

**Цой А.К.<sup>1</sup>, Жусупова Г.Е.<sup>2</sup>, Олжаев Ф.С.<sup>1</sup>, Шалахметова Т.М.<sup>2</sup>, Нуркенов Т.Т.<sup>2</sup>,  
Шаяхметов Е.Г.<sup>1</sup>, Абжанова Э.Р.<sup>1</sup>, Тургамбаева А.М.<sup>1</sup>, Аскарова Ш.Н.<sup>1\*</sup>**

<sup>1</sup>Лаборатория биоинженерии и регенеративной медицины, Национальная Лаборатория Астана,  
Назарбаев Университет, Казахстан, г. Астана

<sup>2</sup>Казахский Национальный Университет им. аль-Фараби, Казахстан, г. Алматы

\*e-mail: shaskarova@nu.edu.kz

## **АНТИОКСИДАНТНЫЕ И НЕЙРОПРОТЕКТОРНЫЕ СВОЙСТВА ФИТОПРЕПАРАТА ИЗ КЕРМЕКА ГМЕЛИНА**

Поиск веществ, подавляющих выработку активных форм кислорода (АФК) и провоспалительных цитокинов в условиях ишемического поражения головного мозга, имеет большое практическое значение для терапии постинсультных состояний. Целью настоящего исследования явилось изучение влияния экстракта из кермека Гмелина на развитие окислительного стресса в астроцитах и нейронах головного мозга человека в условиях воздействия провоспалительного цитокина TNF- $\alpha$  in vitro. В работе использованы методы выделения и культивирования фетальных клеток головного мозга человека, иммуногистохимические, флуоресцентные методы качественного и количественного определения супероксид аниона в выделенных нейронах и астроцитах. В ходе исследования было установлено, что экстракт из кермека Гмелина при дозировке 30 мкг/мл не обладает цитотоксическим эффектом, более того, он нивелирует токсическое действие TNF- $\alpha$ : блокирует образование АФК в нейронах и астроцитах, препятствует активации НАДФН оксидазы в астроцитах. Таким образом результаты проведенного исследования позволяют заключить, что экстракт из кермека Гмелина обладает антиоксидантными, астро- и нейропротекторными свойствами и может быть использован для терапии реперфузионного синдрома. Результаты исследования важны для нейробиологии и медицины.

**Ключевые слова:** инсульт, астроциты, нейроны, кермек Гмелина, активные формы кислорода.

Tsoj A.K.<sup>1</sup>, Zhusupova G.E.<sup>2</sup>, Olzhayev F.S.<sup>1</sup>, Shalahmetova T.M.<sup>2</sup>, Nurkenov T.T.<sup>2</sup>,  
Shajahmetov E.G.<sup>1</sup>, Abzhanova E.R.<sup>1</sup>, Turgambayeva A.M.<sup>1</sup>, Askarova Sh.N.<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Laboratory of bioengineering and regenerative medicine, National Laboratory  
Astana, Nazarbayev University, Kazakhstan, Astana

<sup>2</sup>Al-Farabi Kazakh National University, Kazakhstan, Almaty

\*e-mail: shaskarova@nu.edu.kz

## **Antioxidant and neuroprotective properties of phytopreparate from limonium gmelinii**

The search for substances that inhibit the production of active forms of oxygen (ROS) and pro-inflammatory cytokines in conditions of ischemic brain injury, is of great practical importance for the therapy of post-stroke states. The purpose of this study is to study the effect of extract from *Limonium gmelinii* on the development of oxidative stress in human astrocytes and neurons of the human brain under the influence of the proinflammatory cytokine TNF- $\alpha$  in vitro. Methods of isolation and cultivation of human fetal cells, immunohistochemical, fluorescent methods for the qualitative and quantitative determination of the anion superoxide in isolated neurons and astrocytes were used in the work. In the course of the study it was found that the extract from *Limonium gmelinii* at a dosage of 30  $\mu\text{g}$  / ml does not have a cytotoxic effect, moreover, it neutralizes the toxic effect of TNF- $\alpha$ : blocks the formation of ROS in neurons and astrocytes, prevents the activation of NADPH oxidase in astrocytes. Thus, the results of the conducted study allow us to conclude that the extract from *Limonium gmelinii* possesses antioxidant, astro- and neuroprotective properties and can be used for therapy of reperfusion syndrome. The results of the study are important for neurobiology and medicine.

**Key words:** stroke, astrocytes, neurons, *Limonium gmelinii*, reactive oxygen species.

Цой А.К.<sup>1</sup>, Жусупова Г.Е.<sup>2</sup>, Олжаев Ф.С.<sup>1</sup>, Шалахметова Т.М.<sup>2</sup>, Нуркенов Т.Т.<sup>2</sup>,  
Шаяхметов Е.Г.<sup>1</sup>, Абжанова Э.Р.<sup>1</sup>, Тургамбаева А.М.<sup>1</sup>, Аскарлова Ш.Н.<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Биоинженерия және регенерациялық медицина зертханасы, Астана Ұлттық Лабораториясы,  
Назарбаев Университеті, Қазақстан, Астана қ.

<sup>2</sup>Әл-Фараби атындағы Қазақ ұлттық университеті, Қазақстан, Алматы қ.

\*e-mail: shaskarova@nu.edu.kz

### **Гмелин кермегінен алынған фитопрепараттардың антиоксидантты және нейропротекторлы қасиеті**

Бас миының ишемиялық зақымдалуы кезінде цитокиндерді тудыратын әсерлер мен оттегінің белсенді түрін (АФК) басатын заттарды табу инсульттен кейінгі жағдайды емдеу кезінде практикалық маңызы өте үлкен. Бұл зерттеу жұмысының мақсаты *in vitro* жағдайында TNF- $\alpha$  цитокиндерін тудырушы әсерлерден адамның бас миының астроциттері мен нерв клеткаларында тотығу-тотықсыздану стрестерінің дамуына Гмелин кермегінің экстрактыларының әсерін зерттеу. Бұл жұмыста адамның бас миының фетальді клеткаларын жасанды ортада өсіру және алу әдістері қолданылды. Алынған нейрондар мен астроциттерде супероксид анионын сандық және сапалық флуоресцентті және иммуногистохимиялық әдістермен зерттелінді. Зерттеу жұмысы кезінде 30 мкг/мл мөлшердегі Гмелин кермегінің экстракты цитоцидті әсерге ие емес, одан басқа ол TNF- $\alpha$  улы әсерін жояды: нейрондар мен астроциттерде оттегінің белсенді түрінің түзілуіне тосқауыл қояды, астроциттерде НАДФН оксидазаның белсенділігіне кедергі болады. Сондықтан да зерттеу жұмысының нәтижелері арқылы мынадай қорытынды жасауға болады: Гмелин кермегінің экстракты антиоксидантты, астро- және нейропротекторлы қасиеттерге ие және реперфузионды синдром кезінде терапия үшін пайдалануға болады. Нейробиология мен медицинада зерттеу нәтижелерінің маңызы үлкен.

**Түйін сөздер:** инсульт, астроциттер, нейрондар, Гмелин кермегі, оттегінің белсенді түрі.

### **Введение**

Инсульт головного мозга является третьей причиной смертности населения после болезней сердца и онкологических заболеваний и лидирующей причиной инвалидизации людей пожилого возраста в большинстве стран мира (Feigin VL, 2014: 245). Согласно статистическим данным, в Казахстане ежегодно регистрируется 2.5-3.7 случаев инсульта на 1000 человек, 1-1.8 из которых приводят к смертельному исходу (Erkebaeva SK, 2014: 175). 85% всех инсультов имеют ишемическую природу и вызываются острой тромботической окклюзией сосудов головного мозга, что приводит к нарушению кровотока, кислородному голоданию и гибели нервных клеток (Smith HK, 2012: 2241). Несмотря на то, что восстановление магистрального кровотока в поврежденном участке головного мозга имеет место, последующие за этими событиями приводят к развитию синдрома реперфузии, который вызывает дальнейшее повреждение нервных тканей (Sharma VK, 2013: 895, Matsuo Y, 1994: 344).

Во время развития реперфузионного синдрома, в артериальной крови содержится большое количество лейкоцитов, которые, в ответ на экспрессию молекул адгезии на поверхности эндотелиальных клеток церебральных капил-

ляров поврежденного региона трансмигрируют в паренхиму головного мозга и высвобождают активные формы кислорода (АФК) и медиаторы воспаления, такие как: фактор некроза опухолей альфа (TNF- $\alpha$ ) интерферон-гамма и другие (Savman K, 2013: 228). Активация иммунной системы, изначально направленная на защиту от экзогенных патогенов, во время асептического иммунного ответа (такого, как инсульт), наоборот, приводит к разрушению нервных тканей. В свою очередь, высокое содержание полиненасыщенных жирных кислот и относительно низкое содержание антиоксидантных ферментов в нейронах делает эти клетки крайне чувствительными к окислительному стрессу (Chen H, 2011: 1505). В связи с этим, поиск веществ, подавляющих выработку АФК и провоспалительных цитокинов в условиях ишемического поражения головного мозга, имеет большое практическое значение для терапии постинсультных состояний.

В настоящее время растущий интерес представляют растительные полифенолы, в силу их профилактического и терапевтического потенциала при таких заболеваниях как диабет, атеросклероз, нейродегенеративные, сердечно-сосудистые заболевания, и воспалительные процессы. Было показано, что полифенолы, содержащиеся в овощах, фруктах, зерновых, чае и

вине обладают выраженными антиоксидантными, противовоспалительными свойствами; их положительный эффект при ишемическом инсульте был показан в большом количестве исследований *in vitro* и *in vivo* (Simonyi A, 2005: 135, Chuang DY, 2013: 15, Liu X, 2013: 187, Panickar KS, 2013: 128). Для решения проблемы поиска эффективных терапевтических средств могут быть использованы растения, обладающие значительной протекторной активностью и произрастающие на территории Казахстана. Одним из таких растений является кермек Гмелина (*L. Gmelinii*) – представитель рода *Limonium* (кермек) семейства свинчатковых (Plumbagenaceae), которое произрастает на бросовых землях, не пригодных для земледелия и пастбищ, и имеет промышленный запас на территории нашей Республики. Экстракт полифенолов, выделенный из корней кермека Гмелина, содержит в себе флавоноиды окисленного типа (7-14 %), гидролизующие дубильные вещества, а также моно-, ди- и олигомерные формы флаван-3-олов (40-60 %). Основным мономерным флаваном является (-)-эпикатехингаллат. Флавоноиды окисленного типа представлены 3,5,7,3',4',6'-гексагидроксифлаваном, изорамнетинном, кверцетинном, мирицетинном, и их моно- и дигликозидами (мирицитрин, галактопиранозиды кверцетина и мирицетина, рамногликозид мирицетина, рутин и другие). Также в составе экстракта был идентифицирован новый гликозид гмелинозид I (Zhusupova G.E., 1997: 393). Танины представлены 2-о-β-D-галлоилом и 2,3-о-β-D-дигаллоилглюкозой. Экстракт в своем составе также имеет все 20 природных α-аминокислот, 34 микроэлемента, витамины (С, Е и β-каротин) и ксантофиллы. Таким образом, *Limonium gmelinii* является богатым источником полифенолов и представляется весьма целесообразным изучение его нейропротекторных свойств.

Исходя из всего вышесказанного целью настоящего исследования явилось изучение влияния экстракта из кермека Гмелина на развитие окислительного стресса в астроцитах и нейронах головного мозга человека в условиях воздействия провоспалительного цитокина TNF-α *in vitro*.

### Материалы и методы исследования

Выделение и культивирование клеток головного мозга человека из фетальной ткани и условия влияния экстракта из кермека Гмелина на генерацию АФК в нейронах и астроцитах

Для проведения экспериментов из фетального головного мозга человека (возраст плода от 18 до 21 недели) выделяли нейроны и астроциты. Процедуру выделения клеток проводили методом механической и ферментативной дезагрегации тканей (Jana M, 2007: 2017). Для этого фетальный мозг ополаскивали в PBS (pH 7,4) при 4°C, мелко иссекали и инкубировали в 0,25% растворе трипсина в течение 20 мин при 37°C. Суспензию клеток пропускали через нейлоновый фильтр с диаметром пор 340 мкм и инкубировали в полноценной нейробазальной среде (NB), содержащей 2% питательной среды В27 и 1% пенициллин/стрептомицина в течение 10 мин. После чего, для выделения астроцитов суспензию клеток собирали и помещали в пробирку объемом 50 мл. Прикрепившиеся нейроны культивировали в течение 2-х недель в полноценной NB среде. Оставшуюся после посева нейронов суспензию глиальных клеток переносили на матрасы Т-75 в среде DMEM содержащей 10% фетальной бычьей сыворотки и 1% пенициллин/стрептомицина и культивировали в течение 9 дней. На 9-й день монослой астроцитов очищали от других типов глиальных клеток путем интенсивного встряхивания матрасов на орбитальном шейкере в течение 18 часов при 800 оборотах. Культуральную среду заменяли свежей порцией один раз в три дня. Монослой астроцитов культивировали до достижения 90% конфлюэнтности и пассажировали для проведения экспериментов, которые проводили на 3-м и 4-м пассажах (Sharif A, 2012: 137).

Чистоту культуры нейронов и астроцитов оценивали с помощью иммунофлуоресцентного анализа и подсчета клеток, положительно окрашенных по нейрон-специфичному маркеру MAP2 (Microtubule-associated protein 2) (Soltani MH, 2005: 1841) и специфическому астроглиальному маркеру GFAP (Glial fibrillary acidic protein) (Sharif A, 2012: 142).

Для изучения влияния экстракта из кермека Гмелина на генерацию АФК в нейронах и астроцитах и активацию НАДФН оксидазы в астроцитах клетки были разбиты на следующие группы: контроль (интактные клетки); клетки, которые инкубировали с перекисью водорода (0,5 мМ) в течение 60 минут или с TNF-α (0,1 нг/мл) в течение 60 минут; клетки, которые предварительно инкубировали с экстрактом кермека (30 мкг/мл) в течение 18 часов; клетки, которые инкубировали сначала с экстрактом кермека, а затем с перекисью водорода или TNF-α в тех же условиях, что и в предыдущих группах.

*Определение содержания супероксид аниона в нейронах и астроцитах головного мозга*

Количественную оценку супероксид аниона в нейронах проводили с помощью окрашивания клеток флуоресцентным красителем дигидроэтидиумом (DHE) (Zanetti M, 2005: 65). Нейроны контрольной группы инкубировали в культуральной среде с добавлением DHE (Sigma, США) в концентрации 5 мМ (Zanetti M, 2005: 66) в течение 1 часа. Клетки, которые подвергали воздействию перекиси водорода, инкубировали с DHE параллельно.

Анализ уровня генерации АФК в астроцитах проводили путем оценки общего содержания кислородных радикалов как внутриклеточно, так и в культуральной среде. Для этого использовали метод оценки супероксид аниона с помощью красителя 2',7'-дихлородигидрофлуоросцеин ацетата (DCF). Для анализа содержания АФК в астроцитах клетки инкубировали с DCF (Life Technologies, США) в концентрации 5 мкМ, в течение 1 часа (Corda S, 2001: 762). После инкубации с красителем интенсивность флуоресценции оценивали с помощью планшетного ридера Synergy H1.

*Фиксация клеток и иммунофлуоресцентное окрашивание*

Для проведения флуоресцентного анализа культуру клеток в контроле и опыте фиксировали в течение 30 минут в 3,74% формалине. После чего проводили пермеабиллизацию клеток в 0,1% растворе Тритона X-100 в PBS (рН 7,4) в течение 2-3 минут. Для предотвращения неспецифического связывания антител, покровные стекла с клетками инкубировали в 5% – м растворе сывороточного альбумина в фосфатном буфере (рН 7,4) в течение 1 часа (Askarova S, 2011: 375).

Для окрашивания специфических маркеров нейронов (MAP2) и астроцитов (GFAP), субъединиц НАДФН оксидазы (p47phox и gp91phox) в клетках использовали метод иммунофлуоресцентной окраски. Для этого клетки инкубировали с первичными антителами (SantaCruz Biotechnologies, США), в разведении 1:200, специфичных к исследуемым белкам, в течение 12 часов при температуре 4°C. После этого клетки инкубировали со вторичными антителами, конъюгированными с флуорофором Alexa 594 и Alexa 488 (Life Technologies, США) в разведении 1:1000 в течение 1 часа при комнатной температуре. Все антитела разводили в фосфатном буфере (рН 7,4), содержащем 1% сывороточного альбумина. Затем, для окраски ядер, клетки окрашивали красителем DAPI в течение 5 минут

(Tarnowski BI, 1991: 297). После окраски покровные стекла с клетками высушивали на воздухе и заключали в специальную жидкость ProLong Diamond Antifade Mountant (Life Technologies, США), монтировали на предметные стекла и микроскопировали (Askarova S, 2011: 375).

*Методы конфокальной микроскопии и оценки колокализации белков*

Флуоресцентные изображения субъединиц НАДФН оксидазы p47phox, gp91phox на плазматической мембране эндотелиоцитов и астроцитов получали с помощью лазерного сканирующего конфокального микроскопа Carl Zeiss LSM 700 (Li JM, 2002: 19952).

Флуорофор Alexa 488 (экстинкция 495 нм, эмиссия 519 нм) возбуждали с помощью аргонового лазера (488 нм) при диаметре конфокальной диафрагмы 1 условная единица, для возбуждения флуорофора Alexa 594 (экстинкция 591 нм, эмиссия 618 нм) использовали полупроводниковый диодный лазер (590) при диаметре конфокальной диафрагмы 1 условная единица.

Активность ферментного комплекса НАДФН оксидазы оценивали по количественной колокализации субъединиц gp91phox и p47phox на плазматической мембране клеток. На сериях флуоресцентных оптических срезов толщиной 1 мкм, в каждой клетке индивидуально, определяли пространственную колокализацию исследуемых объектов посредством наложения локально перекрывающейся флуоресценции двух маркеров: gp91phox (красный канал) и p47phox (зеленый канал). Таким образом, на участках колокализации двух флуорофоров при совмещении зеленого и красного спектров получали желтый цвет. В процессе анализа из полученных изображений исключали все цвета кроме желтого, для этого использовали программное обеспечение ImageJ версии 1.48P в модификации Fiji. Интенсивность флуоресценции зеленого, красного и желтого спектров оценивали с помощью программы MetaMorph 7.8. Колокализацию исследуемых белков рассчитывали исходя из отношения перекрывающейся флуоресценции (желтый канал) к общей флуоресценции исходных каналов (зеленый и красный) (Yang X, 2010: 859).

*Количественная флуоресцентная микроскопия*

Качественную визуальную и количественную оценку интенсивности свечения меченых маркеров производили с помощью моторизованного инвертированного флуоресцентного микроскопа Olympus IX83, снабженного ПЗС-фотокамерой Olympus XM10 и программой



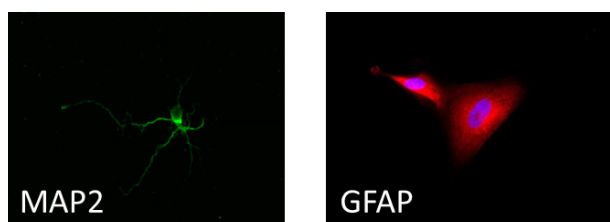
CellSense и MetaMorph 7.8. Для получения флуоресцентных изображений ядер клеток окрашенных красителем DAPI использовали фильтр с экстинкцией 340/390 нм и эмиссией 420/460 нм. Для визуализации клеток окрашенных красителем DHE использовали фильтр экстинкцией 565/585 нм и эмиссией 600/690 нм. Для получения иммунофлуоресцентных снимков использовали одинаковые параметры экспозиции 400 миллисекунд. Количественную оценку производили путем определения интенсивности свечения меченых маркеров в условных единицах. Измерение производили в 500 клетках в каждой группе исследований (Askarova S, 2011: 375).

#### Статистическая обработка данных

Полученные данные представлены в виде средней  $\pm$  стандартная погрешность средней величины (Mean  $\pm$  SEM). Стандартные отклонения между экспериментальными группами оценивались с помощью *t*-критерия Стьюдента. Значения считались достоверно различными при  $p \leq 0,05$ . Анализ данных проводился с использованием программы для статистического анализа SigmaPlot 11.

#### Результаты исследования и их обсуждение

Результаты качественного флуоресцентного анализа маркера нейронов (MAP2) и астроцитов (GFAP) представлены на рисунке 1.



**Рисунок 1** – Флуоресценция фетального нейрона и астроцитов головного мозга человека. Иммунофлуоресцентное окрашивание антителами к белкам MAP2 и GFAP,  $\times 600$

Как видно из приведенного флуоресцентного снимка, в выделенных фетальных клетках наблюдали свечение меченого белка MAP2, специфичного для нейронов (рисунок 1). Количественный анализ показал, что более 90% клеток имели положительную окраску по данному белку. Из этого следует, что в исследуемом образце основной клеточной популяцией являлись нейроны.

Подсчет клеток, положительно окрашенных по астроглиальному маркеру GFAP, показал, что более 93% клеток являлись астроцитами.

Таким образом, результаты проведенного исследования показали, что метод выделения нейронов и астроцитов человека из фетальной ткани, используемый в настоящей работе, позволяет получить чистые линии нейронов и астроцитов из фетальной ткани человека.

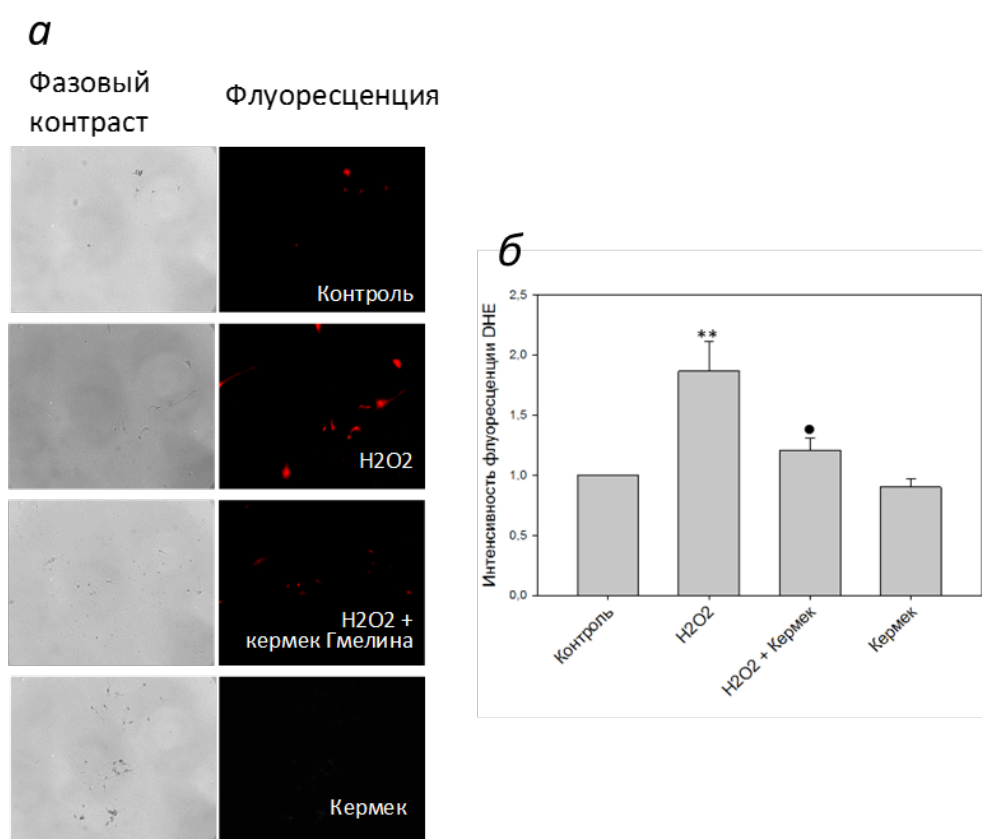
Результаты качественного и количественного флуоресцентного анализа уровня генерации АФК в нейронах представлены на рисунке 2. Видно, что в контроле свечение нейронов практически не наблюдалось. Интенсивность флуоресценции клеток резко возрастала при воздействии перекиси водорода. Однако предварительная обработка клеток растительным экстрактом из кермека Гмелина приводила к снижению интенсивности их свечения, практически до уровня контроля (рисунок 2а). Количественная оценка визуально наблюдаемого свечения клеток выявила значительное возрастание интенсивности флуоресцентного сигнала после воздействия перекиси водорода (рисунок 2б). Что свидетельствовало о значительном аккумуляровании АФК в нейронах. Напротив, предварительное инкубирование клеток с экстрактом из кермека Гмелина и последующее воздействие перекиси водорода, приводило к снижению интенсивности DHE-флуоресценции в нейронах, по сравнению с клетками, которые инкубировали только с перекисью водорода (рисунок 2б).

Результаты количественного флуоресцентного анализа уровня генерации АФК в астроцитах представлены на рисунке 3. Согласно полученным данным, обработка астроцитов TNF- $\alpha$  приводила к резкому увеличению выработки АФК. Предварительное инкубирование клеток с экстрактом из кермека Гмелина препятствовало накоплению АФК в астроцитах. По сравнению с клетками, которые подвергали воздействию только цитокина, данный показатель значительно снижался. В то же время, сам по себе экстракт из кермека Гмелина не оказывал влияния на генерацию АФК в астроцитах, так как в данном эксперименте интенсивность флуоресценции красителя не отличалась от контрольного уровня (рисунок 3).

Результаты исследования влияния экстракта из кермека Гмелина на генерацию активных форм кислорода, показали, что данный экстракт, обладает выраженными антиоксидантными свойствами. Кроме того, сам по себе, при дозировке 30 мкг/мл, данный экстракт не оказывал

влияние на содержание АФК в клетках. Антиоксидантное действие исследуемого экстракта, вероятно, связано с большим содержанием полифенолов, которые, как известно, являются ловушками для кислородных радикалов. Однако, как упоминалось выше, экстракт из кермека Гмелина имеет сложный многокомпонентный состав, таким образом, вполне возможно, что он может оказывать модулирующее действие, направленное на различные ферментные системы клетки. Учитывая свойства экстракта из кермека Гмелина снижать уровень генерации АФК в

клетках головного мозга, логично предположить, что он оказывает непосредственное влияние на энзиматические комплексы, продуцирующие кислородные радикалы. Как известно, одним из важнейших источников АФК в астроцитах является НАДФН оксидаза (Askarova S, 2011: 375, Cai H, 2003: 471, Park L, 2005: 1769). В связи с вышеизложенным, нами было проведено исследование влияния экстракта из кермека Гмелина на активацию НАДФН оксидазы в астроцитах и эндотелиоцитах головного мозга. Результаты этого исследования представлены на рисунке 4.

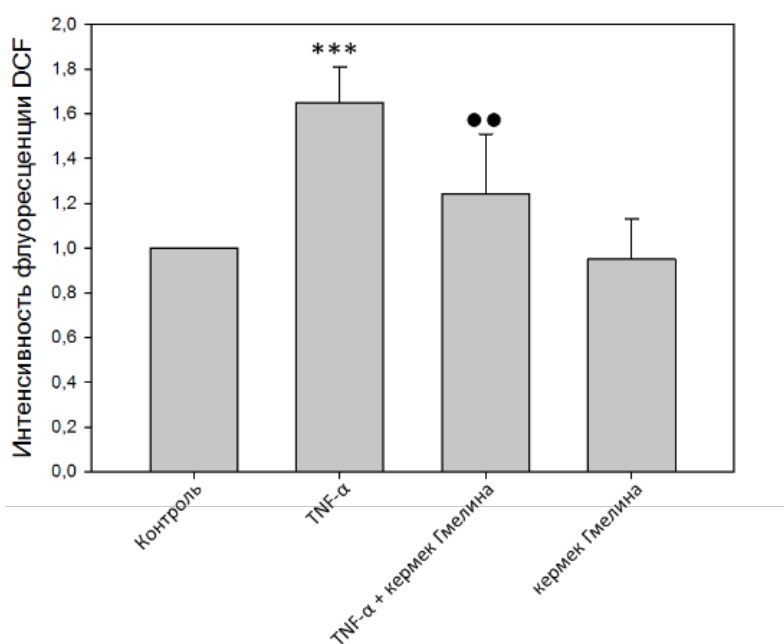


\*\* -  $p \leq 0,01$  по сравнению с контролем, ● -  $p \leq 0,05$ , по сравнению с клетками, которые подвергали воздействию перекиси водорода (t-критерий Стьюдента)

**Рисунок 2** – Флуоресцентные фотографии и анализ АФК в нейронах. Флуоресцентное окрашивание DHE, x200 (а); результаты количественного анализа уровня АФК в нейронах, подвергнутых раздельному и совместному воздействию H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> и экстракта из кермека Гмелина (б).

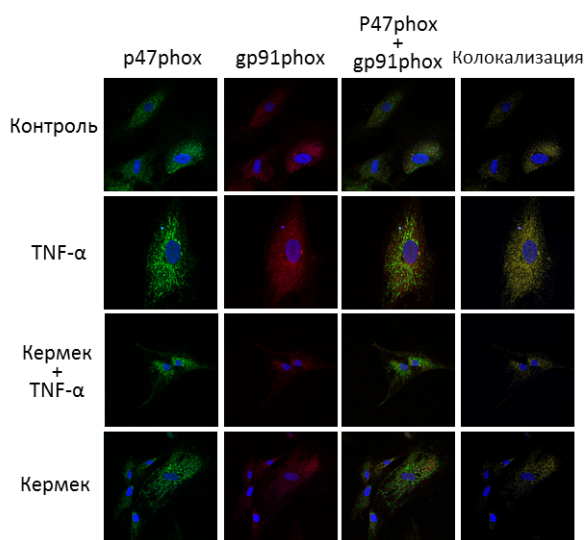
Анализ полученных результатов показал, что уровень колокализации субъединиц НАДФН оксидазы p47phox и gp91phox в астроцитах, которые подвергали воздействию TNF- $\alpha$  возрастал, что свидетельствует об активации данного ферментного комплекса (рисунок 4 а, б). В астроцитах, которые предварительно инкубировали с экстрак-

том из кермека Гмелина, а затем с TNF- $\alpha$ , уровень колокализации субъединиц p47phox и gp91phox значительно снижался по сравнению с клетками, которые подвергали воздействию только TNF- $\alpha$  и оставался на уровне контрольных величин. Сам по себе экстракт из кермека Гмелина на колокализацию субъединиц фермента влияние не оказывал.

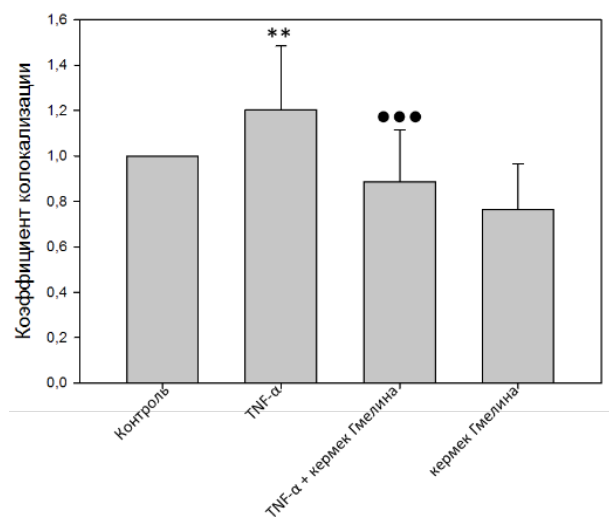


\*\*\*-  $p \leq 0,001$  по сравнению с контролем, ●●-  $p \leq 0,01$ , по сравнению с клетками, которые подвергали воздействию TNF- $\alpha$  (t-критерий Стьюдента)

**Рисунок 3** – Интенсивность флуоресценции DCF в астроцитах головного мозга при воздействии TNF- $\alpha$  и кермека Гмелина, усл.ед.



А



Б

\*\* -  $p \leq 0,01$  по сравнению с контролем, ●●● -  $p \leq 0,001$ , по сравнению с клетками, которые подвергали воздействию TNF- $\alpha$  (t-критерий Стьюдента)

**Рисунок 4** – Флуоресцентные фотографии астроцитов, окрашенных антителами, специфичными к субъединицам НАДФН оксидазы p47phox и gp91phox при воздействии TNF- $\alpha$ , x600 (а); количественный анализ колокализации субъединиц НАДФН оксидазы p47phox и gp91phox в астроцитах (б).

На основании полученных данных, можно заключить, что TNF- $\alpha$  индуцирует сборку цитоплазматических и мембранных субкомпартментов НАДФН оксидазы астроцитов головного мозга и активирует данный ферментный комплекс. Экстракт из кермека Гмелина, препятствует активации НАДФН оксидазы, и, вероятно, таким образом снижает уровень синтеза АФК в клетках. Эти результаты согласуются с результатами по оценке содержания АФК в астроцитах, описанных выше. Резюмируя вышеизложенное,

можно сделать вывод о том, что экстракт из кермека Гмелина оказывает комплексное протекторное действие на астроциты головного мозга. Также результаты проведенного исследования показали, что исследуемый растительный экстракт препятствует развитию окислительного стресса в нейронах. Для более полной оценки терапевтического потенциала данного экстракта в качестве нейропротектора требуется проведение исследований *in vivo*, что является следующим этапом наших исследований.

### Литература

- 1 Askarova S, Yang X, Sheng W, Sun GY, Lee JC (2011) Role of Abeta-receptor for advanced glycation endproducts interaction in oxidative stress and cytosolic phospholipase A(2) activation in astrocytes and cerebral endothelial cells. *Neuroscience*, 199: 375-385.
- 2 Cai H, Griendling KK, Harrison DG (2003) The vascular NAD(P)H oxidases as therapeutic targets in cardiovascular diseases. *Trends in Pharmacological Sciences*, 24 (9): P. 471-478.
- 3 Chen H, Yoshioka H, Kim GS, Jung JE, Okami N, Sakata H, Maier CM, Narasimhan P, Goeders CE, Chan PH (2011) Oxidative stress in ischemic brain damage: mechanisms of cell death and potential molecular targets for neuroprotection. *Antioxid Redox Signal*, 14 (8): 1505-1517.
- 4 Chuang DY, Chan MH, Zong Y, Sheng W, He Y, Jiang JH, Simonyi A, Gu Z, Fritsche KL, Cui J, Lee JC, Folk WR, Lubahn DB, Sun AY, Sun GY (2013) Magnolia polyphenols attenuate oxidative and inflammatory responses in neurons and microglial cells. *J Neuroinflammation*, 10: 15.
- 5 Corda S, Laplace C, Vicaut E, Duranteau J (2001) Rapid reactive oxygen species production by mitochondria in endothelial cells exposed to tumor necrosis factor-alpha is mediated by ceramide. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 24 (6): 762-768.
- 6 Erkebaeva SK, Nurguzhaev ES, Gafurov BG, Tuksanbaeva GU (2014) Prophylaxis of Stroke in Patients with Cerebral Ischemia with Depressive Syndrome. *Neuroscience and Behavioral Physiology*, 44 (2): 175-179.
- 7 Feigin VL, Forouzanfar MH, Krishnamurthi R, Mensah GA, Connor M, Bennett DA, Moran AE, Sacco RL, Anderson L, Truelsen T, O'Donnell M, Venketasubramanian N, Barker-Collo S, Lawes CM, Wang W, Shinohara Y, Witt E, Ezzati M, Naghavi M, Murray C (2014) Global and regional burden of stroke during 1990-2010: findings from the Global Burden of Disease Study 2010. *Lancet* 383 (9913): 245-254.
- 8 Jana M, Jana A, Pal U, Pahan K (2007) A simplified method for isolating highly purified neurons, oligodendrocytes, astrocytes, and microglia from the same human fetal brain tissue. *Neurochem Res*, 32 (12): 2015-2022.
- 9 Li JM, Shah AM (2002) Intracellular localization and preassembly of the NADPH oxidase complex in cultured endothelial cells. *J Biol Chem*, 277 (22): 19952-19960.
- 10 Liu X, Wang Z, Wang P, Yu B, Liu Y, Xue Y (2013) Green tea polyphenols alleviate early BBB damage during experimental focal cerebral ischemia through regulating tight junctions and PKC $\alpha$  signaling. *BMC Complement Altern Med*, 13 (1): 187.
- 11 Matsuo Y, Onodera H, Shiga Y, Shozuhara H, Ninomiya M, Kihara T, Tamatani T, Miyasaka M, Kogure K (1994) Role of cell adhesion molecules in brain injury after transient middle cerebral artery occlusion in the rat. *Brain Res*, 656 (2): 344-352.
- 12 Panickar KS, Jang S (2013) Dietary and plant polyphenols exert neuroprotective effects and improve cognitive function in cerebral ischemia. *Recent Pat Food Nutr Agric*, 5 (2): 128-143.
- 13 Park L, Anrather J, Zhou P, Frys K, Pitstick R, Younkin S, Carlson GA, Iadecola C (2005) NADPH Oxidase-Derived Reactive Oxygen Species Mediate the Cerebrovascular Dysfunction Induced by the Amyloid -beta- Peptide. *J. Neurosci*, 25 (7): 1769-1777.
- 14 Savman K, Heyes MP, Svedin P., Karlsson A (2013) Microglia/macrophage-derived inflammatory mediators galectin-3 and quinolinic acid are elevated in cerebrospinal fluid from newborn infants after birth asphyxia. *Transl Stroke Res*, 4 (2): 228-235.
- 15 Sharif A, Prevot V (2012) Isolation and culture of human astrocytes. *Methods Mol Biol*, 814: 137-151.
- 16 Sharma VK, Kawnayn G, Sarkar N (2013) Acute ischemic stroke: comparison of low-dose and standard-dose regimes of tissue plasminogen activator. *Expert Rev Neurother*, 13 (8): 895-902.
- 17 Simonyi A, Wang Q, Miller RL, Yusof M, Shelat PB, Sun AY, Sun GY (2005) Polyphenols in cerebral ischemia: novel targets for neuroprotection. *Mol Neurobiol*, 31 (1-3): 135-147.



- 18 Smith HK, Gavins FN (2012) The potential of stem cell therapy for stroke: is PISCES the sign? *FASEB J*, 26 (6): 2239-2252.
- 19 Soltani MH, Pichardo R, Song Z, Sangha N, Camacho F, Satyamoorthy K, Sanguenza OP, Setaluri V (2005) Microtubule-associated protein 2, a marker of neuronal differentiation, induces mitotic defects, inhibits growth of melanoma cells, and predicts metastatic potential of cutaneous melanoma. *Am J Pathol*, 166 (6): 1841-1850.
- 20 Tarnowski BI, Spinale FG, Nicholson JH (1991) DAPI as a useful stain for nuclear quantitation. *Biotech Histochem*, 66 (6): 297-302.
- 21 Yang X, Askarova S, Sheng W, Chen JK, Sun AY, Sun GY, Yao G, Lee JC (2010) Low energy laser light (632.8 nm) suppresses amyloid-beta peptide-induced oxidative and inflammatory responses in astrocytes. *Neuroscience*, 171 (3): 859-868.
- 22 Zanetti M, d'Uscio LV, Peterson TE, Katusic ZS, O'Brien T (2005) Analysis of superoxide anion production in tissue. *Methods in molecular medicine*, 108: 65-72.
- 23 Zhusupova G.E. (1997) Fitokhimicheskoe issledovanie kornei kermeka solonchakovogo (Gmelina) [Phytochemical study of the roots of the *Limonium gmelinii*]. Tezisi IV mezhdunarodnoi konferencii po medicinskoj botanike, P. 393.