

ФИЗИОЛОГИЯ

УДК 612.821.6; 591.18; 615.03

ВЛИЯНИЕ КАРНОЗИНА НА УСЛОВНУЮ РЕАКЦИЮ ПАССИВНОГО ИЗБЕГАНИЯ В НОРМЕ И В УСЛОВИЯХ ГИПОКСИИ**Д.С. Бережной, С.Б. Бокиева¹, С.Л. Стволинский², Т.Н. Федорова², А.Н. Иноземцев***(кафедра высшей нервной деятельности; e-mail: berezhnoy.daniil@gmail.com)*

Изучали влияние гистидинсодержащего дипептида карнозина в норме и в условиях гипоксии на условную реакцию пассивного избегания в трехкамерной установке, состоящей из освещенного отсека, темного опасного отсека, в котором крыса получала удар током, и темного безопасного отсека, в котором она не подвергалась электроболевому воздействию. Установлено, что карнозин нормализует физиологические параметры, нарушенные острой гипобарической гипоксией, а также увеличивает выбор безопасного отсека и у интактных крыс, и у крыс в условиях гипоксии.

Ключевые слова: карнозин, гипоксия, память, модифицированное пассивное избегание.

Карнозин (β -аланил-L-гистидин) был открыт русскими биохимиками в составе мышечной ткани в начале прошлого века [1]. В организме млекопитающих он обнаруживается в больших количествах в скелетных мышцах, сердце и мозге. Карнозин обладает плюрипотентными свойствами, действуя как гидрофильный антиоксидант, тканевый рН-буфер, хелатор тяжелых металлов, регулятор иммунных реакций и т.п. [2, 3].

Особая значимость карнозина заключена в его антиоксидантной и мембранопротекторной активности, играющей важную роль в повышении антистрессорной устойчивости [4, 5] в связи с тем, что развитие окислительного стресса лежит в основе нейродегенеративной патологии, в том числе болезней Альцгеймера и Паркинсона, ишемии, рассеянного склероза и т.д. [6–8]. В условиях различных экспериментальных моделей заболеваний ЦНС карнозин препятствует развитию окислительных повреждений в ткани мозга, усиливая эффективность эндогенной системы защиты от окислительного стресса [9–12].

В настоящее время показано, что карнозин улучшает обучение и память в стрессогенных условиях, таких как острая гипобарическая гипоксия [13], ишемия [14] и электроболевое воздействие [15]. Это открывает новый этап в исследовании фармакологической активности дипептида, связанной с его возможным влиянием на мнестические и гностические функции.

Широко используемым методом выявления положительного влияния химических соединений на обучение и память служит методика выработки условной реакции пассивного избегания (УРПИ).

Она основана на том, что крыса, помещенная в освещенное отделение установки, быстро переходит в темное отделение, где получает удар током. Это увеличивает латентный период перехода, что рассматривается как свидетельство формирования следа памяти об ударе током в темном отсеке.

Однако увеличение латентного периода может наступить вследствие не только влияния вещества на память, но и на тревожность или двигательную активность. Это приводит к неоднозначным результатам исследования эффектов тестируемых соединений, и для выявления их положительного влияния требуется усложнять обучение животных [16]. Одним из приемов, затрудняющих избегание тока, служит пространственная дифференцировка условной реакции [17]. Такая дифференцировка позволяет выявить положительные эффекты ноотропов и антиоксидантов [18–20].

На этом основании предложено использовать установку с дополнительным темным отсеком, в котором животное не подвергается удару током. Было показано, что контрольные крысы с одинаковой частотой заходят в оба отсека, а под действием пиретама чаще выбирают отсек, в котором не подвергались удару током [21, 22]. В данной работе изучается влияние карнозина на УРПИ в модифицированной установке в норме и в условиях гипоксии.

Материалы и методы

Работа выполнена на 43 самцах крыс линии Вистар массой 190–330 г. Животные содержались в виварии в клетках по 10 особей при естест-

¹ Северо-Осетинский государственный университет имени К.Л. Хетагурова, г. Владикавказ.

² ФГБНУ “Научный центр неврологии”, г. Москва.

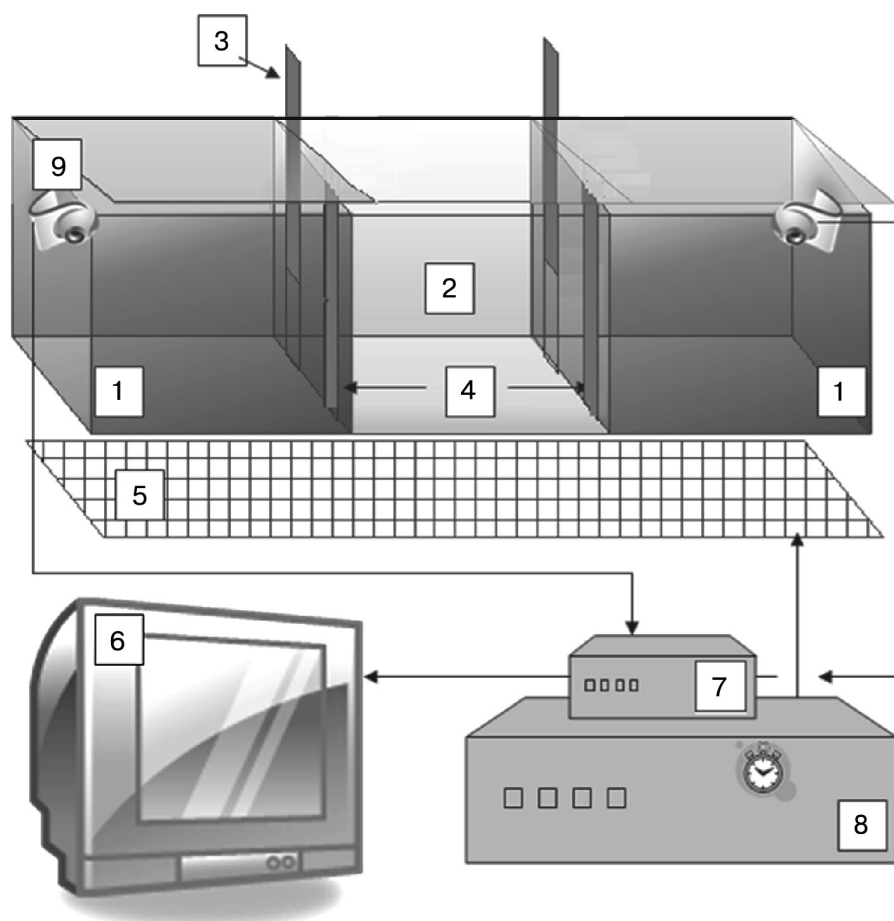


Рис. 1. Схема экспериментальной установки [24].

1. Темные отсеки камеры. 2. Светлый отсек. 3. Заслонка. 4. Отверстия, соединяющие светлый и темный отсеки. 5. Электрифицированный пол. 6. Монитор. 7. Блок управления видеокameraми. 8. Блок управления электрическим током. 9. Видеокамера

венном освещении и свободном доступе к воде и пище. Опыты проводились в камере размером $60 \times 30 \times 35$ см, разделенной на три отсека; из освещенного центрального отсека дверцы вели в темные боковые (рис. 1).

Тест № 1. Крыс по одной помещали в камеру с открытыми дверцами и в течение 5 мин оценивали спонтанную двигательную активность. После этого экспериментальные животные получали карнозин внутривенно (100 мг/кг), а контрольные — физиологический раствор. Спустя 1 ч выработывали УРПИ, для чего животных помещали в освещенный отсек хвостом к дальней стенке и фиксировали латентный период захода в один из темных отсеков, в котором (после закрытия двери) через электрифицированный пол в течение 10 с наносили удары током; этот отсек в дальнейшем считался опасным. На следующий день каждую крысу помещали в освещенный отсек и в течение 5 мин наблюдали за ее поведением

(табл. 1). Регистрировали выбор отсека и латентный период захода в него.

Тест № 2. В следующей серии экспериментов изучали сохранность следа памяти в условиях, отягощенных воздействием физиологического стресса, — острой гипобарической гипоксии. Когда животное заходило в опасный отсек в тесте № 1, оно снова получало электрошоковое раздражение. Животных, не зашедших в опасный отсек, помещали туда принудительно для дополнительного обучения. Спустя 1 ч животных подвергали воздействию гипоксии и через 24 ч в течение 10 мин регистрировали поведение животных в установке. Использовали 4 группы животных (табл. 1).

Острую гипобарическую гипоксию создавали в барокамере проточного типа для предотвращения развития эффекта гиперкапнии [23]. В течение 1 мин давление в барокамере снижали до 0,14 атмосфер. Животных индивидуально выдерживали в камере до момента остановки дыхания, после чего в течение 1 мин давление

поднимали до 1 атмосферы и животных переносили в клетку для визуального контроля реабилитации. Устойчивость животных к гипоксии оценивали по следующим физиологическим параметрам: время потери позы — время от начала действия гипоксии (окончание “подъема на высоту”) до полного расслабления скелетной мускулатуры; время жизни на “высоте” — время от момента окончания подъема до остановки дыхания; время реабилитации — период времени от момента перемещения животного в условия нормально-

Таблица 1

Последовательность экспериментальных процедур

	День 1		День 2			День 3
Физраствор (n = 24)	Ознакомление (n = 24)	Обучение (n = 24)	Тест 1 (n = 24)	Обучение (n = 8)	Гипоксия (n = 8)	Тест 2 (n = 7)
				Обучение (n = 10)		Тест 2 (n = 10)
Карнозин (n = 22)	Ознакомление (n = 22)	Обучение (n = 22)	Тест 1 (n = 22)	Обучение (n = 8)	Гипоксия (n = 8)	Тест 2 (n = 7)
				Обучение (n = 8)		Тест 2 (n = 8)

го атмосферного давления до восстановления активной позы.

Результаты и их обсуждение

Анализ латентных периодов захода в отсеки. При попарном сравнении латентных периодов реакции перехода в темные отсеки у крыс каждой группы (критерий Манна—Уитни) не обнаружилось статистически достоверных отличий, все животные вне зависимости от принадлежности к той или иной группе покидали центральный освещенный отсек. Таким образом, карнозин не оказывал влияния на эту реакцию (рис. 2).

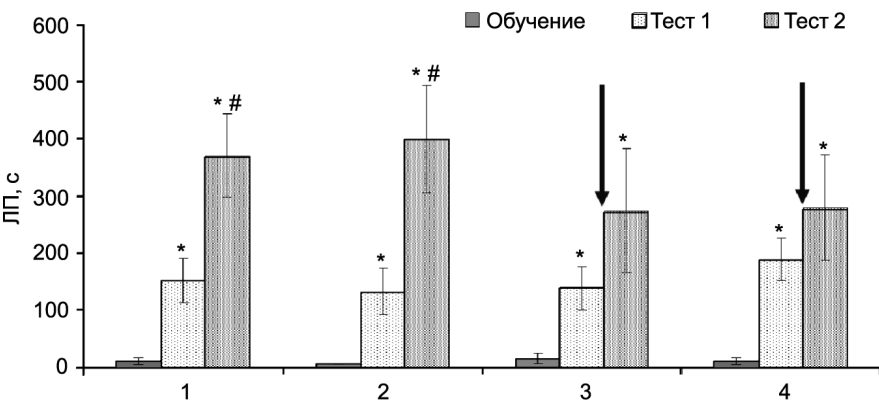


Рис. 2. Латентные периоды захода в темный отсек. По оси абсцисс — группы животных, по оси ординат — латентный период (ЛП, с). Стрелками показан момент воздействия гипоксии. 1 — контроль, 2 — карнозин, 3 — острая гипобарическая гипоксия, 4 — карнозин и острая гипобарическая гипоксия. * — $p < 0,05$ относительно латентного периода до обучения, # — $p < 0,05$ относительно латентного периода в тесте 1

Латентные периоды после удара током в тесте № 1 значительно возрастают у всех групп животных (рис. 2) и сопровождаются реакцией замирания. При повторном воздействии тока наблюдается дальнейшее увеличение латентного периода и реакции замирания. После гипоксии в тесте № 2 статистически значимого увеличения латентного периода по сравнению с тестом № 1 не наблюдалось ни у контрольных, ни у опытных животных.

Из экспериментальных данных также следует, что введение карнозина не влияло на латентные периоды перехода опытных животных из освещенного отсека. Согласно классическим взглядам на УРПИ это означает, что карнозин не оказывает положительного влияния на формирование следа памяти у животных. Однако это противоречит данным о положительном влиянии этого дипептида на обучение, полученным ранее в условиях другой модели [14, 15]. Из-за большого разброса величин латентных периодов, наблюдаемого и в наших

опытах, сложно выявить положительный эффект даже признанных мнотропных препаратов.

Анализ выбора опасного или безопасного отсека животными. В тесте № 1 число контрольных животных, выбиравших опасный, безопасный или центральный освещенный отсеки, статистически значимо не отличалось (табл. 2). Напротив, число экспериментальных животных, зашедших в безопасный отсек, более чем в 2 раза превысило число зашедших в опасный отсек.

Таким образом, показано, что в условиях данной модели карнозин положительно влияет на пространственный компонент памяти и позволяет животному отличать безопасный отсек от отсека,

в котором оно было подвергнуто электролевному воздействию. В отличие от оценки влияния карнозина на обучение и память на основе латентных периодов оценка с помощью показателя предпочтения животными безопасного отсека согласуется с фактом положительного влияния антиоксиданта на условную реакцию активного избегания [15].

Влияние карнозина на устойчивость животных к гипоксии. Анализ активности животных в условиях гипоксии показал отчетливое влияние карнозина на все изучаемые физиологические параметры (рис. 3). Экспериментальные животные дольше контрольных сохраняли позу

($65,0 \pm 6,3$ с и $44,2 \pm 8,8$ с соответственно). Время до остановки дыхания у них также достоверно превышало соответствующий показатель для контрольной группы ($289,7 \pm 48,2$ с против $167,8 \pm 28,5$ с). Следует отметить, что вместе с увеличением времени жизни в условиях гипоксии у животных, получавших карнозин, увеличилось и время реституции после возвращения в нормальные условия. Для объяснения этого эффекта интерес

Таблица 2

Распределение животных по заходам в отсеки

Тест	Вещество	Опасный отсек	Центральный отсек	Безопасный отсек
1	Физраствор (n = 24)	7	8	9
	Карнозин (n = 22)	5	6	11*
2 (без гипоксии)	Физраствор (n = 10)	4	3	3
	Карнозин (n = 8)	0	4	4*
2 (гипоксия)	Физраствор (n = 7)	0	3	4*
	Карнозин (n = 7)	0	2	5*

* — $p < 0,05$ относительно выбора опасного отсека (по критерию согласия частот).

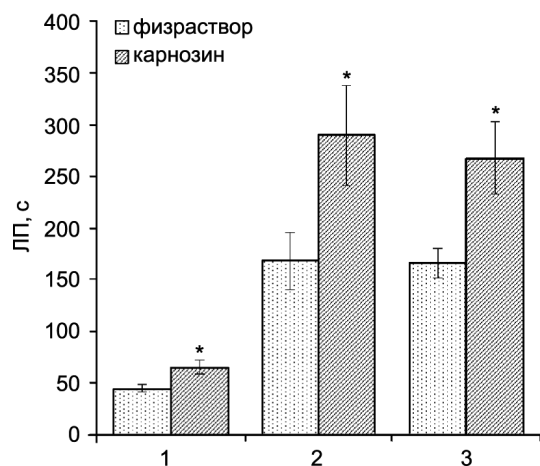


Рис. 3. Основные физиологические показатели устойчивости животных к острой гипобарической гипоксии.

По оси абсцисс — показатели, по оси ординат — латентные периоды (ЛП, с). 1 — время до потери позы, 2 — время до потери дыхания, 3 — время до реституции. * — $p < 0,05$ относительно латентного периода у контрольных животных (по критерию Манна—Уитни)

может представлять такой показатель, как отношение времени реституции ко времени жизни в условиях гипоксии. В условиях действия карнозина это отношение осталось неизменным по сравнению с контролем и составило в среднем $0,99 \pm 0,08$. Неизменное соотношение этих параметров

может свидетельствовать о существующей зависимости между ними: например, увеличение времени нахождения в условиях гипоксии влечет за собой необходимость более длительного восстановления после нее.

Анализ влияния карнозина на УРПИ после воздействия гипоксии показывает, что препарат увеличивает вероятность выбора безопасного отсека (табл. 2). Это свидетельствует о положительном влиянии дипептида, сопоставимом с его воздействием на пространственное предпочтение интактными крысами в тесте № 1.

На основе полученных результатов можно заключить, что природный гистидинсодержащий дипептид карнозин нормализует физиологические параметры, нарушенные острой гипобарической гипоксией, и увеличивает выбор безопасного отсека в модифицированной методике условной реакции пассивного избегания и у интактных крыс, и у крыс в условиях гипоксии. Последнее свидетельствует о положительном влиянии карнозина на пространственный компонент памяти.

* * *

Работа выполнена при поддержке гранта Российского фонда фундаментальных исследований (№ 14-04-00829).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Gulewitsch W.S., Amiradzibi S. Über das Carnosin, eine neue organische Base des Fleischextraktes // Ber. Deutsch. Chem. Ges. 1900. Vol. 33. P. 1902—1903.
2. Болдырев А.А. Карнозин. М.: Изд-во Моск. ун-та, 1998. 319 с.
3. Hipkiss A.R., Cartwright S.P., Bromley C., Gross S.R., Bill R.M. Carnosine: can understanding its actions on energy metabolism and protein homeostasis inform its therapeutic potential? // Chem. Cent. J. 2013. Vol. 7. P. 38—47.
4. Boldyrev A.A. Carnosine: New concept for the function of an old molecule // Biochemistry (Mosc.). Vol. 77. N 4. P. 313—326.
5. Гуляева Н.В. Перспективы создания лекарственных препаратов на основе карнозина (некоторые новые принципы) // Биохимия. 1992. Т. 57. № 9. С. 1398—1403.
6. Румянцев С.А., Федин А.И., Болевич С.Б., Силина Е.В. Свободнорадикальные процессы и их коррекция при геморрагическом инсульте // Неврологический журнал. 2007. Т. 12. № 5. С. 51—56.
7. Federico A., Cardaioli E., Da Pozzo P., Formichi P., Gallus G., Radi E. Mitochondria, oxidative stress and neurodegeneration // J. Neurol. Sci. 2012. Vol. 322. N 1. P. 254—262.
8. Yan M., Wang X., Zhu X. Mitochondrial defects and oxidative stress in Alzheimer disease and Parkinson disease // Free Radic. Biol. Med. 2012. Vol. 62. P. 90—101.
9. Болдырев А.А., Стволинский С.Л., Федорова Т.Н. Карнозин: эндогенный физиологический корректор активности антиоксидантной системы организма // Усп. физиол. наук. 2007. Т. 38. № 3. С. 57—71.
10. Добротворская И.С., Фёдорова Т.Н., Доброта Д., Берёзов Т.Т. Характеристика окислительного стресса в условиях экспериментальной ишемии мозга крыс, отягощенной гипергомоцистеинемией // Нейрохимия. 2011. Т. 28. № 1. С. 49—54.
11. Суслина З.А., Максимова М.Ю., Фёдорова Т.Н. Оксидантный стресс и основные направления нейропротекции при нарушениях мозгового кровообращения // Неврологический журнал. 2007. Т. 12. № 4. С. 1—5.
12. Dobrota D., Fedorova T., Stepanova M., Babusikova E., Stelova D., Tatarkova Z., Stvolinsky S., Boldyrev A. Oxidative stress, induced in rat brain by a combination of 3-nitropropionic acid and global ischemia // J. Clin. Exp. Med. 2010. Vol. 3. N 2. P. 144—152.
13. Stvolinsky S., Toropova K., Gordeeva M. Carnosine and its (S)-Trolox derivative protect animals against oxidative stress // Amino Acids. 2012. Vol. 43. N 1. P. 165—170.
14. Gallant S., Kukley M., Stvolinsky S., Bulygina E., Boldyrev A. Effect of carnosine on rats under experimental brain ischemia // Tohoku J. Exp. Med. 2000. Vol. 191. N 2. P. 85—99.
15. Иноземцев А.Н., Бережной Д.С., Фёдорова Т.Н., Стволинский С.Л. Влияние природного дипептида карнозина на обучение крыс в условиях отрицательного подкрепления // Докл. РАН. 2014. Т. 454. № 5. С. 606—608.
16. Воронина Т.А., Островская Р.У. Методические указания по изучению ноотропной активности фармакологических веществ // Руководство по экспериментальному (доклиническому) изучению новых фармако-

логических веществ / Под ред. Р.У. Хабриева. М.: Ремедиум, 2000. С. 153—158.

17. Stuchlík A., Petrásek T., Prokopová I., Holubová K., Hatalová H., Valeš K., Kubík S., Dockery C., Wesierska M. Place avoidance tasks as tools in the behavioral neuroscience of learning and memory // *Physiol. Res.* 2013. Vol. 12. N 62. Suppl. 1. P. 1—19.

18. Иноземцев А.Н., Капица И.Г., Гарибова Т.Л., Бокеева С.Б., Воронина Т.А. Сопоставление влияния ноотропов и анксиолитиков на функциональные нарушения реакции избегания // *Вестн. Моск. ун-та. Сер. 16. Биология.* 2004. № 3. С. 24—30.

19. Иноземцев А.Н., Прагина Л.Л. Методические приемы стрессогенных воздействий для исследования ноотропных влияний на обучение и память // *Вестн. Моск. ун-та. Сер. 16. Биология.* 1992. № 4. С. 23—31.

20. Inozemtsev A.N. Biological origins of protective mechanisms activated by the disruption of higher nervous

activity // *Moscow Univ. Biol. Sci. Bull.* 2009. Vol. 64. N 2. P. 57—62.

21. Иноземцев А.Н., Бельник А.П., Островская Р.У. Изучение условного рефлекса пассивного избегания в модифицированной трехкамерной установке // *Эксп. клин. фармакол.* 2007. № 2. С. 67—69.

22. Inozemtsev A.N. Analysis of the memory trace nature in passive avoidance response // *Moscow Univ. Biol. Sci. Bull.* 2013. Vol. 68. N 2. P. 53—57.

23. Агаджанян Н.А., Елфимов А.И. Функции организма в условиях гипоксии и гиперкапнии. М.: Медицина, 1986. 272 с.

24. Иноземцев А.Н., Серков А.Н. Выработка условной реакции пассивного избегания у крыс // *Большой практикум по высшей нервной деятельности и нейрофизиологии. Учебное пособие* / Под ред. Д.В. Евтихина и Б.В. Чернышёва. М.: ЛИНОР, 2009. С. 49—58.

Поступила в редакцию
25.06.2014

EFFECTS OF CARNOSINE ON PASSIVE AVOIDANCE RESPONSE IN NORMAL CONDITIONS AND UNDER THE INFLUENCE OF HYPOXIA

D.S. Berezhnoy, S.B. Bokieva, S.L. Stvolinsky, T.N. Fedorova, A.N. Inozemtsev

Effect of histidine-containing dipeptide carnosine on passive avoidance response in normal conditions and under the influence of acute hypobaric hypoxia was analyzed using a three-compartment apparatus that consisted of a light compartment, a dark dangerous compartment in which foot shock was delivered, and a dark safe compartment where the rats were never shocked. The experiment revealed, that carnosine normalized physiological parameters, disrupted by acute hypobaric hypoxia, and increased preference of the safe compartment in both intact rats and hypoxia-treated animals.

Key words: *carnosine, hypoxia, memory, modified passive avoidance.*

Сведения об авторах

Бережной Даниил Сергеевич — ведущ. инженер кафедры высшей нервной деятельности биологического факультета МГУ. Тел.: 8-905-734-67-59; e-mail: berezhnoy.daniil@gmail.com

Бокеева Светлана Батырбековна — канд. биол. наук, доц., зав. кафедрой анатомии, физиологии и ботаники биолого-технологического факультета Северо-Осетинского государственного университета имени К.Л. Хетагурова. Тел.: 8-918-826-19-95; e-mail: bokievasb@rambler.ru

Стволинский Сергей Львович — докт. биол. наук, ведущ. науч. сотр. ФГБНУ “Научный центр неврологии”. Тел.: 8-495-490-24-09; e-mail: slstvolinsky@mail.ru

Фёдорова Татьяна Николаевна — докт. биол. наук, ведущ. науч. сотр. ФГБНУ “Научный центр неврологии”. Тел.: 8-495-490-24-09; e-mail: tn51@bk.ru

Иноземцев Анатолий Николаевич — докт. биол. наук, руководитель лаборатории эволюции механизмов памяти биологического факультета МГУ. Тел.: 8-916-834-54-71; e-mail: a_inozemtsev@mail.ru