

УДК: 612.821.2: 615.8

Л. В. Лоскутова, Н. Г. Колосова, Т. В. Щеглова, В. Е. Тарабанько

КОРРЕКЦИЯ НАРУШЕНИЙ СПОСОБНОСТИ К ОДНОКРАТНОМУ ОБУЧЕНИЮ У ПРЕЖДЕВРЕМЕННО СТАРЕЮЩИХ КРЫС OXYS ЭКСТРАКТОМ ЧЕРНИКИ И ЕЁ ВОЗМОЖНЫЕ МЕХАНИЗМЫ*

Институт цитологии и генетики СО РАН, Новосибирск

НИИ физиологии СО РАМН, Новосибирск

Институт химии и химической технологии СО РАН, Красноярск

Исследовано влияние экстракта черники (*Vaccinium Myrtillus*, L.) на способность к однократному обучению преждевременно стареющих крыс линии OXYS, характеризующихся ранними нарушениями когнитивных функций мозга, идентичными развивающимся при старении человека. Установлено, что экстракт черники (280 мг сухого вещества на кг корма, в том числе 48 мг антоцианов, ежедневно в течение 3, 5, 7 и 9-го мес. жизни) эффективней, чем α -токоферол, предотвращает нарушение способности к однократному обучению в реакции пассивного избегания 10-месячных крыс OXYS. Экстракт черники не изменял содержание карбонильных групп – показателя окислительных повреждений белков в мозге крыс OXYS, – но снижал в нём содержание продуктов перекисного окисления липидов малонового диальдегида. Предполагается, что положительный эффект экстракта черники связан с предупреждением характерных для крыс OXYS дисфункций митохондрий.

Ключевые слова: окислительный стресс, преждевременное старение, память, крысы линии OXYS, экстракт черники

Подтвержденное многочисленными исследованиями участие свободных радикалов в процессе старения вызвало закономерный интерес к использованию антиоксидантов в качестве геронтопротекторов. В последнее время особое внимание уделяется природным соединениям, среди которых на первый план выходят биофлавоноиды, диапазон фармакологических свойств которых постоянно расширяется. Как показано в работе L. Costantino с соавт. [8], значительной антирадикальной активностью обладают флавоноиды из экстракта черники (*Vaccinium Myrtillus*, L.), практическое использование которой ограничивается в основном офтальмологической практикой. В то же время в работе J. A. Joseph с соавт. [10] сообщается о положительном влиянии экстракта голубики – другого представителя рода *Vaccinium* – на дефициты психомоторного поведения и пространственной памяти старых крыс линии Fisher-344.

В настоящей работе мы исследовали способность экстракта черники предотвращать возрастные нарушения памяти, используя в качестве модели преждевременно стареющих крыс линии OXYS, полученной в Институте цитологии и генетики СО РАН селекцией и инбридингом крыс Вистар, чувствительных к катарактогенному эффекту галактозы [3]. До недавнего времени исследование крыс OXYS ограничивалось анализом состояния периферических органов, в то время как когнитивной сфере была посвящена одна работа, выпол-

ненная ещё на 4–5 поколениях крыс [1]. В ней сообщалось об укорочении длительности сохранения условной реакции активного избегания при отсутствии различий в скорости ее приобретения у 2-месячных животных. Наши исследования 4-месячных крыс OXYS 62–67-го поколений выявили нарушение условной реакции пассивного избегания, вырабатываемой в одном сочетании [2]. Снижение способности к запоминанию новой информации при её однократном предъявлении – наиболее ранний симптом нарушения памяти стареющих человека и животных [9], что позволяет рассчитывать на перспективность использования крыс OXYS в качестве модели для исследования механизмов возрастных нарушений функций мозга и поиска путей их коррекции. Задачей настоящей работы явился анализ влияния экстракта черники на сохранение условной реакции пассивного избегания, вырабатываемой в одном сочетании, а также на уровень окислительных повреждений белков и липидов в мозге крыс OXYS и Вистар.

Методика. Работа проведена на 88 крысах-самцах линий Вистар и OXYS в возрасте 9 мес. (лаборатория разведения животных Института цитологии и генетики СО РАН, Новосибирск). Часть животных в течение 3, 5, 7 и 9-го месяцев жизни ежедневно получала с кормом экстракт черники (по 280 мг сухого вещества на кг корма, в том числе 48 мг антоцианидов). Экстракт приготовлен в Институте химии и химической технологии СО РАН упа-

*Работа выполнена при поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (грант 02-04-48317).

риванием сока ягод на ротормном испарителе до содержания сухих веществ 50 весовых процентов и стандартизован по содержанию антоцианидов [4]. Препаратом сравнения служил витамин Е – α -токоферола ацетат ("Уралбиофарм", Россия) по 160 мг на кг корма. В возрасте 10 месяцев оценивали способность животных к однократному обучению. Для этого вырабатывали условную реакцию (УР) пассивного избегания по классической методике [2] в экспериментальной камере, состоящей из двух отделений: освещенного (безопасного) и темного (опасного). Регистрировали латентный период (ЛП) перехода из светлого отделения в темное (время наблюдения – 180 с) и число дефекаций. Через 24 ч после процедуры однократной фамелиризации переход в темное отделение наказывался электрокожным раздражением (0,75 мА, 2 с). Сохранение УР регистрировали через 1 и 7 сут после обучения.

После окончания поведенческого эксперимента животных забивали декапитацией, мозг быстро извлекали, помещали в жидкий азот и до проведения анализов хранили при температуре -70°C . В гомогенатах мозга, приготовленных на охлажденном 25 мМ фосфатном буфере pH 7,4, регистрировали содержание продуктов перекисного окисления липидов (ПОЛ), реагирующих с 2-тиобарбитуровой кислотой (малонового диальдегида, МДА) согласно [14]. Анализировали также содержание карбонильных групп – показателя окислительных повреждений белков, которое оценивали спектрофотометрическим методом в реакции с 2,4-динитрофенилгидразином [12]. Содержание токоферола в мозге определяли флюориметрически [15] на спектрофлюориметре MPF-4 HITACHI; спектрофотометрические измерения выполняли на спектрофотометре HITACHI-556 (Япония).

Результаты обработаны статистически с использованием однофакторной и двухфакторной "ANOVA" в программной среде "STATGRAPHICS".

Результаты. Прием антиоксидантов предупредил появление внешних признаков старения крыс OXYS – увеличил массу тела до уровня контрольных Вистар, улучшил состояние кожи и шерстного покрова. По средним значениям ЛП перехода в темный отсек, представленным на рис. 1, можно судить об эффективности препаратов в коррекции обучаемости животных и сохранения УР пассивного избегания.

Прежде всего, при анализе воспроизведения УР контрольными крысами обнаружены достоверные межлинейные различия, подтверждающие нарушение памяти у крыс OXYS ($F_{1,81}=9,34$; $p=0,003$). При тестировании УР на 7-е сут после обучения различия исчезали за счет тенденции к самоусилению УР у OXYS.

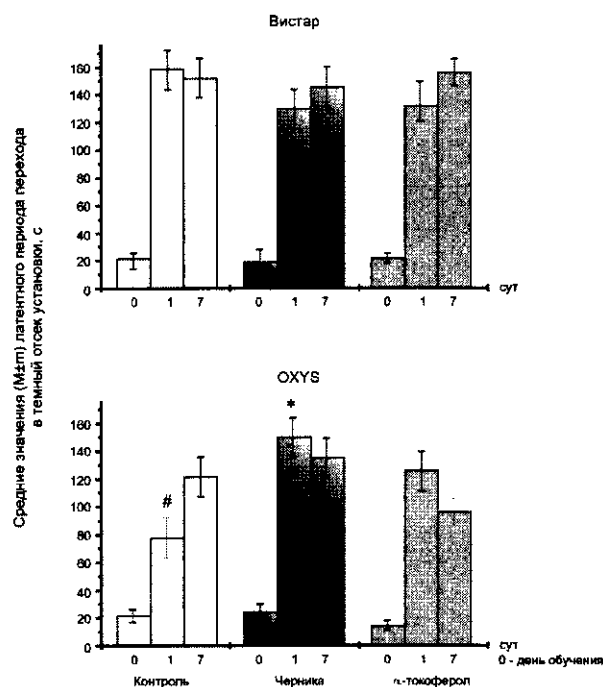


Рис. 1. Влияние экстракта черники и α -токоферола на сохранение условной реакции пассивного избегания у крыс Вистар и OXYS. # – $p=0,003$ по сравнению с контролем Вистар; * – $p=0,01$ по сравнению с тем же днём собственного контроля

Что касается вегетативного компонента условного страха (рис. 2), то величина его соответствует выраженности приобретенного навыка – уровень дефекации резко возрастал ($p<0,05$ в сравнении с 0 днём) у крыс Вистар и лишь незначительно повышался у OXYS.

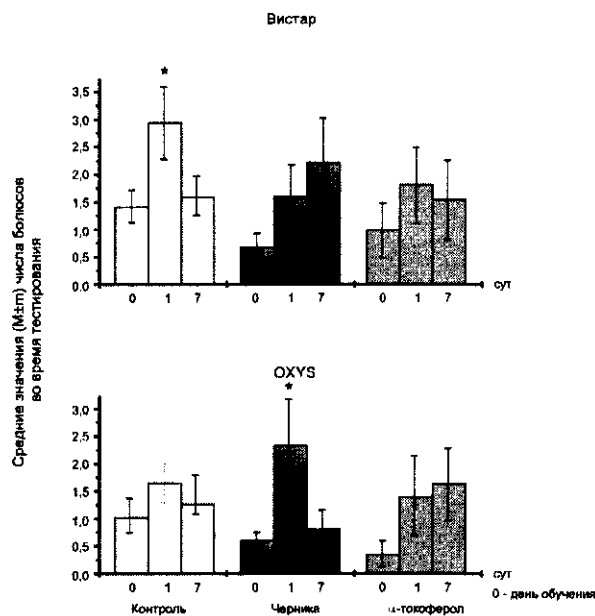


Рис. 2. Количество болюсов при выработке условной реакции пассивного избегания у контрольных и получавших антиоксиданты крыс Вистар и OXYS. * – $p<0,05$ по сравнению с собственным 0 днём

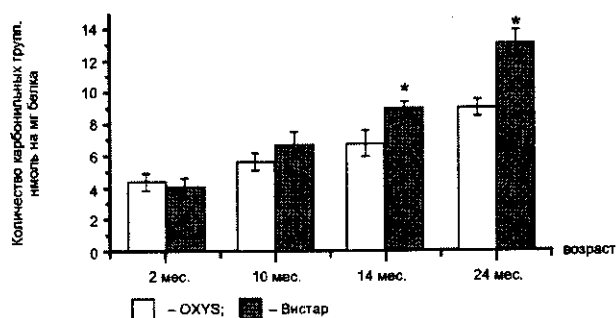


Рис. 3. Возрастные изменения уровня окислительных повреждений белков в мозге крыс Вистар и OXYS. * – достоверные межгрупповые различия, $p < 0,01$

Включение антиоксидантов в рацион не повлияло на сохранение УР крыс Вистар (рис. 1). В то же время зарегистрирован значительный эффект экстракта черники у крыс OXYS при тестировании УР на следующие сутки после обучения ($F_{1,81}=6,87$; $p=0,01$ в сравнении с группой контрольных OXYS). Обращает на себя внимание сходство в динамике сохранения УР между получавшими экстракт черники крысами OXYS и контрольными Вистар как в ранние, так и поздние сроки тестирования. Подобное сходство наблюдалось и в вегетативном проявлении условного страха – количество дефекаций у OXYS, принимавших экстракт черники, возросло после обучения настолько, что не отличалось от контроля того же дня Вистар, но достоверно отличалось от собственного нулевого дня (рис. 2). Возможно, межгрупповые различия в эмоциональности, влияющие на обучение, сгладились длительным приемом этого препарата. Не обнаружено каких-либо межгрупповых (контрольные и принимавшие экстракт черники OXYS) значимых различий для ЛП перехода и количества дефекаций у животных, получавших α -токоферол, хотя тенденция к усилению воспроизведения навыка у крыс OXYS есть.

Таким образом, сравнительный анализ особенностей сохранения УР пассивного избегания у крыс двух линий показал, что крысы OXYS изначально отличаются от Вистар ухудшением сохранения навыка, тестируемого в ранние сроки, что подтверждает данные, полученные ранее на 4-месячных животных [2]. У крыс Вистар с изначально хорошим воспроизведением УР включение в диету антиоксидантов не повлияло на этот показатель, что указывает на избирательность действия экстракта черники относительно исходного когнитивного фона.

В то же время анализ содержания продуктов свободнорадикального окисления белков и липидов в мозге контрольных животных не выявил межгрупповых различий (табл.). Прием антиоксидантов не повлиял на содержание карбонильных групп. Содержание же продуктов ПОЛ, реагирующих с 2-тиобарбитуровой кислотой (МДА), под влиянием экстракта черники снизилось на 25% у крыс OXYS и не изменилось – у Вистар. α -токоферол снизил активность процессов ПОЛ в мозге крыс обеих линий: у OXYS – на 30%, у Вистар – на 25%. Очевидно, что это связано с накоплением α -токоферола в мозге – его содержание возрастало на 44% у крыс Вистар и на 35% – у OXYS.

Сопоставление эффективности антиоксидантов в предупреждении нарушения памяти с их влиянием на содержание в мозге маркеров окислительного стресса – продуктов свободнорадикального окисления белков и липидов – свидетельствует об отсутствии прямой связи между показателями. Менее эффективный в усилении обучаемости α -токоферол в то же время снижал содержание продуктов ПОЛ в мозге крыс обеих линий. Оба препарата оказались не эффективными в отношении карбонильных соединений, однако их уровень в мозге контрольных крыс OXYS этого возраста такой же, как и у Вистар. С возрастом уровень окислительных повреждений белков в мозге нара-

Таблица

Влияние антиоксидантов на содержание карбонильных соединений, ТБК-реактивных продуктов (МДА) и α -токоферола в мозге крыс Вистар и OXYS ($M \pm m$)

Линия	Группа исследования	МДА, нмоль на г ткани	Карбонильные группы, нмоль на мг белка	Токоферол, мкг на г ткани
Вистар	Контроль	47,8 \pm 4,0	6,11 \pm 0,59	4,19 \pm 0,27
	Черника	39,3 \pm 1,85	6,55 \pm 0,48	5,13 \pm 0,55
	α -токоферол	35,8 \pm 3,45* ($p=0,023$)	5,93 \pm 0,49	6,03 \pm 0,56* ($p=0,036$)
OXYS	Контроль	52,9 \pm 5,2	6,92 \pm 0,69	4,67 \pm 0,68
	Черника	40,2 \pm 3,7* ($p=0,048$)	6,11 \pm 0,51	5,12 \pm 0,47
	α -токоферол	36,96 \pm 2,6* ($p=0,010$)	7,59 \pm 1,0	6,3 \pm 0,39* ($p=0,047$)

Примечание. $n=12-15$; * – достоверные различия между контрольными и получавшими антиоксидант животными.

стает у крыс обеих линий, но только после 12 месяцев он становится более высоким у крыс OXYS (рис. 3), в то время как нарушение памяти у них регистрируется уже в 3–4 мес. [2].

В литературе имеются указания на то, что в возрастных изменениях процессов обучения и памяти, в патогенезе нейродегенеративных заболеваний существенную роль играет накопление дефектов в митохондриальной ДНК мозга и, как следствие, угнетение биоэнергетических процессов [11]. Предполагается, что ключевым фактором преждевременного старения крыс OXYS также являются прогрессирующие нарушения структуры и функций митохондрий, которые появляются в митохондриях печени этих животных уже в 2–3-месячном возрасте и затем нарастают [5]. Ранее показано [6], что экстракт черники в режиме в значительной степени предотвращает нарушения функций митохондрий печени крыс OXYS, причём механизм положительного влияния на них экстракта черники прямо не связан с предупреждением окисления липидов и белков митохондрий. Если дисфункции митохондрий и энергетический дефицит имеют место и в мозге, можно предположить что, благоприятное действие экстракта черники на память крыс OXYS обеспечивается теми же механизмами. Аргументом в пользу такого механизма служит то, что флавоноиды, в том числе и антоцианиды из рода *Vaccinium*, способны значительно снижать индуцированный мутагенез в клетках [7]. Наши исследования на бактериях показали, что экстракт черники особенно эффективен в предотвращении мутаций, индуцируемых активными формами кислорода [13]. Все эти, пока косвенные, данные позволяют предполагать, что корректирующее влияние экстракта черники на ранних этапах нарушения памяти может быть обусловлено защитой ДНК митохондрий мозга крыс OXYS от окислительных модификаций, предупреждением нарушения их функционального состояния и развития энергетического дефицита, однако для подтверждения этого предположения необходимы специальные исследования.

Выводы

Показано, что экстракт черники эффективней, чем α -токоферол, предупреждает у крыс OXYS нарушение условной реакции пассивного избегания, вырабатываемой в одном сочетании.

Эффективность экстракта черники в предупреждении нарушений памяти у крыс OXYS прямо не связана с антиоксидантными свойствами: и экстракт черники и α -токоферол снижают содержание продуктов ПОЛ, не изменяя уровень окислительных повреждений белков в мозге крыс OXYS. Предполагается, что более высокая эффективность черники, обусловлена предупреждением нарушений структуры и функций митохондрий.

Линия крыс OXYS – перспективная модель для исследования механизмов естественного и преждевременного старения и разработки способов его профилактики.

CORRECTION OF SINGLE LEARNING ABILITY DISORDERS WITH BILBERRY EXTRACT IN ACCELERATED SENESCENCE OXYS RATS AND ITS POSSIBLE MECHANISMS

L.V. Loskutova, N.G. Kolosova, T.V. Scheglova, V.E. Tarabanko

The influence of bilberry extract (*Vaccinium Myrtillus*, L.) on ability to single learning of accelerated senescence OXYS rats with early disorders of cognitive functions was studied. Testing of 10 month old OXYS rats showed that supplementation with bilberry extract during 3,5, 7 and 9 month of life (280 mg of dry matter on kg of fodder, including 48 mg anthocyanids) completely prevents impairment of ability to single learning in passive avoidance reaction, whereas the effect of -tocoferol (140 mg/kg) is less notable. The bilberry extract had no effect on the protein carbonyl content in OXYS rat brain tissues but decreased the lipid peroxides. It is suggested that positive effect of bilberry extract is to great extent due to its ability to prevent typical functional disorders in the mitochondria and developing energy deficiency in OXYS rats.

ЛИТЕРАТУРА

1. Елисеева А.Г., Соловьева Н.А., Морозкова Т.С. // Генетика. 1975. Т. 11. № 5. С. 72–7.
2. Лоскутова Л.В., Колосова Н.Г. // Бюл. exper. биол. 2000. Т. 130. № 8. С. 155–158.
3. Соловьева Н.А., Морозкова Т.С., Салганик Р.И. // Генетика. 1975. Т. 11. № 5. С. 63–71.
4. Танчев С.С. Антоцианы в плодах и овощах М.: Пищевая промышленность. 1980. С. 15.
5. Шабалина И.Г., Колосова Н.Г., Гришанова А.Ю. и др. // Биохимия. 1995. Т. 60. № 12. С. 2045–2052.
6. Шабалина И.Г., Шалбуева Н.И., Дукалова А.Э., Сидницина О.И., Крысанова Ж.С., Колосова Н.Г. // Эксперим. и клин. фармакол. 2001. 64 (4). С. 34–36.
7. Bagchi D., Gard A., Krohn R. L. et al. // Gen. Pharmacol. 1998. Vol. 30 № 5. P. 771–777.
8. Costantino L., Albasini A., Rastelli G., Benvenuti S. // Planta Med. 1992. Vol. 58. № 4. P. 342–344.
9. Huppert F.A. Age-related changes in memory: learning and remembering new information // Handbook of Neuropsychology, Ch. 7 / Ed. Boller F., Grafman J.: Elsevier Sci. Publ. 1991. P. 123–147.
10. Joseph J.A., Shukitt-Hale B., Denisova N.A. et al. // J. Neurosci. 1999. Vol. 19. № 18. P. 8114–8121.
11. Nicholls D.G., Budd S.L. // Physiolog. Rev. 2000. Vol. 80. № 1. P. 315–358.
12. Reznick A. Z., Packer L. // Methods Enzymol. 1994. Vol. 233. P. 357–363.
13. Scheglova T.V. Antimutagenic effect of bilberry extract (*Vaccinium Myrtillus*) // 1-st Int. Pharmaceutical Congress, Athens, 2001. P. 93–98.
14. Steinbrecher U.P. // In "Free Radicals, Lipoproteins, and Membrane Lipids" (ed. L. Douste-Blazy, and Paoletti), Plenum, New York, 1990. P. 193.
15. Teylor S.L., Lamden M., Tappel A.L. // Lipids. 1976. Vol. 11. № 7. P. 530–538.