

с бородавчатой морщинистостью кутикулы. Длина двуклеточного волоска составляет $84,65 \pm 3,44$ мкм. Волоски на адаксиальной стороне массово располагаются вдоль проводящих тканей, тогда как для абаксиальной стороны листа их приуроченности к каким-либо структурам не отмечено.

Из эндогенных секреторных структур для сырья листьев *P. rupestris* характерны идиобласты, содержащие эфирное масло, обладающее запахом, характерным для видов рода *Patrinia*, и хаотично расположенные друзы оксалата кальция округлой или близкой к округлой формы.

Литература

1. Государственная фармакопея Российской Федерации. Вып. 12. Ч. 1. М.: Изд-во НЦЭСМП, 2008. 704 с.
2. Измоденов А.Г. Силедия. Начало учения. Лесные соки и ягоды. Хабаровск: Хабаровское книжн. изд-во, 2001. 368 с.
3. Измоденов А.Г. Силедия-2. Начало учения. Лесное целебье. Лесной легкоход. Хабаровск.: Хабаровское книжн. изд-во, 2008. 475 с.
4. Недревесная продукция леса на Дальнем Востоке: учебное пособие / Костырина Т.В., Гуков Г.В., Зориков П.С. Владивосток: Дальприбор, 2013. 324 с.

5. Самылина И.А., Аносова О.Г. Фармакогнозия. Атлас: учебное пособие в 2 т. М.: ГЭОТАР-Медиа, 2007. Т. 1. 192 с.

Поступила в редакцию 22.01.2014.

Диагностические признаки листьев *Patrinia rupestris*

О.Г. Зорикова^{1,2}, А.Ю. Маняхин^{1,2}, А.В. Янов²

¹ Горнотаежная станция им. В.Л. Комарова ДВО РАН (692533, Приморский край, с. Горнотаежное, ул. Солнечная, 26); ² Межведомственный научно-образовательный центр «Растительные ресурсы»: Горнотаежная станция им. В.Л. Комарова ДВО РАН – Владивостокский государственный университет экономики и сервиса (690014, Владивосток, ул. Гоголя, 41)

Резюме. Работа посвящена изучению макро- и микроскопических диагностических признаков сырья патринии скальной. Материалом служило высушенное сырье. Исследовали препараты листьев с поверхности в соответствии с общепринятыми методиками. Сырье диагностировали по следующим признакам: эпидермис, соотношение продольного и поперечного размеров клеток, тип и расположение устойчивого комплекса, тип волосков, наличие идиобластов. Был выявлен ряд макро- и микроскопических диагностических признаков для сырья *P. rupestris*. Одни обладают высокой вариабельностью, другие стабильны и позволяют однозначно установить подлинность используемого растительного лекарственного сырья.

Ключевые слова: патриния скальная, микроскопический анализ.

УДК 591.18:591.139:591.51:57.084

ВЛИЯНИЕ ПЕРИФЕРИЧЕСКИ-ИНДУЦИРОВАННОГО НЕЙРОВОСПАЛЕНИЯ НА КОГНИТИВНЫЕ ФУНКЦИИ У МОЛОДЫХ И СТАРЫХ МЫШЕЙ

А.А. Тыртышная^{1,2}, А.А. Зозуля¹

¹ Институт биологии моря им. А.В. Жирмунского ДВО РАН (690041, г. Владивосток, ул. Пальчевского, 17),

² Дальневосточный федеральный университет (690950), г. Владивосток, ул. Суханова, 8)

Ключевые слова: липополисахарид, нейровоспаление, двигательная активность, спонтанные альтерации.

EFFECT OF PERIPHERICALLY-INDUCED NEUROINFLAMMATION ON COGNITIVE FUNCTION IN YOUNG AND OLD MICE

A.A. Tyrtysnaya^{1,2}, A.A. Zozulya¹

¹ Institute of Marine Biology named after A.V. Zhirmunskiy FEB RAS (17 Palchevskogo St. Vladivostok 690041 Russian Federation),

² Far Eastern Federal University (8 Sukhanova St. Vladivostok 690950 Russian Federation)

Background. The article is devoted to experimental evaluation of the impact of peripherally-induced neuroinflammation on the severity of cognitive impairment, depending on age.

Methods. Neuroinflammation has been induced in the 3- and 18-month-old white male mice with an intraperitoneal injection of bacterial lipopolysaccharides *Escherichia coli* 0111: B4 (Sigma Aldrich) 5 mg/kg. After 24 hours, the researchers determined locomotor activity and a working memory in Y-maze. Then the test animals were taken out of the experience and assessed the expression of the proteins GFAP and OX-42 on transverse hippocampal sections.

Results. In 18-month-old mice there have been revealed more severe cognitive deficit and decreased locomotor activity compared with the group of “young” test animals. Immunohistochemical methods in hippocampus of 18-month-old mice showed more pronounced activation of microglia and astrogliosis.

Conclusions. Aging is accompanied by increased tendency to neuroinflammation. Stimulation of the immune system by bacterial

endotoxin increases the severity of inflammatory reactions in the brain of aged mice compared to young animals, regularly provoking neurodegeneration and cognitive deficit.

Keywords: lipopolysaccharide, neuroinflammation, motor activity, spontaneous alterations.

Pacific Medical Journal, 2014, No. 2, p. 23–26.

Нейродегенеративные заболевания представляют собой огромную медико-социальную проблему. Распространенность этих заболеваний неуклонно растет. По данным ассоциации болезни Альцгеймера, в 2013 г. во всем мире количество людей, страдающих от различных видов деменций, составляло около 36 миллионов человек [9].

Старение организма сопровождается разнообразными изменениями в органах и тканях. Мозг человека и высших млекопитающих обладает огромным репаративным потенциалом, и нервные клетки в течение многих лет могут реагировать на эти изменения адаптивно, включаясь в случае декомпенсации в нейродегенеративные каскады, приводящие к развитию когнитивных нарушений [3]. Роль воспалительного ответа в развитии нейродегенеративных заболеваний на сегодняшний день доказана [2], однако, влияние

периферически-индуцированного воспаления на развитие нейровоспаления и, как следствие, когнитивного дефицита, изучено недостаточно.

Цель данной работы состояла в оценке степени влияния периферически индуцированного нейровоспаления на выраженность когнитивных нарушений в зависимости от возраста у мышей.

Материал и методы. Экспериментальная часть работы одобрена комиссией по биомедицинской этике Института биологии моря ДВО РАН (протокол № 12 от 14.12.2012 г.). Исследование проходило в соответствии с правилами проведения работ и использования экспериментальных животных (приложение к приказу МЗ СССР № 755 от 12.08.1977 г.).

В работе использованы 32 самца белой беспородной мыши в возрасте 3 и 18 месяцев, весом 25–30 г. Животных содержали в стандартных условиях вивария. Нейровоспаление индуцировали путем однократной внутривенной инъекции бактериальных липополисахаридов (ЛПС) *Escherichia coli* 0111:B4 (Sigma Aldrich) в дозировке 5 мг/кг. В соответствии с целью эксперимента животных разделили на 4 группы по 8 мышей в каждой:

1. Контроль, 3 мес. – животные в возрасте 3 мес., 200 мкл 0,9% NaCl;
2. ЛПС, 3 мес. – животные в возрасте 3 мес., 200 мкл р-ра ЛПС в 0,9% NaCl;
3. Контроль, 18 мес. – животные в возрасте 18 мес., 200 мкл 0,9% NaCl;
4. ЛПС, 18 мес. – животные в возрасте 18 мес., 200 мкл р-ра ЛПС в 0,9% NaCl.

Через 24 часа после инъекции определяли двигательную активность и состояние рабочей памяти в Y-образном лабиринте. Длительность тестирования одного животного составляла 5 мин. Фиксировалось количество (двигательная активность) и последовательность входов в рукава лабиринта с вычислением коэффициента спонтанных альтернатив (K_s) по формуле [6]:

$$K_s = \frac{R}{A} \times 100\%,$$

где R – количество правильных альтернатив (три последовательных входа в неповторяющиеся рукава лабиринта), A – общее количество возможных альтернатив.

В течение часа после поведенческих тестов животных выводили из опыта декапитацией под изофлурановым наркозом с соблюдением правил и международных рекомендаций Европейской конвенции по защите позвоночных животных, используемых для экспериментов или в иных научных целях (Страсбург, 1986). Проводили транскраниальную перфузию фосфатным буферным раствором и 4%-ным раствором параформальдегида (Sigma), pH 7,3. Головной мозг извлекали и помещали на 48 часов в 4%-ный раствор параформальдегида с последующим изготовлением поперечных срезов на криостат-микротоме Microm HM 525 Cryostat.

Для иммуногистохимического выявления маркеров нейровоспаления применяли первичные антитела к белкам GFAP (1:200; 18-0063, Life technologies) и OX-42 (CD11-b) (1:50, sc-53086, Santa Cruz biotechnology). Для визуализации использовали вторичные антитела, конъюгированные с Alexa Fluor 488 (anti-mouse, 1:200, A-21204, Life technologies) и Alexa Fluor 546 (anti-rabbit, 1:200, A-11010, Life technologies). От каждого животного брались по 4 среза (32 среза для каждой группы). Полученные изображения анализировались с использованием программы ImageJ (НИН, США), где измерялась интенсивность флуоресценции в областях гиппокампа: CA1, CA3 и зубчатой фации. Полученные данные обрабатывались методами вариационной статистики с вычислением средней арифметической и ее ошибки. Достоверность различий оценивалась по критерию Стьюдента.

Результаты исследования. Показатели рабочей памяти в группе «Контроль, 18 мес.» оказались существенно ниже, чем в группе «Контроль, 3 мес.». При индукции нейровоспаления коэффициент спонтанных альтернатив у молодых животных уменьшился на $10,6 \pm 2,8\%$. У старых животных не наблюдалось статистически значимого снижения этого коэффициента после введения ЛПС. Количество входов в рукава лабиринта у старых мышей при индукции нейровоспаления снизилось. У молодых животных наблюдалось лишь незначительное снижение локомоторной активности (табл. 1).

Иммуногистохимическое исследование выявило статистически достоверное повышение экспрессии белков GFAP и OX-42 в гиппокампе при введении ЛПС, как у старых, так и у молодых мышей. Уровень экспрессии данных белков в группах «Контроль, 18 мес.» и «ЛПС, 18 мес.» оказался выше, чем у молодых мышей (табл. 2, рис. 1, 2).

Обсуждение полученных данных. Периферически-индуцированное нейровоспаление снижало локомоторную активность в большей степени у старых, чем

Таблица 1

Рабочая память и локомоторная активность при нейровоспалении

Показатель	Контроль, 3 мес.	ЛПС, 3 мес.	Контроль, 18 мес.	ЛПС, 18 мес.
K_s , %	76,3±0,6	65,8±2,2	65,1±3,5	59,7±3,5
Кол-во входов	22,5±1,9	16,6±2,8	19,9±1,8	3,4±0,4

Примечание. Разница с группой «Контроль, 3 мес.» для групп «ЛПС, 3 мес.» и «Контроль, 18 мес.» статистически значима.

Таблица 2

Экспрессия маркеров нейровоспаления (единицы оптической плотности)

Маркер	Контроль, 3 мес.	ЛПС, 3 мес.	Контроль, 18 мес.	ЛПС, 18 мес.
GFAP	13,1±0,4	20,5±1,4	19,7±0,8	25,1±1,8
OX-42	9,8±0,5	25,4±1,6	20,5±1,6	30,7±2,9

Примечание. Разница между опытными и контрольными группами соответствующего возраста статистически значима.

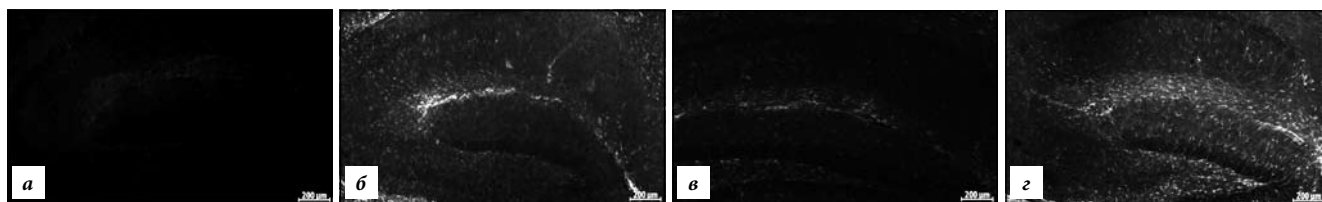


Рис. 1. Экспрессия GFAP в гиппокампе:
а – контроль, 3 мес., б – ЛПС, 3 мес., в – контроль, 18 мес., з – ЛПС, 18 мес. Иммунолюминисценция.

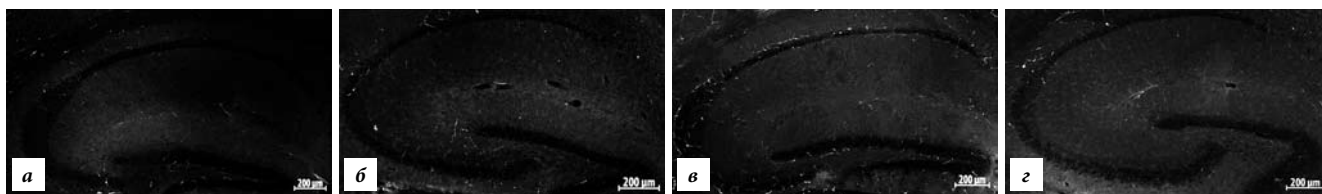


Рис. 2. Экспрессия OX-42 в гиппокампе:
а – контроль, 3 мес., б – ЛПС, 3 мес., в – контроль, 18 мес., з – ЛПС, 18 мес. Иммунолюминисценция.

у молодых животных. Низкое значение коэффициента спонтанных альтернаций в группе «ЛПС, 18 мес.» свидетельствовало о низком уровне рабочей памяти. Кроме того, уровень рабочей памяти в контрольной группе старых мышей был ниже, чем в контрольной группе молодых животных. Подобные различия в уровне локомоторной активности и рабочей памяти могут являться следствием патологических изменений, сопровождающих процесс старения.

Иммуногистохимическими методами выявлена более выраженная активация микроглии (экспрессия OX-42) и астроглиоз (экспрессия GFAP) в группах старых мышей по сравнению с молодыми животными. Полученные данные свидетельствуют о наличии воспалительной реакции в гиппокампе, более выраженной у старых мышей, после периферической стимуляции иммунной системы. Высокий уровень экспрессии данных белков в группе «Контроль, 18 мес.» подтверждал наличие изменений, вероятно, связанных с возрастным ослаблением защитно-компенсаторных реакций организма [7]. Снижение способности противостоять негативным внешним воздействиям закономерно приводит к активации микроглии, нарушению баланса между выработкой про- и противовоспалительных цитокинов и, впоследствии, к переходу острого воспалительного процесса в хронический с развитием нейродегенеративных изменений.

Процесс старения сопровождается повышенной склонностью к нейровоспалению [5]. Стимуляция периферической иммунной системы бактериальными ЛПС служит причиной увеличения выраженности воспалительных реакций в мозге старых мышей, что закономерно приводит к нейродегенерации [3].

Старение организма повышает склонность к развитию оксидантного стресса, вызывающего избыточную выработку активных форм кислорода и окислительную деградацию липидов [8]. Данные процессы способны оказывать влияние на функционирование митохондриальных мембран, вызывая нарушение их

целостности. Окисление липидов приводит к нарушению нормальной упаковки мембранного бислоя, что может вызвать повреждение мембраносвязанных белков [8]. В митохондриях могут повреждаться как ферменты матрикса, так и компоненты дыхательной цепи. Поврежденные мембраны утрачивают энергетический потенциал, контроль за ионными потоками и медиаторными системами, возникают патологические (воспалительные, нейродегенеративные) изменения в тканях. Вышеперечисленные процессы могут повлечь за собой увеличение концентрации свободного внутриклеточного Ca^{2+} [4].

Повышение концентрации внутриклеточного Ca^{2+} приводит к активации нейрональной нитрооксидсинтазы, фосфолипазы A_2 и кальпаинов, семейства Ca^{2+} -зависимых протеиназ, способных разрушать белки цитоскелета и другие мембранные белки. Активация фосфолипазы A_2 способствует чрезмерному высвобождению арахидоновой кислоты из фосфолипидов клеточных мембран. Поскольку ферменты, участвующие в метаболизме арахидоновой кислоты (липооксигеназы, циклооксигеназы), относятся к классу оксидаз со смешанной функцией и утилизируют молекулярный кислород, они могут также служить источниками активных форм кислорода.

Тем не менее сложно делать выводы о том, какие факторы в системе «оксидантный стресс – нейровоспаление» являются первичными, а какие – их следствием. Рассмотренные процессы образуют порочный круг, поскольку весьма часто защитно-компенсаторные механизмы неспособны ликвидировать источник возникших нарушений. Причины ослабления защитно-компенсаторных функций организма различны: неблагоприятные внешние воздействия, врожденные и приобретенные заболевания, старение организма и т.д. [1]. Оксидантный стресс может вызывать повреждение ДНК митохондрий, что в условиях недостаточной репарации ДНК, связанной со старением, играет критическую роль. Рост числа повреждений митохондриальной

ДНК неизбежно приводит к нарушению целостности и функционирования митохондрий, дополнительному высвобождению активных форм кислорода, замыкая порочный круг [8].

Изучение механизмов, лежащих в основе когнитивных нарушений, сопровождающих процессы старения, открывает пути для разработки фармакологических средств, направленных на улучшение когнитивных функций при нейродегенеративных заболеваниях.

Работа выполнена при поддержке Министерства образования и науки Российской Федерации, код проекта 413.

Литература

1. Фоменко С.Е., Кушнерова Н.Ф., Спрыгин В.Г., Момот Т.В. Нарушение обменных процессов в печени крыс под действием стресса // Тихоокеанский мед. журнал. 2013. № 2. С. 67–70.
2. Benarroch E. Neuron-astrocyte interactions: partnership for normal function and disease in the central nervous system // Mayo Clinic Proceedings. 2005. Vol. 80, No. 10. P. 1326–1338.
3. Godbout J.P., Glaser R. Stress-induced immune dysregulation: implications for wound healing, infectious disease and cancer // J. Neuroimmune Pharmacology. 2006. Vol. 1, No. 4, P. 421–427.
4. Guzman J.N., Sanchez-Padilla J., Schumacker P.T. The role of calcium and mitochondrial oxidant stress in the loss of substantia nigra pars compacta dopaminergic neurons in Parkinson's disease // Neuroscience. 2011. Vol. 198. P. 221–231
5. Johnson, R.W., Godbout, J.P. Aging, neuroinflammation and behavior // Psychoneuroimmunology. 2006. Vol. 1. P. 379–391.
6. Knowles J., Danielle S., Thuy-Vi N. [et al.] A small molecule p75NTR ligand prevents cognitive deficits and neurite degeneration in an Alzheimer's mouse model // Neurobiology of Aging. 2013. Vol. 34. P. 2052–2063.

7. Richwine A., Parkin A., Buchanan J. [et al.] Architectural changes to CA1 pyramidal neurons in adult and aged mice after peripheral immune stimulation // Psychoneuroendocrinology. 2008. Vol. 33, No. 10. P. 1369–1377.
8. Sas K., Robotkab H., Toldib J. [et al.] Mitochondria, metabolic disturbances, oxidative stress and the kynurenine system, with focus on neurodegenerative disorders // Journal of the Neurological Sciences. 2007. Vol. 257, No. 1–2. P. 221–239.
9. Sutherland G.T., Chami B., Youssef P., Witting P.K. Oxidative stress in Alzheimer's disease: Primary villain or physiological by-product? // Redox Report. 2013. Vol. 18, No. 4 P. 134–141.

Поступила в редакцию 17.02.2014.

Влияние периферически-индуцированного нейровоспаления на когнитивные функции у молодых и старых мышей

А.А. Тыртышная^{1,2}, А.А. Зозуля¹

¹ Институт биологии моря им. А.В. Жирмунского ДВО РАН (690041, г. Владивосток, ул. Пальчевского, 17), ² Дальневосточный федеральный университет (690950), г. Владивосток, ул. Суханова, 8).

Резюме. Оценивали влияние периферически индуцированного нейровоспаления на выраженности когнитивных нарушений в зависимости от возраста у мышей. Нейровоспаление индуцировали путем внутрибрюшинного введения 3- и 18-месячным животным бактериальных липополисахаридов *Escherichia coli* 0111:B4 (Sigma Aldrich) в дозировке 5 мг/кг. У 18-месячных мышей выявлены более выраженные когнитивный дефицит и снижение локомоторной активности по сравнению с группой «молодых» животных. Иммуногистохимическими методами в гиппокампе у 18-месячных мышей показаны более выраженные активация микроглии и астроглиоза.

Ключевые слова: липополисахарид, нейровоспаление, двигательная активность, спонтанные альтерации.

УДК 615.322: 582.5/9:577.188: 577.121

ХИМИЧЕСКИЙ СОСТАВ ПАТРИНИИ СКАЛЬНОЙ

А.Ю. Маняхин^{1,2}, О.Г. Зорикова^{1,2}, Д.С. Назаров²

¹ Горнотаежная станция им. В.Л. Комарова ДВО РАН (692533, Приморский край, с. Горнотаежное, ул. Солнечная, 26),

² Межведомственный научно-образовательный центр «Растительные ресурсы»: Горнотаежная станция им. В.Л. Комарова ДВО РАН – Владивостокский государственный университет экономики и сервиса (690014, г. Владивосток, ул. Гоголя, 41)

Ключевые слова: *Patrinia rupestris*, трава, корни, вторичные метаболиты.

THE CHEMICAL COMPOSITION OF PATRINIA RUPESTRIS

A.Yu. Manyakhin, O.G. Zorikova, D.S. Nazarov
V.L. Komarov Gornotaezhnaya station, FEB RAS (26 Solnechnaya St. Gorno-taezhnoe village, Primorsky Region 692533 Russian Federation), Interdepartmental Scientific and Educational Center «Plant Resources»: V.L. Komarov Gornotaezhnaya station, FEB RAS – Vladivostok State University of Economics and Service (41 Gogolya St. Vladivostok 690014 Russian Federation)

Background. The paper gives the analysis of the chemical composition of raw materials and extracts of the root and aboveground parts of *Patrinia rupestris*, potentially having neurotropic activity.

Methods. Raw herbs and roots were procured at the flowering stage (in August). The researchers used standard methods.

Results. Content of secondary metabolites was higher in the raw herb, in the roots it exceeded analogous proportion of polysaccharides by 82.5%, tannins – 34.7%, pectins – 61.1%, catechins – 224.9%, carotenes – 20.4%. Flavonol content in the herb exceeded

that of the root part by 12.2 times. The extracts were water-soluble components: polysaccharides, flavonols, tannins.

Conclusions. Raw root and aboveground parts of *P. rupestris* contains the same biologically active substances with the number of secondary metabolites in raw root is significantly smaller than that of the raw herb.

Keywords: *Patrinia rupestris*, herb, roots, secondary metabolites

Pacific Medical Journal, 2014, No. 2, p. 26–27.

В последние годы интерес к лекарственным растениям заметно возрастает, особенно к тем, которые потенциально обладают нейротропной активностью, что объясняется широкой распространенностью неврозоподобных расстройств с тенденцией к затяжному течению и хронизации и способностью провоцировать соматическую патологию. Растительные препараты, имеющие существенно меньше побочных эффектов, чем распространенные лекарственные средства, могут