

ВЛИЯНИЕ ЭКСТРАКТОВ КОРНЯ И НАДЗЕМНОЙ ЧАСТИ АСТРАГАЛА ПЕРЕПОНЧАТОГО (*ASTRAGALUS MEMBRANACEUS* (FISH.) BUNGE) НА НЕКОТОРЫЕ МЕХАНИЗМЫ ДЕСТРУКТИВНЫХ ПРОЦЕССОВ, ПРОТЕКАЮЩИХ В НЕЙРОНАХ

Л. В. Шурыгина, А. А. Кравцов, Э. И. Злищева, Т. В. Андросова, Л. И. Злищева, Н. Н. Лобова

Кубанский государственный университет

Поступила в редакцию 20.06.2014 г.

Аннотация. Исследовано влияние экстрактов корня и надземной части астрагала перепончатого (АП) на уровень внутриклеточного кальция при эксайтотоксическом действии глутамата и выживаемость нейронов при низкокалиевом апоптозе. Установлено, что экстракты корня и надземной части АП увеличивают выживаемость нейронов мозжечка в низкокалиевой среде, индуцирующей апоптоз, снижают внутриклеточный уровень Ca^{2+} в условиях нейротоксического действия глутамата. Наиболее выраженный эффект на уровень Ca^{2+} оказывает экстракт корня АП. По-видимому, нейропротекторный эффект экстрактов корня и надземной части АП может быть связан со стабилизацией кальциевого гомеостаза нейронов.

Ключевые слова: астрагал перепончатый, нейроны мозжечка, низкокалиевый апоптоз, глутаматная эксайтотоксичность, кальций.

Abstract. The effect of the aerial part and root extracts of *Astragalus membranaceus* (AM) at the level of intracellular calcium under glutamate excitotoxicity and neuronal survival in low-potassium apoptosis. Found that extracts of roots and aerial parts AM increase cerebellar neuronal survival in low-potassium medium, inducing apoptosis, reduces intracellular Ca^{2+} levels under glutamate neurotoxicity. The most pronounced effect on the level of Ca^{2+} has a root extract AM. Apparently, that neuroprotective effect of the aerial parts and root extracts of AM can be connected with the stabilization of neuronal calcium homeostasis.

Keywords: *Astragalus membranaceus*, cerebellar neurons, low-potassium apoptosis, glutamate excitotoxicity, calcium.

По данным Всемирной организации здравоохранения, ежегодно в мире регистрируется 15–20 млн новых случаев инсультов, при этом более 80% выживших больных остаются инвалидами. В виду этого ишемическое повреждение головного мозга является важной медико-социальной проблемой, успешной решение которой позволит повысить эффективность фармакотерапии многих заболеваний человека [1]. В связи с этим представляется весьма важным поиск новых направлений и средств воздействия на различные звенья

данного патологического процесса, а также изучение механизма их действия.

В последнее время наряду с традиционными нейропротекторными лекарственными препаратами, значительное внимание уделяется растительным экстрактам с нейропротекторными свойствами [2]. Среди вышеназванных средств особый интерес представляет астрагал перепончатый (*Astragalus membranaceus* (Fish.) Bunge) - многолетнее травянистое растение семейства Fabaceae. Астрагал перепончатый - традиционное средство народной медицины Китая, Монголии, Тибета. В китайской традиционной медицине его корень уже около 300 лет применяется для лечения постин-

© Шурыгина Л. В., Кравцов А. А., Злищева Э. И., Андросова Т. В., Злищева Л. И., Лобова Н. Н., 2014

сультных больных [3]. Результаты исследований, полученные в последние 10 лет, свидетельствуют о том, что экстракт корня АП и его отдельные компоненты оказывают нейропротекторное действие при моделировании ишемии *in vitro* и *in vivo*. Он является потенциальным нейропротектором при лечении болезни Паркинсона, стимулирует рост периферических нервов, препятствует эксайтотоксичности [4, 5, 6, 7]. Проведенные нами ранее исследования [8, 9] показали, что экстракты и корня, и надземной части АП повышают устойчивость культивируемых нейронов мозга к глутаматной эксайтотоксичности. При этом экстракты корня и надземной части обладают высокой и практически равной эффективностью.

При гипоксии и ишемии мозга ведущим патогенетическим фактором повреждения нейронов является гиперстимуляция нейрональных рецепторов возбуждающими аминокислотами [10, 11]. Токсическое действие возбуждающего медиатора глутамата – «феномен эксайтотоксичности» влечет за собой метаболические, медиаторные и структурные изменения нейронной сети с непрерывным развитием некроза и апоптоза нейронов. Пусковым элементом процесса на пике развития феномена эксайтотоксичности выступает массивное поступление в клетки ионов кальция [12]. С другой стороны, апоптоз может быть вызван снижением внутриклеточной концентрации Ca^{2+} [13]. Таким образом, поддержание кальциевого гомеостаза является крайне важным для выживания нейронов. В связи с этим выяснение воздействия экстрактов АП на гомеостаз Ca^{2+} в клетках представляется весьма актуальным.

Цель работы – изучение влияния экстрактов корня и надземной части астрагала перепончатого на уровень кальция в нейронах мозга при эксайтотоксическом воздействии глутамата, а также на выживаемость нейронов при низкокальциевом апоптозе.

МЕТОДИКА ЭКСПЕРИМЕНТА

Корни и надземная часть астрагала перепончатого были собраны в окрестностях г. Улан-Уде (трава – в период массового цветения, в июле, корни – в сентябре). Сырье высушивали, измельчали и готовили экстракты [14]. Для исследований применяли водные растворы экстрактов.

В работе использованы 7–8-дневные культуры нейронов мозжечка, полученные от 7–9-дневных крысят методом ферментно-механической диссоциации [15]. Культуры выращивали в 96-лу-

ночных планшетах, покрытых поли-L-лизиним, в культуральной среде, содержащей 10% эмбриональной телячьей сыворотки, 2 мМ глутамина, 10 мМ буфера HEPES, 25 мМ KCl. В культуры, использованные для определения влияния экстрактов на уровень Ca^{2+} , через 24 часа от начала культивирования был добавлен 1 мкМ арабинозидмоноцитозид для предотвращения пролиферации не нейрональных клеток.

Для исследования влияния экстрактов АП на уровень кальция при глутаматной эксайтотоксичности использовали флуоресцентный зонд Fluo-4 AM, который внутри клетки расщепляется до Fluo-4, взаимодействующего со свободным кальцием и дающего флуоресценцию, регистрация которой и позволяет исследовать уровень кальция в нейронах. Fluo-4 AM вносили в культуральную среду на 30 мин в концентрации 5 мкМ. Воздействие глутаматом осуществляли в солевом растворе (мМ): NaCl - 154; KCl - 25; $Na_2HPO_4 \cdot 12H_2O$ - 0,35; $CaCl_2$ - 2,3; $NaHCO_3$ - 3,6; глюкоза - 5,6; HEPES - 5 (pH 7,5). Длительность воздействия глутамата составляла 10 мин, концентрация - 100 мкМ. По истечении 10 мин культуры промывали солевым раствором и переносили в солевой раствор с экстрактами, либо в солевой раствор без экстрактов. Контрольные культуры помещали на 10 мин в солевой раствор без глутамата. Исследуемые экстракты вносили в культуры в концентрации 90 мкг/мл после воздействия глутамата. Измерение интенсивности флуоресценции производили спустя 60 мин после воздействия глутамата на многофункциональном ридере для микропланшетов Filter Max F5 при длине волны возбуждения 485 нм, эмиссии 535 нм. Перед измерением культуры трижды промывали солевым раствором. Результаты измерения представлены в %, за 100% принимали интенсивность флуоресценции контрольных культур.

Индукцию апоптоза в культурах нейронов мозжечка крыс производили снижением концентрации ионов калия в культуральной среде спустя 7 дней культивирования. Для экспериментов использовали бессывороточную среду [16]. Заменяли культуральную среду с 25 мМ K^+ на бессывороточную с 5 мМ K^+ . Контрольные культуры помещали в бессывороточную среду с 25 мМ K^+ . В часть культур были добавлены экстракты корня или надземной части АП в концентрации 90 мкг/мл. Спустя 24 часа культуры фиксировали ФУСом, окрашивали трипановым синим и проводили под-

счет числа живых и погибших нейронов на инвертированном микроскопе. Результаты представлены как процентная доля живых нейронов.

Статистическую обработку данных проводили в программе STATISTICA 10 с использованием t-критерия Стьюдента.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Результаты исследования влияния экстрактов АП на выживаемость нейронов при низкокальциевом апоптозе представлены на рисунке 1. Анализ данных показал, что при инкубации культур в течение 24-х часов в бессывороточной среде с 5 мМ K^+ , наблюдается резкое сокращение числа живых нейронов (до $34,0 \pm 2,4\%$). Внесение в эту же среду экстрактов корня или надземной части астрагала перепончатого способствует увеличению доли живых нейронов на 10,3 и 9,7%, соответственно. То есть, экстракты корня и надземной части астрагала оказывают статистически значимый и практически равный защитный эффект на нейроны мозжечка в низкокальциевой среде, вызывающей апоптоз. В бессывороточной среде с 25 мМ K^+ экстракты астрагала перепончатого не оказывают влияния на выживаемость нейронов, их число остается на уровне контроля.

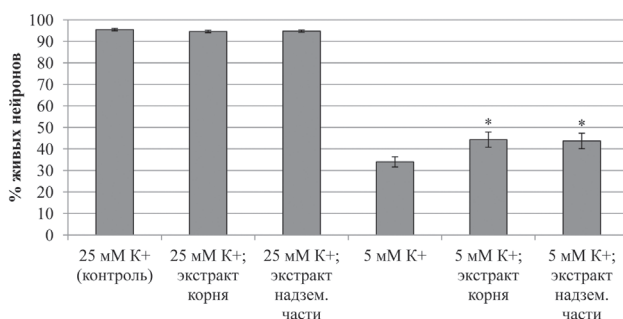


Рис. 1. Влияние экстрактов астрагала перепончатого на выживаемость культивируемых нейронов при низкокальциевом апоптозе. * - $p < 0,05$ в сравнении с группой «5 мМ K^+ ».

При изучении влияния экстрактов корня и надземной части астрагала перепончатого на кальциевый гомеостаз культивируемых нейронов мозжечка при глутаматной эксайтотоксично-

сти (табл. 1) с использованием флуоресцентного зонда Fluo-4 AM было установлено, что после воздействия глутамата концентрация кальция в нейронах резко (более чем в 4 раза) возрастает. При внесении в культуры нейронов мозжечка, обработанные глутаматом, экстракта корня астрагала отмечалось статистически значимое снижение внутриклеточного уровня кальция. Снижение концентрации кальция в нейронах мозжечка в условиях глутаматной эксайтотоксичности отмечалось и после внесения в культуру экстракта надземной части астрагала. Однако эффект снижения уровня кальция в нейронах был ниже, чем при добавлении экстракта корня. В отсутствие глутамата экстракты надземной части и корня астрагала перепончатого влияния на содержание кальция в нейронах не оказывают.

Таким образом, установлено, что экстракты корня и надземной части АП увеличивают выживаемость нейронов мозжечка в условиях низкокальциевой среды, индуцирующей апоптоз. Экстракт корня АП достоверно снижает внутриклеточный уровень кальция в условиях глутаматной эксайтотоксичности, менее выраженный эффект оказывает экстракт надземной части.

Известно, что гибель нейронов при гипоксии/ишемии мозга обусловлена гиперстимуляцией глутаматных рецепторов. Активация ионотропных глутаматных рецепторов приводит к поступлению в клетку Ca^{2+} и Na^+ и выходу K^+ . В дальнейшем, в результате деполяризации клеточной мембраны Ca^{2+} начинает поступать в цитоплазму и по потенциал-зависимым Ca^{2+} -каналам. В условиях нормы поглощение Ca^{2+} митохондриями в значительной степени обеспечивает поддержание его концентрации на безопасном уровне. Однако при гиперстимуляции глутаматных рецепторов продолжающийся массивный вход Ca^{2+} в цитоплазму приводит к перегрузке митохондрий. Со временем это приводит к отсроченной Ca^{2+} дисрегуляции (ОКД) - лавинообразному увеличению концентрации внутриклеточного Ca^{2+} . Считается, что ОКД развивается в результате митохондриальной дисфункции и является этапом запуска необратимых процессов гибели нейронов [17, 18, 19].

Таблица 1.

Влияние экстрактов астрагала перепончатого на интенсивность флуоресценции Fluo-4 в культурах нейронов мозжечка при глутаматной эксайтотоксичности.

Интенсивность флуоресценции Fluo-4, %					
Контроль	Экстракт корня	Экстракт надземной части	Глутамат	Глутамат + экстракт корня	Глутамат + экстракт надземной части
100,0 \pm 5,4	93,7 \pm 10,9	94,8 \pm 11,4	416,9 \pm 22,3	359,9 \pm 13,4*	388,8 \pm 16,9

* - $p < 0,05$ в сравнении с группой «Глутамат».

Применение экстрактов АП в условиях глутаматной эксайтотоксичности способствует снижению внутриклеточного уровня кальция. По видимому, экстракты АП снижают потенциал развития Ca^{2+} -зависимых нейрональных дисфункций, сопровождающихся ОКД, и, в соответствии с этим, уменьшают гибель нейронов.

Известно, что при помещении нейронов в среду с пониженной до 5 мМ концентрацией K^+ апоптоз связан со снижением внутриклеточной концентрации Ca^{2+} . Причиной последнего является закрытие потенциал-зависимых Ca^{2+} -каналов плазматической мембраны в результате её реполяризации [13]. Ключевая роль кальция в выживании нейронов в среде с пониженным содержанием K^+ подтверждается также тем, что применение агониста кальциевых каналов (Bay K8644) способствует лучшему выживанию нейронов, а при воздействии нифедипина - блокатора кальциевых каналов - нейроны гибнут и при высоких концентрациях K^+ . Нейроны умирают в результате апоптоза, когда уровень кальция, опускается ниже определенного порогового значения в отсутствие агентов выживаемости [20].

Полагаем, что, возможно, экстракты АП поддерживают пороговый уровень Ca^{2+} в нейронах и снижают K^+ -потребность для выживания нейронов.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Экстракты корня и надземной части астрагала перепончатого снижают внутриклеточный уровень кальция в условиях глутаматной эксайтотоксичности и увеличивают выживаемость нейронов мозжечка в условиях низкокальциевой среды, индуцирующей апоптоз. Полагаем, что нейропротекторный эффект экстрактов астрагала перепончатого может быть связан со стабилизацией кальциевого гомеостаза нейронов.

Работа выполнена при поддержке РФФИ (грант 12-04-00406_a).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Гусев Е.И. Ишемия головного мозга / Е.И. Гусев, В.И. Скворцова. — М. — 2001. — 328 с.
2. Барнаулов О.Д. Фитотерапия в неврологии / О.Д. Барнаулов, М.Л. Пospelова. — СПб. — 2009. — 320 с.
3. Decoction can improve recovery of neurological function, reduce infarction volume, stimulate neural proliferation and modulate VEGF and Flk1 expressions in transient focal cerebral ischemic rat brains / G. Cai [et al.] // *Journal of Ethnopharmacology*. — 2007. — Vol. 113. — P. 292–299.
4. Astragaloside IV protects against ischemic brain injury in a murine model of transient focal ischemia / Y. Luo [et al.] // *Neuroscience Letters*. — 2004. — Vol. 363. — P. 218–223.
5. Neuroprotective effects of Astragaloside IV in 6-hydroxydopamine-treated primary nigral cell culture / W.-S. Chan [et al.] // *Neurochemistry International*. — 2009. — Vol. 55. — P. 414–422.
6. Effect of *Astragalus membranaceus* in rats on peripheral nerve regeneration: in vitro and in vivo studies / M.C. Lu [et al.] // *J. Trauma*. — 2010. — Vol. 68(2). — P. 434–440.
7. Isoflavonoids from *Astragalus mongholicus* protect PC12 cells from toxicity induced by l-glutamate / D. Yu [et al.] // *Journal of Ethnopharmacology*. — 2005. — Vol. 98. — P. 89–94.
8. Нейропротекторный эффект экстрактов из надземной части *Astragalus membranaceus* и *A. mongholicus* (Fabaceae) в условиях токсического действия глутамата / А.Я. Шурыгин [и др.] // *Растительные ресурсы*. — 2012. — Т. 48. — № 2. — С. 273–277.
9. Нейропротекторный эффект экстрактов корня и надземной части астрагала перепончатого в культуре нейронов мозжечка крыс при глутаматной эксайтотоксичности / Л.В. Шурыгина [и др.] // *Вестник Бурятского государственного университета*. — 2012. — № 2. — С. 109–115.
10. Olney J.W. Brain lesions, obesity, and other disturbances in mice treated with monosodium glutamate / J.W. Olney // *Science*. — 1969. — Vol. 164. — P. 719–721.
11. Kainic Acid as a Tool in Neurobiology / E.G. McGeer, J.W. Olney, P. L. McGeer Eds. — New York. — 1978. — P. 95–121.
12. Матвеев А.Г. Феномен цитотоксичности и механизмы повреждения нейронов новой коры при гипоксии и ишемии / А.Г. Матвеев // *Тихоокеанский медицинский журнал*. — 2004. — № 2. — С. 18–23.
13. Apoptosis in cerebellar granule cells is blocked by high KCl, forskolin, and IGF-1 through distinct mechanisms of action: the involvement of intracellular calcium and RNA synthesis / C. Galli [et al.] // *J. Neurosci*. — 1995. — Vol. 15. — P. 1172–1179.
14. Соколов С.Я. Справочник по лекарственным растениям / С.Я. Соколов, И.П. Замотаев — М. — 1985. — 464 с.

15. Влияние хронической свинцовой интоксикации на радикалообразование в мозге и глутаматную нейротоксичность в культуре нейронов мозжечка / А.А. Кравцов [и др.] // Известия высших учебных заведений. Северо-Кавказский регион. Естественные науки. — 2009. — № 5. — С. 97–99.

16. K⁺-dependent Cerebellar Granule Neuron Apoptosis / I. Lauritzen [et al.] // The Journal of Biological Chemistry. — 2003. — Vol. 278. — № 34. — P. 32068–32076.

17. Отсроченная Ca²⁺ дисрегуляция в молодых нейронах мозжечка при гиперстимуляции

глутаматных рецепторов, роль NMDA-каналов / А.В. Вабниц. [и др.] // Биол. мембраны. — 2006. — Т. 23. С. 311–319.

18. Роль митохондрий в механизмах токсического действия глутамата / Н.К. Исаев [и др.] // Биохимия. — 2005. — Т. 70. — Вып. 6. — С. 741–750.

19. Khodorov B. Glutamate-induced deregulation of calcium homeostasis and mitochondrial dysfunction in mammalian central neurons / B. Khodorov // Prog. Biophys. Mol. Biol. — 2004. — Vol. 86. — P. 279–351.

20. Nicholls D.G. Mitochondria and Neuronal Survival / D.G. Nicholls, S.L. Budd // Physiol. Rev. — 2000. — Vol. 80. — P. 315–360.

Шурыгина Людмила Васильевна — зав. отделом биологически активных веществ, кандидат сельхоз. наук, старший науч. сотр., ФГБОУ ВПО «Кубанский государственный университет», тел. 8(861)2378207; e-mail: balizfarm@mail.ru

Кравцов Александр Анатольевич — науч. сотр. отдела биологически активных веществ, кандидат биол. наук, ФГБОУ ВПО «Кубанский государственный университет»; e-mail: aakravtsov@mail.ru

Злищева Энна Ивановна — ведущий науч. сотр. отдела биологически активных веществ, кандидат биол. наук, старший науч. сотр., ФГБОУ ВПО «Кубанский государственный университет»; e-mail: balizfarm@mail.ru

Андросова Татьяна Васильевна — старший науч. сотр. отдела биологически активных веществ, ФГБОУ ВПО «Кубанский государственный университет»; e-mail: balizfarm@mail.ru

Злищева Лариса Ивановна — ведущий науч. сотр. отдела биологически активных веществ, кандидат биол. наук, ФГБОУ ВПО «Кубанский государственный университет»; e-mail: balizfarm@mail.ru

Лобова Наталья Николаевна — науч. сотр., отдела биологически активных веществ, ФГБОУ ВПО Кубанский государственный университет; e-mail: balizfarm@mail.ru

Shurygina Ludmila V. — head of Department of Biologically Active Substances «Kuban State University», candidate of agricultural sciences; Ph. 8 (861) 2378207, e-mail: balizfarm@mail.ru

Kravtsov Aleksandr A. — research associate of Department of Biologically Active Substances «Kuban State University», candidate of biological sciences; e-mail: aakravtsov@mail.ru

Zlischeva Enna I. — leading research associate of Department of Biologically Active Substances «Kuban State University», candidate of biological sciences; e-mail: balizfarm@mail.ru

Androsova Tatyana V. — research associate of Department of Biologically Active Substances «Kuban State University»; e-mail: balizfarm@mail.ru

Zlischeva Larissa Ivanovna — leading research associate of Department of Biologically Active Substances «Kuban State University», candidate of biological sciences; e-mail: balizfarm@mail.ru

Lobova Natalia Nikolaevna — research associate of Department of Biologically Active Substances «Kuban State University»; e-mail: balizfarm@mail.ru