

# ОРИГИНАЛЬНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

© С. М. Гуляев, Л. Н. Шантанова, Э. Т. Батоцыренова, 2016  
УДК 611.831-008.615-085:599.323.4

*С. М. Гуляев, Л. Н. Шантанова, Э. Т. Батоцыренова*

## МОРФОМЕТРИЧЕСКАЯ ОЦЕНКА НЕЙРОПРОТЕКТИВНОГО ДЕЙСТВИЯ ЭКСТРАКТА АСТРАГАЛА ПЕРЕПОНЧАТОГО НА ГОЛОВНОЙ МОЗГ КРЫС ПРИ ИММОБИЛИЗАЦИОННОМ СТРЕССЕ

Лаборатория экспериментальной фармакологии (зав. — д-р мед. наук А. Г. Мондодоев), Институт общей и экспериментальной биологии СО РАН, г. Улан-Удэ

Целью исследования явились анализ гистологических и морфометрических изменений в головном мозгу у крыс при иммобилизационном стрессе и оценка нейропротективного действия экстракта астрагала перепончатого (*Astragalus membranaceus*) — ЭА. Работа проведена на крысах линии Вистар, разделенных на 3 группы (по 6 животных в каждой): 1-я группа — интактные крысы; 2-я — контроль — животные, подвергнутые иммобилизационному стрессу в течение 18 ч; 3-я группа — крысы, получавшие перорально ЭА (50 мг/кг) в течение 7 сут и испытавшие иммобилизационный стресс. Степень стрессового повреждения головного мозга оценивали морфометрическим методом, учитывая долю неизмененных, гиперхромных сморщенных нейронов и нейронов с признаками дистрофии в III–V слоях коры большого мозга и области СА1 гиппокампа на стандартной площади среза. Иммобилизационный стресс у крыс приводил к отчетливо выраженному повреждению нейронов в коре большого мозга и гиппокампе. ЭА ограничивал стресс-индуцируемое повреждение нейронов: в коре большого мозга и гиппокампе доля гиперхромных сморщенных нейронов была снижена в 3 и 4,6 раза соответственно по сравнению с контролем.

**Ключевые слова:** кора большого мозга, гиппокамп, иммобилизационный стресс, экстракт астрагала перепончатого, нейропротективный эффект

Актуальной проблемой в современной медицине является профилактика и лечение стрессовых состояний, являющихся фактором и нередко сопутствующим фоном множества психоневрологических, терапевтических и хирургических заболеваний [8, 12, 14]. В борьбе со стрессовыми состояниями представляется необходимым применение растительных средств, оказывающих нейромодулирующее, антиоксидантное, нейропротективное комплексное действие [3, 5].

Астрагал перепончатый (*Astragalus membranaceus*) издавна широко используется в традиционной медицине Китая, Кореи и Монголии как адаптогенное, тонизирующее и восстановительное средство при усталости, общей слабости, многих хронических, в частности, неврологических и сердечно-сосудистых заболеваниях [5, 6]. Широкий диапазон лечебного действия указанного растения обусловлен содержанием различных групп биологически активных соединений: изофлавоноидов, тритерпеновых сапонинов, полисахаридов, а также аминокислот и микроэлементов [3, 5]. *Astragalus membranaceus* обладает нейромодулирующей, антиоксидантной и вазодилатирующей

активностью [9, 15–17], оказывает нейропротективное действие при острой ишемии головного мозга [7, 11]. Однако его влияние на морфофункциональное состояние головного мозга при стрессорном воздействии мало изучено.

Цель настоящего исследования — анализ морфологических изменений в головном мозгу у крыс при иммобилизационном стрессе и морфометрическая оценка нейропротективного действия экстракта *Astragalus membranaceus* (ЭА).

**Материал и методы.** В работе использовали крыс линии Вистар массой 180–200 г обоего пола, разделенных на 3 группы (по 6 животных в каждой группе): 1-ю группу составили интактные крысы; 2-ю (контрольную) группу — крысы, подвергавшиеся иммобилизационному стрессу; 3-ю группу — крысы, получавшие ЭА и подвергнутые иммобилизационному стрессу. Средство из *Astragalus membranaceus* (Fish.) Bunge получали путем экстракции измельченных корней этанолом (60%), концентрирования и высушивания в вакуум-сушильном шкафу. Сухой ЭА разводили дистиллированной водой, вводили крысам внутривенно в дозе 50 мг/кг однократно в течение 7 сут, последнее введение осуществляли за 1 ч до начала эксперимента. Животным контрольной группы вводили дистиллированную воду по аналогичной схеме.

### Сведения об авторах:

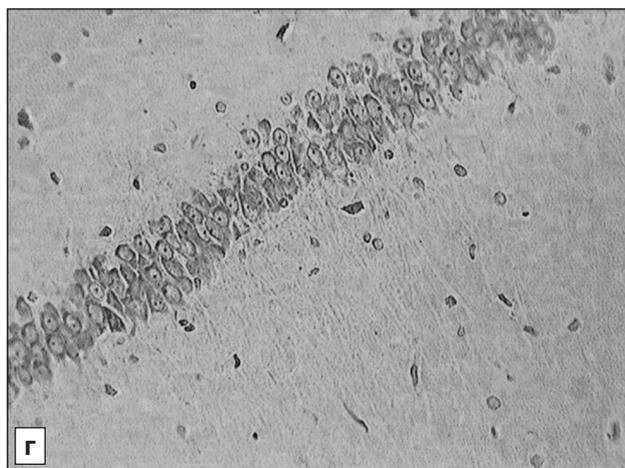
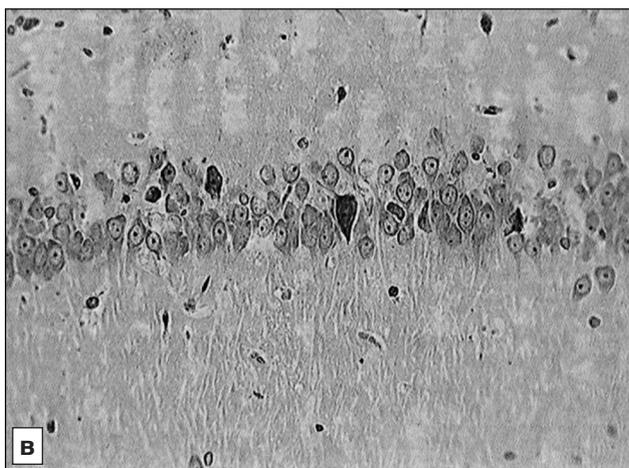
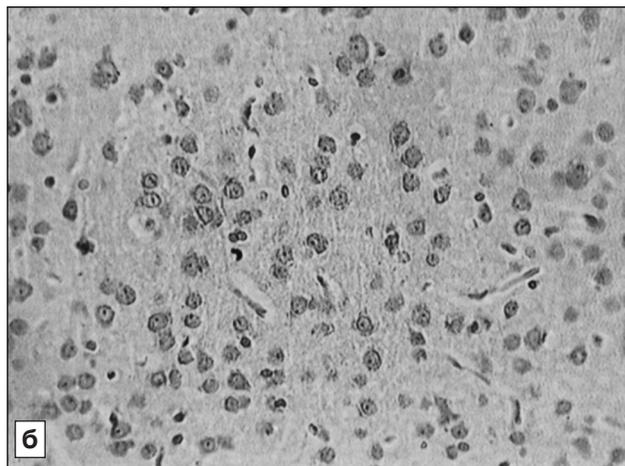
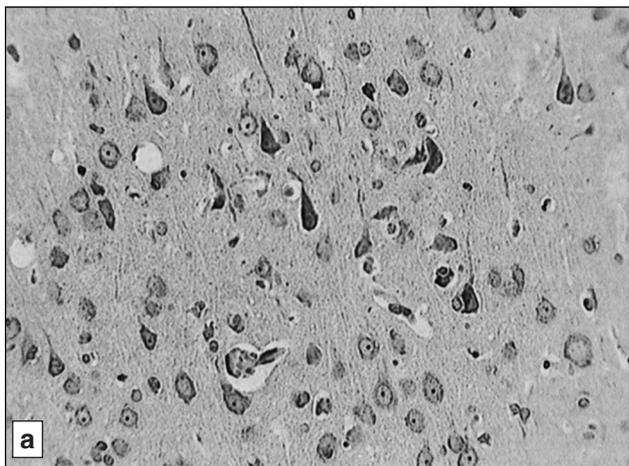
Гуляев Сергей Миронович (e-mail: [s-gulyaev@inbox.ru](mailto:s-gulyaev@inbox.ru)), Шантанова Лариса Николаевна, Батоцыренова Эльвира Токтохоевна (e-mail: [elvibato.uu@yandex.ru](mailto:elvibato.uu@yandex.ru)), лаборатория экспериментальной фармакологии, Институт общей и экспериментальной биологии СО РАН, 670046, г. Улан-Удэ, ул. Сахьяновой, 6

Иммобилизационный стресс у крыс вызывали путем фиксации их конечностей в положении лежа на спине к деревянной платформе в течение 18 ч. После эксперимента крыс мгновенно декапитировали, извлекали головной мозг и помещали на 1 мес в 10% раствор нейтрального формалина, вырезали из него фронтальные участки на уровне передних теменных областей. Образцы после стандартной гистологической обработки заливали в парафин, делали срезы толщиной 5 мкм и окрашивали крезильовым фиолетовым [2]. Гистологический и морфометрический анализ микропрепаратов головного мозга проводили с использованием светового микроскопа Motic DMW-B1-223 ASC (Motic, Китай), программы «Motic Images, 2000»: в III–V слоях коры большого мозга и области CA1 гиппокампа (на площади 150×300 мкм) [1] подсчитывали количество и определяли доли неизмененных, гиперхромных сморщенных нейронов и нейронов с признаками дистрофии. Оценку статистической значимости полученных данных проводили по t-критерию Стьюдента.

**Результаты исследования.** У крыс контрольной группы в коре большого мозга были отмечены спазм, дистония микрососудов, отек эндотелия и расширение периваскулярных пространств, а также повреждение нейронов (*рисун*

*нок, а*). Нейроны, погибшие по типу острого некроза, отличались окрашиванием цитоплазмы в темно-синий цвет и темным плохо различимым ядром неправильной формы — «гиперхромные сморщенные нейроны». Были обнаружены также погибающие нейроны с признаками необратимой дистрофии (аутофагия): отчетливо выраженной вакуолизацией цитоплазмы, изменением формы тела, эксцентричным положением ядра.

Нередко отмечался перичеллюлярный отек, цитолиз, сопровождающийся, как правило, нейронофагией. Наряду с указанными повреждениями, были видны участки нервной ткани, содержавшие неизмененные нейроны. Они имели правильную форму тела, хорошо различимое округлое ядро и светлую цитоплазму. При морфологическом исследовании гиппокампа у животных контрольной группы обнаружено, что острый иммобилизационный стресс приводил к изменениям его структуры преимущественно в поле CA1, где были отмечены дезинтеграция пирамидного слоя,



Кора передней теменной области (V слой) большого мозга (а, б) и гиппокампа (в, г) крыс, испытавших иммобилизационный стресс — контроль (а, в), подвергавшихся иммобилизационному стрессу и получавших экстракт астрагала (б, г).

а — гиперхромные сморщенные нейроны, цитолиз; б — дистрофически измененные нейроны; в — дезинтеграция пирамидного слоя, гиперхромные и дистрофически измененные нейроны; г — почти неизмененный пирамидный слой с большим количеством нейронов нормального строения. Окраска крезильовым фиолетовым. Ув.400

повреждение нейронов с образованием гиперхромных сморщенных и с признаками дистрофии (см. рисунок, в).

У крыс, получавших ЭА, изменения сосудов, периваскулярный отек были незначительными, а повреждения нейронов менее выраженными, чем в контроле: в коре полушарий большого мозга доля гиперхромных сморщенных нейронов была значимо меньше (таблица); нейроны с признаками дистрофии характеризовались обратимыми изменениями в виде слабой вакуолизации цитоплазмы, острого набухания нейронов (см. рисунок, б). Доля неизменных нейронов в гиппокампе (см. рисунок, г) была значимо больше, чем в контроле (см. таблицу).

Морфометрический анализ показал, что ЭА оказывал нейропротективное действие: в коре большого мозга доля неизменных нейронов была больше в 2 раза, гиперхромных сморщенных нейронов — в 3 раза меньше, чем в контроле; доля нейронов с признаками дистрофии была равной показателю в контроле, но признаки дистрофических изменений нейронов в большинстве случаев свидетельствовали об их обратимости в отличие от таковых в контроле. В гиппокампе доля неизменных нейронов была больше в 2 раза, гиперхромных нейронов — в 4,6 раза меньше, а с признаками дистрофии — меньше в 1,5 раза, чем в контроле (см. таблицу), доля неизменных нейронов (см. рисунок, г) в гиппокампе была сопоставима с таковой у интактных крыс.

Обсуждение полученных данных. В наших исследованиях острый иммобилизационный стресс у крыс вызывал повреждение нейронов в коре передней теменной области и поля СА1 гиппокампа, что согласуется с данными литературы [10, 13]. Нейроны указанных областей крайне чувствительны к стрессу из-за высокой плотности рецепторов глутамата, а также осо-

бенностей ангиоархитектоники и локального кровоснабжения [8]. Стресс вызывает избыточный выброс глутамата из окончаний перевозбужденных нейронов, что приводит к запуску серии патологических механизмов: гиперактивации рецепторов глутамата, развитию глутамат-кальциевого каскада реакций, генерации свободных радикалов [13]. Они, вероятно, являются основными причинами повреждения и гибели нейронов. К повреждающим факторам относят и уменьшение кровоснабжения указанных участков мозга из-за гиперчувствительности локальных микрососудов к вазоконстрикторному действию избытка катехоламинов при их стресс-индуцированной гиперсекреции [4]. Принимая во внимание, что стрессовые повреждения структур головного мозга обусловлены развитием цепи разных взаимосвязанных патологических процессов, становится очевидным, что нейропротекторное действие лекарственного средства будет более выраженным при комплексном воздействии на них.

Как уже было отмечено выше, *Astragalus membranaceus* содержит группы активных соединений: сапонины (астрагалозиды), полисахариды, изофлавоноиды, они обладают разным спектром фармакологических свойств. Показано, что *Astragalus membranaceus*, его действующие соединения проявляют нейромодулирующую, противоглутаматную, антиоксидантную, вазорелаксирующую активность в экспериментах *in vitro* и *in vivo*. Так, изофлавоноиды растения оказывают антиоксидантное, противоглутаматное, нейропротективное влияние на культуры нейронов при нейротоксическом воздействии глутаматом [15, 16]. Выделенное из растения вещество — астрагалозид IV обладает нейропротективной активностью при острой ишемии головного мозга [7, 11]. Экстракт растения и его активные соединения полисахариды защищают эндотелий сосудов, дают вазорелак-

Относительное содержание различных нейронов в структурах головного мозга у крыс при иммобилизационном стрессе и получавших экстракт астрагала ( $\bar{x} \pm s_{\bar{x}}$ , %)

Группа животных	Нейроны коры полушарий большого мозга (III, IV, V слои)			Нейроны гиппокампа (CA1)		
	Неизменные	Дистрофически измененные	Гиперхромные сморщенные	Неизменные	Дистрофически измененные	Гиперхромные сморщенные
Интактная	78±4	17,5±1,5	4,5±0,5	83,1±1,1	11,1±0,9	5,8±0,5
Подвергавшаяся иммобилизационному стрессу — контрольная	32,0±2,7	33,5±2,2	34,5±2,7	46±4	28,8±2,1	25,0±2,1
Подвергавшаяся иммобилизационному стрессу и получавшая экстракт астрагала	67,6±2,9*	21,3±1,9*	11,1±0,8*	79,3±1,7*	15,3±1,4*	5,4±0,3*

\* Различия по сравнению с контролем значимы при  $P \leq 0,05$ .

сирующий эффект при повреждении их вазоконстрикторными агентами [17]. Наличие указанных фармакологических свойств у данного растения характеризует его как потенциально эффективное средство, способное предупреждать развитие основных механизмов повреждения структур головного мозга при стрессовых расстройствах.

Проведенные гистологические и морфометрические исследования показали, что введение ЭА при остром иммобилизационном стрессе оказывало защитное действие на нейроны коры большого мозга и гиппокампа крыс. Очевидно, что нейропротективное влияние *Astragalus membranaceus* на структуры мозга обусловлено комплексным действием его активных соединений на цепь базисных патологических процессов при состоянии, индуцированном стрессом.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Автандилов Г.Г. Медицинская морфометрия: Руководство. М.: Медицина, 1990.
2. Меркулов Г.А. Курс патологистологической техники. М.: Медгиз, 1966.
3. Соколов М.Я., Замотаев М.В. Справочник по лекарственным растениям (Фитотерапия). М.: Медицина, 1988.
4. Фармакологическая регуляция тонуса сосудов / Под ред. П.А.Галенко-Ярошевского. М.: Изд-во РАМН, 1999.
5. Шретер А.И., Валентинов Б.Г., Наумова Э.М. Природное сырье китайской медицины: Справочник. М.: Теревинф, 2004.
6. *Astragalus membranaceus* / *Alternat. Med. Rev.* 2003. Vol. 8, № 1. P. 72–77.
7. Cai Y.H., Qin Z., Yao Q.L. A prospective, pilot study of *Astragalus membranaceus* in the treatment of acute cerebral infarction // *J. Clin. Neurol.* 1994. № 7. P. 216–218.
8. Heuser I., Lammers C.-H. Stress and the brain // *Neurobiol. Aging.* 2003. Vol. 24. P. S69–S76.
9. Jalsrai A., Grecksch G., Becker A. Evaluation of the effects of *Astragalus mongholicus* Bunge saponin extract on central nervous system functions // *J. Ethnopharmacol.* 2010. Vol. 131. P. 544–549.
10. Lee Y.J., Choi B., Lee E.H. et al. Immobilization stress induces cell death through production of reactive oxygen species in the mouse cerebral cortex // *Neurosci. Lett.* 2006. Vol. 392. P. 27–31.
11. Luo Y., Qin Z., Hong Z. et al. Astragaloside IV protects against ischemic brain injury in a murine model of transient focal ischemia // *Neurosci. Lett.* 2004. Vol. 363. P. 218–223.
12. Makino S., Hashimoto K., Gold P.W. Multiple feedback mechanisms activating corticotropin-releasing hormone system in the brain during stress // *Pharmacol. Biochem. Behav.* 2002. Vol. 73. P. 147–158.
13. Moghaddam B. Stress preferentially increases extraneuronal levels of excitatory amino acids in the prefrontal cortex: comparison to hippocampus and basal ganglia // *J. Neurochem.* 1993. Vol. 60. P. 1650–1657.
14. Raio C.M., Phelps E.A. The influence of acute stress on the regulation of conditioned fear // *Neurobiol. Stress.* 2015. Vol. 1. P. 134–146.
15. Toda S., Shirataki Y. *Astragalus radix*, a crude drug in Oriental medicines, on lipid peroxidation and protein oxidative modification by copper // *J. Ethnopharmacol.* 1999. Vol. 68. P. 331–333.
16. Yu D., Duan Y., Bao Y. et al. Isoflavonoids from *Astragalus mongholicus* protect PC12 cells from toxicity induced by L-glutamate // *J. Ethnopharmacol.* 2005. Vol. 98. P. 89–94.
17. Zhang B.Q., Hu S.-J., Qiu L.-H., Zhu J.-H. Effects of *Astragalus membranaceus* and its main components on the acute phase endothelial dysfunction induced by homocysteine // *Vascul. Pharmacol.* 2007. Vol. 46. P. 278–285.

Поступила в редакцию 30.06.2015

Получена после доработки 14.04.2016

*S.M.Gulyaev, L.N.Shantanova, E.T.Batotsyrenova*

#### MORPHOMETRIC EVALUATION OF THE NEUROPROTECTIVE EFFECT OF THE EXTRACT OF *ASTRAGALUS MEMBRANACEUS* ON THE BRAIN OF RATS SUBJECTED TO IMMOBILIZATION STRESS

The aim of the study was to analyze histological and morphometric changes in the brain of rats subjected to immobilization stress and to assess the neuroprotective effect of the extract of *Astragalus membranaceus* (AE). The work was carried out on Wistar rats that were divided into 3 groups (6 animals in each): group 1 — intact rats; group 2 — control animals subjected to immobilization stress for 18 h; group 3 — rats treated orally with AE (50 mg/kg) for 7 days and then subjected to immobilization stress. The level of stress-induced brain damage was assessed by a morphometric method, by measuring the proportions of morphologically intact neurons, hyperchromatic shrunken neurons and neurons with the signs of degeneration in layers III–V of the cerebral cortex and CA1 region of the hippocampus in the standard area of the section. Immobilization stress in rats led to a clearly pronounced neuronal damage in the cerebral cortex and hippocampus. AE was found to limit the stress-induced neuronal damage in the cerebral cortex and the hippocampus: the proportion of hyperchromatic shrunken neurons was reduced 3 and 4.6 times, respectively, compared to control.

**Key words:** *cerebral cortex, hippocampus, immobilization stress, Astragalus membranaceus extract, a neuroprotective effect*

Laboratory of Experimental Pharmacology, Institute of General and Experimental Biology, RAS Siberian Branch, Ulan-Ude