzymes and is absorbed in the intestine. Humans consume up to several milligrams of CPA daily based on their diet. This work describes the effect of CPA on physical activity and cognitive abilities of mammals after oral administration.

CPA demonstrated nootropic, actoprotective, and mnemotropic activities. The introduction of CPA accelerated the learning time of rats in the 'open field' non-associative learning test, increased the swimming time of mice and rats in the exercised swimming test, increased the preservation of the memory trace in healthy rats and rats with cerebral ischemia in the test for passive avoidance conditioning (PAC) preservation. CPA was more efficient than a competitive drug No'opept by some parameters.

Thus, CPA showed high biological activity after oral administration at concentrations comparable to occurring in food. Given the stimulating effect of CPA, its intake is likely to increase a person's performance or maintain it at the normal level under stress or a lack of natural CPA in food.

Keywords: peptide; cyclic peptide; diketopiperazine; nootropic

Введение

Для современного человека характерно низкое потребление высококачественного животного белка и ферментированных продуктов и, как следствие, содержащихся в таких продуктах биологически-активных веществ. Их недостаток в рационе может вносить ощутимый вклад в развитие снижения работоспособности и когнитивного дефицита.

Одной из групп таких веществ являются циклические дипептиды, в частности 2,5-дикетопиперазины (2,5-ДКП, 2,5-diketopiperazines, 2,5-DKP). Первым биологически активным циклическим дипептидом, обнаруженным в организме человека в 1965 году, был циклогистидил-пролин [1]. Сейчас описаны уже сотни циклических дипептидов, многие из которых способны стимулировать когнитивные способности [2].

Важным представителем этой группы соединений, часто встречающимся в обычных продуктах питания, является цикло-пролил-аланин (ЦПА, cPA, cAP). Содержание ЦПА в пищевых продуктах по литературным данным составляет:

- 228,2 мг/кг в жареном какао [3]
- 31,5 мг/кг в дрожжевом экстракте [4]
- 11,3 мг/кг в тушеной говядине [5]
- 4 мг/кг в сушено-ферментированном тунце кацуобуси [6]
- 1,13 мг/кг в сыре камамбер, причем его содержание увеличивается по мере созревания сыров [7]
- 0,11 мг/л в чае пуэр [8]
- 0,081 мг/л в чае гойши [9]
- Обнаружены, но количественно не определялись в кофе [10], пиве [11], куриной эссенции [12] и в ряде других природных источников

В целом, ЦПА, как и прочие циклические дипептиды, в наибольших количествах содержится в богатых белками пищевых продуктах, прошедших ферментацию или тепловую обработку [13]. Механизм образования циклических дипептидов, в том числе ЦПА, при приготовлении пищи подробно описан [14].

Таким образом, сбалансированно питающийся человек в день потребляет примерно 4-6 мг ЦПА. При недостатке богатых белком и ферментированных продуктов в рационе его количество, очевидно, меньше. Дикетопиперазины способны всасываться в кишечнике [15], поэтому могут проявлять свой биологический эффект при приеме с пищей.

Известно, что ЦПА обладает нейропротекторными свойствами [16]. Соответственно, при недостатке в рационе стимулирующее влияние ЦПА на когнитивные функции организма отсутствует. Мы предположили, что его недостаток в рационе приводит к снижению адаптивных

способностей организма, неустойчивости к стрессам, повышению утомляемости. Тем не менее, до настоящего момента биологическая активность ЦПА при пероральном применении не была исследована.

Цель исследования

Исследовать влияние цикло-пролил-аланина на работоспособность и когнитивные способности млекопитающих при пероральном приеме.

Материалы и методы

Получение цикло(пролил-аланина) (ЦПА). ЦПА получали методом классического пептидного синтеза по Вос-технологии из Вос-L-Pro-OH и гидрохлорида H-L-Ala-OMe. Полученный продукт очищали перекристаллизацией до чистоты >97%, чистоту определяли с помощью аналитической ОФ-ВЭЖХ, идентичность устанавливали с помощью МС-анализа. MW 169 Da, CAS 65556-33-4.

Животные. Исследование проводили на белых беспородных крысах самцах (питомник «Рапполово», Санкт-Петербург, Россия) массой 200-220 грамм, возраст 9-10 недель, белых беспородных мышах самцах (питомник «Рапполово», Санкт-Петербург, Россия) массой 19–21 г, возраст 9–10 недель. В эксперименты включали только здоровых животных, в т.ч. в контрольные группы. В каждой группе было не менее 10 животных. Животных каждого вида содержали отдельно в одной из комнат барьерного типа, в условиях обычного вивария при смешанном освещении, они получали гранулированный корм и питьевую воду *ad libitum*. Животные находились по 5 особей в пластиковых клетках (3W Fengshi, Китай) на подстилке из мелкой древесной стружки.

Все процедуры по обращению с животными выполнялись в соответствии с Европейской конвенцией по защите позвоночных животных (Страсбург, 1986), правилами лабораторной практики (GLP), Приказом МЗ СР РФ № 708н от 23 августа 2010 г. «Правила лабораторной практики», ГОСТ 33215-2014 «Руководство по содержанию и уходу за лабораторными животными. Правила оборудования помещений и организации процедур», ГОСТ 33216-2014 «Руководство по содержанию и уходу за лабораторными животными. Правила содержания и ухода за лабораторными грызунами и кроликами».

Тест «открытое поле». Использовалась круглая пластиковая арена с бортами по периметру, диаметр 100 см. Пол арены приподнят и разделен на 19 квадратов с отверстиями для регистрации двигательной и исследовательской активности. Над ареной размещен источник света. Характер и количество движений животного отмечает регистратор. Регистрировали 6 компонентов поведения в течение 5-и минут наблюдения: латентный период выхода, вертикальную и горизонтальную активность, количество заглядываний в норки, груминг и акты дефекации. Тестирование проводили до начала эксперимента, а также на 7, 14 и 21 сутки.

Для того, чтобы нивелировать случайные различия в исходных значениях между разными экспериментальными группами, связанные с индивидуальными особенностями животных, рассчитывали интенсивность угасания двигательной активности (величину Δ) относительно исходных (фоновых) значений. Величину Δ вычисляли как разность между исходным значением показателя и его значением в каждый последующий день исследования для каждой группы животных.

В данном эксперименте ЦПА вводили крысам внутрижелудочно ежедневно в течение 20 дней в дозах 50 мкг/кг и 200 мкг/кг в день. В качестве препарата сравнения ежедневно, в течение 20 дней внутрижелудочно вводили препарат «Ноопепт» (этиловый эфир N-фенилацетил-L-пролилглицина, CAS 157115-85-0, ОАО «Фармстандарт-Лексредства», Россия) в дозе 5 мг/кг в день. Контрольные животные получали физиологический раствор по аналогичным схемам в эквивалентных объемах. В день первого введения препаратов животных на 5 минут помещали в арену открытого поля и фиксировали параметры двигательной активности для получения исходных значений. Далее на 7, 14 и 21 сутки эксперимента животных вновь помещали в открытое поле и вновь регистрировали те же параметры двигательной активности.

Плавание с дополнительной нагрузкой. Использовали прозрачные цилиндры для плавания, высотой 100 см для крыс и 25 см для мышей, и свинцовые грузы разной массы. Температура воды в цилиндрах +28-30 °С. Первое плавание животных проводили с целью рандомизации животных по устойчивости к физической нагрузке. Плавание осуществлялось с грузом (свинцовый груз на резиновом кольце, прикрепляемый к корню хвоста), равным 10% от веса тела тестируемого животного. Животные плавали с грузом до утомления, о котором свидетельствует погружение на дно цилиндра. В этот момент животное быстро извлекали из воды и в течение минуты обсушивают сухим полотенцем. Животные, длительность плавания которых при рандомизации отклонялось от среднего времени плавания более чем на 35% в большую или меньшую сторону, исключали из эксперимента. После определения фонового значения продолжительности плавания животным вводили внутрижелудочно в дозе 200 мкг/кг в день крысам и 6 мг/кг в день мышам в течение 7 дней, и исследование повторяли.

Условный рефлекс пассивного избегания (УРПИ). Использовали аппаратно-программный комплекс Шелтер (Нейроботикс, Россия). Эксперимент осуществляли в 3 этапа: отбор животных, проводящих в светлой камере не более 40 из 120 секунд наблюдения, выработка УРПИ, оценка сохранности приобретенного УРПИ на фоне введения ЦПА. Для оценки сохранности УРПИ животное помещали в светлый отсек камеры и в течение 180 секунд регистрировали поведение животного. Если животное не заходило в темный отсек, его считали обученным; если заходило – не обученным или забывшим факт электроболевого раздражения. Сохранность УРПИ

определяли через 11 дней после выработки, на следующий день после последнего введения изучаемых препаратов. Для каждой экспериментальной группы фиксировали количество обученных и необученных животных. Интактные животные получали внутрижелудочно ЦПА в дозах 10 мкг/кг, 100 мкг/кг и 1000 мкг/кг или препарат «Ноопепт» в дозе 5 мг/кг через 5 часов после выработки УРПИ и далее на протяжении 9 дней (всего 10 введений). Животным контрольной группы вводили физиологический раствор.

При оценке воздействия препарата на когнитивные функции в УРПИ на фоне билатеральной окклюзии общих сонных артерий у животных формировали УРПИ, и в тот же день проводили операцию по перевязке сонных артерий под общим наркозом. ЦПА вводили внутрижелудочно через 4 часа после оперативного вмешательства и далее ежедневно в течение 5 дней в дозе 6 мг/кг. Животным контрольной группы по той же схеме вводили физиологический раствор. В исследование также была добавлена ложнооперированная группа, у которой под общим наркозом препарировали сонные артерии без наложения лигатур. Сохранность УРПИ определяли через 24 часа, 48 часов и 5 суток после операции.

Модель ишемии головного мозга при окклюзии сонных артерий. Острую церебральную ишемию моделировали путем полной необратимой одномоментной билатеральной окклюзии общих сонных артерий крыс под медикаментозным наркозом (пропофол, 15 мг/кг). Для перевязки сонных артерий наркотизированной крысе рассекали кожу, клетчатку, поверхностную и собственную фасции шеи, затем тупым методом освобождали доступ к артериям. Лигатуры накладывали ниже бифуркации общей сонной артерии. Убедившись в отсутствии кровотечения, рану ушивали.

Статистический анализ. Количественные результаты представлены в таблицах в виде средних значений $\pm$ ошибка среднего ($\text{mean} \pm \text{SEM}$). Группы сравнивали между собой с помощью непарного t-критерия Стьюдента с неравными отклонениями. Номинальные данные (обученность в тесте УРПИ) представлены в виде доли обученных животных. Группы сравнивали между собой с помощью критерия хи-квадрат Пирсона. В обоих случаях отличия считали достоверными при $p < 0,05$. Статистический анализ проводили с помощью программы Prism 8 (Graphpad, США).

Результаты и обсуждение

Ноотропную активность ЦПА исследовали в модели неассоциативного обучения на белых беспородных крысах. Исследуемое вещество и препарат сравнения (ЦПА и «Ноопепт») вводили в течение 20 дней, анализ поведенческой активности животных проводили на 7, 14 и 21 сутки после первого попадания крысы в арену открытого поля (Таблица 1).

Все животные, повторно помещенные в арену открытого поля, демонстрировали снижение горизонтальной и вертикальной двигательной активности на 7, 14 и 21 сутки по сравнению с исходными значениями. Животные, лучше запомнившие арену открытого поля, демонстрировали меньшую исследовательскую активность, у животных с худшей памятью двигательная активность снижалась медленнее. При этом расчет интенсивностей угасания горизонтальной и вертикальной активности (величин Δ) показал последовательное нарастание данных величин во всех экспериментальных группах. Это говорит о формировании памятного следа и угасании исследовательско-ориентировочной реакции у всех экспериментальных животных.

Сравнение результатов исследования в контрольной группе и группах, получавших ЦПА, показало, что:

- Интенсивность угасания (Δ) горизонтальной активности в группах получавших ЦПА в дозах 50 и 200 мкг/кг, была достоверно повышена по сравнению с контрольной группой, которой вводили физиологический раствор на 7, 10 и 14 сутки эксперимента.
- Δ вертикальной активности, была достоверно повышена только в группе, получавшей ЦПА в дозе 200 мкг/кг, на 7, 10 и 14 сутки, по сравнению с контрольной группой.
- Сравнение результатов исследования в контрольной группе и группе, получавшей препарат «Ноопепт», показало, что введение «Ноопепт» в дозе 5 мг/кг достоверно увеличивало только Δ вертикальной активности и только на 14 и 21 сутки эксперимента.
- Значительных отличий в количестве заглядываний, груминге и количестве болюсов среди всех экспериментальных групп обнаружено не было.

Таким образом, ЦПА значительно снижает интенсивность горизонтальной и вертикальной активности экспериментальных животных. Увеличение дозы препарата приводит к расширению типов поведения, на которые препарат оказывает эффект. Это говорит о том, что ЦПА оказывает выраженное ноотропное действие в модели неассоциативного обучения крыс, превосходящее по скорости наступления действие препарата «Ноопепт».

Таблица 1

Влияние ЦПА на структуру поведения крыс в открытом поле (mean±SEM, %)

Показатели	Экспериментальная группа и пол							
	Физ. раствор	Физ. раствор, Δ от исходного	ЦПА 50 мкг/кг	ЦПА 50 мкг/кг, Δ от исходного	ЦПА 200 мкг/кг	ЦПА 200 мкг/кг, Δ от исходного	Препарат «Ноопепт», 5 мг/кг	Препарат «Ноопепт», 5 мг/кг, Δ от исходного
Исходные значения								
Латентный период, с	0	—	0	—	0	—	0	—
Горизонтальная активность	49,0±4,2	—	71,7±7,6	—	61,7±8,1	—	50,8±5,8	—
Вертикальная активность	14,9±3,5	—	15,3±3,9	—	21,2±3,1	—	14,7±2,0	—
Заглядывания	3,1±0,7	—	4,3±1,3	—	3,6±0,8	—	4,3±1,6	—
Груминг	5,4±1,1	—	5,8±1,3	—	4,3±0,6	—	4,3±1,1	—
Болюсы	2,8±0,3	—	2,6±0,5	—	2,1±0,5	—	2,7±0,5	—
7-й день								
Латентный период, с	0	—	0	—	0	—	0	—
Горизонтальная активность	30,4±4,2* 62%	18,6	34,0±7,2* 47,4%	37,7#	25,2±5,9* 40,8%	36,5#	19,9±5,4* 39,2%	30,9
Вертикальная активность	7,7±1,6*	7,2	10,4±3,8	4,9	5,1±1,4*	16,1#	3,5±1,0*#	11,2
Заглядывания	1,3±0,5	—	1,1±0,5	—	0,5±0,5	—	0,5±0,3	—

Груминг	4,6±1,0	—	2,8±1,0	—	3,8±0,8	—	3,5±0,7	—
Болюсы	1,9±0,3	—	2,5±0,6	—	1,5±0,5	—	1,5±0,7	—
14-й день								
Латентный период, с	0	—	0	—	0	—	0	—
Горизонтальная активность	22,9±5,0* 46,7%	26,1	22,4±5,7* 31,2%	49,3#	10,2±5,6*# 16,5%	51,2#	7,1±1,5*# 14%	43,7#
Вертикальная активность	5,3±1,8*	9,6	7,3±2,6	8,0	1,9±0,7*	19,3#	2,9±1,4*	11,8
Заглядывания	1,1±0,3	—	0,6±0,4	—	0,4±0,3	—	0,2±0,2	—
Груминг	4,0±1,0	—	2,0±0,6	—	1,6±0,7	—	1,1±0,7	—
Болюсы	1,8±0,5	—	2,1±0,3	—	2,0±0,4	—	1,6±0,4	—
21-й день								
Латентный период, с	0	—	0	—	0	—	1,0±1,0	—
Горизонтальная активность	20,2±4,9* 41%	28,8	25,1±5,8* 35%	46,6#	15,4±4,9* 24,9%	46,3#	6,9±2,1*# 13,6%	43,9#
Вертикальная активность	4,6±1,7*	10,3	5,2±1,6*	10,1	2,2±0,7*	19,0#	1,2±0,6*	13,5
Заглядывания	1,5±0,7	—	1,3±0,3	—	0,4±0,3	—	0	—
Груминг	1,9±0,7	—	1,9±0,7	—	1,1±0,5	—	0,9±0,5	—
Болюсы	1,8±0,4	—	1,9±0,3	—	2,4±0,5	—	1,6±0,4	—

* – Достоверные отличия от исходных значений, t-тест Стьюдента, $p < 0,05$, # – Достоверные отличия от значений в контрольной группе, получавшей физиологический раствор, t-тест Стьюдента, $p < 0,05$.

Влияние ЦПА на физическую работоспособность животных исследовали в тесте плавания с дополнительной нагрузкой на белых беспородных крысах и белых беспородных мышах. ЦПА животным вводили внутривенно в дозе 200 мкг/кг в день крысам и 6 мг/кг в день мышам в течение 7 дней, контрольные животные по аналогичной схеме получали физиологический раствор. Продолжительность плавания определяли до начала введения ЦПА и после завершения курса. Животные, получавшие ЦПА, продемонстрировали достоверно большую продолжительность плавания как по сравнению со своими исходными показателями, так и по сравнению с контрольной группой животных, получавшей физиологический раствор (Таблица 2). Таким образом, ЦПА обладает выраженной актопротекторной активностью.

Таблица 2

**Время плавания животных в тесте плавания с нагрузкой при введении ЦПА
(mean±SEM, %)**

	Контроль, сек.	ЦПА, сек.
Крысы		
Исходно	187,3±15,1	186,0±14,7
Через 7 дней	209,4±16,8	268,3±28,9 ^{^*}
Мыши		
Исходно	216,1±17,0	216,1±12,8
Через 7 дней	354,0±42,1 [^]	574,4±83,4 ^{^*}

* – достоверные различия по сравнению с контрольной группой, t-тест Стьюдента, $p < 0,05$; [^] – достоверные различия по сравнению с исходными значениями, t-тест Стьюдента, $p < 0,05$.

Влияние ЦПА на когнитивные функции крыс исследовали в модели условного рефлекса пассивного избегания (УРПИ) на интактных животных и на фоне билатеральной окклюзии общих сонных артерий, которая приводит к ишемии головного мозга. Животные контрольной группы, получавшие физиологический раствор, сохраняли УРПИ через 11 дней после выработки в 50% случаев. Животные, получавшие ЦПА, сохраняли УРПИ в до 90% случаев. Таким образом, сохранность УРПИ увеличивалась под действием ЦПА, причем эффект становился более выраженным с ростом дозы. При этом ЦПА превосходил по эффективности препарат «Ноопепт».

Таблица 3

Сохранность УРПИ через 11 дней после выработки рефлекса у интактных животных

Контроль	ЦПА, 10 мкг/кг	ЦПА, 100 мкг/кг	ЦПА, 1000 мкг/кг	«Ноопепт», 5 мг/кг
Зашли в темную камеру / общее число				
10/20	4/20*	2/20*	2/20*	6/20*

* – достоверные различия по сравнению с контрольной группой, критерий хи-квадрат Пирсона, $p < 0,05$.

Эксперимент по изучению воздействия ЦПА на когнитивные функции животных с ишемическим поражением головного мозга был проведен с использованием метода выработки условного рефлекса пассивного избегания (УРПИ) на фоне билатеральной окклюзии общих сонных артерий у крыс. У всех животных формировали УРПИ, и в тот же день у животных контрольной и опытной группы проводили операцию по перевязке сонных артерий под общим наркозом. У животных в ложнооперированной группе под общим наркозом препарировали сонные артерии без наложения лигатур. Сохранность УРПИ определяли через 24 часа, 48 часов и 5 суток после операции (Таблица 4).

Таблица 4

**Сохранность УРПИ на фоне перевязки сонной артерии у крыс через 24, 48 часов
и 5 дней после операции**

Ложнооперированные	Ишемия + Физ. раствор	Ишемия + ЦПА 6 мг/кг
Зашли в темную камеру (24 часа после операции)/общее число		
0/20	8/20*	2/20
Зашли в темную камеру (48 часа после операции)/общее число		
0/20	11/20*	3/20
Зашли в темную камеру (5 суток после операции)/общее число		
0/20	12/20*	4/20*

* – достоверные различия по сравнению с контрольной группой, критерий хи-квадрат Пирсона, $p < 0,05$.

В группе ложно оперированных животных 100% крыс сохранили выработанный УРПИ на все сроки эксперимента. Это говорит о том, что ложное оперативное вмешательство без лигирования сонных артерий и сопровождающий его общий наркоз не изменяют сохранность памятного следа экспериментальных животных.

Через 24 часа после операции 40% животных, подвергнутых билатеральной окклюзии сонных артерий, утрачивают УРПИ, а через 2 дня и 5 суток после операции потеря УРПИ наблюдается у 60% животных. При этом животные, подвергнутых билатеральной окклюзии сонных артерий и получавшие ЦПА, через 24 часа после операции УРПИ утрачивают только в 10% случаев, а через 2 дня и 5 суток после операции потеря УРПИ наблюдается лишь у 20% животных. Таким образом, было показано, что ежедневное внутрижелудочное введение ЦПА приводит к сохранению памятного следа, что выражается в повышении сохранности УРПИ на фоне окклюзии сонных артерий.

Заключение

Проведенные исследования позволяют сделать следующие заключения о биологической активности ЦПА:

- ЦПА показал выраженную ноотропную активность в тесте неассоциативного обучения у крыс. Эффективность ЦПА по ряду параметров превосходила эффективность препарата сравнения «Ноопепт»;
- ЦПА демонстрирует выраженную актопротекторную активность, значительно увеличивая физическую выносливость мышей и крыс в тесте плавания с нагрузкой;
- ЦПА увеличивает сохранность памятного следа у здоровых интактных крыс при курсовом введении в тесте сохранности УРПИ;
- ЦПА увеличивает сохранность памятного следа у крыс с ишемическим поражением головного мозга в тесте сохранности УРПИ. Данный эффект наблюдается после однократного введения ЦПА.

Таким образом, ЦПА проявил высокую биологическую активность при пероральном введении. Это вещество содержится в разнообразных пищевых продуктах в концентрациях, сравнимых с исследованными. Поэтому можно предположить с высокой степенью вероятности, что поступающий с пищей ЦПА оказывает позитивное влияние на физиологические функции человека, а его отсутствие в принимаемой пище может оказывать негативный эффект. Учитывая, ЦПА значительно активизирует когнитивные функции и обладает актопротекторным действием, его прием, вероятно, позволит увеличить умственную и физическую работоспособность человека, а также поддерживать их на нормальном уровне в условиях повышенных нагрузок или при недостатке природного ЦПА в пище.

Библиография

1. Perry T.L., Richardson K.S.C., Hansen S., Friesen A.J.D. Identification of the Diketopiperazine of Histidylproline in Human Urine. *J Biol Chem.* 1965;240(11):4540-4542.
2. Prasad C. Bioactive cyclic dipeptides. *Peptides.* 1995;16(1):151-164. doi:10.1016/0196-9781(94)00017-z
3. Stark T., Hofmann T. Structures, sensory activity, and dose/response functions of 2,5-diketopiperazines in roasted cocoa nibs (*Theobroma cacao*). *J Agric Food Chem.* 2005;53(18):7222-7231. doi:10.1021/jf051313m
4. Da Costa N.C., Chen M.Z., Merritt D., Trinnaman L. Methionine-Containing Cyclic Dipeptides: Occurrence in Natural Products, Synthesis, and Sensory Evaluation. In: *Controlling Maillard Pathways To Generate Flavors*. Vol 1042. ACS Symposium Series. American Chemical Society; 2010:111-120. doi:10.1021/bk-2010-1042.ch011
5. Chen M.Z., Dewis M.L., Kraut K., et al. 2, 5-Diketopiperazines (Cyclic Dipeptides) in Beef: Identification, Synthesis, and Sensory Evaluation. *J Food Sci.* 2009;74(2):C100-C105. doi:10.1111/j.1750-3841.2009.01062.x
6. Shimamura T., Yamamoto K., Otsuka Y. et al. Determination of Cyclic Dipeptides in Extracts of Katsuobushi (Dried Bonito) and Other Dried Fishes. *Food Preserv Sci.* 2017;43(5):227-233. doi:10.5891/jafps.43.227
7. Otsuka Y. Sakaji M., Arita H. et al. Determination of cyclic dipeptides in various types of cheeses. *Milk Sci.* 2021;70(2):63-72. doi:10.11465/milk.70.63
8. Yamamoto K., Hayashi M., Murakami Y. et al. Development of LC-MS/MS analysis of cyclic dipeptides and its application to tea extract. *Biosci Biotechnol Biochem.* 2016;80(1):172-177. doi:10.1080/09168451.2015.1075865
9. Otsuka Y., Shimamura T., Sakaji M. et al. Quantification of Proline-containing Cyclic Dipeptides by LC-MS/MS. *Anal Sci.* 2020;36(8):977-980. doi:10.2116/analsci.19P470
10. Ginz M., Engelhardt U.H. Identification of new diketopiperazines in roasted coffee. *Eur Food Res Technol.* 2001;213(1):8-11. doi:10.1007/s002170100322
11. Gautschi M., Schmid J.P., Peppard T.L. et al. Chemical Characterization of Diketopiperazines in Beer. *J Agric Food Chem.* 1997;45(8):3183-3189. doi:10.1021/jf9700992
12. Chen Y.H., Liou S.E., Chen C.C. Two-step mass spectrometric approach for the identification of diketopiperazines in chicken essence. *Eur Food Res Technol.* 2004;218(6):589-597.
13. Borthwick A.D., Da Costa N.C. 2,5-diketopiperazines in food and beverages: Taste and bioactivity. *Crit Rev Food Sci Nutr.* 2017;57(4):718-742. doi:10.1080/10408398.2014.911142

14. Otsuka Y., Arita H., Sakaji M. et al. Investigation of the formation mechanism of proline-containing cyclic dipeptide from the linear peptide. *Biosci Biotechnol Biochem.* 2019;83(12):2355-2363. doi:10.1080/09168451.2019.1659718
15. Gallo-Torres H.E., Heimer E.P., Witt C. et al. The in vivo gastrointestinal absorption in rats of the intact cyclo(L-leucylglycine) dipeptide. *Can J Physiol Pharmacol.* 1984;62(3):319-328. doi:10.1139/y84-050
16. Дейко Р.Д., Штрыголь С.Ю., Колобов А.А., Симбирцев А.С. Циклопролилаланин: нейропротекторные и антиоксидантные свойства в модели острого нарушения мозгового кровообращения у крыс. *Обзоры по клинической фармакологии и лекарственной терапии.* 2016;14(4):16-23. doi:10.17816/RCF14416-23
(Deiko R.D., Shtrygol S.Y., Kolobov A.A., Simbirtsev A.S. Cycloprolylalanine: neuroprotective and antioxidant properties in a model of acute cerebrovascular ischemia in rats. *Reviews of clinical pharmacology and drug therapy.* 2016;14(4):16-23. doi:10.17816/RCF14416-23)
17. Borthwick A.D., Da Costa N.C. 2,5-diketopiperazines in food and beverages: Taste and bioactivity. *Crit Rev Food Sci Nutr.* 2017;57(4):718-742. doi:10.1080/10408398.2014.911142
18. Kawai T., Ishida Y., Kakiuchi H. et al. Flavor components of dried squid. *J Agric Food Chem.* 1991;39(4):770-777. doi:10.1021/jf00004a031
19. Ryan L.A.M., Dal Bello F., Arendt E.K., Koehler P. Detection and quantitation of 2,5-diketopiperazines in wheat sourdough and bread. *J Agric Food Chem.* 2009;57(20):9563-9568. doi:10.1021/jf902033v