

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ
РАБОТЫ

УДК 612.821.6

**БЛОКИРОВАНИЕ ЭКСТРАКТАМИ ГОМОГЕНАТА ЖУКА-ЧЕРНОТЕЛКИ
Alphitobius diaperinus ДЕЙСТВИЯ ПРОНЕЙРОТОКСИНА МРТР
И ТОКСИНА МРР⁺ В ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ МОДЕЛИ
БОЛЕЗНИ ПАРКИНСОНА**

© 2018 г. Н. А. Ушакова¹, В. М. Ковальзон¹*, В. П. Шевченко²,
И. Ю. Нагаев², Е. Ю. Рыбалкина³, А. В. Ревущин⁴, А. В. Амбарян¹,
А. И. Бастратов¹, Г. В. Павлова⁴, Д. С. Павлов¹

¹ФГБУН Институт проблем экологии и эволюции им. А.Н. Северцова РАН, Москва, Россия

²ФГБУН Институт молекулярной генетики РАН, Москва, Россия

³ФГБУ Российский онкологический научный центр им. Н.Н. Блохина МЗ РФ, Москва, Россия

⁴ФГБУН Институт биологии гена РАН, Москва, Россия

Поступила в редакцию 30.06.2017 г.

После доработки 26.09.2017 г.

Взрослые мыши-самцы C57Bl/6 ($n = 105$) были разделены на 5 групп. 1-я группа служила контролем. 2–5-й группам животных подкожно вводили 40 мг/кг пронеуротоксина МФТП (метилфенилтетрагидропиридин), что формирует у животных в течение двух недель состояние, сходное с начальной стадией болезни Паркинсона. Мыши групп 3–5 ежедневно получали вместе с кормом в качестве добавки один из трех экстрактов биомассы жука-чернотелки *Alphitobius diaperinus*. Через 2 нед. всех животных тестировали на наличие двигательных нарушений в тесте вертикального стержня, затем усыпляли и проводили гистохимический анализ дофамин-содержащих отделов головного мозга. Кроме этого, проводили изучение тех же экстрактов на противодействие токсину МРР⁺ в культуре клеток нейробластомы. Обнаружено, что первичный водный и, особенно, вторичный водно-метанольный экстракты оказывали мощный протекторный эффект на нейротоксическое воздействие как по поведенческому тесту, так и по результатам морфоконтроля. В обоих эффективных экстрактах обнаружено присутствие значительных концентраций аргинина. Исследование *in vitro* подтвердило протекторное действие первичного водного экстракта.

Ключевые слова: экстракт гомогената жука-чернотелки, *Alphitobius diaperinus*, экспериментальная модель болезни Паркинсона, двигательные дисфункции, культура клеток нейробластомы, протекторный эффект

DOI: 10.7868/S1027813318010168

ВВЕДЕНИЕ

Болезнь Паркинсона (БП) – хроническое прогрессирующее дегенеративное заболевание ЦНС, которое клинически проявляется, в частности, как нарушение координации движений. БП – одна из наиболее социально значимых, и изучение ее биологических основ является важнейшей задачей всех современных наук о мозге. При этом заболевании происходит по неизвестным пока причинам очень медленная (в течение десятков лет), но неуклонная дегенерация дофаминергических нейронов компактной части черной субстанции среднего мозга (SNpc), проецирующихся в ядра стриатума. Процесс протекает бессимп-

томно в результате включения компенсаторных механизмов, и лишь на поздней стадии развития заболевания, когда остается меньше половины исходного количества дофаминсодержащих нейронов, а уровень дофамина, доставляемого в стриатум этими нейронами, падает в 4 раза, возникают двигательные, а в дальнейшем – и когнитивные нарушения. Однако начинать лечение в этот период уже слишком поздно, и в истории мировой медицины не было еще ни одного больного, которого удалось бы излечить. Современная медицина может лишь облегчить симптомы заболевания и, в некоторых случаях, немного замедлить развитие болезни. Поэтому создание адекватных экспериментальных моделей и поиск ранних маркеров заболевания являются сейчас первостепенными задачами [1, 2].

* Адресат для корреспонденции: 119071 Москва, Ленинский пр-т, 33, ИПЭЭ РАН, тел. +7(495) 954-15-11, e-mail: kovalzon@sevin.ru.

Современная лекарственная терапия БП направлена на восполнение дефицита дофамина, развивающегося при БП в результате гибели дофаминергических нейронов мозга, а также на торможение прогрессирования болезни (нейропротекторная терапия). Для фармакотерапии БП применяют холинолитические средства, производные аминоадамантана, ДОФА-содержащие средства, ингибиторы моноаминоксидазы типа Б (МАО-В), ингибиторы катехол-О-метилтрансферазы и агонисты дофаминовых рецепторов [3–5]. Несмотря на достаточно широкий спектр реально применяемых и находящихся в стадии исследования препаратов для терапии БП, продолжает оставаться актуальной задача отыскания новых средств этого назначения, что обусловлено не только недостаточной эффективностью известных средств, но и их побочными эффектами [2, 6, 7].

Прогресс в изучении патогенеза нейродегенеративных заболеваний зависит в первую очередь от разработки адекватных экспериментальных моделей. Наибольший интерес представляют модели доклинической и ранней клинической стадий БП. Последняя характеризуется пороговым уровнем деградации nigrostriатной дофаминергической системы и первыми незначительными нарушениями моторной функции. Такие модели дают уникальную возможность изучать патогенез заболевания — молекулярные механизмы нейродегенерации и нейропластичности — на его ранней стадии, осуществлять поиск периферических биомаркеров, как основу для создания доклинической диагностики, и идентифицировать новые молекулярные мишени для фармакотерапии, в первую очередь для нейропротекции. Очевидно, что нейропротекторное лечение может быть эффективно, только если оно начато на ранней стадии, а не на поздней, когда большая часть нейронов уже погибла [8].

Одной из общепризнанных является нейротоксическая МФТП (1-метил-4-фенил-1,2,3,6-тетрагидропиридин, англ. сокр. МРТР) модель БП. Появление этой модели было связано с калифорнийскими наркоманами с выраженными симптомами паркинсонизма, обнаруженным в 1983 г. Оказалось, что эти молодые люди практиковали внутривенные инъекции неочищенного меперидина — синтетического аналога героина, содержавшего большие концентрации побочного продукта синтеза — МФТП. Проведенные в последующие годы тщательные исследования показали, что молекула МФТП в силу высокой липофильности легко проходит через гематоэнцефалический барьер, проникает в астроциты и там под воздействием фермента МАО-В превращается в ион MPP^+ (1-метил-4-фенил-пиридин ион). Этот ион связывается с высокоаффинным белком-переносчиком дофамина (DAT) и таким образом проникает внутрь митохондрий дофаминсодержа-

щих нейронов. Затем он ингибирует комплекс-1 (связанный с ферментом NADH-убихинон-оксидоредуктазой) митохондриальной цепочки передачи электрона и, таким образом, разобщает окислительное фосфорилирование. Это, в свою очередь, приводит к нарушению продукции АТФ, повышению уровня внеклеточного кальция, образованию свободных радикалов/активных форм кислорода, которые, взаимодействуя с клеточными белками, нуклеиновыми кислотами, липидами и другими молекулами, вызывают клеточные повреждения и, в конечном счете, гибель нейронов — то есть проявления дофаминовой нейротоксичности [9–11].

На черных мышках линии C57BL/6 разработана модель БП, которая в настоящее время является общепризнанной и валидированной Международным обществом психофармакологов. В соответствии с этой моделью мышам системно вводят пронеуротоксин МФТП, избирательно разрушающий дофаминергическую систему. Эффект этого токсина зависит от дозировки и режима введения. Так, было показано, что однократное введение 40 мг/кг (1/2 дозы LD_{50}) моделирует раннюю клиническую стадию БП. Стадии идентифицировали по первым проявлениям нарушения моторного поведения, а также по результатам гистологического исследования [12].

Насекомые давно привлекают внимание исследователей как источник биологически активных веществ. Так, например, пчела *Apis mellifera*, личинки и взрослые особи большого мучного хрущака *Tenebrio molitor*, падальной мухи семейства *Calliphoridae*, восковой моли *Galleria mellonella*, тутового шелкопряда *Bombyx mori* содержат новые антимикробные пептиды, хитин-меланиновые комплексы, флавоноиды, аминокислоты, органические кислоты [13–20].

Большой интерес вызывают жуки-чернотелки семейства *Tenebrionidae*, которые используются в народной медицине для лечения широкого спектра заболеваний. Эти насекомые синтезируют защитные секреты, которые представляет собой смесь репеллента и блокирующих хеморецепторных веществ. Они находятся в кутикулярных включениях или брюшных железах и высвобождаются, когда жуки подвергаются стрессу. Считается, что секреты жуков необходимы насекомому также для предотвращения высыхания и защиты от патогенных микроорганизмов [21–24]. Показано, что эти секреты являются источником фармакологически активных соединений, перспективных для лечения респираторных заболеваний [25]. Имеются сведения о возможности медицинского применения выделенных из экстрактов жука-чернотелки *Ulomoides dermestoides* веществ с противовоспалительными и иммуномодулирующими

свойствами, а также цитотоксичностью по отношению к клеткам некоторых опухолей [26–28].

Широко распространен в умеренной и южной зоне Европейской части России и в Сибири жук-чернотелка *Alphitobius diaperinus*, который относится к семейству Tenebrionidae также, как и *U. dermestoides* [29]. Нами было предположено, что некоторые компоненты биомассы жука *A. diaperinus* могут обладать тормозящей активностью в отношении отставленных эффектов пронеуротоксина МФТП, вызывающего экспериментальный паркинсонизм у мышей линии C57Bl/6JSto [30, 31]. Проведенные предварительные опыты на модели ранней клинической стадии БП (системная однократная инъекция МФТП в дозе 40 мг/кг) показали, что иммобилизованный на фитоносителе гомогенат жука *A. diaperinus* обладает выраженной способностью нейтрализовать отставленное действие на мышей пронеуротоксина МФТП при тестировании физической выносливости животных на вращающемся стержне (Ротароде) через 2 нед. после инъекции. Гистологические исследования выявили уменьшение количества тирозингидроксилаза (ТГ)-иммунопозитивных нейронов в области SNpc у мышей, получивших пронеуротоксин, по сравнению с интактными мышами и животными, получавшими по профилактической схеме гомогенат жука *A. diaperinus* на фитоносителе. Между интактными мышами и животными, получавшими с пищей гомогенат, достоверных различий по дофаминергическим нейронам не отмечалось. Результаты указали на отсутствие характерного для развития БП поражения дофаминергических нейронов SNpc у мышей, получавших и пронеуротоксин, и “антидот” [30].

Последующее изучение показало, что при экстракции биомассы жука наибольшим эффектом в качестве “антидота” к пронеуротоксину МФТП обладает водно-метанольный экстракт, полученный после твердофазной экстракции. Поведенческие данные были получены с помощью тестирования животных на вертикальном шесте [31]. Эти результаты потребовали проведения дальнейших исследований.

Цели настоящего исследования:

1) проверка рабочей гипотезы о способности водно-метанольных экстрактов гомогената биомассы взрослого жука *A. diaperinus* противодействовать двигательным дисфункциям и разрушению ТГ-содержащих нейронов SNpc, вызванным системными введениями пронеуротоксина МФТП в модели ранней стадии БП у мышей *in vivo*;

2) выявление действия экстрактов на клетки нейробластомы SH-SY5Y в присутствии нейротоксина MPP⁺, *in vitro*.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Биомасса взрослого жука *A. diaperinus* получена при культивировании насекомого в ИПЭЭ РАН в контролируемых условиях на пшеничных отрубях. 5 г свежесобранной биомассы после отделения от кормового субстрата обездвигивали при -18°C , затем гомогенизировали, заливали охлажденной дистиллированной водой (1 : 3) и экстрагировали 24 ч на холоде. Далее центрифугировали при 12000 g 5 мин. Фугат пропустили через 0.22 мкм бактериальный фильтр Millipore (Sigma) и получили 15 мл водного экстракта (экстракт-1), из которого отобрали 10 мл и хранили при -4°C , а 5 мл подвергли дальнейшей обработке.

Вторичный водно-метанольный экстракт получали добавлением метанола к 5 мл водного экстракта-1. После отделения выпавшего осадка центрифугированием при 12000 g \times 5 мин супернатант пропустили через патрон Sep-Pack C18 Classic (Waters Corporation), затем упарили на роторном испарителе и диспергировали в 5 мл дистиллированной воды на УЗ бане S30H (Elma Schmidbauer) и получили экстракт-2. Оставшиеся на патроне вещества смыли с патрона метанолом, фильтрат упарили на роторном испарителе и диспергировали в 5 мл дистиллированной воды на УЗ бане (получили экстракт-3).

Изучение состава экстрактов проводили методом масс-спектрометрии на приборе LCQ Advantage Max (Thermo Scientific) с ионизацией электрораспылением, прямым шприцевым вводом образцов в виде метанольных растворов с концентрацией экстрактов 10 мкл/мл.

Концентрацию аргинина измеряли методом ВЭЖХ в виде дансильных производных, приготовленных по модифицированному методу [32]. В качестве внутреннего стандарта использовали бета-аланин (Sigma). В центрифужную микропробирку типа Eppendorf (1.5 мл) добавляли 10 мкл анализируемого экстракта, 5 мкг раствора бета-аланина в воде, 70 мкл 50 мМ Li₂CO₃, 30 мкл ацетонитрила, 10 мкл раствора дансилхлорида в ацетонитриле (10 мг/мл). Время реакции – 3 ч при комнатной температуре, в темноте. После реакции в пробирку добавляли 10 мкл ледяной уксусной кислоты для нейтрализации.

ВЭЖХ проводили на хроматографе “Мили-Хром-A02” (“ЭкоНова”). Колонка Prontosil 120-5-C18aq, 2 \times 80 мм. Элюент: А – 0.2 М LiClO₄ + 5 мМ HClO₄; Б – метанол; градиент кусочно-линейный, 0 мин – 15% Б, 8.5 мин – 50% Б, 10 мин – 50% Б, 16.5 мин – 100% Б, 20 мин – 100% Б. Скорость потока – 150 мкл/мин. Детектирование при 250 нм. Объем вводимой пробы – 3 мкл.

Полученные экстракты иммобилизовали на стерильных пищевых пшеничных отрубях, конечная влажность массы – 8%. Препараты храни-

ли в холодильнике и ежедневно в течение недели скармливали подопытным животным, для чего сухие препараты добавляли в основную кормосмесь для мышей путем дробного смешения и тщательного перемешивания (из расчета 8 г препарата на 1 кг кормовой смеси). Основная кормосмесь состояла из каши, включающей отваренные овес и горох, с добавлением растительного масла. Потребление мышами исследуемых экстрактов стандартизировали путем раздачи корма в количестве, соответствующем ежесуточной норме потребления для мышей (11 г термически обработанных зерновых).

Методом весовых аналогов были составлены 5 групп мышей (молодые половозрелые самцы линии C57BL/6JSto, $n = 104$):

группа 1 – контроль (животным вводили физиологический раствор вместо токсина и давали кормосмесь без добавок, $n = 27$);

группа 2 – “токсин без экстракта” (мышам вводили токсин и давали кормосмесь без добавок, $n = 25$);

группа 3 – “токсин + экстракт-1” – мышам вводили токсин и давали кормосмесь с добавлением экстракта-1 (первичный водный экстракт, $n = 21$);

группа 4 – “токсин + экстракт-2” – мышам вводили токсин и давали кормосмесь с добавлением экстракта-2 (вторичный водно-метанольный экстракт, $n = 21$);

группа 5 – “токсин + экстракт-3” – мышам вводили токсин и давали кормосмесь с добавлением экстракта-3 (остаток, смытый с патрона Ser-Pack C18, $n = 10$).

Схема опыта включала следующие стадии:

1) предварительное профилактическое содержание в течение недели подопытных мышей на рациионе с препаратами;

2) введение животным пронеуротоксина МФТП и продолжение кормления препаратами в течение 2-х нед.;

3) выявление первых признаков болезни Паркинсона с помощью поведенческого теста “вертикальный шест”;

4) гистохимический анализ наличия поражений головного мозга;

5) определение возможности использования культуры клеток нейробластомы SH-SY5Y для оценки свойств экстрактов жука *A. diaperinus* ингибировать цитотоксическое действие MPP⁺.

В течение первой недели эксперимента мыши групп 3–5 получали соответствующие препараты в составе кормосмеси. Животные групп 1 и 2 получали аналогичный корм без препаратов. Затем животным групп 2–5 был введен подкожно однократно пронеуротоксин МФТП (Sigma, США) в дозе 40 мг/кг, после чего в течение последующих

двух недель мыши получали такой же корм, как и до инъекции. Мыши контрольной группы 1 в течение всего опыта получали основную кормосмесь без препаратов, и этим мышам вводили физиологический раствор вместо токсина.

Спустя две недели после введения токсина у мышей всех групп определяли наличие сенсомоторных нарушений в тесте с вертикальным шестом [33–38] в нашей модификации [31, 39]. Индивидуальное тестирование проводили в домашней клетке. В начале тестирования в клетку с мышью ставили вертикальный шест с неполированной, грубой поверхностью, высотой 50 см и диаметром 1 см. Близко от вершины шеста на него помещали мышь так, чтобы ее голова была ориентирована вертикально вверх. Оказавшись на шесте, мышь переориентирует положение своего тела головой вертикально вниз и начинает спуск с шеста на дно клетки (рис. 1). С помощью секундомера фиксировали время спуска на присыпанное опилками дно клетки. Даже если животное после переориентирования спускается по шесту не до конца и на некотором расстоянии до дна клетки спрыгивает, фиксировали время, за которое мышь достигла дна клетки. В нашем варианте методики с каждой мышью проводили 3 теста. Минимальный промежуток времени между тестированиями – 1 мин. Тест считали успешным, если мышь успевала переориентировать свое тело и начать спуск в течение первых 150 с тестирования. Если мышь не спускалась с шеста в течение первых 150 с в двух или во всех трех испытаниях, ее данные при статистическом анализе не учитывали. Для статистического анализа отбирали максимальное для каждой мыши (в 2-х или 3-х испытаниях) время спуска с шеста, поскольку именно этот показатель позволяет оценить локомоторные дисфункции, не позволяющие мыши с клиническими признаками экспериментально вызванного паркинсонизма быстро спуститься с шеста. Результаты экспериментов обработаны с помощью программного статистического пакета “Unistat 6.5.04” с использованием рангового критерия Краскела–Уоллиса, при попарных апостериорных множественных сравнениях использовался тест Коновера–Инмана.

Поражение головного мозга мышей при разрыве БП, связанное с разрушением дофаминсодержащих нейронов, оценивали посредством подсчета дофаминергических нейронов, иммуногистохимически окрашенных на ключевой фермент биосинтеза катехоламинов – тирозингидроксилазу (ТГ). Животных усыпляли внутрибрюшинным введением летальной дозы уретана (более 1 г/кг). Кровеносную систему транскардиально перфузировали раствором фосфатно-солевого буфера PBS (Sigma, США), pH 7.4, а затем – 4%-м раствором формальдегида в PBS. После дополнительной фиксации в растворе формальдегида в течение

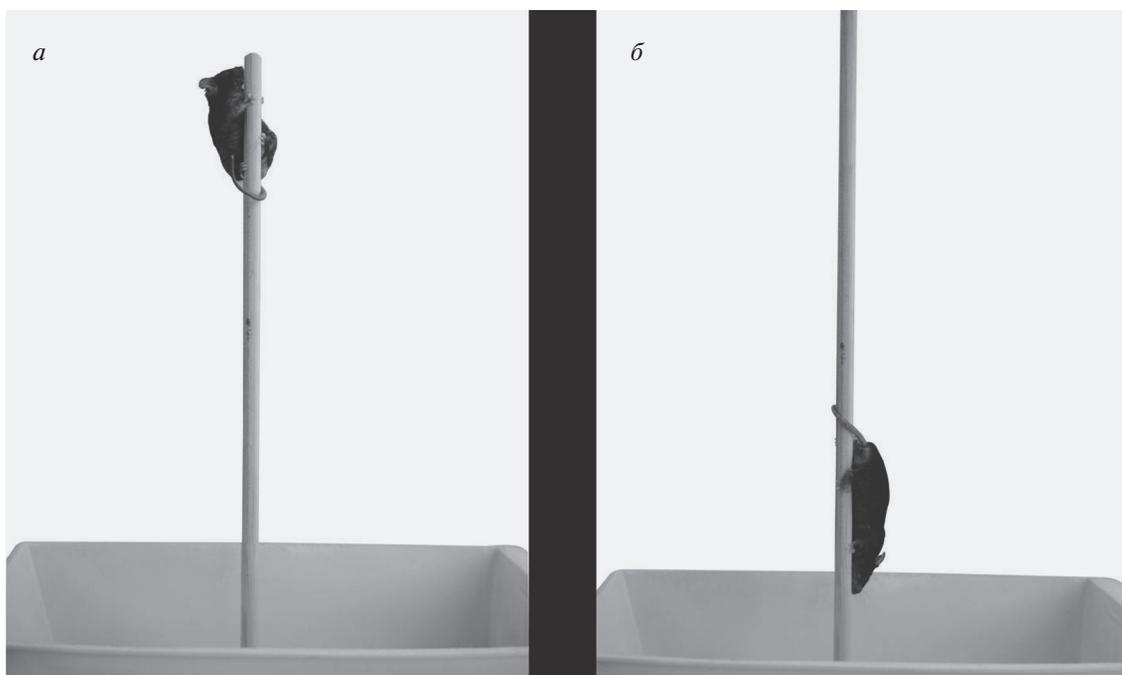


Рис. 1. Поведенческий тест с вертикальным шестом: *a* – начальное положение мыши, *б* – спуск вниз.

ние 12 ч при +4°C мозг пропитывали 30% раствором сахарозы в PBS 24 ч при +4°C. В дальнейшем мозг разделяли с помощью замораживающего микротомы (MSE, Великобритания). Фронтальные срезы толщиной 40 мкм, содержащие черную субстанцию, собирали в PBS. Для иммуногистохимического окрашивания каждый 4-й срез помещали в раствор моноклональных мышинных антител против ТГ (T2928, Sigma, США), разведенных в отношении 1 : 200 в растворе PBS с добавлением 2% нормальной лошадиной сыворотки, 0.3% детергента Тритон X-100 (Sigma). В этом растворе срезы содержали при 4–8°C в течение 12 ч при постоянном перемешивании. После промывки в PBS срезы на 1 ч погружали в раствор биотинилированных антител лошади против иммуноглобулина мыши (Vector Laboratories, США), разведенных PBS в отношении 1 : 100 с добавлением 0.3% Тритон X-100 при комнатной температуре. Затем после трехкратной промывки в PBS срезы помещали в раствор комплекса АВС (Vector Laboratories) в PBS при разведении 1 : 200 также на 1 ч, и проводили стандартную пероксидазную реакцию с помощью 0.03% раствора диаминобензидина (Sigma) в PBS с добавлением 0.01% перекиси водорода. Окрашенные срезы помещали на предметные стекла, покрывали 50% глицерином и покровным стеклом. Количественный анализ ТГ-позитивных клеток на иммуногистохимически окрашенных срезах проводили с помощью микроскопа Olympus IX81 (Olympus, Япония), снабженного моторизованным предметным столиком Marzhauser

motorized stage (Marzhauser Wetzlar, Германия), управляемым с помощью компьютера, и цифровой фотокамерой Olympus DP72. Подсчет клеток осуществляли с монитора компьютера с использованием программы Cell (Olympus Soft Imaging Solution, Германия) с помощью метода оптического фракционатора [40].

Для выявления действия экстрактов *A. diaperinus* на клетки SH-SY5Y клетки нейробластомы культивировали 48 часов в присутствии токсина MPP⁺ (1 и 2 мМ) и разных экстрактов жука-чернотелки. За 100% жизнеспособности приняли количество живых клеток при действии токсина MPP⁺ в соответствующей концентрации. Оценивали пролиферацию клеток при совместном введении экстракта с 0.1 или 0.2 мМ дофаминергического токсина MPP⁺ (метилфенилпиридин ион, Sigma) в культуральную среду RPMI, содержащую 10% fcs. Эффективность размножения клеток оценивали, используя МТТ-тест. Тест основан на способности митохондриальных дегидрогеназ живых клеток превращать желтый МТТ (3-(4,5-диметилтиазолил-2)2,5-дифенил тетразолиум бромид) (“ПанЭко”) в нерастворимый в водных растворах синий формазан [41]. Клетки рассевали в 96-луночные плато (5 тысяч на лунку) в 90 мкл стандартной культуральной среды. Через 20 ч инкубации к клеткам добавляли по 10 мкл экстракта и токсина. Конечная концентрация экстракта в культуральном растворе составляла 1%, токсина – 1 мМ или 2 мМ. Клетки инкубировали еще 48 ч, после чего в каждую лунку добавляли по 20 мкл препарата

Таблица 1. Статистика теста Коновера–Инмана (Q) и достоверность различий времени спуска с шеста между экспериментальными группами мышей (* $p \leq 0.05$; ** $p \leq 0.01$)

Сравниваемые группы	Q статистика	Достоверность различий (p)
1 и 2	3.9696	0.0002**
1 и 3	1.9569	0.0538
1 и 4	1.3183	0.1911
1 и 5	1.1156	0.2679
2 и 3	2.1351	0.0358*
2 и 4	5.0300	0.0000**
2 и 5	1.4681	0.1459
3 и 4	3.1712	0.0021**
3 и 5	0.0730	0.9420
4 и 5	1.8937	0.0618

МТТ (разведенного в физиологическом растворе 5 мкг/мл) на 3 ч. За 3 ч инкубации в живых клетках происходила ферментативная реакция и вырабатывался формазан, который в виде кристаллов накапливался в клетках. Далее раствор тщательно убирали из лунок и добавляли в каждую лунку 60 мкл ДМСО (диметилсульфоксид) (“Химмед”) для растворения кристаллов формазана. Тщательно встряхивали до полного растворения. Количественное определение формазана проводили на многоканальном фотометре (Thermo scientific) с фильтром 530 нм. Жизнеспособность клеток оценивали по соотношению оптической плотности в контрольных лунках (без добавления веществ) и в лунках с веществом.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Из биомассы взрослого жука-чернотелки *A. diaperinus* были получены три экстракта: первичный водный (экстракт-1), вторичный водно-метанольный (экстракт-2) и смыв с патрона Sep-Pack C18 (экстракт-3). Методом масс-спектрометрии в составе экстрактов обнаружено присутствие аргинина в качестве доминирующего компонента на спектрограмме (рис. 2, верхний спектр). Спектр фрагментации пика аргинина 175@35 эВ совпадает с библиотечным спектром для аргинина (рис. 2, средний спектр), что позволяет идентифицировать данное вещество как L-аргинин. Количественное определение содержания аргинина в экстрактах методом ВЭЖХ в виде дансильных производных дало результаты в диапазоне от 10 до 17 мг/мл экстракта (рис. 2, нижний спектр). Концентрация аргинина в экстракте-1 и экстракте-2 оказалась одинакова (аргинин не терялся при приготовлении метанольного экстракта). Экстракт-3 не содержал аргинина.

Из трех экстрактов были получены экспериментальные сухие препаративные формы на основе соответствующих экстрактов, после чего было проведено опытное кормление трех групп подопытных мышей C57BL/6JSto в течение 3-х нед. Через неделю после начала профилактического кормления препаратами животным была сделана инъекция пронеуротоксина МФТП по схеме, описанной в методах. После инъекции 15% мышей погибли в первые сутки от стресса на воздействие и острой токсичности. Гибели выживших животных в ходе дальнейшего эксперимента и по его окончании не наблюдали. После завершения экспериментального кормления анализировали максимальное время спуска всех мышей с вертикального шеста.

Показатели максимального времени спуска мышей представлены на рис. 3. Данные по статистике теста Коновера–Инмана (Q) и достоверности различий времени спуска с шеста между экспериментальными группами показаны в табл. 1. Как видно, попарные апостериорные сравнения с использованием критерия Коновера–Инмана показали достоверное превышение максимальной длительности спуска с шеста у мышей группы 2 (“токсин без экстракта”) в сравнении с группой 1 (“контроль; Q = 3.9696, $p = 0.0002$), группой 3 (“токсин + экстракт-1”; Q = 2.1351, $p = 0.0358$) и группой 4 (“токсин + экстракт-2”; Q = 5.0300, $p < 0.0001$).

Попарные сравнения экспериментальных групп 2 и 5 (Q = 1.4681, $p = 0.1459$), 3 и 1 (Q = 1.9569, $p = 0.0538$), 1 и 4 (Q = 1.3183, $p = 0.1911$) достоверных различий по максимальной длительности спуска с шеста не выявили. В группе 3 максимальная длительность спуска с шеста была достоверно больше, чем в группе 4 (Q = 3.1712, $p = 0.0021$). Результаты, представленные на рис. 3, показывают статистический разброс данных.

Таким образом, введение пронеуротоксина МФТП значительно и достоверно снижало двигательную координацию мышей в тесте вертикального стрежня, что проявилось в увеличенном максимальном времени спуска животных группы 2 (44.8 ± 7.5 с) по сравнению с контрольными мышами группы 1 (16.7 ± 2.8 с). Оба экстракта – водный (группа 3) и вторичный водно-метанольный (группа 4) оказывали выраженное противодействие пронеуротоксину, сглаживая эффекты МФТП и уменьшая время спуска с вертикального шеста (соответственно, 28.7 ± 5.6 с – показатели мышей группы 3, а время спуска мышей группы 4 – 12.2 ± 1.2 с). Вторичный водно-метанольный экстракт (группа 4) оказался не только более эффективным при нейтрализации действия пронеуротоксина МФТП (группа 2), чем первичный водный экстракт (группа 3), но даже оказал стимулирующее действие на животных. Координация и дви-

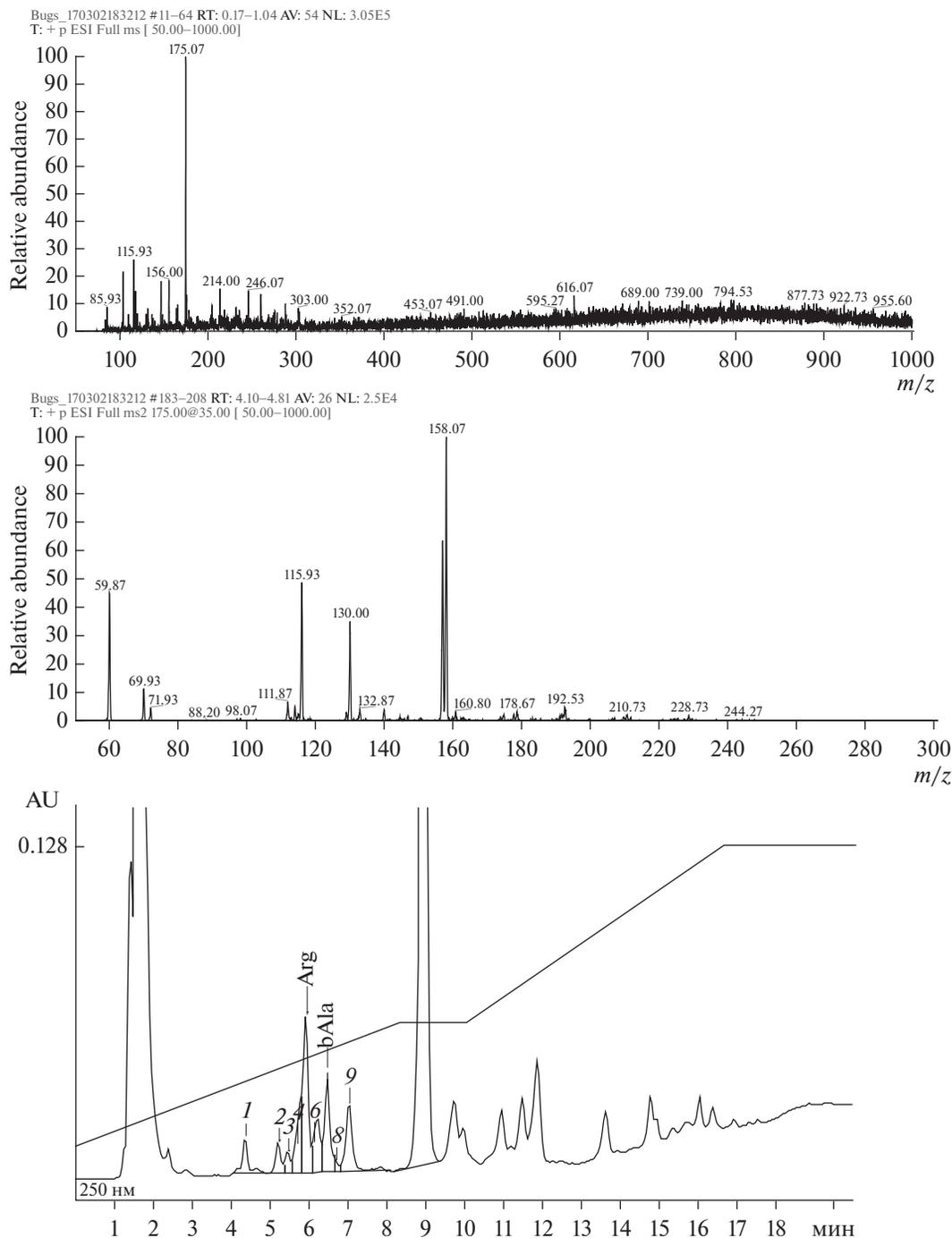


Рис. 2. Вверху — масс-спектр экстракта-1, 1 мкл/мл в метаноле. Пик 175 — аргинин. В середине — масс-спектр фрагментации молекулярного пика аргинина 175@35 эВ. Внизу — определение концентрации аргинина методом ВЭЖХ в виде дансильных производных. Проба: экстракт-1, 10 мкл. Концентрация аргинина в экстракте — 16.3 мг/мл.

гательная активность мышей группы 4 оказались выше контрольных мышей группы 1 на 4.6 с.

По завершении опытного кормления животных было проведено гистохимическое исследование мозга. Общее количество ТГ-содержащих нейронов в компактной части черной субстанции и вентральной покрышке среднего мозга (сред-

ние значения и разброс) у всех пяти групп мышей представлены в табл. 2. На рис. 4, в качестве примера, представлены фронтальные срезы среднего мозга по одной мыши из 1-й, 2-й и 3-й групп, как наиболее контрастные. Введение экстрактов жука-чернотелки *A. diaperinus* в рацион мышей по профилактической схеме снизило токсическое действие МФТП и позволило сохранить до-

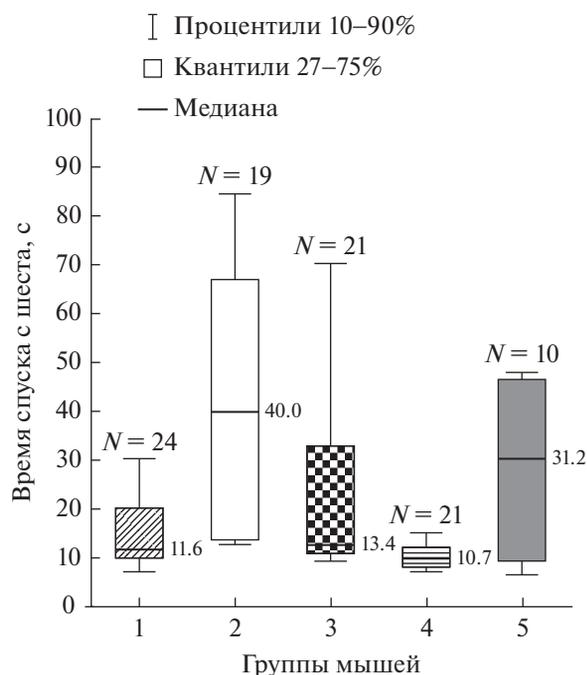


Рис. 3. Медиана максимального (в трех испытаниях) времени спуска мышей с шеста (в секундах) в экспериментальных группах.

фамин-содержащие нейроны у животных из группы 3 (“токсин + экстракт-1”) и 4 (“токсин + экстракт-2”) – полностью, а из группы 5 (“токсин + экстракт-3”) – частично.

Результаты исследования *in vitro* действия экстрактов *A. diaperinus* на клетки SH-SY5Y в присутствии токсина MPP⁺ представлены на рис. 5. Количество живых клеток после совместного воздействия токсина в двух концентрациях и “антидота” в виде трех экстрактов нормировано относительно воздействия самого токсина (без “антидота”), принятого за 100%. Видно, что первичный водный экстракт-1 снизил токсический эффект MPP⁺ в концентрации 2 мМ на 25%, а вторичный водно-метанольный экстракт-2 снизил тот же токсический эффект на 13%. Это проявилось в соответствующем повышении количества жизнеспособных клеток. Остаток, смытый с

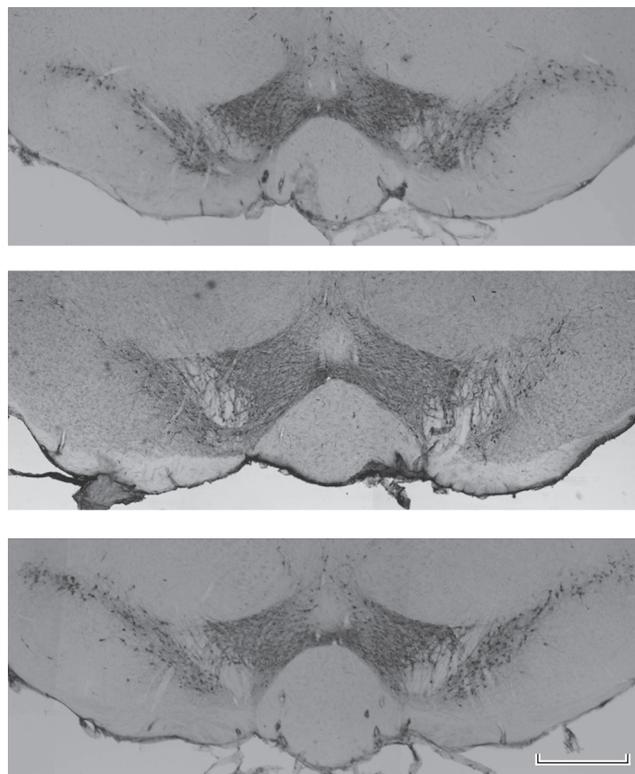


Рис. 4. Поперечный срез головного мозга. Вверху – мышь из контрольной группы 1. Темным окрашены клетки, содержащие тирозингидроксилазу. В центре – область вентральной покрышки среднего мозга, расходящиеся “крылья” – компактная часть черной субстанции. В середине – та же область головного мозга мыши из группы 2 (“токсин”). Внизу – та же область головного мозга мыши из группы 3 (“токсин + экстракт-1”) через 2 нед. после введения подкожно пронеуротоксина МФТП. Масштаб – 1 мм.

патрона Sep-Pack C18 (экстракт-3) не оказал протекторного действия.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

В поведенческом тесте в опытах на мышах C57BL/6JSto получены достоверные данные по протекторным свойствам водного и вторичного водно-метанольного экстракта жука-чернотелки *A. diaperinus* по отношению к пронеуротоксину МФТП, и профилактики препаратами, содержа-

Таблица 2. Результаты гистохимического исследования мозга

Показатель	Группа мышей				
	1 контроль	2 “токсин без экстракта”	3 “токсин + + экстракт-1”	4 “токсин + + экстракт-2”	5 “токсин + + экстракт-3”
Количество ТГ-содержащих нейронов в SNrс+VTA (M ± S.E.M)	11797 ± 703*	3435 ± 308	13472 ± 610*	15360 ± 823*	8064 ± 464

* $p < 0.05$ по сравнению с группой 2, U-критерий.

щими экстракты, развития экспериментальной модели болезни Паркинсона.

Первичный водный экстракт-1 содержал компоненты, выделение которых методом твердофазной экстракции ТФЭ [42] позволило получить из первичного водного экстракта более эффективный вторичный водно-метанольный экстракт-2. Экстракт-3, содержащий остаточные вещества после вторичной водно-метанольной экстракции, не оказал протекторного действия, и время спуска мышей с вертикального шеста достоверно не отличалось от аналогичного показателя животных из группы 2 (“токсин без экстракта”). Первичный водный экстракт показал большой статистический разброс данных, что может быть связано с некоторой нестабильностью экстракта, поскольку он может содержать ферменты, автолизирующие активные вещества, или окислители, инактивирующие их. Вторичный водно-метанольный экстракт-2 продемонстрировал более устойчивое действие на мышей. Это позволяет предположить, что в составе вторичного водно-метанольного экстракта-2 содержится вещество (вещества), вносящее наиболее важный вклад в эффективную “компенсацию” у мышей линии С57 клинических проявлений начальной стадии экспериментально вызванной БП и улучшающие мозговую деятельность.

Действие пронеуротоксина МФТП на мышей выразилось также в существенном (на 70%) уменьшении количества дофамин содержащих нейронов в области SNpc долового мозга животных из группы 2 (“токсин без экстракта”) по сравнению с контрольными особями (группа 1), что соответствует литературным данным [12, 30]. Эти результаты в целом соответствуют показателям поведенческого теста на двигательную координацию на вертикальном шесте. Учитывая, что физиологически активные экстракты жука поступали в организм животного с кормом, а эффект выявлен на морфологии клеток головного мозга, можно предположить, что активными должны быть низкомолекулярные водорастворимые соединения, попадающие из желудочно-кишечного тракта в кровь и по кровеносной системе достигающие головного мозга, проникающие через гематоэнцефалический барьер и оказывающие протекторное воздействие на дофаминергические нейроны.

Возможны, по крайней мере, два пути для такого воздействия. Во-первых, через торможение глиального фермента MAO-B, превращающего пронеуротоксин МФТП в нейротоксин MPP⁺ и, во-вторых, через активацию глиального нейротрофического фактора – защитного белка дофаминергических нейронов [43].

Обнаруженное присутствие L-аргинина в экстрактах может указывать на то, что эта аминокислота является важным компонентом экстрактов, действующим против болезни Паркинсона. Известно, что аргинин, донор оксида азота, самого

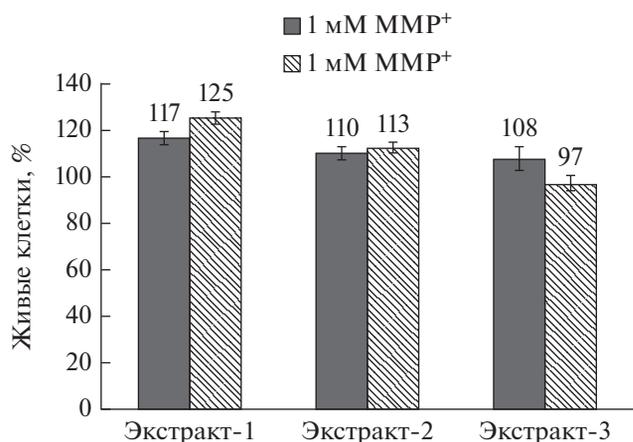


Рис. 5. Протекторное действие на клетки SH-SY5Y экстрактов *A. diaperinus*. Количество живых клеток (по оси ординат) после совместного воздействия токсина в концентрациях 1 и 2 мМ и “антидота” в виде трех экстрактов нормировано относительно воздействия самого токсина (без “антидота”), принятого за 100%.

мощного из эндогенных сосудорасширяющих веществ, является также предшественником вещества ADMA (асимметричный диметиларгинин), эндогенного ингибитора NO-синтазы. Таким образом осуществляется саморегуляция образования NO в организме. При БП, особенно на поздних стадиях заболевания, нарушается соотношение аргинин/ADMA, что приводит к NO недостаточности. Представляется, таким образом, что ADMA является фактором риска для БП и может участвовать в ее патогенезе. Современная терапия БП включает потребление аргинина в качестве пищевой добавки наряду с витаминами B6, B12 и фолиатами [7, 44, 45].

На культуре клеток нейробластомы SH-SY5Y получены эффекты *in vitro*, лишь частично коррелирующие с результатами, полученными на интактных животных *in vivo*. Таким образом, использование культуры клеток SH-SY5Y в качестве модели для исследования взаимодействия токсина MPP⁺ с различными фракциями экстрактов жука *A. diaperinus* требует дальнейшего изучения. Тем не менее, и на культуре клеток показано принципиальное антиоксическое действие экстрактов жука-чернотелки *A. diaperinus*. Причины меньшей протекторной эффективности вторичного водно-метанольного экстракта по сравнению с первичным водным экстрактом на культуре клеток нейробластомы, не соответствующей поведенческой реакции мышей, можно объяснить присутствием в первичном водном экстракте более широкого спектра веществ, чем во вторичном водно-метанольном экстракте. Эти вещества, которые остались в патроне Sep-Pack C18 после пропуска водно-метанольного экстракта, усиливают действие на клетки компонентов

экстракта-2. Кроме того, мышам давали сухие препараты, а культуре клеток – непосредственно экстракты. Возможно, в препаративной форме первичного водного экстракта активные, действующие против БП вещества подвергались разрушению, что снижало биологическую эффективность препарата. Препаративная форма вторичного водно-метанольного экстракта была более устойчива при хранении, поэтому произвела больший эффект.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, в настоящей работе впервые показано, что выраженные сенсомоторные нарушения, выявляемые в тесте с вертикальным шестом, возникавшие у мышей через 2 нед. после системного введения 40 мг/кг пронейротксина МФТП, были снижены или отсутствовали, если животные получали с пищей “антидот” в виде первичного водного или вторичного водно-метанольного экстрактов биомассы жука-чернотелки *A. diaperinus*. Результаты гистохимического анализа количества дофаминсодержащих нейронов головного мозга показали сохранение пигментированных нейронов после инъекции токсина при содержании животных на профилактическом рационе с водными экстрактами гомогената биомассы жука и соответствовали данным, полученным в поведенческом тесте с вертикальным шестом. Культура клеток нейробластомы SH-SY5Y в меньшей степени реагировала на действие экстрактов, однако выявлено некоторое протекторное действие первичного водного экстракта жука-чернотелки, и в меньшей степени – вторичного водно-метанольного экстракта.

БЛАГОДАРНОСТИ

Работа поддержана программой Президиума РАН “Фундаментальные исследования для разработки биомедицинских технологий” и грантом РФФИ (проект № 15-06-0909/17-ОГОН).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Угрюмов М.В. // Нейродегенеративные заболевания. Фундаментальные и прикладные аспекты / Ред. Угрюмов М.В. М.: Наука, 2010. С. 8–35.
2. Угрюмов М.В. // Нейродегенеративные заболевания: от генома до целостного организма / Ред. Угрюмов М.В. М.: Научный мир, 2014. Т. 1, 2.
3. Zhang Z.-T., Cao X.-B., Xiong N., Wang H.-C., Huang J.-S., Sun S.-G., Wang T. // Acta Pharmacologica Sinica. 2010. V. 31. P. 900–906.
4. Гехт А.Б., Попов Г.Р., Гудкова А.А., Коришнова Е.С., Болдырева Е.А., Гусев Е.И. // Нейродегенеративные заболевания: от генома до целостного организма / Ред. Угрюмов М.В. М.: Научный мир, 2014. Т. 1. С. 74–95.
5. Нодель М.Р. // Неврология, нейропсихиатрия, психосоматика. 2013. № 2. С. 29–34.
6. Угрюмов М.В., ред. // Нейродегенеративные заболевания: фундаментальные и прикладные аспекты. М.: Наука, 2010. 448 с.
7. Белокоскова С.Г., Цикунов С.Г. // Обзоры по клинической фармакологии и лекарственной терапии 2013. Т. 11. № 4. С. 61–67.
8. Колачева А.А., Козина Е.А., Хакимова Г.Р., Кучеряну В.Г., Кудрин В.С., Нигматуллина Р.Р., Базян А.С., Григорьян Г.А., Угрюмов М.В. // Нейродегенеративные заболевания: от генома до целостного организма / Ред. Угрюмов М.В. М.: Научный мир, 2014. Т. 1. С. 356–422.
9. Ковальзон В.М., Завалко И.М. // Нейрохимия. 2013. Т. 30. № 3. С. 193–206.
10. Ковальзон В.М., Завалко И.М., Дорохов В.Б. // Нейродегенеративные заболевания: от генома до целостного организма / Ред. Угрюмов М.В. М.: Научный мир. 2014. Т. 1. С. 136–161.
11. Yokoyama H., Kuroiwa H., Kasahara J., Araki T. // Acta Neurobiol. Exp. 2011. V. 71. P. 269–280.
12. Ugrumov M.V., Khaindrava V.G., Kozina E.A., Kucheryanu V.G., Bocharov E.V., Kryzhanovsky G.N., Kudrin V.S., Narkevich V.B., Klodt P.M., Rayevsky K.S., Pronina T.S. // Neuroscience. 2011. V. 181. P. 175–188.
13. Корначев В.В. // Целебная фауна. М.: Наука, 1989. 189 с.
14. Бакулин А.В., Велешко И.Е., Румянцева Е.В., Левов А.Н., Бурмистрова Л.А., Курченко В.П., Хисматуллин Р.Г., Варламов В.П., Кривцов Н.И. // Доклады РАН. 2011. № 5. С. 48–52.
15. Mak P., Chmiel D., Gasek G.J. // Acta Biochim. Pol. 2001. V. 48. № 4. P. 1191–1195.
16. Finke M.D. // Zoo. Biology. 2002. V. 21. P. 269–285.
17. Naga J.P., Suneetha Y., Kumar K.P. // Int. J. Pharm. Life Sci. 2014. V. 5. № 5. P. 3546–3553.
18. Zhang Q., Yan S.-Q., Li M.-Z. // J. Fib. Bioeng. Inform. Rev. 2010. V. 3. № 1. P. 1–8.
19. Chernysh S.I., Gordja N.A., Simonenko N.P. // Entomol. Sci. 2000. V. 3. № 1. P. 139–144.
20. Chernysh S.I., Filatova N.A., Chernysh N.S. // J. Insect Physiol. 2004. V. 50. P. 777–781.
21. Geiselhardt S., Schmitt T., Peschke K. // Chemoecology. 2009. V. 19. № 1. P. 1–6.
22. Gunbilig D., Boland W. // Sci. Pharm. 2009. V. 77. № 3. P. 597–604.
23. Brown W.V., Doyen J.T., Moore B.P., Lawren J.F. // J. Aust. Ent. Soc. 1992. V. 31. № 1. P. 79–89.
24. Howard R.W., Jurenka R.A., Blomquist G.J. // Insect Biochem. 1986. V. 16. № 5. P. 757–760.
25. Wahrenndorf M.S., Wink M. // J. Ethnopharmacol. 2006. V. 106. № 1. P. 51–56.
26. Santos R.C., Lunardelli A., Caberlon E., Bastos C.M., Nunes F.B., Pires M.G.S., Biolchi V., Paul E.L., Vieira F.B.C., do Carmo Aquino A.R., Corseuil E., de Oliveira J.R. // Inflammation. 2009. V. 33. № 3. P. 173–179.
27. Crespo R., Villaverde M.L., Girotti J.R., Güerci A., Juárez M.P., de Bravo M.G. // J. Ethnopharmacol. 2011. V. 136. № 1. P. 204–209.
28. Mendoza D.L.M., Saavedra S.A. // Vitae. 2013. V. 20. № 1. P. 41–48.

29. Соколов Е.А. // Вредители запасов, их карантинное значение и меры борьбы. Оренбург: Печатный дом "Димур", 2004.
30. Ушакова Н.А., Ковальзон В.М., Бастратов А.И., Козлова А.А., Ревещин А.В., Павлова Г.В., Павлов Д.С. // ДАН (биохимия, биофизика, молекулярная биология). 2015. Т. 461. № 3. С. 358–361.
31. Ковальзон В.М., Ушакова Н.А., Бастратов А.И., Козлова А.А., Амбарян А.В., Шевченко В.П., Нагаев И.Ю., Павлов Д.С. // Рос. физиол. журн. 2016. Т. 102. № 4. С. 436–441.
32. Барам Г.И., Куснер Ю.С., Миргородская О.А., Назимов И.В., Подтележников А.В. // Биоорг. химия. Т. 15. № 11. С. 1462–1467.
33. Fernagut P. O., Chalon S., Diguet E., Guilloteau D., Tison F., Jaber M. // Neuroscience. V. 116. P. 1123–1130.
34. Fleming S.M., Salcedo J., Fernagut P.O., Rockenstein E., Masliah E., Levine M.S., Chesselet M.F. // J. Neurosci. V. 24. № 42. P. 9434–9440.
35. Matsuura K., Kabuto H., Makino H., Ogawa N. // J. Neurosci. Methods. 1997. V. 73. P. 45–48.
36. Ogawa N., Hirose Y., Ohara S., Ono T., Watanabe Y. // Res. Commun. Chem. Pathol. Pharmacol. 1985. V. 50. P. 435–441.
37. Ogawa N., Mizukawa K., Hirose Y., Kajita S., Ohara S., Watanabe Y. // Eur. Neurol. 1987. V. 26. Suppl. 1. P. 16–23.
38. Sedelis M., Schwarting R.K., Huston J.P. // Behav. Brain Res. 2001. V. 125. P. 109–125.
39. Kovalzon V.M., Moiseenko L.S., Ambaryan A.V., Kurtenbach S., Shestopalov V.I., Panchin Y.V. // Behav. Brain Res. 2017. V. 318. № 1. P. 24–27.
40. West M.J., Ostergaard K., Andreassen O.A., Finsen B. // J. Comp. Neurol. 1996. V. 370. P. 11–22.
41. Heo D.S., Park J.G., Hata K., Day R., Herberman R.B., Whiteside T.L. // Cancer Res. 1990. V. 50. № 12. P. 3681–3690.
42. McDonald P.D., Bouvier E.S.P. // Solid Phase Extraction Applications Guide and Bibliography. A Resource for Sample Preparation Methods Development. Milford, MA: Waters, 1995.
43. Revishchin A., Moiseenko L., Kust N., Bazhenova N., Teslia P., Panteleev D., Kovalzon V., Pavlova G. // BMC Neuroscience. 2016. V. 17. № 1. Paper 34.
44. Халимова Х.М., Раимова М.М., Матмуродов П.Ж. // Український хіміотерапевтичний журнал. 2012. № 3. С. 148–150.
45. Dorszewska J., Kozubski W. // Etiology and Pathophysiology of Parkinson's Disease / Ed. Rana A.Q. Rijeka: InTech, 2011. P. 349–372.

Blockage of the Action of the Proneurotoxin MPTP and Toxin MPP⁺ by Extracts of Homogenates of *Alphitobius diaperinus* Litter Beetles in an Experimental Model of Parkinson's Disease

N. A. Ushakova^a, V. M. Koval'zon^a, V. P. Shevchenko^b, I. Yu. Nagaev^b, E. Yu. Rybalkina^c, A. V. Revishchin^d, A. V. Ambaryan^a, A. I. Bastrakov^a, G. V. Pavlova^d, D. S. Pavlov^a

^aSevertsov Institute of Ecology and Evolution, Russian Academy of Sciences, Moscow, Russia

^bInstitute of Molecular Genetics, Russian Academy of Sciences, Moscow, Russia

^cBlokhin Russian Oncological Scientific Center, Ministry of Health of Russian Federation, Moscow, Russia

^dInstitute of Gene Biology, Russian Academy of Sciences, Moscow, Russia

Adult male mice C57BL/6 ($n = 105$) were divided into five groups. The first group served as a control. In the 2nd–5th groups, the animals were treated subcutaneously with 40 mg/kg of proneurotoxin MPTP (methylphenyltetrahydropyridine), which forms a state similar to the initial stage of Parkinson's disease over a 2-week period. Mice of groups 3–5 daily received an additive along with their food: one of three extracts of the biomass of the litter beetle *Alphitobius diaperinus*. In 2 weeks, all animals were tested for motor disorders in the vertical bar test; they were then euthanized and histochemical analysis of the dopamine-containing brain regions was performed. In addition, the same extracts were tested for counteraction to MPP⁺ toxin in cultured neuroblastoma cells. It was found that the primary aqueous and, especially, secondary water–methanol extracts had a powerful protective effect against the neurotoxic effect judging by the results of both the behavioral test and morphological control. Arginine was found at substantial concentrations in both effective extracts. An in vitro study confirmed the protective effect of the primary aqueous extract.

Keywords: extract of homogenate of litter beetle, *Alphitobius diaperinus*, experimental model of Parkinson's disease, motor dysfunction, cell culture of neuroblastoma, protective effect