***К 40-летию Института физиологически активных веществ РАН***

## *ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ*

# ЗАЩИТНОЕ ДЕЙСТВИЕ ЭКСТРАКТА ЛИСТЬЕВ ЧЕРНИКИ В ОТНОШЕНИИ ЭКСАЙТОТОКСИЧЕСКОГО ДЕЙСТВИЯ ГЛУТАМАТА НА НЕЙРОНЫ КОРЫ МОЗГА КРЫС

***Н.Н. Лермонтова, Л.Н. Петрова, Т.П. Серкова, О.В. Новикова, И.М. Бравова, М.Е. Неганова, С.Г. Клочков****

Институт физиологически активных веществ Российской академии наук,
142432, Черноголовка, Московская обл., Северный проезд, 1; *эл. почта: klochkov@ipac.ac.ru

Водный экстракт листьев черники ингибирует глутамат-индуцированный вход ионов $Ca^{2+}$ в синаптосомы нейронов мозга крыс, и $IC_{50}$ этого процесса близка к $IC_{50}$ для МК-801 – известного неконкурентного антагониста глутаматных рецепторов NMDA-подтипа. Водный экстракт листьев черники предохранял культивируемые нейроны коры мозга крысы от нейротоксического действия глутамата, причём выраженность ингибирования зависела от времени инкубации с экстрактом, на фоне которого действовал глутамат.

**Ключевые слова:** экстракт; черника; культивируемые нейроны; глутамат; МК-801; эксайтотоксичность

**DOI:** 10.18097/BMCRM00045

## ВВЕДЕНИЕ

Известно, что экстракты из некоторых лекарственных растений, широко употребляемых в народной медицине, оказывают положительное действие при ишемии, травме мозга, нейродегенеративных заболеваниях различной природы – паркинсонизме и сенильных деменциях альцгеймеровского типа. Как правило, их механизм действия связывают, в первую очередь, с улучшением микроциркуляции крови в мозге и увеличением антиоксидантов в тканях из-за большого количества растительных флавоноидов [1]. В последнее время получены данные, свидетельствующие о прямом нейропротекторном действии растительных экстрактов и (или) их компонентов на нервные клетки *in vitro*. Эффект был показан на широко применяемой для подобных целей модели ишемического повреждения эксайтотоксическими аминокислотами культивируемых нейронов [2-4]. При ишемии-реперфузии выход большого количества глутамата в принейрональное пространство вызывает гиперстимуляцию глутаматных рецепторов, особенно NMDA-подтипа, и значительный вход ионов $Ca^{2+}$ в нейроны, что способствует их дегенерации [5, 6]. Инактивация NMDA-рецепторов антагонистами, в том числе и (+)-5-Метил-10,11-дигидро-5Н-дибензо [a,d] циклогептен-5,10-имин малеатом (МК-801), предохраняет нейроны от гибели, вызываемой избытком глутамата [7].

В настоящей работе было исследовано действие лиофилизированного водного экстракта листьев черники *Vaccinium myrtillus* L. на способность ингибировать глутамат-стимулируемый вход ионов $Ca^{2+}$ в синаптосомы и предохранять культивируемые кортикальные нейроны крысы от эксайтотоксического действия глутамата в сравнении с препаратом МК-801.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

*Материалы*

В работе использовали реактивы производства “Sigma-Aldrich” (США). Для определения входа кальция в синаптосомы использовали радиоактивную метку $^{45}Ca^{2+}$ (удельная активность 200 ГБК/мл, производство “Sigma-Aldrich”).

*Животные*

В экспериментах использовались самцы нелинейных беспородных крыс весом 200-220 г. Животные содержались в условиях стандартного вивария с 12-часовым световым режимом и свободным доступом к воде и пище. Все манипуляции с животными проводились в соответствии с решениями комиссии по Биоэтике ИФАВ РАН. В работе использовалось оборудование Центра коллективного пользования ИФАВ РАН.

*Приготовление водного экстракта листьев черники*

Для приготовления экстракта использовали листья черники *Vaccinium myrtillus* L., собранные на территории Московской области в период интенсивного цветения. Собранное воздушно-сухое сырьё (100 граммов) измельчали и трижды экстрагировали 300 мл дистиллированной воды температурой 45°С в течение 1 ч. Полученный экстракт фильтровали, частично упаривали на роторном испарителе (температура бани 45°С), затем высушивали в лиофильной сушке. Полученный экстракт хранили при 0°С.

*Определение суммы флавоноидов в водном экстракте листьев черники*

Определение суммы флавоноидов проводили спектрофотометрическим методом согласно фармакопейной методике, применяемой в фармацевтической промышленности [8] и модифицированной под конкретную задачу. Оптическую плотность раствора определяли на спектрофотометре Lambda 35 (“PerkinElmer”, США) в кювете с толщиной слоя 1 см при $\lambda = 330$ нм.

Процентное содержание суммы флавоноидов X вычисляют по формуле:

$$X = \frac{25 \times D \times K \times 100}{E^{1\%}_{1\text{см}} \times m \times (100\text{-}w) \times L},$$

© 2018 Коллектив авторов. Лицензиат ИБМХ, Москва. Статья открытого доступа, распространяется на условиях лицензии Creative Commons Attribution (CC BY-SA 4.0) (http://creativecommons.org/licenses/by-sa/4.0/).

где D – оптическая плотность испытуемого раствора; 25 – объём раствора А, мл; К – коэффициент разведения раствора А, равный 100; коэффициент экстинкции Е – удельный показатель поглощения, равный 560.8; m – навеска сырья в расчёте на взятый аликвот, г; w – потеря в массе сырья при высушивании (в %); L – толщина слоя, см.

*Определение глутамат-индуцированного входа ионов $Ca^{2+}$ в синаптосомы нейронов мозга крыс*

Синаптосомы коры мозга крыс выделяли из коры мозга новорожденных (9-10 дней) крыс Вистар по стандартной методике Хайоша. Кору мозга гомогенизировали в 10 объёмах охлаждённой 0.32 М сахарозы (5 мМ HEPES pH 7.4). Гомогенат центрифугировали в течение 10 мин при 1500 *g*. Полученный супернатант центрифугировали 20 мин при 10000 *g* [9]. Для аккумуляции радиоактивной метки $^{45}Ca^{2+}$ Р2-фракцию синаптосом суспендировали в инкубационном буфере А следующего состава: 132 мМ NaCL, 5 мМ KCL, 5 мМ HEPES, pH 7.4 (концентрация белка 1.5-2.0 мг/мл) и вносили исследуемое вещество и $^{45}Ca^{2+}$ (удельная активность 200 ГБК/мл). Захват $^{45}Ca^{2+}$ в синаптосомы стимулировали внесением глутамата в концентрации $2\times10^{-4}$ М. Через 5 мин инкубации при 30°С захват останавливали фильтрованием через фильтры gF/B (“Merck Millipore”, Германия), промывая три раза ледяным буферным раствором В (145 мМ KCL, 10 мМ Трис, 54 мМ трилона В), и подсчитывали количество радиоактивной метки на жидкостном сцинтилляционном счётчике Tri-Carb 2800 TR (“PerkinElmer/Packard”, США). Количество захваченного $^{45}Ca^{2+}$ в синаптосомах определяли по разнице в содержании метки при стимуляции глутаматом и без стимуляции глутаматом и выражали в процентах контроля (контроль принимали за 100%). Каждая проба ставилась в трёх параллелях, и каждый препарат исследовался в двух независимых экспериментах.

## РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

По логарифмическим кривым зависимости действия от концентрации, экстракт черники близок по способности ингибировать вызываемый глутаматом вход $Ca^{2+}$ в синаптосомы к МК-801 ($IC_{50}$ – 9.1 мкг/мл и 7.72 мкг/мл соответственно) (табл. 1). Предполагается, что основные действующие вещества экстракта листьев, используемых в медицине растений, в том числе и черники, представлены флавоноидами [10]. Содержание суммы флавоноидов в экстракте листьев черники по нашим данным составляет 6.7%, что согласуется с литературными данными [11].

Для экспериментов на культивируемых нейронах были выбраны концентрации 10 мкг/мл экстракта черники и 100 мкМ МК-801, примерно соответствующие их $IC_{50}$ по способности ингибировать глутамат-зависимый вход $Ca^{2+}$ в синаптосомы. Использовали предварительную инкубацию нейронов с веществами, совместную с глутаматом и последующую инкубацию. Из рисунка 1 и таблицы 2 видно, что после инкубирования с глутаматом, погибли практически все нейроны. Инкубирование с МК-801 достаточно эффективно предохраняет нейроны от действия глутамата (табл. 2, рис. 2, видно много живых нейронов). Экстракт черники предохранял зрелые, то есть имеющие ионотропные глутаматные рецепторы, культивируемые нейроны от нейротоксического действия глутамата (рис. 3, табл. 2).

**Таблица 1.** Влияние МК-801 и экстракта черники на захват $^{45}Ca^{2+}$ в синаптосомы коры мозга крыс при стимуляции глутаматом

| МК-801 | | | Экстракт черники | | |
|---|---|---|---|---|---|
| С, мкг/мл | lg C | % ингибирования | С, мкг/мл | lg C | % ингибирования |
| 0.17 | -6.77 | 2.0±0.3 | 1 | -6.0 | 0 |
| 0.34 | -6.47 | 2.5±0.9 | 2.5 | -5.6 | 23.3±1.3 |
| 1.69 | -5.77 | 2.4±1.1 | 5 | -5.3 | 35.5±0.8 |
| 3/37 | -5.47 | 28.0±1.8 | 10 | -5.0 | 55.3±7.1 |
| 8.43 | -5.08 | 53.5±2.7 | 25 | -4.6 | 34.1±1.6 |
| 16.85 | -4.77 | 65.0±6.5 | 50 | -4.3 | 24.2±2.7 |
| 33.7 | -4.47 | 36.7±1.9 | 100 | -4.0 | 15.1±2.1 |
| | | | 200 | -3.7 | 12.5±1.4 |

**Таблица 2.** Влияние экстракта из листьев черники (*Vaccinium myrtillus* L.) на выживаемость культивируемых нейронов при действии глутамата. Количество живых нейронов после инкубации с исследуемыми веществами через 18 ч (в % от контроля). * – статистически значимые отличия от действия глутамата ($p<0.05$, T-test); ± – влияние отстутствует.

| Вид культуры, время культивирования до инкубации | Инкубация с исследуемыми веществами (предварительная, вместе с 100 мкмоль глутамата и последующая) | | |
|---|---|---|---|
| | глутамат, 100 мкмоль | МК-801, 100 мкмоль | экстракт черники, 10 мкг/мл |
| 1. Клетки-зерна мозжечка, 11 дней | 38±6 | 66±8* | 58±8* |
| 2. Нейроны коры, 13 дней | 21±7 | 93±9* | 49±6* |
| 3. Нейроны коры, 14 дней | ± | ± | ± |

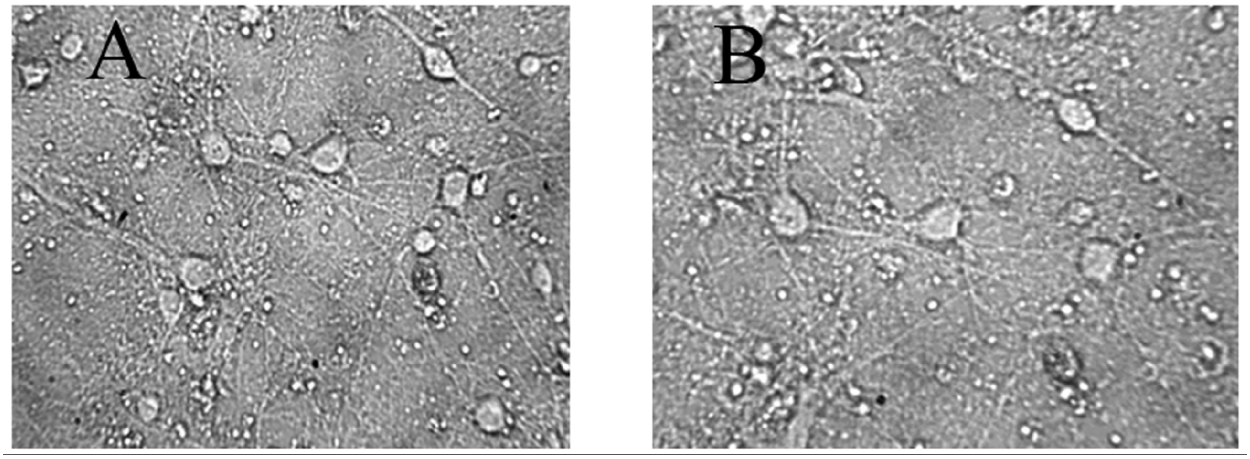


**Рисунок 1. А** - до, **В** - 30 мин в среде с 100 мкМ глутамата, затем - в среде культивирования 18 ч до съемки. Погибли все нейроны, кроме одного. (Метод светлого поля)

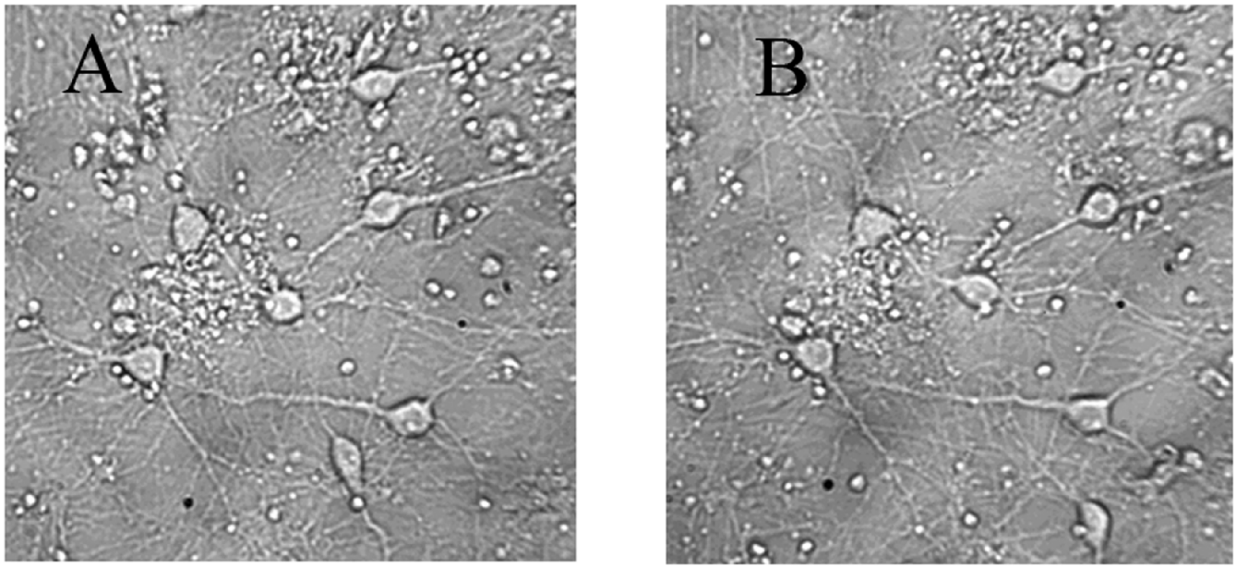


**Рисунок 2. А** - до, **В** - 30 мин. в среде среде с 10 мкМ МК-801 (специфический ингибитор глутаматных рецепторов); 30 мин в среде с МК-801 + 100 мкм глутамата, затем - в среде культивирования с МК-801 18 ч до съемки. Нейроны живы. (Метод тёмного поля)

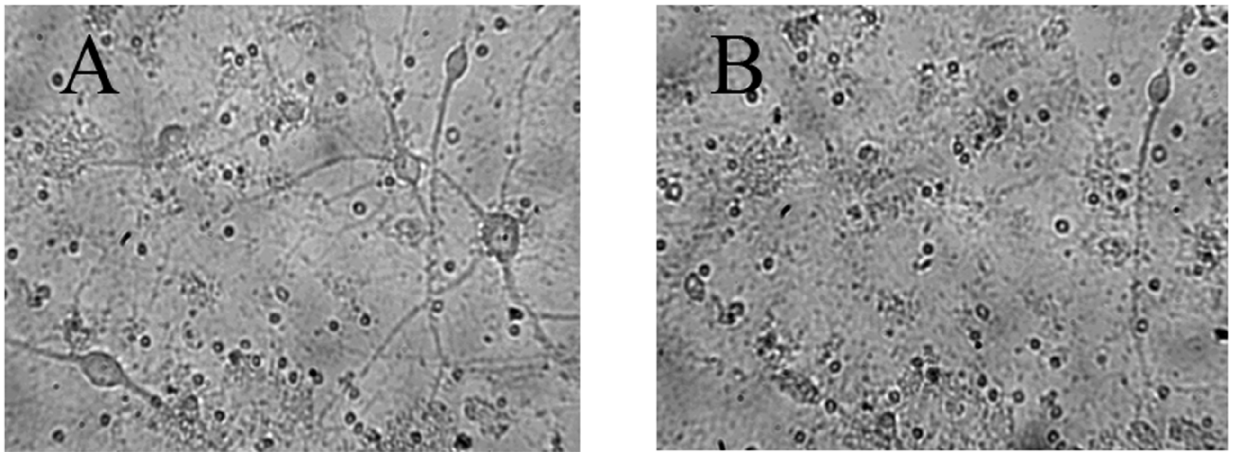


**Рисунок 3. А** - до, **В** - 30 мин в среде с 10 мкг экстракта черники; 30 мин в среде с экстрактом черники + 100 мкМ глутамата, затем - в среде культивирования с экстрактом черники 18 ч до съемки. Большинство нейронов живы. (Метод тёмного поля)

Наилучшие результаты по ингибированию действия глутамата показал вариант с предварительной, совместной и последующей инкубацией нейронов с экстрактом черники, когда нейроны все время инкубировались в присутствии экстракта черники. Как следует из литературных данных, предварительное инкубирование с антагонистами глутаматных рецепторов NMDA-подтипа усиливает их защитное действие по отношению к глутамату [12], что видно на примере МК-801 (табл. 2). Возможно, и в экстракте черники присутствуют специфические ингибиторы рецепторов NMDA, однако связывание их с рецептором слабое и недостаточное для ингибирования в случае только предварительной инкубации до введения в среду глутамата. Последующее присутствие экстракта черники в среде обеспечило лучшую выживаемость нейронов, что может зависеть и от антиоксидантных свойств компонентов растительных экстрактов – флавоноидов. Наличием в экстракте черники антиоксидантов можно объяснить не только его защитные свойства, но и характерную колоколообразную форму кривой зависимости доза-эффект (табл. 2). Показано, что для многих антиоксидантов в экспериментах *in vitro* кривые доза-эффект имеют колоколообразную форму и довольно узкий диапазон действующих концентраций [13], что мы и наблюдали в эксперименте. Глутамат, кроме воздействия на свои специфические рецепторы, в больших концентрациях действует на клетки как сильный оксидант, уменьшает синтез глутатиона и вход ионов $Ca^{2+}$. Различные флавоноиды, присутствующие обычно в растительных экстрактах, способны ингибировать эти процессы [14]. В наших экспериментах большая концентрация глутамата повлияла на выживаемость незрелых нейронов в меньшей степени, чем на зрелые нейроны повлияла малая концентрация глутамата. Вероятно, поэтому действие протекторов в данном случае выражено очень слабо. В связи с этим вариант с последующей инкубацией показал лучшее защитное действие, чем вариант без него (табл. 2), что может указывать и на проявление протекторного действия флавоноидов. Возможно, именно многокомпонентность экстракта черники и обеспечивает лучшую защиту от нейротоксичности глутамата.

Таким образом, нами было показано, что водный экстракт листьев черники ингибирует глутамат-индуцированный вход ионов $Ca^{2+}$ в синаптосомы нейронов мозга крыс и $IC_{50}$ этого процесса близка к $IC_{50}$ для МК-801, известного неконкурентного антагониста глутаматных рецепторов NMDA-подтипа. Водный экстракт листьев черники предохранял культивируемые нейроны коры мозга крысы от нейротоксического действия глутамата, причем выраженность ингибирования зависела от времени инкубации с экстрактом, на фоне которого действовал глутамат.

## БЛАГОДАРНОСТИ

В работе использовано оборудование Центра коллективного пользования ИФАВ РАН. Работа выполнена в рамках Госзадания 0090-2017-0018.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Spagnuolo C., Napolitano M., Tedesco I., Moccia S., Milito A., Russo G.L. (2016) Neuroprotective Role of Natural Polyphenols. Curr Top Med Chem.;16(17):1943-1950. DOI: 10.2174/1568026616666160204122449

2. Zhou S., Chen X., Gu X., Ding F. (2009) *Achyranthes bidentata* Blume extract protects cultured hippocampal neurons against glutamate-induced neurotoxicity. J Ethnopharmacol., 122(3):547-54. DOI: 10.1016/j.jep.2009.01.025

3. Shimada Y., Goto H., Kogure T., K Kohta., Shintani T., Itoh T., Terasawa K. (2000) Extract prepared from the bark of Cinnamomum cassia Blume prevents glutamate-induced neuronal death in cultured cerebellar granule cells. Phytother Res.; 14(6):466-468. DOI: 10.1002/1099-1573(200009)14:63.0.CO;2-Z

4. Cho J., Kong J.Y., Jeong D.Y., Lee K.D., Lee D.U., Kang B.S. (2001) NMDA recepter-mediated neuroprotection by essential oils from the rhizomes of Acorus gramineus. Life Sci.; 68(13):1567-73. DOI: 10.1016/S0024-3205(01)00944-4

5. Rothman S.M., Olney J.W. (1986) Glutamate and the pathophysiology of hypoxic--ischemic brain damage. Ann Neurol. (2):105-11. DOI: 10.1002/ana.410190202

6. Wang R., Reddy P.H. (2017) Role of Glutamate and NMDA Receptors in Alzheimer's Disease. J Alzheimers Dis.; 57(4):1041-1048. DOI: 10.3233/JAD-160763

7. Qian Y., Tang X., Guan T., Li Y., Sun H. (2016) Neuroprotection by Combined Administration with Maslinic Acid, a Natural Product from Olea europaea, and MK-801 in the Cerebral Ischemia Model. Molecules. 21(8). pii: E1093. DOI: 10.3390/molecules21081093

8. Grinkevich N.I., Safronich L.N. (eds.) (1983) Chemical analysis of medicinal plants, M., High School, pp. 91-92.

9. Grigoriev, V.V., Petrova, L.N., Gabrelian, A.V., Zamoyski, V.L., Serkova, T.P., & Bachurin, S.O. (2012) Effect of somatostatin on presynaptic and postsynaptic glutamate receptors and postsynaptic GABA receptors in the neurons of rat brain. Bulletin of experimental biology and medicine, 154(1), 10-12. DOI: 10.1007/s10517-012-1862-x

10. Havsteen B.H. (2002) The biochemistry and medical significance of the flavonoids. Pharmacology & Therapeutics, 96(2-3), 67-202. DOI: 10.1016/S0163-7258(02)00298-X

11. Mauri P., Pietta P. (2000) Electrospray characterization of selected medicinal plant extracts. J. of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, 23, 61-68. DOI: 10.1016/S0731-7085(00)00264-8

12. Tremblay R., Chakravarthy B., Hewitt K., Tauskela J., Morley P., Atkinson T., Durkin J.P. (2000) Transient NMDA receptor inactivation provides long-term protection to cultured cortical neurons from a variety of death signals. J Neurosci.; 20(19):7183-92. DOI: 10.1523/JNEUROSCI.20-19-07183.2000

13. Chistyakov V.A. (2008) Nonspecific Mechanisms for Protection against Destructive Action of Reactive Oxygen Species. Uspekhi sovremennoj biologii. 128(3), 300-306.

14. Ishige K., Schubert D., Sagara Y. (2001) Flavonoids protect neuronal cells from oxidative stress by three distinct mechanisms. Free Radic Biol Med.; 30(4):433-446. DOI: 10.1016/S0891-5849(00)00498-6

Поступила: 12. 06. 2018.
Принята к публикации: 07. 08. 2018.

# PROTECTIVE ACTION OF THE EXTRACT OF BLUEBERRY LEAVES AGAINST GLUTAMATE EXCITOTOXICITY ON NEURONS OF THE RAT CEREBRAL CORTEX

***N.N. Lermontova, L.N. Petrova, T.P. Serkova, O.V. Novikova, I.M. Bravova, M.E. Neganova, S.G. Klochkov****

Institute of Physiologically Active Compounds of RAS,
1 Severny proezd, Chernogolovka, Moscow region, 142432 Russia; *e-mail: klochkov@ipac.ac.ru

The aqueous extract of blueberry leaves inhibits the glutamate-induced $Ca^{2+}$ influx into the synaptosomes of rat brain neurons and the $IC_{50}$ value of this process is close to the $IC_{50}$ for MK-801, a well-known noncompetitive antagonist of glutamate NMDA subtype receptors. The aqueous extract of blueberry leaves protected the cultured neurons of the rat cerebral cortex from the neurotoxic effect of glutamate, and the inhibition intensity depended on the incubation time with the extract.

**Key words:** extract; blueberry; cultured neurons; glutamate; MK-801; excitotoxicity

**ACKNOWLEDGMENTS**

The equipment of the Center for Collective Use of the Institute of Physiologically Active Compounds of the Russian Academy of Sciences was used. The work was carried out within the framework of the State Proposal 0090-2017-0018.