

**ФАРМАКОЛОГИЯ И ФАРМАЦИЯ
PHARMACOLOGY AND PHARMACY**

DOI: 10.29413/ABS.2019-4.2.15

Изучение нейропротективного действия экстракта чистотела большого (*Chelidonium majus L.*) *in vitro*

Жалсрай А.¹, Санжиева Л.Ц.²

¹ Институт традиционной медицины и технологии (210646, г. Улан-Батор, ул. Чингисхана, 214, Монголия); ² ФГБОУ ВО «Бурятский государственный университет им. Доржи Банзарова» (670000, Республика Бурятия, г. Улан-Удэ, ул. Смолина, 24а, Россия)

Автор, ответственный за переписку: Санжиева Людмила Цымпиловна, e-mail: ltssanzh@gmail.com

Резюме

Целью данного исследования было изучение нейропротекторного действия экстракта чистотела большого (*Chelidonium majus L.*). Количество определение суммарного алкалоида из экстракта Чистотела большого проводили методом титрования. Экстракт чистотела большого продемонстрировал значительное ингибирование свободных липидных радикалов в ESR-анализе, но не уменьшал образование гидроксильных радикалов. Концентрация полумаксимального ингибирования (IC_{50}) свободных липидных радикалов экстрактом составила 2,96 мг/мл, тогда как для гидроксильных радикалов она составила 55,13 мг/мл. Также оценено защитное действие экстракта чистотела большого против митохондриальной дисфункции, вызванной 100 мкМ малондиальдегида, в изолированных митохондриях клеток головного мозга. Экстракт чистотела большого в концентрациях 12 и 25 мг/мл достоверно увеличивал пониженный уровень комплекса I, что указывает на проявление его антиоксидантного действия. Но при этом экстракт не влиял на пониженный уровень активности энзимов электронтранспортной цепи митохондрий (комплекс II и малатдегидрогеназы МДГ), вызванный 100 мкМ малондиальдегида. Также мы изучили защитное действие экстракта против нейротоксичности, вызванной перекисью водорода (H_2O_2) в культивированных кортикальных нейронах. Показано, что экстракт чистотела большого в концентрациях от 0,05 до 0,5 мг/мл достоверно снижает гибель нейронов, вызванную токсическим действием перекиси водорода (100 мкМ, H_2O_2).

При определении механизма действия использовался люциферазный тест ARE-luc. Было показано, что экстракт активирует ARE-зависимую экспрессию генов, но не влияет на пониженный уровень NF-E2-зависимого фактора 2 (Nrf2).

Можно предположить, что экстракт чистотела большого оказывает нейрозащитное действие, активируя ARE-зависимый сигнальный путь.

Ключевые слова: чистотел большой, нейропротективное действие, антиоксидант-респонсивный элемент

Для цитирования: Жалсрай А., Санжиева Л.Ц. Изучение нейропротективного действия экстракта чистотела большого (*Chelidonium majus L.*) *in vitro*. *Acta biomedica scientifica*. 2019; 4(2), 108-115. doi: 10.29413/ABS.2019-4.2.15

The Study of the Neuroprotective Effect of the Extract from *Chelidonium Majus L.* *in Vitro*

Zhalsrai A.¹, Sanzhieva L.Ts.²

¹ Institute of Traditional Medicine and Technology (ul. Genghis Khan 214, Ulaanbaatar 210646, Mongolia); ²Banzarov Buryat State University (ul. Smolina 24a, Ulan-Ude 670000, Russian Federation)

Corresponding author: Lyudmila Ts. Sanzhieva, e-mail: ltssanzh@gmail.com

Abstract

*The protection of neurons from damage and death is an important challenge in the development of treatment of brain ischemia and neurodegenerative diseases. This study aims to investigate protective effect of the extract prepared from Chelidonium majus, which contains total alkaloids. In the present study, we examined antioxidant activity of total alkaloids from Chelidonium majus *in vitro*. Hydroxyl radical and lipid radicals were detected using spin trapping agents with ESR spectrometer. Chelidonium majus extract exhibited dose-dependent scavenging effects on lipid radicals. Half-maximal inhibitory concentration (IC_{50}) of the extract was 2.96 mg/ml, whereas for hydroxyl radicals it was 55.13 mg/ml. These results showed that extract of Chelidonium majus is partly inhibited free radicals.*

Antioxidant effects of this extract were further demonstrated by protecting enzyme activity of the mitochondrial respiratory electron transport chain (complex I) in isolated brain mitochondrial dysfunction induced by MDA. However, it did not change the decreased level of complex II, and malate dehydrogenase (MDH) in a concentration of 12 and 25 mg/ml.

Here, we examined the neuroprotective effect of the extract from *Chelidonium majus* against oxidative stress in cultured cortical neurons, using MTT. We found that pretreatment with the extract of *Chelidonium majus* (0.05 and 0.5 mg/ml) significantly inhibited H₂O₂-induced cell death in cortical neurons. Furthermore, the use of a luciferase reporter (ARE-luc) assay showed that extract from *Chelidonium majus* activates protective signaling pathway in primary cortical neurons through ARE/Nrf2 pathway. Together, this suggests that total alkaloids from *Chelidonium majus* may be neuroprotective by increasing anti-oxidant gene expression.

Key words: *Chelidonium majus* L, neuroprotection effects, antioxidant responsive elements

For citation: Zhalsrai A., Sanzhieva L.Ts. The study of the neuroprotective effect of the extract from *Chelidonium majus* L. *in vitro*. *Acta biomedica scientifica*. 2019; 4(2), 108-115. doi: 10.29413/ABS.2019-4.2.15

Чистотел большой *Chelidonium majus* L. – многолетнее травянистое растение, принадлежащее семейству маковых (*Papaveraceae*). Трава чистотела большого содержит три типа бензилизохинолин-алкалоидов, сапонины, витамины, органические кислоты и эфирные масла [1]. Чистотел большой широко используется в народной медицине европейских и азиатских стран, особенно, в традиционной китайской медицине [1]. Экстракт чистотела большого обладает сильным антиоксидантным, антипролиферативным, а также противораковым и генотоксическим действием [2]. Алкалоиды и флавоноиды чистотела большого, благодаря своим антиоксидантным свойствам, могут оказывать хемозащитное и цитотоксическое действие, вызывая апоптоз [3], уменьшают число повреждённых клеток и подавляют активность аминотрансферазы, вызванной p-DAB [4, 5]. Несмотря на широкое терапевтическое применение чистотела большого, его эффекты довольно противоречивы и поэтому, действие экстракта нуждается в детальных исследованиях.

Одним из механизмов защиты при оксидативном стрессе является антиоксидант-респонсивный элемент (ARE). ARE также известен как активатор цис-регуляторной последовательности в участках промотора генов, кодирующих защитные белки [6]. В научной литературе описан широкий спектр различных индукторов транскрипции генов, регулируемых ARE: прежде всего это хинон-оксидоредуктаза-1 и антиоксидантные энзимы. Гены, отвечающие за антиоксидантную защиту, регулируются через транскрипционный NF-E2-зависимый фактор 2 (Nrf2). В норме Nrf2 находится в цитоплазме в виде комплекса с белком Keap1. В ответ на окислительный стресс Cys-остатки в Keap1 окисляются, Nrf2 высвобождается, транслоцируется в ядро и связывается с ARE-содержащими промоторами генов [7]. Хотя окислительный стресс в цитоплазме способствует активации Nrf2, но окислительные условия в ядре ингибируют связывание Nrf2 с ARE [8].

Целью настоящего исследования явилось выяснение нейропротективного действия экстракта чистотела большого и оценка его влияния на антиоксидант-респонсивный элемент (ARE).

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

В работе использовали половозрелых крыс линии Wistar весом 200–250 г, мышей линии Wistar 20–25 г из вивария Института Традиционной Медицины и Технологии при Министерстве Образования Монголии. Крысы содержали по восемь особей в клетке. Все животные находились в контролируемых условиях (суточный цикл состоял из 12 часов дня и 12 часов ночи).

Эксперименты выполнены с соблюдением принципов гуманности, изложенных в директиве Европейского

сообщества (86/609EC) и одобренных Комитетом по медицинской этике в соответствии с положением Института ТМТ Министерства Образования о работе с экспериментальными животными.

В работе были использованы следующие препараты:

Фактор Ха быка, NaCl, KCl, CaCl₂, MgCl₂, KH₂PO₄, HEPES, глюкоза, глутамат, поли-D-лизин, гелданамин, MTT (3-(4,5-Dimethyl-2-thiazolyl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide), ЭГТА, 2-APB, дантролен, иономицин, тетродотоксин, ФМСФ, ARAC, «TritonX-100» (Sigma, USA); NF-kBp65 total kit ELISA (Biosource). Набор для анализа гена двойной люциферазы Dual-Glo был приобретён в Promega, (Promega, Medison, WI, USA). tBHQ и все другие реагенты приобретены у Sigma-Aldrich (Poole, UK).

Конструкции плазмид: pR BGP2 и Nrf2 плазмиды были любезно предоставлены профессором Ken Itoh (Университет Цукуба, Япония). Renilla (pRL-TK) плазмиды приобретены в Promega.

Приготовление экстракта

0,5 кг измельчённой надземной части чистотела большого замачивали в 0,5 л 1%-ного раствора аммиака, закрывали пробкой и выдерживали в течение 15 минут. Затем прибавляли 2 л хлороформа, интенсивно перемешивали и оставляли на 17 часов при комнатной температуре для экстракции, после чего фильтровали через тампон из стекловаты [9]. К полученному экстракту добавляли 0,5 л 5%-ного раствора соляной кислоты. Используемые растворители и соляная кислота взаимонерастворимы, поэтому формируется чёткая граница раздела фаз в растворе. Сосуды со смесями экстрактов и соляной кислотой энергично встряхивали в течение часа. Алкалоиды переходят из экстракта в раствор соляной кислоты и там аккумулируются. Для отделения алкалоидов от кислоты использовался традиционный метод обратного перевода алкалоидов в форму свободных оснований. Для этого солянокислая фракция подщелачивалась 10%-ным раствором едкого натра до pH10 (значение pH определялось по индикаторной бумаге) и к ней добавляли 1 л хлороформа. Содержимое сосуда энергично встряхивалось в течение 1 часа, после чего хлороформная фракция отделялась с помощью делильной воронки. Этот раствор алкалоидов упаривался в роторном испарителе (40–50 °C), а сухой остаток растворялся в 20–100 мл этанола. Такой препарат суммы алкалоидов использовался для дальнейших исследований.

Количественное определение алкалоида проводили методом титрования [10]. 1 г вещества переносили в стакан для титрования последовательно с помощью 5 мл хлороформа, 10 мл ледяной уксусной кислоты, 10 мл ацетонитрила и титровали потенциометрически раствором хлорной кислоты (0,05 моль/л). Содержание суммы алкалиодов в пересчёте на хелидонин составляло 1,9 %.

Содержание суммы алкалоидов в пересчёте на хелидонин (абсолютно сухого вещества) в процентах (Х) вычисляли по формуле:

$$X = \frac{(V - V1) \times 0,01765 \times 100 \times 100 \times 80}{m \times (100 - W) \times 50}$$

где: 0,01765 – количество суммы алкалоидов в пересчёте на хелидонин, соответствующее 1 мл раствора хлорной кислоты (0,05 моль/л), в граммах; V – объём хлорной кислоты (0,05 моль/л), пошедшей на титрование суммы алкалоидов, в миллилитрах; V1 – объём хлорной кислоты (0,05 моль/л), пошедшей на титрование в контрольном опыте, в миллилитрах; m – масса сырья в граммах; W – потеря в массе при высушивании сырья в процентах.

Полученные водно-спиртовые экстракты выпаривали под вакуумом до густого остатка и оставляли в холодильнике (-80 °C) до использования.

Определение флавоноидов и алкалоидов проводили методом тонкоструйной хроматографии. Для определения алкалоидов использовали смеси (4:3:2) хлороформ : метанол : вода в качестве элюента и спрей хлорида алюминия. Для флавоноидов использовали смеси (30:10:15) этилацетат : муравьиная кислота : уксусная кислота в качестве элюента 365 нм.

Выделение и культивирование нейронов коры головного мозга

Исследования проводили на первичных 3-дневных культурах нейронов коры (3–5-дневных). Суспензию клеток (10^6 клеток/мл) получали по методу, описанному T. Numakawa et al. [10]. Кору извлекали из обоих полушарий мозга новорождённых крысят линии Wistar (не старше 24 часов), под микроскопом отделяли кору от мозговых оболочек и сосудов, измельчали и инкубировали в течение 15 мин в Ca^{2+} - и Mg^{2+} -сбалансированном солевом растворе Хэнка (Invitrogen), содержащем 0,1 % папаина. Затем клетки подвергали диссоциации, суспензию фильтровали и центрифугировали при 4 °C, 15000 об./мин в течение 5 минут. Осторожно удаляли супернатант. Ресуспендировали осадок в охлаждённом фосфатном буфере Дульбекко (DMEM/F12) 1:1, 10%-ной фетальной лошадиной сыворотки (Sigma, MO, США), 25 mM глюкозы, 10 mM HEPES (Sigma), 2 mM глутамина (Biosource International, CA, США) 100 МЕ/мл пенициллина и 0,1 мг/мл стрептомицина. Суспензию клеток высевали во флаконы (15 мл), покрытые поли-D-лизином, при концентрации 10^6 клеток/мл. Помещали в инкубатор при температуре 35,5 °C.

MTT тест (бромид 3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-2,5-дифенил тетразолия)

Нейроны получали из коры мозга новорождённых крыс (1–2 суток), а эксперименты проводились на 2–3-суточных культурах. Клетки оценивали через 6 часов после стимуляции H_2O_2 . Количественно гибель клеток оценивали, используя общепринятые тесты по интенсивности превращения 3-[4-,5-диметилтиазол-2-ил]-2,5-дифенил тетразолиум бромида (MTT) в формазан. MTT добавляли в культурную среду до конечной концентрации 1 мг/мл, инкубировали клетки 2 часа при 37 °C. Затем среду отбирали и добавляли 150 мкл MTT буфера для растворения формазанов, инкубировали при комнатной температуре в течение 4 часов до полного растворения кристаллов, затем перевели в 96-луночные микропланшеты. Оптическую плотность измеряли при

350 нм. Оценивали результаты в процентах по отношению к контролю.

Анализ гена двойной люциферазы.

Трансфекция люциферазы

Трансфекцию плазмид в нейроны проводили как описано Bahia [11]. Нейроны, выращенные в 24-луночных планшетах подвергали трансфекции, используя реагенты трансфекции: pRBGP2, pARE-luc репортёры плазмид и контрольной плазмиды люциферазы renilla, чтобы определить эффективность трансфекции. Кодирующий pRBGP2 или pARE-luc репортёр плазмид смешивали с 10 мкл реагента в течение 15 минут, затем добавляли к нейронам. После 2-часового инкубационного периода заменяли среду на свежую. Использовали 0,5 мкг DNA/well и 0,5 мкл Lipofect AMINE 2000 согласно инструкции производителя.

После трансфекции к нейронам, выращенным в 24-луночных планшетах, в инкубационную среду добавляли трет-бутилгидрохинон (tBHQ) или экстракт чистотела большого и инкубировали в течении 24 часов. Затем инкубационную среду удаляли аспирацией и добавляли 20 мкл глюказис-буфера и инкубировали в течение 10 мин. Клеточный лизат переносили на 96-луночный планшет (Sigma-Aldrich). Активность люциферазы renilla вырабатывали контрольной плазмидой тимидинкиназы (pRL-TK; Promega, Madison, WI) и тестирували, добавляя 20 мкл двойной Гло-Стоп и Гло-субстрат, содержавший стоп-раствор для люциферазы светлячков (firefly), и измеряли активность люциферазы на люминометре TD-20 (Turner Design). Активность люциферазы Firefly нормализовали относительно активности Renilla. Среднее и его стандартную ошибку подсчитывали для пяти независимых повторений. Активность люциферазы выражали в виде соотношения «плазмида светлячка : плазмида люциферазы renilla».

Приготовление митохондрий

В экспериментах использовались крысы-самцы линии Sprague-Dawley, содержащиеся в условиях вивария при естественном освещении и свободном доступе к воде и пище. Митохондрии извлекали по методу J. Long [12, 13]. Крыс декапитировали и мозг быстро вынимали, промывали для выделения митохондрий на среде: 0,25 M сахарозы, 10 mM трис-HCl буфера, 0,5 mM этилендиаминетрауксусной кислоты (EDTA), pH 7.4. Измельчённые ткани гомогенизировали в том же буфере гомогенизатором с тефлоновым пестиком. Ядерную фракцию из гомогената мозга в различных тканях выделяли центрифугированием при 800–1000 g в течение 10 мин. Затем брали супернатант и центрифугировали ещё раз при 10000 g в течение 10 мин и выделяли митохондрии мозга. Осадок митохондрий супендировали в среде выделения и промывали 2 раза. Концентрацию митохондриального белка определяли по методу Лоури [14].

Образцы с МДА или без МДА инкубировали с экстрактом чистотела большого в различных концентрациях в течение часа.

Анализ активности митохондриальных ферментов

Для анализа активности митохондриальных ферментов, митохондрии (500 мкг/мЛ) растворяли в различных буферах в зависимости от фермента и доводили до конечной концентрации. МДА с экстрактом инкубировали в течение 30 мин, при 37 °C измеряли на спектрометре [12, 15].

Инкубационная смесь для определения активности комплекса I (NADH-CoQ oxidoreductase) содержала следующий состав: 0,5 мМ трис-HCl, pH 8,1, 25 мкг/мл митохондрий, 1% BSA, 10 мкМ антимицин A, 2 мМ NaNO₃, 0,5 мМ коэнзим Q1 в конечной концентрации. Об активности комплекса I (NADH-CoQ oxidoreductase) судили по убыли DCPIP. Время инкубации смеси – 30 мин при температуре 37 °C. Реакцию начинали добавлением 200 мМ NADH и сканировали при длине волны λ = 600 нм в течение 2 минут [12].

Реакционный буфер для определения активности комплекса II (Succinate-CoQ oxidoreductase) имел следующий состав: 0,5 М фосфатный буфер, pH 7,8, 1 % BSA, 10 мкМ антимицин A, 2 мМ NaNO₃, 0,5 мМ коэнзим Q1, 25 мкг/мл митохондрий в конечной концентрации. Реакции начинали после добавления 10 мМ сукцинаты (succinate) и сканировали при длине волны λ = 600 нм в течение 2 мин при 30 °C [15].

Состав реакционного буфера для определения малатдегидрогеназы МДГ (malat dehydrogenase, MDH) на спектрометре был следующим: NAD+ 2,5 мМ, Малат 75 мМ, 10x (0,35 K_{H2}PO₄), 50 мМ MgCl₂, 20 мМ NaNO₃, 5 мМ EDTA, pH 7,25 и 25 мкг/мл в конечной концентрации с и без МДА и экстракта. Реакции начинали после добавления 25 мМ никотинамидаденидинуклеода (NAD+) и регистрировали максимальную NADH-оксидазную активность при длине волны λ = 340 нм [15].

Регистрация митохондриального мембранныго потенциала (Δφ)

Регистрацию трансмембранныго потенциала измеряли по флуоресценции в двухволновом режиме при длинах волн 590 и 530 нм по методу [16]. Изменения проводили в реакционной среде, содержащей 0,25 М сахарозы, 10 мМ трис-HCl буфера, 0,5 мМ этилендиаминететрауксусной кислоты (EDTA), pH 7,4 и добавляли краситель JC-1(5,5',6,6'-тетрахлор-1,1',3,3'-тетраэтилбензими-дазолкарбоцанин иодид/хлорид). JC-1 является катионным красителем, поглощение которого митохондриями напрямую связано с величиной митохондриального мембранныго потенциала. Митохондриальную супспензию разбавляли буфером JC-1 до 0,5 мкг/мл. Образцы с МДА или без МДА инкубировали с экстрактом *Chelidonium majus* L. (CH) в различных концентрациях в течение 30 мин. Затем к гомогенату добавляли 1,5 мкг/мл свежеприготовленного раствора флюрохрома JC-1 и инкубировали при температуре 37 °C в течение 30 мин. В качестве контроля использовали гомогенаты, не обработанные экстрактом CH и МДА. Затем митохондрии дважды отмывали буфером и измеряли интенсивность флуоресценции. Мембранный потенциал митохондрий выражали соотношением интенсивности флуоресценции между двух областей спектра λ = 590 нм и λ = 530 нм.

Электронный спиновый резонанс (ESR)

Измерение гидроксильных и липидных радикалов проводили методом электронного спинового резонанса (ESR-анализа) [17, 18]. Для обнаружения гидроксильных радикалов использовали 50 мкЛ реакционный смеси в качестве спиновых ловушек, содержащий 100 мМ 5,5-диметил-1-пирролин-N-оксида (DMPO), 100 мМ пероксида водорода (H₂O₂), 0,3 мМ Fe(II)/0,15 мМ диэтилентриаминпентауксусной кислоты (DTPA) и

30 мкЛ экстракта. Реакция была инициирована 0,3 мМ Fe(II)/0,15 мМ DTPA, и затем через 5 мин регистрировали электронный спиновый резонанс. Для регистрации липидных радикалов использовали 50 мкЛ реакционной смеси в качестве спиновых ловушек, содержащей 100 мМ N-трет-бутил-а-фенилнитрона (POBN), 20 мМ (SDS), 40 мМ линолевой кислоты (LA), 0,11 мМ Cu²⁺, 0,1 М H₂O₂, 20 мМ натрий-фосфатного буфера (PBS) и 20 мкЛ вещества. Реакцию инициировали медью (Cu²⁺), через 5 мин после добавления смеси регистрировали электронный спиновый резонанс.

Статистическая обработка данных

Данные представлены в виде средних значений ± SD трёх независимых экспериментов, достоверность отличий определяли по критерию АНОВА. Статистическая значимость была установлена на уровне *p* < 0,05.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Влияние экстракта на липидные и гидроксильные радикалы

Экстракт чистотела большого (ЧБ) продемонстрировал значительное ингибирование свободных липидных радикалов в ESR-анализе. Ингибирующий эффект экстракта ЧБ обнаруживался в широком спектре концентраций от 0,62 до 20 мг/мл. Максимальное 89,04%-ное ингибирование свободных радикалов было обнаружено в концентрации 20 мг/мл. Концентрация полумаксимального ингибирования (IC₅₀) экстракта свободных липидных радикалов составила 2,96 мг/мл. Эти результаты указывают на то, что экстракт ЧБ содержит биоактивный элемент с низким молекулярным весом, который может способствовать выживаемости нейронов, уменьшая свободные липидные радикалы, индуцированные инсультом (рис. 1).

Однако, экстракт чистотела большого довольно слабо воздействовал на гидроксильные радикалы, в концентрации 17–25 мг/мл он ингибировал гидроксильные радикалы на 6–10 %. В высокой концентрации (50 мг/мл) ингибировал гидроксильные радикалы на 40 %. Поэтому концентрация полумаксимального ингибирования (IC₅₀) экстракта ЧБ составила 35,17 мг/мл.

Исследование нейропротекторного действия ЧБ на уровень митохондриальных дисфункций, вызванных МДА

Способность экстракта чистотела большого уменьшать образование свободных липидных радикалов возможно связано с защитным действием экстракта. Чтобы оценить протекторное действие экстракта чистотела большого мы провели следующий тест. Изолированные митохондрии клеток мозга подвергли токсикации 100 мкМ МДА, индуцируя уменьшение уровня I и II комплексов активации электронно-транспортной цепи *in vitro* по сравнению с контрольными группами, не подвергнутыми токсикации МДА.

Экстракти ЧБ в концентрации 6 и 12 мг/мл не влияли на уменьшение уровня комплексов I и II, вызванного МДА. Хотя экстракт в высокой концентрации (25 мг/мл) достоверно увеличивал уровень комплекса I, но поддерживал инактивацию комплекса II, индуцированную 100 мкМ малондиалдегида (МДА). Более того экстракт ЧБ не влиял на уровень инактивации МДГ (MDH), вызванной 100 мкМ малондиальдегида.

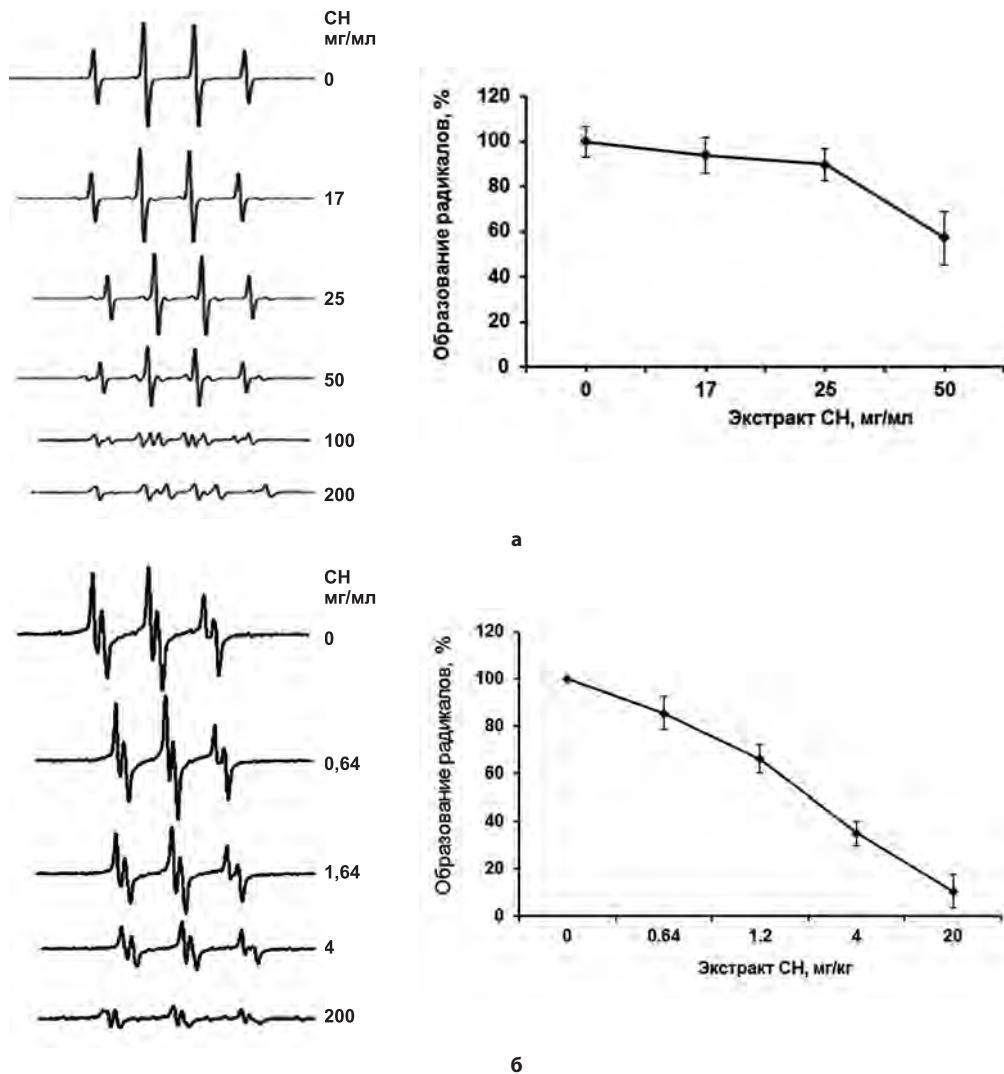


Рис. 1. Влияние экстракта чистотела большого на образование свободных радикалов: а – обнаружение липидных и гидроксильных радикалов с помощью электронного спинового резонанса (ESR); б – количественный результат гидроксильных радикалов.

Fig. 1. Effect of the *Chelidonium majus* extract on the formation of free radicals: a – detection of lipid and hydroxyl radicals using electron spin resonance (ESR); b – quantitative result of hydroxyl radicals.

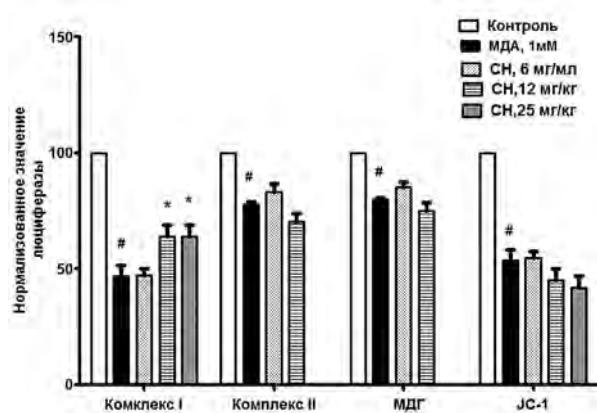


Рис. 2. Влияние экстракта на МДА-индуцированную инактивацию митохондриальных энзимов. * – статистически значимые различия между группами ($p < 0,05$).

Fig. 2. Effect of *Chelidonium majus* extract on MDA-induced mitochondrial dysfunction in isolated mitochondria of rat brain. * – statistically significant differences between groups ($p < 0.05$).

Изучение действия экстракта ЧБ на выживаемость нейронов и влияния на ARE-зависимую экспрессию кортикальных нейронов

Мы исследовали влияние экстракта ЧБ на выживаемость культивируемых кортикальных и striatum нейронов мозга крысы в условиях интоксикации 100 мкМ перекисью водорода (H_2O_2). Кортикальные нейроны инкубировали с экстрактом ЧБ в течение 24 часов и через 6 часов после действия 100 мкМ H_2O_2 оценивали гибель клеток. Показано, что экстракт ЧБ в концентрациях от 0,05 до 0,5 мг/мл достоверно снижает гибель нейронов, вызванную токсическим действием перекиси водорода (H_2O_2). Максимальную выживаемость кортикальных нейронов при экскайтотоксичности наблюдали при действии 0,05 мг/мл экстракта ЧБ. Обнаружено, что экстракт ЧБ только в концентрации 0,5 мг/мл защищал нейроны от гибели, индуцированной перекисью водорода (рис. 3).

Чтобы определить механизм нейропротективного действия экстракта ЧБ мы изучили его возможное влияние на ARE сигнальный путь, используя тест на

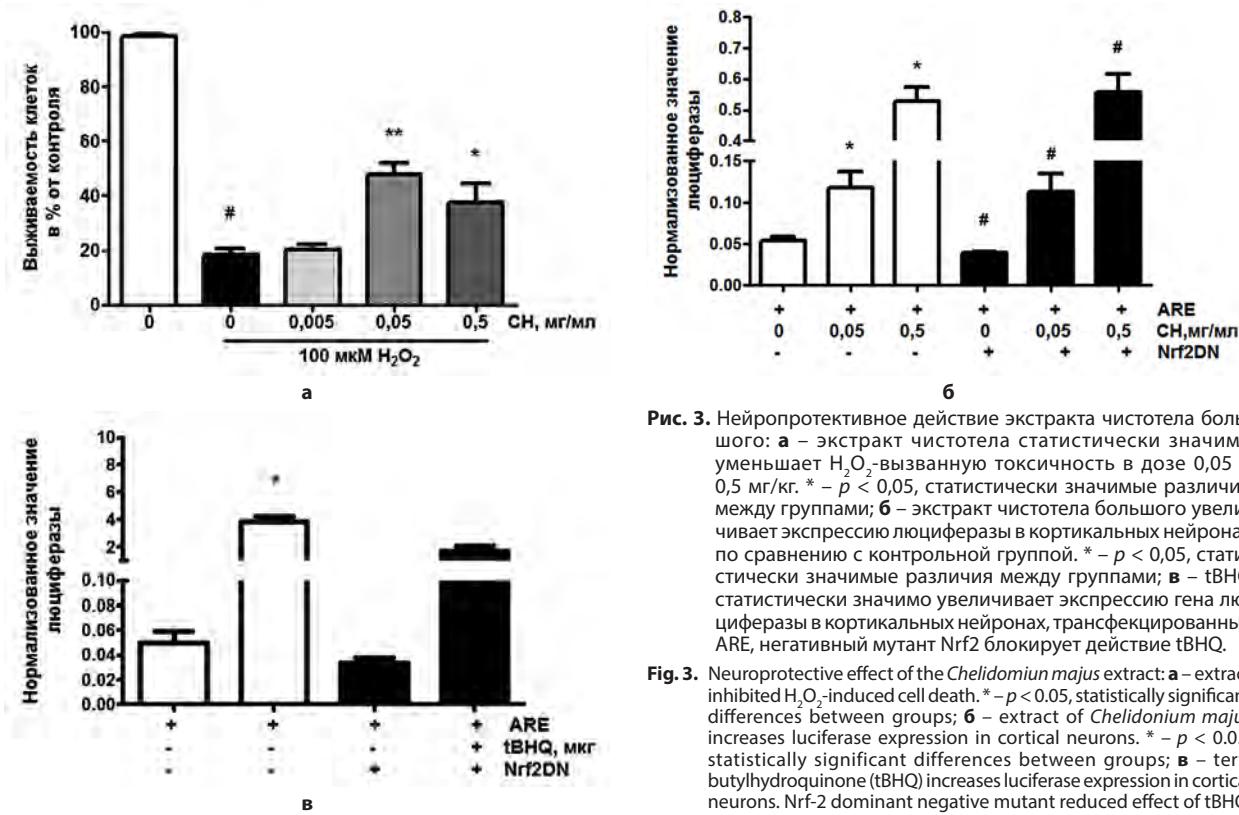


Рис. 3. Нейропротективное действие экстракта чистотела большого: **a** – экстракт чистотела статистически значимо уменьшает H₂O₂-вызванную токсичность в дозе 0,05 и 0,5 мг/кг. * – p < 0,05, статистически значимые различия между группами; **б** – экстракт чистотела большого увеличивает экспрессию люциферазы в кортикальных нейронах по сравнению с контрольной группой. * – p < 0,05, статистически значимые различия между группами; **в** – tBHQ статистически значимо увеличивает экспрессию гена люциферазы в кортикальных нейронах, трансфектированных ARE, негативный мутант Nrf2 блокирует действие tBHQ.

Fig. 3. Neuroprotective effect of the *Chelidonium majus* extract: **a** – extract inhibited H₂O₂-induced cell death. * – p < 0.05, statistically significant differences between groups; **b** – extract of *Chelidonium majus* increases luciferase expression in cortical neurons. * – p < 0.05, statistically significant differences between groups; **c** – tert-butylhydroquinone (tBHQ) increases luciferase expression in cortical neurons. Nrf-2 dominant negative mutant reduced effect of tBHQ. * – p < 0.05, statistically significant differences between groups.

ARE-зависимую люциферазу. Мы составляли положительный антиоксидант-респонсивный элемент люциферазе (pARE-luc vector), вставляя в pGL3-basic plasmid (Promega) антиоксидант-респонсивный элемент (ARE), при этом попытку вставления повторяли 3 раза. Для управления ARE проводили ко-трансфекцию кортикальных нейронов с плазмидами, содержащими pRBGP2 и ARE-репортёр (pARE-luc), затем нейроны подвергали лечению экстрактом ЧБ и оценивали степень влияния на экспрессию генов антиоксидант-респонсивного элемента (ARE). Экстракт ЧБ в концентрации 0,5 мг/мл достоверно увеличивал уровень pRBGP2, управляемый ARE-зависимой люциферазой, по сравнению с контролем. Хотя влияние экстракта ЧБ было значительно слабее чем трет-бутилгидрохинона (tBHQ). Синтетический трет-бутилгидрохинон (tBHQ) является сильнейшим индуктором сигнальной системы Keap1/Nrf2/ARE, что подтверждает высокий уровень ARE-зависимой люциферазы по сравнению с контрольной группой. Nrf2DN является негативным мутантом Nrf2, блокирующим экспрессию ARE-зависимой люциферазы. Было показано, что в нейронах, в которых проведены трансфекции вместе с pARE-luc и Nrf2DN, уровень экспрессии ARE-зависимой люциферазы был достоверно ниже, чем в трансфекции только с pARE-luc, что указывает на блокирование экспрессии Nrf2 [19]. Более того, после трансфекции трет-бутилгидрохинона (tBHQ) вместе с pARE-luc и Nrf2DN наблюдалось снижение уровня экспрессии гена антиоксидант-респонсивного элемента (ARE) по сравнению с показателем трансфекции с pARE-luc и трет-бутилгидрохиноном (tBHQ), что указывает на блокирование антиоксидантного действия трет-бутилгидрохинона (tBHQ). Однако активирование ARE-зависимых генов, инициируемое экстрактом чистотела большого, не блокируется негативным мутантом Nrf2 (Nrf2DN), что указывает на непрямое действие экстракта ЧБ на регуляторную систему Nrf2/Keap1.

ОБСУЖДЕНИЕ

В настоящее время большой интерес представляют нейропротективные свойства лекарственных растений. Многочисленные исследования различных растений демонстрируют защитное действие против нейродегенеративных расстройств, включая болезни Альцгеймера, Паркинсона [20]. В этой работе мы впервые демонстрировали нейропротективное действие экстракта чистотела большого против H₂O₂-нейротоксичности и проявление антиоксидативной активности экстракта из чистотела большого в форме активации ARE в кортикальных нейронах и существенное ингибирование липидных радикалов. Концентрация полумаксимального ингибиования (IC₅₀) свободных липидных радикалов экстрактом составила 2,96 мг/мл. Также мы изучили антиоксидантное действие экстракта чистотела большого против митохондриальной дисфункции, вызванной МДА. Экстракт не влиял достоверно на пониженный уровень комплексов I и II, индуцированный МДА, но при этом восстанавливал снижение активности малатдегидрогеназы МДГ (MDH). НАД-зависимая малатдегидрогеназа играет значительную роль в биохимической адаптации организма к гипоксии. Митохондриальная дисфункция вызывает многочисленные патологические состояния, в частности, нейрорегенеративные расстройства, такие как болезни Паркинсона, Альцгеймера, Хантингтона. Митохондриальные комплексы I и II выполняют перенос электронов от метаболических молекул, таких как продукты гликолиза и жирной кислоты, к убихинону (Коферменту Q), пре-

вращая в убихинол. Известно также, что малат участвует в транспорте низкомолекулярного антиоксиданта, такого как цитрат, через биологические мембранны. Одним из защитных механизмов является антиоксидант-респонсивный элемент (ARE), который участвует в окислительном стрессе [21]. Nrf2 связывается с ДНК через ARE, который координирует ответ на АФК-стресс с увеличением экспрессии белков антиоксидантов и ферментов протеиновых комплексов I и II [22, 23]. Наши данные указывают на взаимосвязь нейропротективного действия экстракта чистотела большого и активации антиоксидант-респонсивного элемента. Экстракт управляет ARE-зависимой экспрессией генов, но при этом не изменяет уровень ARE-зависимой экспрессии генов после введения NrfDN, который блокирует NF-E2-зависимый фактор 2 (Nrf2). Тогда как антиоксидантное действие синтетического трет-бутилгидрохинона (tBHQ) блокируется негативным мутантом NF-E2-зависимого фактора 2 (Nrf2), что подтверждает причастность Keap1/Nrf2/ARE-сигнальной системы в действии трет-бутилгидрохинона (tBHQ). Существуют данные, утверждающие, что антиоксидантный эффект обусловлен сигнальной системой Nrf2/Keap1/ARE и зависит от степени экранирования OH-групп и наличия атома двухвалентной серы, что вероятнее всего в нашем соединении не соблюдается.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Экстракт чистотела большого обладает слабым антиоксидантным и нейропротективным действием, которое, возможно, проявляется через механизмы ARE/Nrf2 сигнальных путей.

Работа выполнена при поддержке гранта Центра Вольфсона (The Wolfson Center for Age-Related Disease), Лондон, и Министерство Образования, Культуры и Нauки, Монголии.

Благодарности

Мы благодарны за неоценимую помощь и поддержку профессорам П. Доэрти, Р.Ж. Уильям (Центр Вольфсона, Лондон) в исследовании механизмов действия экстракта. Выражаем также благодарность доктору Ж. Лонг (Университет науки жизни, Ксиан, Китай), доктору П.К. Вакния (Центр Вольфсона, Лондон) и профессору Е.Н. Амосовой (НИИ фармакологии и регенеративной медицины) за полезные консультации.

ЛИТЕРАТУРА

- Colombo ML, Bosisio E. Pharmacological activities of *Chelidonium majus* L. (Papaveraceae). *Pharmacol Res.* 1996; 33(2): 127-134. doi: 10.1006/phrs.1996.0019
- Biswas J, Bhattacharjee N, Khuda-Bukhsh AR. Efficacy of a plant extract (*Chelidonium majus* L.) in combating induced hepatocarcinogenesis in mice. *Food Chem Toxicol.* 2008; 46(5): 1474-1487. doi: 10.1016/j.fct.2007.12.009
- Nadova S, Miadokova E, Alfoldiova L, Kopaskova M, Hasplova K, Hudcová A, Vaculíková D, Gregan F, Cipak L. Potential antioxidant activity, cytotoxic and apoptosis-inducing effects of *Chelidonium majus* L. extract on leukemia cells. *Neuro Endocrinol Lett* 2008; 29(5): 649-652.
- Mitra S, Gole M, Samajdar K, Sur RK, Chakraborty BN: Antihapatotoxic activity of *Chelidonium majus*. *Int J Pharmacognosy* 1992; 30: 125-128.
- Mitra S, Sur RK, Roy A, Mukherjee AS. Effect of *Chelidonium majus* L. on experimental hepatic tissue injury. *Phytother Res.* 1996; 10: 354-356. doi: 10.1002/(SICI)1099-1573(199606)10:4<354::AID-PTR838>3.0.CO;2-7

- Rushmore TH, Morton MR, Pickett CB. The antioxidant responsive element. Activation by oxidative stress and identification of DNA consensus sequence required for functional activity. *J Biol Chem.* 1991; 266(18): 11632-11639.
- Dinkova-Kostova AT, Holtzclaw WD, Cole RN, Itoh K, Wakabayashi N, Katoh Y, et al. Direct evidence that sulfhydryl groups of Keap1 are the sensors regulating induction of phase 2 enzymes that protect against carcinogens and oxidants. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2002; 99(18): 11908-11913. doi: 10.1073/pnas.172398899
- Kim YC, Yamaguchi Y, Kondo N, Masutani H, Yodoi J. Thioredoxin-dependent redox regulation of the antioxidant responsive element (ARE) in electrophile response. *Oncogene.* 2003; 22(12): 1860-1865. doi: 10.1038/sj.onc.1206369
- Муравьева Д.А., Самылина И.А., Яковлев Г.П. *Фармакогнозия: Учебник.* 4-е изд., перераб. и доп., М: Медицина, 2002.
- Numakawa T, Kumamaru E, Adachi N, Yagasaki Y, Izumi A, Kunugi H. Glucocorticoid receptor interaction with TrkB promotes BDNF-triggered PLC-gamma signaling for glutamate release via a glutamate transporter. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2009; 106(2): 647-652. doi: 10.1073/pnas.0800888106
- Bahia RK. *Skin adhesive hydrogels for the topical delivery of active agents.* Thesis, Aston University, Birmingham, 2008.
- Long J, Lui C, Sun L. Neuronal mitochondrial toxicity of malondialdehyde: inhibitory effects on respiratory function and enzyme activities in rat brain mitochondria. *Neurochemistry Research,* 2009; 34(4): 786-794. doi: 10.1007/s11064-008-9882-7
- Long J, Ma J, Luo C. Comparison of two methods for assaying complex I activity in mitochondria isolated from rat liver, brain and heart. *Life Sci.* 2009; 85(7-8): 276-280. doi: 10.1016/j.lfs.2009.05.019
- Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the Folin-Phenol reagent. *J Biol Chem.* 1951; 193(1): 265-271
- Humphries KM, Yoo Y, Szweda LI. Inhibition of NADH-linked mitochondrial respiration by 4-hydroxy-2-nonenal. *Biochemistry.* 1998; 37(2): 552-557. doi: 10.1021/bi971958i
- Reers M, Smiley ST, Mottola-Hartshorn C, Chen A, Lin M, Chen LB. Mitochondrial membrane potential monitored by JC-1 dye. *Methods Enzymol.* 1995; 260: 406-417
- Liu J, Mori A. Antioxidant and free radical scavenging activities of *Gastrodia elata* Bl. and *Uncaria rhynchophylla* (Mrq) Jacks. *Neuropharmacology.* 1992; 31(12): 1287-1298
- Liu J, Mori A. Monoamine metabolism provides an antioxidant defense in the brain against oxidant-and free radical-induced damage. *Arch Biophys Biophys.* 1993; 302(1): 118-127. doi: 10.1006/abbi.1993.1189
- Gilca ML, Gaman E, Panait I, Atanasiu U. *Chelidonium majus* – an intergrative review: Traditional knowledge versus modern findings. *Fortsch Komplementmed.* 2010; 17(5): 241-248. doi: 10.1159/000321397
- Mandel S, Youdim MB. Catechin polyphenols: neurodegeneration and neuroprotection in neurodegenerative diseases. *Free Radic Biol Med.* 2004; 37(3): 304-317. doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2004.04.012
- Itoh K, Igashira K, Hayashi N, Nishizawa M, Yamamoto M. Regulatory mechanisms of cellular response to oxidative stress. *Free Radic. Res.* 1999; 31(4): 319-324.
- Itoh K, Wakabayashi N, Katoh Y, Ishii T, Igashira K, Engel JD, et al. Keap1 represses nuclear activation of antioxidant responsive elements by Nrf2 through binding to the amino-terminal Neh2 domain. *Genes Dev.* 1999; 13(1), 76-86.
- Nguyen T, Sherratt PJ, Pickett CB. Regulatory mechanisms controlling gene expression mediated by the antioxidant response element. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* 2003; 43: 233-260. doi: 10.1146/annurev.pharmtox.43.100901.140229

REFERENCES

- Colombo ML, Bosisio E. Pharmacological activities of *Chelidonium majus* L. (Papaveraceae). *Pharmacol Res.* 1996; 33(2): 127-134. doi: 10.1006/phrs.1996.0019

2. Biswas J, Bhattacharjee N, Khuda-Bukhsh AR. Efficacy of a plant extract (*Chelidonium majus* L.) in combating induced hepatocarcinogenesis in mice. *Food Chem Toxicol.* 2008; 46(5): 1474-1487. doi: 10.1016/j.fct.2007.12.009
3. Nadova S, Miadokova E, Alfoldiova L, Kopaskova M, Hasplova K, Hudecova A, Vaculcikova D, Gregan F, Cipak L. Potential antioxidant activity, cytotoxic and apoptosis-inducing effects of *Chelidonium majus* L. extract on leukemia cells. *Neuro Endocrinol Lett* 2008; 29(5): 649-652.
4. Mitra S, Gole M, Samajdar K, Sur RK, Chakraborty BN. Antineoplastic activity of *Chelidonium majus*. *Int J Pharmacognosy* 1992; 30: 125-128.
5. Mitra S, Sur RK, Roy A, Mukherjee AS. Effect of *Chelidonium majus* L. on experimental hepatic tissue injury. *Phytother Res.* 1996; 10: 354-356. doi: 10.1002/(SICI)1099-1573(199606)10:4<354::AID-PTR838>3.0.CO;2-7
6. Rushmore TH, Morton MR, Pickett CB. The antioxidant responsive element. Activation by oxidative stress and identification of DNA consensus sequence required for functional activity. *J Biol Chem.* 1991; 266(18): 11632-11639.
7. Dinkova-Kostova AT, Holtzclaw WD, Cole RN, Itoh K, Wakabayashi N, Katoh Y, et al. Direct evidence that sulfhydryl groups of Keap1 are the sensors regulating induction of phase 2 enzymes that protect against carcinogens and oxidants. *Proc Natl Acad Sci* 2002; 99(18): 11908-11913. doi: 10.1073/pnas.172398899
8. Kim YC, Yamaguchi Y, Kondo N, Masutani H, Yodoi J. Thioredoxin-dependent redox regulation of the antioxidant responsive element (ARE) in electrophile response. *Oncogene.* 2003; 22(12): 1860-1865. doi: 10.1038/sj.onc.1206369
9. Muravyeva DA, Samylina IA, Yakovlev GP. *Pharmacognosy*. M., 2002. (In Russ.)
10. Numakawa T, Kumamaru E, Adachi N, Yagasaki Y, Izumi A, Kunugi H. Glucocorticoid receptor interaction with TrkB promotes BDNF-triggered PLC-gamma signaling for glutamate release via a glutamate transporter. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2009; 106(2): 647-652. doi: 10.1073/pnas.0800888106
11. Bahia RK. *Skin adhesive hydrogels for the topical delivery of active agents*. Thesis, Aston University, Birmingham, 2008.
12. Long J, Lui C, Sun L. Neuronal mitochondrial toxicity of malondialdehyde: inhibitory effects on respiratory function and enzyme activities in rat brain mitochondria. *Neurochemistry Research*, 2009; 34(4): 786-794. doi: 10.1007/s11064-008-9882-7
13. Long J, Ma J, Luo C. Comparison of two methods for assaying complex I activity in mitochondria isolated from rat liver, brain and heart. *Life Sci.* 2009; 85(7-8): 276-280. doi: 10.1016/j.lfs.2009.05.019
14. Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the Folin-Phenol reagent. *J Biol Chem.* 1951; 193(1): 265-271
15. Humphries KM, Yoo Y, Szweda LI. Inhibition of NADH-linked mitochondrial respiration by 4-hydroxy-2-nonenal. *Biochemistry.* 1998; 37(2): 552-557. doi: 10.1021/bi971958i
16. Reers M, Smiley ST, Mottola-Hartshorn C, Chen A, Lin M, Chen LB. Mitochondrial membrane potential monitored by JC-1 dye. *Methods Enzymol.* 1995; 260: 406-417
17. Liu J, Mori A. Antioxidant and free radical scavenging activities of *Gastrodia elata* Bl. and *Uncaria rhynchophylla* (Miq) Jacks. *Neuropharmacology.* 1992; 31(12): 1287-1298
18. Liu J, Mori A. Monoamine metabolism provides an antioxidant defense in the brain against oxidant-and free radical-induced damage. *Arch Biophys Biophys.* 1993; 302(1): 118-127. doi: 10.1006/abbi.1993.1189
19. Gilca ML, Gaman E, Panait I, Atanasiu U. *Chelidonium majus* – an integrative review: Traditional knowledge versus modern findings. *Forsch Komplementmed.* 2010; 17(5): 241-248. doi: 10.1159/000321397
20. Mandel S, Youdim MB. Catechin polyphenols: neurodegeneration and neuroprotection in neurodegenerative diseases. *Free Radic Biol Med.* 2004; 37(3): 304-317. doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2004.04.012
21. Itoh K, Igarashi K, Hayashi N, Nishizawa M, Yamamoto M. Regulatory mechanisms of cellular response to oxidative stress. *Free Radic. Res.* 1999; 31(4): 319-324.
22. Itoh K, Wakabayashi N, Katoh Y, Ishii T, Igarashi K, Engel JD, et al. Keap1 represses nuclear activation of antioxidant responsive elements by Nrf2 through binding to the amino-terminal Neh2 domain. *Genes Dev.* 1999; 13(1), 76-86.
23. Nguyen T, Sherratt PJ, Pickett CB. Regulatory mechanisms controlling gene expression mediated by the antioxidant response element. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* 2003; 43: 233-260. doi: 10.1146/annurev.pharmtox.43.100901.140229

Сведения об авторах

Жалсрай Алдармаа – кандидат биологических наук, старший научный сотрудник, Институт традиционной медицины и технологий, e-mail: jaldarmaa@gmail.com
Санжиеева Людмила Цымпиловна – кандидат биологических наук, доцент кафедры зоологии и экологии, ФГБОУ ВО «Бурятский государственный университет им. Доржи Банзарова», e-mail: ltssanzh@gmail.com

Information about the authors

Zhaltsrai Aldarmaa – Cand. Sc. (Biol.), Senior Research Officer, Institute of Traditional Medicine and Technology, e-mail: jaldarmaa@gmail.com
Lyudmila Ts. Sanzhieva – Cand. Sc. (Biol.), Associate Professor at the Department of Zoology and Ecology, Banzarov Buryat State University, e-mail: ltssanzh@gmail.com

Статья получена: 24.09.2018. Статья принята: 09.10.2018. Статья опубликована: 26.04.2019.
Received: 24.09.2018. Accepted: 09.10.2018. Published: 26.04.2019.