

ОРИГИНАЛЬНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

НЕЙРОНАУКИ

**БЛОКИРОВАНИЕ ЭКСТРАКТОМ ЖУКА-ЧЕРНОТЕЛКИ
ALPHITOBIOUS DIAPERINUS СЕНСОМОТОРНЫХ НАРУШЕНИЙ
У МЫШЕЙ СО СТРИАРНОЙ ДОФАМИНЕРГИЧЕСКОЙ
НЕДОСТАТОЧНОСТЬЮ**

© В. М. Ковальзон,¹ Н. А. Ушакова,¹ А. И. Бастрakov,¹
А. А. Козлова,¹ А. В. Амбарян,¹ В. П. Шевченко,² И. Ю. Нагаев,²
Д. С. Павлов¹

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

² Институт молекулярной генетики РАН, Москва, Россия
E-mail: naushakova@gmail.com; somnolog43@gmail.com

Пять групп мышей линии C57Bl/6JSto (группы 1—5) тестировали на вертикальном шесте спустя две недели после подкожного введения группам 2—5 пронеуротоксина МФТП в дозе 40 мг/кг, формирующего в течение этого периода сенсомоторные нарушения, сходные с начальной стадией болезни Паркинсона. 1—я группа мышей служила контролем. За неделю до введения метилфенилтетрагидропиридин (МФТП) и в течение всего периода после его введения (2 недели) животным групп 3—5 в качестве пищевой добавки (8 г на 1 кг корма) давали один из трех экстрактов гомогената биомассы «жука-целителя» *Alphitobius diaperinus*. Экстракты были: водный (№ 1), водно-метанольный (№ 2) и водно-метанольный после твердофазной экстракции (№ 3). Экстракты иммобилизовали на фитонсителе. Животных групп 1 и 2 содержали на обычном рационе без введения препаратов. Выраженные сенсомоторные нарушения у мышей группы 2 (токсин) отсутствовали как в группе 1 (контроль), так и в группах 3—5, в которых животные получали с пищей «антидот» в виде экстракта биомассы жука-чернотелки. Наибольшая эффективность выявлена у препарата № 3.

Ключевые слова: экстракты биомассы жука-чернотелки, экспериментальная модель паркинсонизма, двигательные дисфункции.

Рос. физиол. журн. им. И. М. Сеченова. Т. 102. № 4. С. 000—000. 2016

V. M. Kovalzon,¹ N. A. Ushakova,¹ A. I. Bastrakov,¹ A. A. Kozlova,¹ A. V. Ambaryan,¹ V. P. Shevchenko,² I. Yu. Nagaev,² D. S. Pavlov.¹ BLOCKING SENSORIMOTOR DISORDERS IN STRIATIC DOPAMINERGIC DEFICIENT MICE BY THE EXTRACTS OF «REMEDY BEETLE» *ALPHITOBIOUS DIAPERINUS*. ¹ Severtsov Institute Ecology and Evolution, Moscow, Russia; ² Institute of Molecular Genetics, Russian Academy Sciences, Moscow, Russia, e-mail: somnolog43@gmail.com.

Five groups of C57Bl/6JSto mice (groups 1—5) were tested on a vertical pole 2 weeks since subcutaneous administration of proneurotoxin MPTP (40 mg per kg b. w.) to groups 2—5. Group 1 served as control. It is known that this MPTP dosage forms within 2 weeks sensorimotor disturbances similar to the initial stage of Parkinson's disease. One week before MPTP injection and during all the period after it (2 weeks) animals of groups 3—5 got one of the three extracts of biomass

homogenate of the «remedy beetle» *Alphitobius diaperinus* as an additive to their food (8 g per 1 kg of food). The extracts were as follows: water (N 1), water-methanol (N 2) and water-methanol one after solid-phase extraction (N 3). All extracts were immobilized on a phytocarrrier. Animals of groups 1 & 2 used ordinary food. Sensorimotor disturbances which could be clearly seen in the 2nd group of mice (MPTP) were absent in group 1 (control) as well as groups 3—5 which received an «antidote» with their food as one of the extracts of homogenate of the beetle biomass. The extract N 3 demonstrated maximal efficiency of all.

Key words: extracts of biomass of the «remedy beetle», experimental models of parkinsonism, movement disorders.

RUSSIAN JOURNAL OF PHYSIOLOGY. V. 102. N 4. P. 000—000. 2016

В народной медицине в странах Центральной и Южной Америки известно применение жука-чернотелки *Ulomoides dermestoides* из семейства Tenebrionidae как источника биологически активных веществ, влияющих на такие физиологические дисфункции, как болезнь Паркинсона (БП) [13]. В литературе имеются единичные сведения о возможности медицинского применения водного и метанольного экстрактов этого жука, которые обладают противовоспалительным, иммуномодулирующим эффектом [10] и цитотоксичностью по отношению к клеткам некоторых опухолей [5]. Жук-чернотелка *Ulomoides dermestoides* — пантропический вид, не встречается в России. Близким видом к *Ulomoides dermestoides* является жук-чернотелка *Alphitobius diaperinus*, который широко распространен на территории РФ: в умеренной и южной зоне Европейской части и в Сибири [3]. Было предположено, что гомогенат биомассы взрослого жука *Alphitobius diaperinus* может обладать тормозящей активностью в отношении отставленных эффектов пронеуротоксина МФТП (метилфенилтетрагидропиридин), вызывающего экспериментальный паркинсонизм у мышей линии C57BL/6 [1, 2]. Проведенные предварительные опыты на модели ранней клинической стадии БП (системная однократная инъекция МФТП в дозе 40 мг/кг [15]) показали, что иммобилизованный на фитоносителе гомогенат жука *Alphitobius diaperinus* обладает выраженной способностью нейтрализовать отставленное действие на мышей пронеуротоксина МФТП при тестировании физической выносливости животных на вращающемся стержне (ротароде) через 2 недели после инъекции. Гистологические исследования выявили уменьшение количества тирозингидроксилаза (ТГ) — иммунопозитивных нейронов в компактной зоне черной субстанции (SNpc) у мышей, получивших пронеуротоксин, по сравнению с интактными мышами и животными, получавшими по профилактической схеме гомогенат жука *Alphitobius diaperinus* на фитоносителе. А между интактными мышами и животными, получавшими с пищей гомогенат, достоверных различий по дофаминергическим нейронам не отмечалось. Иными словами, полученные результаты указали на отсутствие характерного для развития паркинсонизма поражения дофаминергических нейронов SNpc у мышей, получивших и пронеуротоксин, и «антидот» [4].

Целью настоящего исследования явилась проверка рабочей гипотезы о способности водно-метанольных экстрактов гомогената жука *Alphitobius diaperinus* противодействовать двигательным дисфункциям, вызванным системными введениями пронеуротоксина МФТП в модели ранней стадии болезни Паркинсона у мышей.

МЕТОДИКА

Биомасса взрослого жука *Alphitobius diaperinus* получена при культивировании насекомого в ИПЭЭ РАН в контролируемых условиях на пшеничных отрубях. Свежесобранную биомассу после отделения от кормового субстрата обездвигивали при –18 °С, затем получили 15 мл водного экстракта, который после отделения осадка центрифугированием при 12000 g × 5 мин и последующего

фильтрации через 0.22 мкм-фильтр разделили на три части. Одну часть — 5 мл водного экстракта — оставили без дальнейшей обработки (экстракт № 1). Ко вторым 5 мл добавили метанол и после экстракции и повторного отделения осадка центрифугированием при 12000 г × 5 мин удалили метанол на роторном испарителе. Полученный экстракт довели водой до первоначального объема 5 мл (экстракт № 2). Получилась непрозрачная темно-желтая суспензия. К третьей части водного экстракта в количестве 5 мл добавили метанол и после экстракции повторно отделили осадок центрифугированием при 12000 г × 5 мин. Затем экстракт был проведен по стандартному варианту твердофазной экстракции с использованием Sep-Pack C18, и после удаления метанола на роторе получена водно-метанольная вытяжка, объем которой довели водой до 5 мл (экстракт № 3). Экстракт — раствор светло-желтого цвета. Полученные экстракты иммобилизовали на стерильных пищевых пшеничных отрубях, конечная влажность массы — 8 %. Препараты хранили в холодильнике и ежедневно в течение недели скармливали опытным мышам, для чего их 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.

Опыты проведены на молодых половозрелых самцах домового мыши линии C57BL/6JSto ($n = 56$). Животные содержались группами по 5—10 особей в стандартных клетках размером 360 × 245 × 105 см. Методом весовых аналогов были составлены 5 групп:

1 — контрольная группа без воздействия (животным не вводили токсин, и они не получали препарат в составе кормосмеси);

2 — контрольная группа — токсин без компенсации (контрольная группа мышей, которым инъецировали токсин, но не давали препаратов в составе кормосмеси);

3—5 — три опытные группы (мыши, в рацион которых вводили препараты с экстрактами и которым была сделана инъекция токсина): 3 — экстракт № 1; 4 — экстракт № 2; 5 — экстракт № 3.

В течение первой недели эксперимента мыши всех опытных групп (группы 3—5) получали соответствующие препараты в составе кормосмеси. Животные обеих контрольных групп (группы 1, 2) получали аналогичный корм без препаратов. Затем животным всех опытных групп и контрольной группы без компенсации (группы 2—5) был введен подкожно токсин МФТП в дозе 40 мг/кг, после чего в течение последующих двух недель мыши получали такой же корм, как и до инъекции (опытные группы 3—5 продолжали получать корм с соответствующими препаратами, контрольная группа 2 — основную кормосмесь). Мыши группы 1 (контрольная без воздействия) в течение всего опыта получали основную кормосмесь без препаратов, и этим мышам не вводили токсин.

Спустя две недели после введения токсина у мышей всех групп определяли наличие сенсомоторных нарушений в тесте с вертикальным шестом [6, 7, 9, 11, 12, 14] в нашей модификации. Индивидуальное тестирование проводили в знакомой для животных обстановке в стандартной кювете того же размера, что и их домашняя клетка. В начале тестирования в кювету ставили вертикальный шест с неполированной грубой поверхностью высотой 50 см и диаметром 1 см. Близко от вершины шеста на него помещали мышшь так, чтобы ее голова была ориентирована вертикально вверх. Оказавшись на шесте, мышшь переориентировала положение своего тела головой вертикально вниз и начинала спуск с шеста на дно клетки. С помощью секундомера фиксировали время спуска на дно клетки. Даже если животное после переориентирования спускалось по шесту не до конца и на некотором расстоянии до дна клетки падало, фиксировали время, за которое мышшь достигала дна клетки. В нашем варианте методики с каждой мышшь проводили 3 теста. Минимальный промежуток времени между тестированиями — 1 мин. Тест считали успешным, если мышшь успевала переориентировать свое тело и на-

чать 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 или 3 испытаниях) время спуска с шеста, поскольку именно этот показатель позволяет оценить локомоторные дисфункции, не позволяющие мышам 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.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Результаты показали наличие достоверных различий между экспериментальными группами: критерий Краскела—Уоллиса: $H_4 = 12.18$, $p = 0.016$ (табл. 1, 2). Медиана максимального времени спуска с шеста у мышей из группы 2 (контрольная — токсин без компенсации) достоверно превышала этот показатель в группе 1 (контрольные мыши без воздействия) и в опытных группах с экстракта-

Т а б л и ц а 1

Максимальное (из 2—3 попыток) время спуска мышей экспериментальных групп с шеста (с)

Группа мышей	Число особей в группе	Медиана времени спуска с шеста	Разброс	
			от	до
1	17	12	6	70
2	10	37	13	103
3	10	15	10	129
4	10	10.5	5	145
5	9	9	6	142

Т а б л и ц а 2

Статистика теста Коновера—Инмана (Q) и достоверность различий времени спуска с шеста между экспериментальными группами

Сравнения групп	Q -статистика	Вероятность (p)
Группы 1 и 2	2.52	0.015*
Группы 1 и 3	1.41	0.16
Группы 1 и 4	0.51	0.61
Группы 1 и 5	1.23	0.22
Группы 2 и 3	0.98	0.33
Группы 2 и 4	2.70	0.009**
Группы 2 и 5	3.29	0.002**
Группы 3 и 4	1.72	0.09
Группы 3 и 5	2.33	0.024*
Группы 3 и 5	0.66	0.51

Примечание. * $p \leq 0.05$, ** $p \leq 0.01$.

ми (группы 3—5, табл. 2). Было выявлено также, что медиана максимального времени спуска с шеста в группе 3 (водный экстракт) была достоверно выше, чем в группе 5 (метанольный экстракт № 2). Наиболее достоверными были различия между группой 2 (контрольная — токсин без компенсации) и группой 5 (экстракт № 3).

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Результаты, представленные в табл. 1 и 2, показывают, что введение пронеуротоксина МФТП значительно и достоверно снижало двигательную координацию мышей в тесте вертикального стрежня. Сравнение группы 1 с группами 3, 4 и 5 показывает, что все три примененных экстракта оказывали выраженное противодействие пронеуротоксину, сглаживая эффекты МФТП. Мощный антиоксидантический эффект обоих метанольных экстрактов (№ 2 и 3) подтверждается также сравнением группы 2 с группами 4 и 5. При этом сравнение групп 3 и 5 показывает, что метанольный экстракт № 3 оказался более эффективен при нейтрализации действия пронеуротоксина МФТП, чем водный экстракт № 1. Это позволяет предположить, что именно в составе метанольного экстракта № 3 содержится вещество (вещества), вносящее наиболее важный вклад в эффективную «компенсацию» у мышей линии С57 клинических проявлений начальной стадии экспериментально вызванного паркинсонизма.

Таким образом, исходная гипотеза была в целом подтверждена. Имобилизованные на фитоносителе водно-метанольные экстракты гомогената жука *Alphitobius diaperinus* действительно продемонстрировали способность «нейтрализовать» действие на мышей пронеуротоксина МФТП, моделирующее начальную стадию болезни Паркинсона. Выраженные сенсомоторные нарушения в тесте с вертикальным шестом, возникавшие у мышей через 2 недели после системного введения 40 мг/кг МФТП, отсутствовали, если животные получали с пищей «антидот» в виде экстракта гомогената биомассы жука-чернотелки.

Какое биологически активное вещество (вещества) в гомогенатах ответственно за противодействие разрушительному эффекту пронеуротоксина, и каков механизм этого противодействия — остается неизвестным и является предметом наших дальнейших исследований. В свете текущих представлений о механизмах действия МФТП возможно, в частности, такое предположение, как ингибирование фермента МАО-В, содержащегося в глии и превращающего пронеуротоксин МФТП в нейротоксин МФП⁺ (метилфенилпиридин-ион), разрушающий дофаминергические и другие нейроны [2]. Возможна также активация синтеза и реализации полипептида ГНФ (глиальный нейротрофический фактор), способствующего повышению устойчивости нейронов к неспецифическим разрушающим воздействиям [1, 8].

Работа выполнена при финансовой поддержке Программы президиума РАН П. 1П. Фундаментальные исследования для разработки биомедицинских технологий.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

[1] Ковальзон В. М., Завалко И. М. Нейрохимия цикла бодрствование—сон и болезнь Паркинсона. Нейрохимия. 30 (3): 193—206. 2013.

[2] Ковальзон В. М., Завалко И. М., Дорохов В. Б. Болезнь Паркинсона, дофаминергическая система мозга и регуляция сна. Нейродегенеративные заболевания. Ред. Угрюмов М. В. М. Мир науки. Т. 1. С.136—161. 2014.

[3] Соколов Е. А. Вредители запасов, их карантинное значение и меры борьбы. Оренбург. Печатный дом «Димур». 2004.

- [4] Ушакова Н. А., Ковальзон В. М., Бахраков А. И., Козлова А. А., Ревущин А. В., Павлова Г. В., Павлов Д. С. Способность гомогената жука-чернотелки *Alphitobius diaperinus*, иммобилизованного на фитоносителе, блокировать развитие экспериментального паркинсонизма. Докл. АН (биохимия, биофизика, молекулярная биология). 461(3): 358—361. 2015.
- [5] Crespo R., Villaverde M. L., Girotti J. R., Gierci A., Jubrez M. P., Bravo M. G. Cytotoxic and genotoxic effects of defence secretion of *Ulomoides dermestoides* on A549 cells. J. Ethnopharmacol. 136(1): 204—209. 2011.
- [6] Fernagut P. O., Chalon S., Diguet E., Guilloteau D., Tison F., Jaber M. Motor behaviour deficits and their histopathological and functional correlates in the nigrostriatal system of dopamine transporter knockout mice. Neuroscience. 116: 1123—1130. 2003.
- [7] Fleming S. M., Salcedo J., Fernagut P. O., Rockenstein E., Masliah E., Levine M. S., Chesselet M. F. Early and progressive sensorimotor anomalies in mice overexpressing wild-type human alpha-synuclein. J. Neurosci. 24(42): 9434—9440. 2004.
- [8] Manolov A. I., Dolgikh V. V., Revishchin A. V., Pavlova G. V., Zavalko I. M., Moiseenko L. S., Ukrainseva Y. V., Bazhenova N. S., Galimova D. R., Dorokhov V. B., Kovalzon V. M. The protector effect of transgene GDNF on sleep in MPTP mouse model of Parkinson's disease. J. Sleep Res. 23(Suppl. 1): 57. 2014.
- [9] Matsuura K., Kabuto H., Makino H., Ogawa N. Pole test is a useful method for evaluating the mouse movement disorder caused by striatal dopamine depletion. J. Neurosci. Methods. 73: 45—48. 1997.
- [10] Mendoza D. L. M., Saavedra S. A. Chemical composition and anti-irritant capacity of whole body extracts of *Ulomoides dermestoides* (coleoptera, tenebrionidae). Vitae. 20(1): 41—48. 2013.
- [11] Ogawa N., Hirose Y., Ohara S., Ono T., Watanabe Y. A simple quantitative bradykinesia test in MPTP-treated mice. Res. Commun. Chem. Pathol. Pharmacol. 50: 435—441. 1985.
- [12] Ogawa N., Mizukawa K., Hirose Y., Kajita S., Ohara S., Watanabe Y. MPTP-induced parkinsonian model in mice: biochemistry, pharmacology and behavior. Eur. Neurol. 26 (Suppl 1): 16—23. 1987.
- [13] Santos R. C., Lunardelli A., Caberlon E., Bastos C. M., Nunes F. B., Pires M. G., Bicolchi V., Paul E. L., Vieira F. B., Resende do Carmo Aquino A., Corseuil E., de Oliveira J. R. Anti-inflammatory and immunomodulatory effects of *Ulomoides dermestoides* on induced pleurisy in rats and lymphoproliferation in vitro. Inflammation. 33(3): 173—179. 2010.
- [14] Sedelis M., Schwarting R. K., Huston J. P. Behavioral phenotyping of the MPTP mouse model of Parkinson's disease. Behav. Brain Res. 125: 109—125. 2001.
- [15] Ugrumov M. V., Khaindrava V. G., Kozina E. A., Kucheryanu V. G., Bocharov E. V., Kryzhanovskiy G. N., Kudrin V. S., Narkevich V. B., Klodt P. M., Rayevskiy K. S., Pronina T. S. Modeling of presymptomatic and symptomatic stages of parkinsonism in mice. Neuroscience. 181: 175—188. 2011.

Поступила 18 XI 2015
После доработки 20 I 2016