

КРИОПРОТЕКТОРНЫЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ ДИПЕПТИДА L-КАРНОЗИНА (β-АЛАНИЛ-L-ГИСТИДИНА)

© 2023 г. А. А. Мокрушин*

Институт физиологии им. И.П. Павлова РАН, Санкт-Петербург, 199034 Россия

*E-mail: mok@inbox.ru

Поступила в редакцию 30.09.2022 г.

После доработки 02.11.2022 г.

Принята к публикации 07.11.2022 г.

Дипептид (β-аланил-L-гистидин) обнаружен в значительных количествах в мышцах и в головном мозге млекопитающих, особенно в обонятельных структурах. L-карнозин проявляет многие протективные эффекты при действии на клетки различных цитотоксических факторов. Срезы обонятельной коры мозга крыс мы использовали для изучения криопротективных характеристик L-карнозина в процессе криосохранения (КС). Анализировали изменения активности N-метил-D-аспаратных рецепторов (NMDAR) при регистрации NMDA-потенциалов, вызываемых электрической стимуляцией латерального обонятельного тракта. Срезы мозга преинкубировали с L-карнозином (20 мМ) в искусственном цереброспинальном растворе, замораживали (–10°C,) и после длительного КС (30 сут) отогревали до 37°C. До и после КС определяли изменения амплитуд NMDA-потенциалов. Обнаружено, что дипептид оптимизировал pH замораживающего раствора после КС и сохранял активность NMDAR, определяемых по амплитуде NMDA-потенциалов. L-карнозин после КС способствовал дегидратации избыточной свободной воды из срезов. Дипептид ингибировал развитие глутаматной эксайтотоксичности в срезах мозга в процессе КС и сохранял нормальное функционирование NMDAR. Полученные данные доказывают, что L-карнозин проявляет свойства эндогенного криопротектора в нервной ткани.

Ключевые слова: L-карнозин, срезы мозга, рецепторы NMDA, фокальные потенциалы, замораживание–отогревание, криосохранение

DOI: 10.31857/S0041377123020049, **EDN:** LWPMHE

Криосохранение (КС) — это биотехнология обратимого торможения жизнедеятельности клеток и органов млекопитающих при длительном воздействии отрицательных температур. Исследование закономерностей и способов КС очень востребовано в регенеративной медицине для трансплантации и создании криобанка (Ichikawa et al., 2007).

Достигнуты значительные успехи КС одноклеточных клеток (ооцитов, сперматозоидов, клеток крови) с последующим восстановлением их биологических функций после отогревания. Однако значительные проблемы возникают при длительном КС нервной ткани из-за ее гетерогенности, необходимости сохранения не только базовых функций (передачи информации в нервной сети), но и более высоких (пластических свойств): способности обучения и хранения информации (памяти). Вместе с тем, в клинике существует острая потребность эксплан-

татов мозга для пересадки при таких невропатологиях, как инсульт, эпилепсия и травма. Такие экспланты мозга должны храниться в криобанке при специальных условиях. Установлено, что обычные способы замораживания–отогревания в процедуре КС вызывают нарушение функций нервных клеток, синапсов и делают их непригодными для трансплантации. Для сохранения их функций при КС используют криопротекторы. Традиционно применяемые протекторы (ДМСО, этиленгликоль и др.) оказывают негативное влияние на нейроны и блокируют синаптические механизмы, поэтому их применение при КС нецелесообразно (Пичугин, 2013). Таким образом, для потенциальных криопротекторов нервной ткани предъявляются особые требования, чтобы они обладали высокой эффективностью, не нарушали функций отдельных синаптических механизмов, не влияли на интегрированность нейрональной сети, а также не проявляли токсичность.

В настоящей работе в качестве потенциального криопротектора был исследован карнозин. Карнозин (β-аланил-L-гистидин), эндогенный дипептид, синтезируемый ферментом карнозинсинтаза 1 (CARNS1) из аминокислот β-аланина (синтезируется в печени) и

Принятые сокращения: КС — криосохранение; ДМСО — диметилсульфоксид; ЛОТ — латеральный обонятельный тракт; ФП — фокальные потенциалы; АМРА — альфа-амино-3-гидрокси-5-метилизоксазол-4-пропионовая кислота; CARNS — карнозинсинтаза; NMDA — N-метил-D-аспарат; NMDAR — рецептор(ы) NMDA.

L-гистидина (получаемого из пищи). Содержание этого дипептида наиболее высокое (миллимолярные концентрации) в сердечных и скелетных мышцах, а также в головном мозге, особенно в обонятельной луковице и обонятельной коре (Boldyrev et al., 2013). Так, концентрация L-карнозина в коре больших полушарий головного мозга составляет 0.1 мМ, а в обонятельных луковицах — на порядок выше (1–2 мМ) (Hepkiss et al., 1998; Boldyrev et al., 2013). В меньших количествах (менее 0.1 мМ) он находится и в других тканях организма (Boldyrev et al., 2013).

Уровни L-карнозина в тканях целого организма регулируются активностью двух карнозинов с помощью которых, он распадается на β -аланин и L-гистидин: CNDP1 и цитозольной карнозиндипептидазы 2 (CNDP2), которые относятся к семейству металлопротеаз M20 (Teufel et al., 2003).

Выявлено, что L-карнозин в нормотермических условиях производит плеiotропные положительные эффекты в организме. Так, L-карнозин проявляет свойства антиоксиданта, он нейтрализует активные формы кислорода, а также предотвращает перекисное окисление липидов, сохраняя структуру клеточных мембран. Дипептид препятствует процессу гликелирования, т.е. окисления белков глюкозой и связывает образующиеся при гликолизе протоны (Pepper et al., 2010). Он выполняет роль внутриклеточного pH-буфера, что указывает на способность пептида проникать внутрь клеток через их мембраны (Boldyrev et al., 2013). L-карнозин действует в организме хелатором тяжелых металлов (свинец, ртуть, мышьяк, кадмий), которые являются ферментными ядами, а также защищает клетки от прооксидантных металлов (железа, меди, цинка), вызывающих разрушение клеточных мембран (Berezhnoy et al., 2019).

В контексте исследования L-карнозина в качестве криопротектора важно отметить его функции в центральных обонятельных структурах. Так, выявлена совместная локализация возбуждающего медиатора — глутамата и L-карнозина в пресинаптических терминалах в обонятельных нейронах, что может улучшать функционирование глутаматергических рецепторных механизмов (Sassoe-Pognetto et al., 1993; Bonfanti et al., 1999). Экзогенная аппликация L-карнозина на обонятельные нейроны приводила к снижению их гибели за счет действия на глутаматергическую систему и митохондриальную биоэнергетику клеток (Ouyang et al., 2016).

Колокализация L-карнозина и глутамата в пресинапсах обонятельных нейронов привела к гипотезе, что L-карнозин является основным нейротрансмиттером в обонятельных структурах (Tiedje et al., 2010). Однако она не подтвердилась (Bonfanti et al., 1999; De Marchis et al., 2000). Вместе с тем, выявлено, что L-карнозин, выделяясь из пресинапсов во внеклеточное пространство в обонятельной коре, действует, как объемный медиатор паракринно, воздействуя на окружающие клетки и способствуя их активации, за-

щает от действия стресс-факторов (Мокрушин, Плеханов, 2001).

Обнаружено, что L-карнозин модулирует глутаматергическую медиаторную систему в центральной нервной системе и в микромолярных концентрациях активирует AMPA и NMDA-зависимые механизмы (Khama-Murad et al., 2008).

Особый интерес представляют результаты исследований протективного потенциала L-карнозина. В условиях развития ишемического и геморрагического поражения мозговых структур L-карнозин проявил себя эффективным протектором нервных клеток (Zemke et al., 2005; Khama-Murad et al., 2011; Zhang et al., 2011; Bae, Majid, 2013; Lopachev et al., 2017, 2020; Стволинский и др., 2017). Выявлено протективное действие L-карнозина на такие нейродегенеративные заболевания, как болезнь Альцгеймера, Паркинсона и др. (Solana-Manrique et al., 2022).

Таким образом, представленные данные доказывают, что L-карнозин является мультипотентным эффективным протектором и нейромодулятором в нормальных условиях в структурах нервной системы. В связи с этим мы предположили, что обладая протективным потенциалом, L-карнозин может выполнять функцию криопротектора в нервной ткани в процессе КС. Для того чтобы проверить эту гипотезу, мы исследовали эффекты экзогенной аппликации L-карнозина на экспериментальной модели — переживающих срезах обонятельной коры мозга крыс.

Срезы головного мозга являются оптимальными экспериментальными объектами для разработки протоколов, методов КС и поиска криопротекторов. Они позволяют изучать восстановление активности не только нейронов, но и синаптических механизмов при КС. Удалось обнаружить, что при медленных скоростях охлаждения срезов обонятельной коры (0.1–0.125°C/мин) до 16°C активность таких ионотропных глутаматергических рецепторных механизмов, как α -амино-3-гидрокси-5-метилизоксазол-4-пропионовая кислота (AMPA) и N-метил-D-аспартата (NMDAR) сохранялись (Mokrushin et al., 2014). В дальнейших исследованиях была выявлена различная устойчивость AMPAR и NMDAR к замораживанию—отогреванию срезов головного мозга при низкотемпературном КС (–10°C, 52 дня). AMPAR в этих условиях сохранялись и усиливались, а процессы NMDAR, наоборот, подавлялись и блокировались, что указывало на значительное (необратимое) нарушении их функций (Мокрушин, 2016, 2020; Мокрушин, Боровиков, 2017). Эти результаты принципиальны, поскольку NMDAR являются ключевыми в глутаматергической медиаторной системе головного мозга, участвуют в обучении, формировании памяти, а также в развитии различных невропатологий (эпилепсии, инсульта, травмы и др.) (Obrenovitch, Urenjak, 1997). Поскольку NMDAR являются наиболее уязвимыми механизмами при действии долговременного КС, в настоящей работе мы

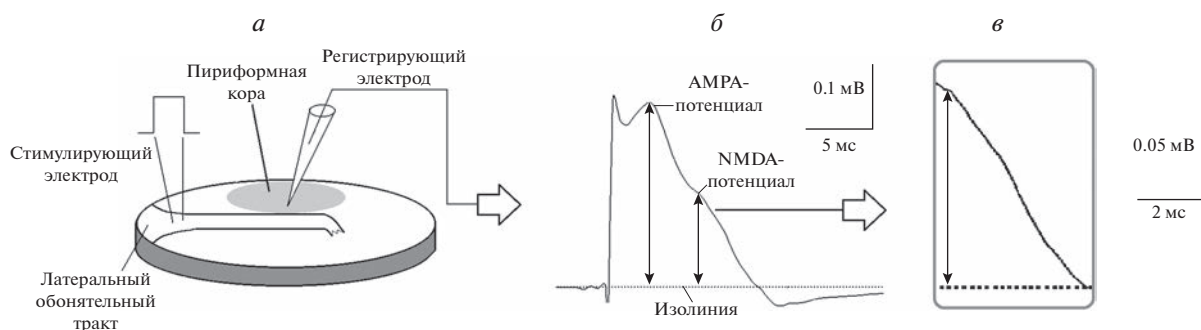


Рис. 1. Схема экспериментальной модели для изучения криопротекторных характеристик L-карнозина (20 мМ). *а* — Схема среза обонятельной коры мозга крыс с основными морфологическими структурами и локализацией стимулирующего и регистрирующего электродов. *б* — Суммарный потенциал, регистрируемый в срезе в ответ на электрическую стимуляцию латерального обонятельного тракта с указанием постсинаптических компонентов: раннего AMPA-потенциала и позднего NMDA-потенциала (мкВ). *в* — NMDA-потенциал (в увеличенном масштабе), являющийся индикатором активности NMDAR; в работе изучали только изменения NMDA-потенциалов при действии L-карнозина в процессе криосохранения; штрих-линия представляет изолинию; вертикальная стрелка показывает способ измерения амплитуд NMDA-потенциала. Калибровка указана.

сосредоточились на исследовании эффектов карнозина на эти рецепторные механизмы. Срезы обонятельной коры мозга крыс преинкубировали в растворе с L-карнозином в концентрации 20 мМ, замораживали в нем до -10°C , хранили при этой температуре в течение 30 сут, затем отогревали до 37°C и регистрировали изменения активности NMDAR до и после КС.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДИКА

Животные. Все эксперименты проводили на белых крысах-самцах линии Wistar массой 180–200 г. Использовали 20 животных, которых содержали в помещении вивария Института физиологии им. И.П. Павлова РАН при свободном доступе к воде и пище с 12-часовым циклом ночь/день. Эксперименты с животными проводили в соответствии с рекомендациями по этике, предложенными Директивой Совета Европейских сообществ (86/609 ЕЕС).

Приготовление срезов. Исследования проведены на тангенциальных срезах обонятельной коры головного мозга крыс-самцов толщиной 400–500 мкм. Срезы мозга включают нейроны пириформной коры, глутаматергические синапсы и проводящие нервные волокна латерального обонятельного тракта (ЛОТ) (рис. 1*а*). Приготовление срезов происходило следующим образом. Крыс декапитировали при помощи гильотины. Хирургическими инструментами извлекали головной мозг и помещали его на фильтровальную бумагу, покрывающую металлический столик, охлажденный до 4°C . При помощи специального резака (Митюшов и др., 1986; Мокрушин, 1997) готовили срезы обонятельной коры мозга. Кисточкой срез переносили в стеклянный флакон с искусственным цереброспинальным раствором (ИЦР; состав в мМ: 124 NaCl, 5 KCl, 2.6 CaCl₂, 1.24 KH₂PO₄, 1.2 MgSO₄, 3 NaHCO₃, 10 глюкозы; pH 7.3 при 37°C) объемом 1 мл. Длительность всей

процедуры приготовления среза от момента декапитации до помещения его во флакон с раствором составляла 1–1.5 мин. Газовую атмосферу над жидкостью со срезом в течение 1 мин заменяли на кислород. Флакон со срезом устанавливали в аппарат Варбурга (Германия) с частотой качаний 120 за 1 мин при температуре 37°C .

Определение активности NMDAR. Срезы предварительно инкубировали в течение 1 ч аэрированным ИЦР. После этого срезы один за другим переносили в регистрационную камеру электрофизиологической установки (Мокрушин, Боровиков, 2017), непрерывно перфузировали ИЦР со скоростью 2.0 мл/мин и регистрировали активность NMDA-потенциалов. В ответ на электрическую стимуляцию ЛОТ в нормотермических условиях внеклеточно регистрируются фокальные потенциалы (ФП), которые отражают суммарную активность нейронов пириформной коры и волокон ЛОТ. Без стимуляции ЛОТ спонтанная активность в срезах не регистрируется. ФП является многокомпонентным потенциалом, состоящим из пресинаптического компонента, который отражает активность проводящих волокон ЛОТ — суммарный потенциал действия (ПД-ЛОТ) и постсинаптических компонентов, которые отражают активацию глутаматергических ионотропных рецепторов — альфа-амино-3-гидрокси-5-метилизоксало-4-пропионовой кислоты (AMPA) и *N*-метил-D-аспартата (NMDAR) (рис. 1*б*). В настоящей работе изучали изменения только активности NMDAR в виде NMDA-потенциалов (рис. 1*в*). Эти потенциалы фармакологически идентифицированы ранее в нормотермических условиях при аппликации на срезы специфического антагониста D-APV (50 мкМ) (Мокрушин, 1997; Mokrushin, Pavlinova, 2013). В срезах регистрировали амплитуды NMDA-потенциалов (мкВ) стеклянными микроэлектродами, заполненными 1 М NaCl, с сопротивлением 1–5 МОм. Эти потенциалы регистрировали в ответ на электрические импульсы

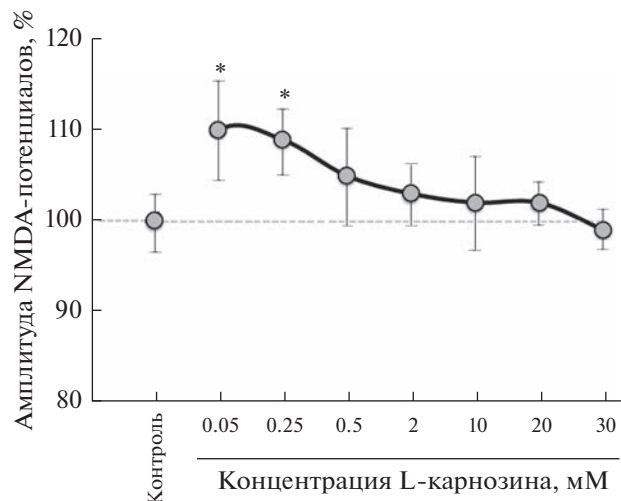


Рис. 2. Дозо-зависимое действие экзогенной аппликации *L*-карнозина в разной концентрации на амплитуду NMDA-потенциалов в срезах обонятельной коры крыс. Ось абсцисс — шкала неравномерная. Каждая концентрация *L*-карнозина тестировалась на отдельной группе срезов ($n = 12$ для каждой концентрации). Штриховая линия — амплитуда NMDA-потенциала в срезах в контроле без аппликации *L*-карнозина (100%). * Различия амплитуды NMDA-потенциалов по сравнению с контрольными значениями достоверны при $P \leq 0.05$ (непараметрический *U*-критерий Вилкоксона–Манна–Уитни).

ЛОТ от электростимулятора (ЭСУ-1, Россия) прямоугольной формы, длительностью 0.1 мс, интенсивностью 1–3 В и частотой 0.003 Гц при 37°C в течение 20 мин. Регистрацию проводили в проточной камере электрофизиологической установки (Мокрушин, Боровиков, 2017) с использованием усилителя (НТО, Россия). Потенциалы оцифровывали аналого-цифровым прибором (Е 20–10, Россия) и обрабатывали с помощью компьютерной программы “Анализ электрической активности нейронов” (Институт физиологии им. И.П. Павлова РАН, Россия).

Измерение pH среды. Измерение pH ИЦР со срезов до и после КС с использованием *L*-карнозина осуществляли с помощью pH-метра Seven Compact S220 (Mettler Toledo, США). Значения pH определяли с точностью до 0.1. Температуру среды со срезами до и после замораживания при регистрации NMDA-потенциалов измеряли с помощью прибора “Измеритель пид-регулятор ТРМ12” (Россия).

Определение содержания воды в срезах. Содержание воды определяли путем измерения веса срезов до и после воздействия КС. Срезы после предварительной инкубации в контрольной среде (без *L*-карнозина) помещали на фильтровальную бумагу и быстро удаляли избыток жидкости, не удаляя воду из ткани. Затем срезы взвешивали на торсионных весах ВТ-500 (Россия), полученные значения весов обозначали как M_k (контрольные, мг). После КС срезы снова высушивали в сушильном шкафу при 85°C в течение 5 ч, охлаждали в эксикаторе, повторно взвешивали,

вес обозначали как $M_{вс}$ (мг). Содержание воды в срезах определяли в мг по формуле: $S_v = (M_k - M_{вс}) / M_{вс}$ где: S_v — содержание воды в срезах после КС, M_k — вес контрольных срезов до КС, $M_{вс}$ — вес высушенных срезов после КС.

Протокол криосохранения срезов с *L*-карнозином проводили в следующей последовательности. Срезы в течение 20 мин перфузировали ИЦР (солевой состав см. выше) в проточной камере электрофизиологической установки (Мокрушин, Боровиков, 2017) и регистрировали амплитуды NMDA-потенциалов (мкВ). Полученные значения амплитуд NMDA-потенциалов рассматривали как контрольные перед замораживанием и принимали за 100%. Затем срезы перфузировали ИЦР (того же состава) с добавлением *L*-карнозина до концентрации 20 мМ в течение 20 мин и регистрировали NMDA-потенциалы. Далее срезы замораживали в растворе ИЦР при медленной скорости (0.1°C/мин) до –10°C и хранили в морозильнике термостата “ThermoStat plus” (Eppendorf, Германия). Через 30 сут КС срезы отогревали до 37°C с такой же скоростью (0.1°C/мин), при этом солевой состав среды и концентрация *L*-карнозина не менялись. Вновь регистрировали NMDA-потенциалы и выражали их в % по отношению к значениям до замораживания. Во время отогревания NMDA-потенциалы регистрировали в диапазоне температур от 5°C до 37°C.

Химические реактивы для приготовления растворов были приобретены в фирме Химреактив (Россия), *L*-карнозин — у Sigma (США).

Статистическую обработку изменения амплитуд NMDA-потенциалов проводили с использованием непараметрического параметра Вилкоксона–Манна–Уитни (*U*-критерия). Цифровые данные выражали средним значением и его стандартной ошибкой. Различия считали достоверными при уровне статистической значимости $P \leq 0.05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Нейротропное действие *L*-карнозина на активность NMDAR. Для выяснения протективного эффекта *L*-карнозина в процессах криосохранения нервной ткани представляется важным определить нейротропные эффекты его экзогенной аппликации в отношении активности NMDAR. Это необходимо для определения оптимальной концентрации *L*-карнозина для последующего использования его в качестве криопротектора. Активность NMDAR оценивали по амплитуде NMDA-потенциалов. Каждую концентрацию *L*-карнозина тестировали на отдельной группе срезов. Результаты исследований представлены на рис. 2.

Зависимость амплитуд NMDA-потенциалов от концентрации экзогенного *L*-карнозина была нелинейной. Малые концентрации дипептида (0.05, 0.25 мМ) вызывали увеличение NMDA-потенциалов. *L*-кар-

нозин в концентрации 0.5–2 мМ также индуцировал возрастание амплитуды NMDA-потенциалов, но эти изменения были статистически недостоверными по сравнению с контрольными значениями. В диапазоне концентраций экзогенного L-карнозина 10–30 мМ амплитуда NMDA-потенциалов не отличалась от контрольных значений.

Представленные результаты соответствуют ранним данным в том, что микромолярные концентрации L-карнозина активируют NMDA-потенциалы (Khama-Murad et al., 2008).

На основе полученных результатов для последующего изучения протективных свойств L-карнозина была выбрана концентрация 20 мМ как наиболее стабильная (в диапазоне 10–30 мМ) по действию на NMDA-потенциалы.

Действие L-карнозина на pH замораживающей среды до и после КС. В предыдущей работе было обнаружено, что после КС срезов мозга замораживающая среда закислялась до pH 6.5 и при этом амплитуды NMDA-потенциалов значительно редуцировались или блокировались; использование гибридной буферной системы из карбонатной (NaHCO_3), фосфатной (KH_2PO_4) и трис(гидроксиметил)аминометановой ($(\text{HOCH}_2)_3\text{CNH}_2$), а также увеличение pH среды до 7.6–7.7 в процессе замораживания срезов способствовало сохранению амплитуды NMDA-потенциалов после КС (Мокрушин, 2022). В связи с этим возник вопрос, как “справится” L-карнозин с изменением pH замораживающего раствора после КС? Для ответа на этот вопрос срезы инкубировали в замораживающем растворе в течение 20 мин при температуре 37°C с L-карнозином (20 мМ) до и после КС. Полученные данные сравнивали со значениями pH в растворе инкубации срезов без L-карнозина и замораживания (контроль).

Добавление L-карнозина в замораживающий раствор до КС не влияло на pH раствора, но приводило к увеличению pH этого раствора после КС до pH 7.4 (рис. 3). Отметим, что такое повышение pH не критично и находится в оптимальном диапазоне для функционирования NMDAR (pH 7.2–7.4, на рис. 3 отмечен серым фоном).

Этот вывод подтверждается измерением амплитуд NMDA-потенциалов до и после КС. Так, амплитуда NMDA-потенциалов до КС составляла 129 ± 8 мкВ, а после КС и последующего отогревания составляла 118 ± 10 мкВ. Статистически эти значения не отличались от значений до КС ($P \geq 0.05$, $U = 29$, $n = 7$).

Таким образом, L-карнозин “справляется” с регуляцией pH замораживающего раствора и проявляет характеристики криопротектора.

Влияние L-карнозина на содержание воды в срезах до и после КС. Процесс дегидратации–гидратации нервных клеток и межклеточного пространства является важным вопросом в сохранении жизнеспособности структур нервной ткани после КС. Этот

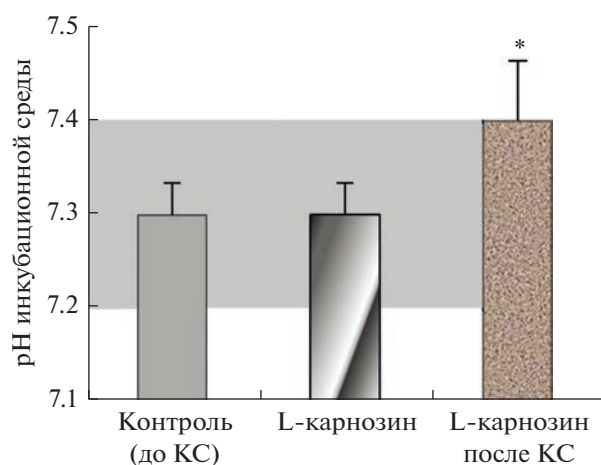


Рис. 3. Действие экзогенного L-карнозина (20 мМ) на pH замораживающего раствора до и после криоконсервации (КС). Серым фоном отмечены оптимальные диапазоны pH (pH 7.2–7.4), при которых стабильно сохраняются амплитуды NMDA-потенциалов ($n = 7$). * – Отличия значений pH замораживающего раствора с 20 мМ карнозина после КС от значений pH раствора без карнозина до КС (контроль) достоверны при $P \leq 0.05$ (непараметрический U-критерий Вилкоксона–Манна–Уитни).

вопрос был изучен в специальной серии экспериментов. Исследовали изменение содержания воды (набухание) в срезах после повторного отогревания срезов от -10 до 37°C . Методика измерения содержания воды в срезах и расчеты подробно описаны в разделе “Материал и методика”.

Вес срезов после КС без добавления L-карнозина в замораживающий раствор увеличивался в среднем на $20 \pm 7\%$ по сравнению с контрольными значениями (рис. 4). Эти данные указывают на усиление гидратации ткани срезов (набухание), что может оказать негативное влияние на функционирование NMDA-зависимых механизмов. Измерение амплитуд NMDA-потенциалов подтвердило такое предположение. Так, амплитуда NMDA-потенциала уменьшалась после КС без L-карнозина и составляла 16 ± 5 мкВ против 128 ± 10 мкВ до КС ($P \leq 0.05$, $U = 7$, $n = 12$).

Степень гидратации срезов значительно снижалась при добавлении L-карнозина (20 мМ) в замораживающий раствор (рис. 4). После КС вес срезов незначительно увеличивался ($108 \pm 6\%$ против 100% в контроле, $P > 0.05$, $U = 7$, $n = 16$). Однако такие изменения гидратации срезов в присутствии L-карнозина в замораживающем растворе способствовали сохранению NMDA-потенциалов после КС. Амплитуда NMDA-потенциалов до КС составляла 134 ± 11 мкВ, а после КС – 124 ± 10 мкВ. Статистически эти значения не отличались от значений до КС ($P \leq 0.05$, $U = 27$, $n = 12$).

Таким образом, L-карнозин в замораживающем растворе после КС уменьшал гидратацию срезов и способствовал сохранению активности NMDA-за-

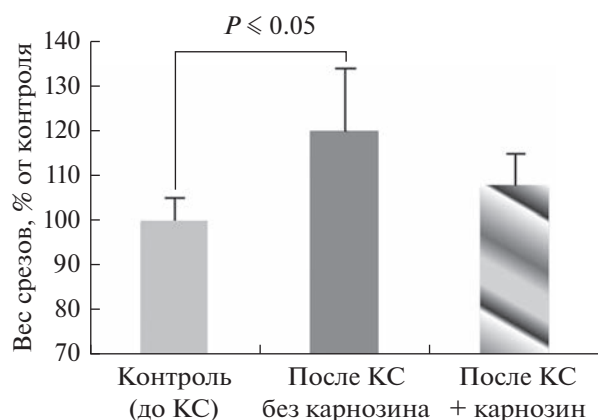


Рис. 4. Действие L-карнозина (20 мМ) на изменение содержания воды (набухание) в срезах мозга, определяемому по их весу, в процессе КС. Для каждой группы измерений $n = 5$. Различия величин амплитуд NMDA-потенциалов до КС (контроль) и после КС без L-карнозина достоверны при $P \leq 0.05$ (непараметрический U -критерий Вилкоксона–Манна–Уитни).

висимых механизмов. Следовательно, экзогенный L-карнозин проявляет свойства криопротектора.

Действие L-карнозина (20 мМ) на изменения NMDA-потенциалов при отогревании срезов после КС. На основании приведенных выше данных о криопротекторных свойствах L-карнозина мы исследовали динамику изменений амплитуд NMDA-потенциалов в процессе отогревания срезов после КС при добавлении L-карнозина и сравнили с аналогичным процессом без L-карнозина.

В контрольных экспериментах без использования L-карнозина амплитуда NMDA-потенциалов изменялась куполообразно в процессе отогревания срезов с медленной скоростью ($0.1^\circ\text{C}/\text{мин}$) (рис. 5). При 5°C амплитуда NMDA-потенциалов была ниже контрольного значения (до замораживания) и составляла $97 \pm 3\%$. Дальнейшее отогревание срезов приводило к увеличению амплитуды NMDA-потенциалов с максимумом в диапазоне температур от 21 до 26°C (137 ± 4 и $139 \pm 5\%$ соответственно). Затем активность амплитуды NMDA-потенциалов резко снижалась и при 37°C составляла $37 \pm 4\%$ от значений до КС (рис. 5).

Полученные данные свидетельствуют о гиперактивации NMDA-зависимых механизмов при отогревании без L-карнозина с медленной скоростью $0.1^\circ\text{C}/\text{мин}$ в диапазоне температур от 10 до 26°C . Куполообразная кривая указывает на развитие процесса эксайтотоксичности, которая связана с усиленным выделением возбуждающего медиатора глутамата из пресинапсов и активацией постсинаптических глутаматных рецепторов. Затем интенсифицируется поток ионов кальция внутрь клеток, что приводит к нарушению нормального функционирования клеток, а при глубокой гипотермии и последующем отогревании — эксайтотоксическую гибель нейронов (Warren et al.,

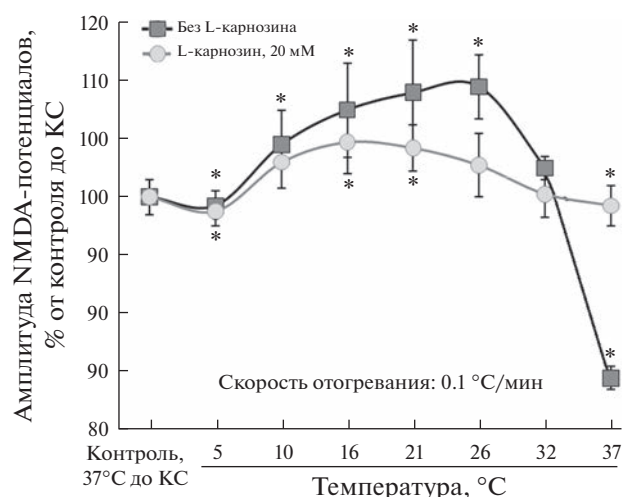


Рис. 5. Динамика изменений амплитуд NMDA-потенциалов при отогревании после предварительной обработки срезов L-карнозином (20 мМ). По оси абсцисс — температура замораживающего раствора при отогревании, при которой измеряли амплитуду NMDA-потенциалов, $^\circ\text{C}$ (шкала неравномерная; $n = 9$). Скорость отогревания: $0.1^\circ\text{C}/\text{мин}$. * Отличия амплитуды NMDA-потенциалов от контрольных значений достоверны при $P \leq 0.05$ (непараметрический U -критерий Вилкоксона–Манна–Уитни).

2012). В результате амплитуда NMDA-потенциалов редуцируется ниже значений до КС и на данной экспериментальной модели наблюдается нарушение функционирования NMDAR. Следовательно, КС срезов с медленной скоростью ($0.1^\circ\text{C}/\text{мин}$) замораживания—отогревания без L-карнозина не способствует сохранению значений NMDAR, которые были до КС.

Добавление L-карнозина (20 мМ) в замораживающий раствор также сопровождалось куполообразной формой изменений амплитуды NMDA-потенциалов, но при этом значительно снижались амплитудные характеристики этой кривой (рис. 5). Только в диапазоне температур от 16°C до 21°C значения амплитуды NMDA-потенциалов (120 ± 5 и $118 \pm 7\%$ соответственно) превышали контрольные до КС. При дальнейшем увеличении температуры в интервале от 26 до 37°C значения амплитуды NMDA-потенциалов не отличались от контрольного уровня до КС (рис. 5).

Полученные данные указывают на то, что L-карнозин ингибирует развитие глутаматной эксайтотоксичности в срезах мозга в процессе КС и способствует сохранению нормального функционирования NMDA-механизмов как наиболее уязвимых к действию замораживания—отогревания.

ОБСУЖДЕНИЕ

В настоящей работе мы впервые представили характеристики L-карнозина как криопротектора для

нервной ткани теплокровных негиберирующих животных в процессе длительного КС.

Дипептид как криопротектор имеет несомненное преимущество по сравнению с часто используемыми токсичными криопротекторами ДМСО и этиленгликолем. В отличие от них, L-карнозин имеет эндогенное происхождение, не токсичен и обладает высокой биосовместимостью. Для того чтобы доказать криопротекторные свойства L-карнозина, мы исследовали его эффекты в отношении сохранения активностей NMDAR как наиболее уязвимых механизмов нервной ткани при длительном КС.

При интерпретации протективных свойств L-карнозина после КС следует принять во внимание весь спектр полученных данных. Во-первых, дипептид оптимизировал pH замораживающего раствора после КС и тем самым сохранял активность NMDA. Кроме того, фактором, усиливающим протективный эффект L-карнозина, было использование гибридной буферной системы — карбонатной (NaHCO_3), фосфатной (KH_2PO_4) и трис(гидроксиметил)аминометановой ($(\text{HOCH}_2)_3\text{CNH}_2$), — что также улучшает активности NMDA механизмов (Мокрушин, 2022).

Во-вторых, L-карнозин способствовал дегидратации срезов. Это важно, поскольку свободная вода является причиной разрушения клеточных мембран кристаллами льда при 4°C как в процессе, так и после КС при отогревании.

Положительной характеристикой L-карнозина, как криопротектора, является отсутствие у него токсичности, поскольку он эндогенного происхождения. Пептид метаболизируется в организме на β -аланил и L-гистидин, участвующих в других процессах. По этой характеристике он превосходит такие часто используемые криопротекторы, как ДМСО и этиленгликоль. Они являются токсичными, плохо выводятся из клеток и их применение на нервной ткани вызывает необратимые повреждения нейронов (Пичугин, 2013).

Очевидно, что L-карнозин является проникающим криопротектором (Matsumura et al., 2021), поскольку установлено, он может активно транспортироваться через клеточные мембраны рядом белков из семейства протонно-связанных олигопептидных переносчиков (POT), также белков SLC15 и внутри клеток дипептид действует как pH-буфер (Boldyrev et al., 2013) тем самым увеличивается протективный потенциал пептида.

Возникает вопрос, почему в настоящей работе была использована концентрация L-карнозина 20 мМ, десятикратно превышающая его содержание в обонятельной луковице (1–2 мМ). Стратегия нашего выбора основана на том, чтобы L-карнозин действовал не только как проникающий, но и как внешний криопротектор. Для этого увеличили концентрацию экзогенного дипептида, поскольку он распадается под действием CNDP1 и цитозольной CNDP2 (Teufel et al., 2003). Кроме того, мы полагали,

что L-карнозин будет проявлять свои другие положительные характеристики — антиоксиданта, ингибитора процесса гликелирования и связывания образующихся при гликолизе протонов. Эти способности L-карнозина также могут усилить его криопротекторные свойства.

Таким образом, результаты проведенных исследований доказывают, что дипептид L-карнозин может рассматриваться как нетоксичный криопротектор в срезах мозга теплокровных негиберирующих животных. Экзогенный L-карнозин оптимизировал pH замораживающего раствора после КС. Он способствовал дегидратации избыточной свободной воды из срезов. L-карнозин ингибировал развитие глутаматной эксайтотоксичности в срезах мозга в процессе КС и способствовал сохранению нормального функционирования NMDA-механизмов как наиболее уязвимых механизмов при замораживании—отогревании.

Для нервной системы теплокровных эти данные получены впервые. Подтверждением результатов наших исследований являются данные об участии карнозина как криопротектора в репродуктивной системе животных. Установлено, что карнозин присутствует в семенной плазме нескольких видов организмов (Boldyrev et al., 2013) и может быть ключевым фактором устойчивости сперматозоидов к КС. Такое предположение подтвердилось в работе, в которой определяли концентрации эндогенного карнозина, присутствующего в семенной плазме жеребцов, и сопоставляли эти результаты с подвижностью сперматозоидов и окислительным статусом при КС. Удалось обнаружить, что более высокие концентрации эндогенного карнозина способствовали более высокой толерантности сперматозоидов к охлаждению и КС. В тех образцах семенной плазмы, в которых уровень карнозина был низкий, наблюдали значительное снижение активности сперматозоидов после КС. Авторы обнаружили, что дипептид способствовал ингибированию окислительного стресса во время КС, действуя как хелатор малонового диальдегида (Rocha et al., 2018).

В другой работе применяли экзогенный карнозин и его аналог ансерин, у которого в гетероцикле гистидина водород замещён на метильную группу. Эякуляты сперматозоидов японского перепела инкубировали *in vitro* и отдельно апплицировали на них эти дипептиды. Суспензии инкубировали при 15°C в течение 12 сут. Выявили, что оба дипептида улучшали параметры подвижности сперматозоидов после КС (Sarkar et al., 2021).

Таким образом, приведенные выше данные доказывают, что как эндогенный, так и экзогенный карнозин, работает в качестве криопротектора и в других тканях организма и можно предположить, что карнозин является универсальным криопротектором. Важно отметить, что аналог карнозина также обладает криопротективным потенциалом.

Мы полагаем, что полученные данные могут стать основой для разработки терапевтических препаратов на основе L-карнозина для применения его в качестве нетоксичного эндогенного криопротектора для нервной ткани.

БЛАГОДАРНОСТИ

Автор признателен Г.П. Смирновой за помощь в проведении экспериментов и С.Е. Боровикову за техническую помощь в настройке и обслуживании электрофизиологической установки.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

В работе с животными были соблюдены все международные и национальные инструкции Института физиологии им. И.П. Павлова РАН по уходу и использованию животных в эксперименте, а также рекомендации по этике, предложенные Директивой Советом Европейских сообществ (86/609 ЕЕС).

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Автор заявляет об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Митюшов М.И., Емельянов Н.А., Мокрушин А.А., Войнер И.А., Багаева Т.Р. 1986. Переживающий срез мозга как объект нейрофизиологического и нейрохимического исследования. Л.: Наука. 127 с. (Mityushov M.I., Emelyanov N.A., Mokrushin A.A., Voiner I.A., Bagaeva T.R. 1986. The surviving slice of the brain as an object of neurophysiological and neurochemical research. L.: Nauka. 127 p.)
- Мокрушин А.А. 1997. Пептид-зависимые механизмы нейрональной пластичности в обонятельной коре. Автореф. докт. дис. СПб. 40 с. (Mokrushin A.A. 1997. Peptide-dependent mechanisms of neuronal plasticity in the olfactory cortex. Thesis Doct. Diss. St. Petersburg. 40 p.)
- Мокрушин А.А. 2016. Эффекты глубокого замораживания и отогревания на ионотропные глутаматергические рецепторные механизмы *in vitro*. Бюлл. exper. биол. мед. Т. 161. С. 36. (Mokrushin A.A. 2016. Effects of deep freezing and rewarming on ionotropic glutamatergic receptor mechanisms *in vitro*. Bull. Exper. Biol. Med. V. 161. P. 36)
- Мокрушин А.А. 2020. Влияние длительности криосохранения на активность ионотропных глутаматергических механизмов исследование *in vitro*. Известия РАН. серия биологическая. 2020. № 1. С. 1–10. (Mokrushin A.A. 2020. The influence of duration cryopreservation on activity of ionotropic glutamatergic mechanisms *in vitro* study. Proceedings of the Russian Academy of Sciences. Biological series. 2020. № 1. P. 1–10).
- Мокрушин А.А. 2022. Улучшение кислотно-щелочного состава среды для длительного и обратимого криосохранения срезов мозга крыс. Цитология. Т. 64. № 1. С. 96. (Mokrushin A.A. 2022. Improvement of the acidbase composition of the environment for long-term and reversible cryopreservation of rat brain slices. Tsitologiya. V. 64. № 1. P. 96.)
- Мокрушин А.А., Боровиков С.Е. 2017. Установка для изучения гипотермических эффектов на переживающих срезах мозга теплокровных. Междунар. журн. прикладных фундам. исследований. Т. 2. С. 214. (Mokrushin A.A., Borovikov S.E. 2017. Device for the study of hypothermic effects on the surviving brain slices of homeotherms. Int. J. Applied Basic Res. V. 2. P. 214.)
- Мокрушин А.А., Плеханов А.Ю. 2001. Иммунологическая идентификация эндогенных пептидов, секретируемых клетками переживающих срезов обонятельной коры мозга крыс. Доклады Академии наук. Т. 378. № 4. С. 567. (Mokrushin A., Plekhanov A.Yu. 2001. Immunological identification of endogenous peptides secreted by surviving slices of rat olfactory cortex. Dokl. Biol. Sci. V. 378. P. 227.)
<https://doi.org/10.1023/a:1019206506211>
- Пичугин Ю.И. 2013. Теоретические и практические аспекты современной криобиологии. М.: Научно-технический центр криобиологии и анабиоза. 60 с. (Pichugin Y.I. 2013. Theoretical and practical aspects of modern cryobiology. M.: Nauchno-Tekhn. Tsentri Kriobiol. Anabioz. 60 p.)
- Стволинский С.Л., Федорова Т.Н., Девятков А.А., Медведев О.С., Белоусова М.А., Рыжков И.Н., Тутельян В.А. 2017. Нейропротективное действие карнозина в условиях экспериментальной фокальной ишемии-реперфузии головного мозга. Журн. неврологии и психиатрии. Т. 12. С. 60. (Stvolinsky S.L., Fedorova T.N., Devyatkov A.A., Medvedev O.S., Belousova M.A., Ryzhkov I.N., Tutelyan V.A. 2017. Neuroprotective effect of carnosine in experimental focal ischemia-reperfusion of the brain. J. Neurol. Psychiatry. V. 12. P. 60.)
- Bae O., Majid A. 2013. Role of histidine/histamine in carnosine-induced neuroprotection during ischemic brain damage. Brain Res. V. 1527. P. 246.
<https://doi.org/10.1016/j.brainres.2013.07.004>
- Berezhnoy D.S., Stvolinsky S.L., Lopachev A.V., Devyatkov A.A., Lopacheva O.M., Kulikova O.I., Abaimov D.A., Fedorova T.N. 2019. Carnosine as an effective neuroprotector in brain pathology and potential neuromodulator in normal conditions. Amino Acids. V. 51. P. 139.
- Boldyrev A.A., Aldini G., Derave W. 2013. Physiology and pathophysiology of carnosine. Physiol. Rev. V. 93. P. 1803.
- Bonfanti L., Peretto P., De M.S., Fasolo A. 1999. Carnosine-related dipeptides in the mammalian brain. Prog. Neurobiol. V. 59. P. 333.
- De Marchis S., Modena C., Peretto P., Migheli A., Margolis F.L., Fasolo A. 2000. Carnosine-related dipeptides in neurons and glia. Biochemistry. V. 65. P. 824.
- Hipkiss A.R., Preston J.E., Himsworth D.T., Worthington V.C., Keown M., Michaelis J., Lawrence J., Mateen A., Allende L., Eagles P.A. 1998. Pluripotent protective effects of carnosine, a naturally occurring dipeptide. Ann. N.Y. Acad. Sci. V. 854. P. 37.
- Ichikawa J., Yamada R.X., Muramatsu R., Ikegaya Y., Matsuki N., Koyama R. 2007. Cryopreservation of granule cells from

- the postnatal rat hippocampus. *J. Pharmacol. Sci.* V. 104. P. 387.
- Khama-Murad A.X., Pavlinova L.I., Mokrushin A.A.* 2008. Neurotropic effect of exogenous L-carnosine in cultured slices of the olfactory cortex from rat brain. *Bull. Exp. Biol. Med.* V. 146. P. 1–3.
<https://doi.org/10.1007/s10517-008-0227-y>
- Khama-Murad A., Mokrushin A., Pavlinova L.* 2011. Neuroprotective properties of L-carnosine in the brain slices exposed to autoblood in the hemorrhagic stroke model in vitro. *Regul. Pept.* V. 167. P. 65.
<https://doi.org/10.1016/j.regpep.2010.11.007>. Epub. 2010 Dec. 9.
- Lopachev A.V., Lopacheva O.M., Akkuratov E.E., Stvolinskii S.L., Fedorova T.N.* 2017. Carnosine protects a primary cerebellar cell culture from acute NMDA toxicity. *Neurochem. J.* V. 11. P. 38.
- Lopachev A.V., Kazanskaya R.B., Khutorova A.V., Fedorova T.N.* 2020. An overview of the pathogenic mechanisms involved in severe cases of COVID-19 infection, and the proposal of salicyl-carnosine as a potential drug for its treatment. *Eur. J. Pharmacol.* V. 886. P. 173457.
<https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2020.173457>
- Matsumura K., Hayashi F., Nagashima T.* 2021. Molecular mechanisms of cell cryopreservation with polyampholytes studied by solid-state NMR. *Commun. Materials.* V. 2. P. 116.
- Mokrushin A.A., Pavlinova L.I.* 2013. Effects of the blood components on the AMPA and NMDA synaptic responses in brain slices in the onset of hemorrhagic stroke. *Gen. Physiol. Biophys.* V. 32. P. 489.
- Mokrushin A.A., Pavlinova L.I., Borovikov S.E.* 2014. Influence of cooling rate on activity of ionotropic glutamate receptors in brain slices at hypothermia. *J. Therm. Biol.* V. 44. P. 5.
- Obrenovitch T.P., Urenjak J.* 1997. Altered glutamatergic transmission in neurological disorders: from high extracellular glutamate to excessive synaptic efficacy. *Progress Neurobiol.* V. 51. P. 39.
- Ouyang L., Tian Y., Bao Y., Xu H., Cheng J., Wang B., Shen Y., Chen Z., Lyu J.* 2016. Carnosine decreased neuronal cell death through targeting glutamate system and astrocyte mitochondrial bioenergetics in cultured neuron/astrocyte exposed to ogd/recovery. *Brain Res. Bull.* V. 124. P. 76.
- Pepper E.D., Farrell M.J., Nord G., Finkel S.E.* 2010. Antiglycation effects of carnosine and other compounds on the long-term survival of escherichia coli. *Appl. Env. Microbiol.* V. 76. P. 7925.
- Rocha C.C., Kawai G.K.V., de Agostini L. J.D., Angrimani D., Rui B.R., de Cássia B.L., da Silva B., Alonso M.A., Mendes C.M.* 2018. Carnosine as malondialdehyde scavenger in stallion seminal plasma and its role in sperm function and oxidative status. *Theriogenol.* V. 119. P. 10.
- Sarkar P.K., Egusa A., Matsuzaki M., Sasanami T.* 2021. Effect of anserine and carnosine on sperm motility in the Japanese quail. *J. Poult. Sci.* V. 58. P. 186.
- Sassoe-Pognetto M., Cantino D., Panzanelli P., Verdundi C.L., Giustetto M., Margolis F.L., De B.S., Fasolo A.* 1993. Presynaptic co-localization of carnosine and glutamate in olfactory neurones. *Neuroreport.* V. 5. P. 7.
- Solana-Manrique C., Sanz F.J., Martínez-Carrión G., Paricio N.* 2022. Antioxidant and neuroprotective effects of carnosine: therapeutic implications in neurodegenerative diseases. *Antioxidants.* V. 11. P. 848.
- Teufel M., Saudek V., Ledig J.P., Bernhardt A., Boularand S., Carreau A., Cairns N.J., Carter C., Cowley D., Duverger D.* 2003. Sequence identification and characterization of human carnosinase and a closely related non-specific dipeptidase. *J. Biol. Chem.* V. 278. P. 6521.
- Tiedje K., Stevens K., Barnes S., Weaver D.* 2010. Beta-alanine as a small molecule neurotransmitter. *Neurochem. Int.* V. 57. P. 177.
- Warren D., Bickler P., Clark J., Gregersen M., Brosnan H., McKleroy W., Gabatto P.* 2012. Hypothermia and rewarming injury in hippocampal neurons involves intracellular Ca^{2+} and glutamate excitotoxicity. *Neurosci.* V. 207. P. 316.
<https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2011.12.034>. Epub. 2012 Jan. 12.
- Zhang X., Song L., Cheng X., Yang Y., Luan B., Jia L., Xu F., Zhang Z.* 2011. Carnosine pretreatment protects against hypoxia-ischemia brain damage in the neonatal rat model. *Eur. J. Pharm.* V. 667. P. 202.
- Zemke D., Krishnamurthy R., Majid A.* 2005. Carnosine is neuroprotective in a mouse model of stroke. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* V. 25. P. S313.

Cryoprotective Characteristics of L-Carnosine Dipeptide (β -Alanyl-L-Histidine)

A. A. Mokrushin*

Pavlov Institute of Physiology of the Russian Academy of Sciences, Saint Petersburg, 199034 Russia

**e-mail: mok@inbox.ru*

The dipeptide (β -alanyl-L-histidine) is found in significant amounts in the muscles and brain of mammals, especially in the olfactory structures. L-Carnosine exhibits many protective effects when exposed to various cytotoxic factors on cells. We used slices of the rat olfactory cortex to study the cryoprotective characteristics of L-carnosine during cryopreservation (CP). Changes in the activity of N-methyl-D-aspartate receptors (NMDAR) were analyzed during registration of NMDA potentials induced by electrical stimulation of the lateral olfactory tract. Brain slices were preincubated with L-carnosine (20 mM) in solution, frozen (-10°C), and after a long CP (30 days) they were warmed up to 37°C and changes in the amplitudes of NMDA potentials were determined. It was found that the dipeptide optimized the pH of the freezing solution after CP and retained the activity of NMDAR, determined by the

amplitude of NMDA potentials. L-Carnosine after CP contributed to the dehydration of excess free water from the slices. The dipeptide inhibited the development of glutamate excitotoxicity in brain slices during CP and maintained normal NMDAR functioning. The data obtained prove that L-carnosine exhibits the properties of an endogenous cryoprotector in the nervous tissue.

Keywords: L-Carnosine, cortical slices, NMDA receptors, focal potentials, freezing/thawing, cryopreservation