

## ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ EXPERIMENTAL RESEARCHES

DOI: 10.12737/article\_59e85b61621441.15725580

УДК 615.322

Жалсрай А. <sup>1</sup>, Санжиева Л.Ц. <sup>2</sup>

### ИЗУЧЕНИЕ ПРОТИВОИШЕМИЧЕСКОГО И АНТИДЕПРЕССИВНОГО ДЕЙСТВИЯ ЭКСТРАКТА ИЗ СПАРЖИ КОХИНХИНСКОЙ

<sup>1</sup> Институт традиционной медицины и технологии  
(г. Улан-Батор, ул. Чингисхана, 214, Монголия)

<sup>2</sup> ФГБОУ ВО «Бурятский государственный университет»  
(670000, г. Улан-Удэ, ул. Смолина, 24а, Россия)

Экстракт из спаржи кохинхинской (*Asparagus cochinchinensis* (AC)) имеет противоопухолевое, противовоспалительное и иммуностимулирующее действие. Однако нейробиологические механизмы, лежащие в основе действия AC, изучены недостаточно. Поэтому целью настоящего исследования явилось исследование потенциальных терапевтических эффектов AC, включая противоишемическую активность при окклюзии среднетазовой артерии (ОСМА) и антидепрессивное действие при иммобилизации мышей. Кроме того, были измерены концентрации цитокинов TNF- $\alpha$  и IL-6 в плазме крови. Результаты исследования показали, что экстракт AC в дозе 200 мг/кг значительно ( $p < 0,01$ ) уменьшал размер ишемии в области гиппокампа (контроль –  $125,9 \pm 8,7 \mu\text{м}^2$ ; AC –  $55,9 \pm 22,6 \mu\text{м}^2$ ) и стриатума (контроль –  $53,8 \pm 13,7 \mu\text{м}^2$ ; AC –  $19,7 \pm 14,5 \mu\text{м}^2$ ) после индукции ОСМА. Также установлено, что в дозе 100 и 200 мг/кг экстракт AC статистически значимо уменьшал период иммобилизации, не оказывая существенного влияния на температуру тела, что указывает на наличие антидепрессивной активности. Концентрации цитокинов TNF- $\alpha$  и IL-6 значительно отличались в плазме крови контрольных и оперированных животных ( $p = 0,006$ ), тогда как между экспериментальными группами различий в концентрации цитокинов не было выявлено (операция ОСМА и лечение AC).

**Ключевые слова:** спаржа кохинхинская, ишемия, антидепрессивная активность, инсульт, цитокины, окклюзия среднетазовой артерии

### THE STUDY OF ANTI-ISCHEMIC AND ANTIDEPRESSANT EFFECTS OF ASPARAGUS COCHINCHINENSIS EXTRACT

Zhalsrai A. <sup>1</sup>, Sanzhieva L.T. <sup>2</sup>

<sup>1</sup> Institute of Traditional Medicine and Technology (ul. Genghis Khan 214, Ulaanbaatar, Mongolia)

<sup>2</sup> Buryat State University (ul. Smolina 24a, Ulan-Ude 670000, Russian Federation)

Extracts of *Asparagus cochinchinensis* (AC) have antitumor, antiinflammatory, and immunostimulatory effects. The neurobiological mechanisms underlying the effects of AC have not been sufficiently explored. Thus, we performed in vivo experiments to characterize potential therapeutic effects including anti-ischemic and antidepressant activities. In addition, the concentrations of TNF- $\alpha$  and IL-6 cytokines in blood plasma were measured.

In the tail suspension test immobility time was significantly reduced after acute and chronic administration of AC in the dose of 100 and 200 mg/kg which suggests antidepressant activity without effect on body core temperature. After subchronic treatment, the immobility time was significantly different ( $p < 0.0001$ ). Compared with saline-injected controls, immobility time was reduced in animals treated with 100 mg/kg ( $p = 0.002$ ) and 200 mg/kg ( $p < 0.001$ ) respectively. Chronic treatment with AC extract did not change body temperature ( $p = 0.06$ ).

In a pilot study, we measured the effect of subchronically-administered AC extract on infarct size after middle cerebral artery occlusion (MCAO). Infarct size in the selected slices is lower in the hippocampus (control –  $125.9 \pm 8.7 \mu\text{m}^2$ ; AC –  $55.9 \pm 22.6 \mu\text{m}^2$ ) and striatum (control –  $53.8 \pm 13.7 \mu\text{m}^2$ ; AC –  $19.7 \pm 14.5 \mu\text{m}^2$ ) in the animals pretreated with AC. Both cytokines were measured in plasma samples collected from control animals and the experimental groups significantly differed in IL-6 and TNF- $\alpha$  plasma concentrations. Statistical analysis revealed a significant effect of surgery (control and MCAO;  $p = 0.006$ ). As regards TNF- $\alpha$  and IL-6 plasma concentration, there were no differences between the groups (surgery MCAO and treatment AC).

This is the first evidence that extract from *Asparagus cochinchinensis* exerted protective effects in the in vivo MCAO model. However, extract did not effect on the increased levels of cytokine including TNF- $\alpha$  and IL-6.

**Key words:** *Asparagus cochinchinensis*, ischemia, antidepressant activity, stroke, cytokines, middle cerebral artery occlusion

Ишемический инсульт (инфаркт мозга) занимает ведущее место в смертности и инвалидизации населения разных стран. У больных, перенёвших

инсульт, помимо неврологического дефицита, развиваются депрессия и нарушение когнитивных функций [7].

На сегодняшний день активно проводится поиск новых нейротропных средств среди лекарственных растений, обладающих антиоксидантной активностью.

В народной медицине многих стран растения семейства спаржевых используются в лечебных целях с древних времён. В литературных источниках сообщается о наличии противовоспалительных, когнитивных, противораковых эффектов спаржи кохинхинской (*Asparagus cochinchinensis* (AC)) и широком использовании её при лечении воспаления лёгких и горла, раковой болезни [5], однако практически отсутствуют сведения о действии *Asparagus cochinchinensis* на центральную нервную систему.

Как известно, ограничение распространения зоны инфаркта является важнейшей целью постинсультной терапии. Для оценки влияния препарата на зоны инфаркта используется одна из наиболее адекватных экспериментальных моделей ишемического инсульта – модель локальной ишемии головного мозга у мышей путём окклюзии средней мозговой артерии (ОСМА) [3].

**Целью настоящего исследования** явилось изучение антиишемической активности экстракта спаржи на модели ишемического инсульта, вызванного окклюзией средней мозговой артерии, а также изучение антидепрессивной активности экстракта на модели иммобилизации мышей.

#### МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

В работе использовали половозрелых мышей линии Вистар весом 20–25 г из вивария Института традиционной медицины и технологии при Министерстве культуры, образования, науки и спорта Монголии. Мышей содержали по десять 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 (86/609ЕС) и одобренных Комитетом по медицинской этике, в соответствии с положением Института традиционной медицины и технологии о работе с экспериментальными животными.

#### Приготовление экстракта

Корневища и корни спаржи кохинхинской собрали в сентябре 2016 г. в окрестностях района Булган на плантации Института традиционной медицины и технологии. Экстракт из измельчённых корней *Asparagus cochinchinensis* получали путём экстракции метанолом в течение 10 дней при комнатной температуре. Соотношение сырья:экстрагент составляло 1:10. Полученные извлечения, фильтровали и выпаривали в роторном испарителе и высушивали до густого остатка при температуре не выше 30 °С и оставляли в холодильнике (–80 °С) до использования. Суммарное содержание сапонинов определялось спектрофотометрически при длине волны 590 нм методом абсолютной калибровки по реакции с нитратом натрия в присутствии серной кислоты [1]. Суммарное содержание сапонинов в пересчёте на гликозиды в густом экстракте составляло 21,65 %.

#### Подвешивание мышей за хвост

В камере (51 × 25 × 15 см), поделённой на три отсека по 16 см, мышь подвешивали за хвост на лейкопластыре на расстоянии 1,5 см от кончика так, чтобы расстояние от пола до носа составляло 10 см. В течение 6 мин наблюдали за поведением животных, регистрируя длительность иммобилизации. Животным опытной группы внутрибрюшинно вводили экстракт АС однократно за 1 час до тестирования и многократно в течение 14 дней 1 раз в сутки в дозах 100, 200 мг/кг. Животные контрольной группы получали дистиллированную воду.

#### Модель окклюзии средней мозговой артерии

Фокальную ишемию головного мозга создавали необратимой окклюзией правой ветви средней мозговой артерии с использованием нейлоновой нити диаметром 0,25 мм с силиконовым наконечником (под наркозом), длительностью 60 мин по методу, описанному А. Kolodziej [3]. Через 60 мин после индукции ОСМА животных декапитировали, извлекали головной мозг в условиях гипотермии и делали два среза шириной 3 мм, а кровь собирали. Срезы мозга окрашивали в 1%-м растворе крезила фиолетового (cresyl violet, Sigma Aldrich, USA). Затем каждый окрашенный срез фотографировали с двух сторон и определяли площадь инфаркта, измеряя белую область мозга с помощью программы Image Pro6. Экстракт АС вводили мышам внутрибрюшинно за час до тестирования в течение 14 дней в дозах 100, 200 мг/кг. В группе ложнопериоперированных животных осуществлялась операционная процедура по протоколу, за исключением того, что окклюзию артерии не производили. Контролем для животных с ишемией служили ложнопериоперированные животные. Для мышей, получавших вещества, контролем служили нелеченные животные с ишемией мозга.

Для определения уровня цитокинов экстракт АС вводили однократно внутрибрюшинно в дозе 200 мг/кг за 1 час до индукции ОСМА. Концентрацию IL-6 и TNF-α в сыворотке крови животных определяли твердофазным иммуноферментным методом с помощью коммерческих наборов соответствующих реагентов (Sigma, Platinum ELISA), согласно инструкции производителей. Исследования выполнялись на автоматическом иммуноферментном анализаторе «ELISA» (Япония).

#### РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Антидепрессивное действие экстракта АС изучали в тесте «подвешивание за хвост», регистрируя продолжительность иммобилизации мышей в течение 6 мин (рис. 1). Контрольной группе вводили внутрибрюшинно физиологический раствор, экспериментальной группе также внутрибрюшинно вводили экстракт АС в дозе 100 и 200 мг/кг и имипрамин (Imipramine-Imi) в дозе 30 мг/кг. Антидепрессант имипрамин (Imi) при однократном введении в дозе 30 мг/кг статистически значительно уменьшал время иммобилизации (на 25 %), по сравнению с показателями у контрольных животных ( $p < 0,01$ ). Как видно из рисунка 1, при однократном введении экстракт

АС в дозе 100 и 200 мг/кг статистически значимо снижал время иммобилизации (с 15 % до 20 %), по сравнению с контрольной группой, что указывает на наличие у экстракта АС антидепрессивных свойств. Экстракт АС после хронического введения (в течение 14 дней в дозе 100 и 200 мг/кг) статистически значимо ( $p < 0,05$ ) уменьшал продолжительность периода иммобилизации, по сравнению с контрольной группой (на 26–38 %), что подтверждает антидепрессивное действие экстракта АС. Статистически значимые различия наблюдались между группами животных, получивших экстракт АС и имипрамин (Imi), при этом экстракт АС проявлял сопоставимый антидепрессивный эффект, по сравнению с имипрамином (рис. 1а, б).

Помимо антидепрессивного действия было оценено влияние экстракта АС на температуру тела, в сравнении с имипрамином (рис. 1в, г).

Экстракт АС при остром и хроническом введении существенно не влиял на температуру тела животных, по сравнению с аналогичным показателем у контрольной группы, тогда как введение имипрамина в дозе 30 мг/кг приводило к снижению температуры тела, по сравнению с контрольной группой, на 4 % (рис. 1в). Как известно, ишемия

мозга наиболее часто сопровождается депрессией [7]. Необходимо отметить также, что классические антидепрессанты существенно снижают температуру тела [9].

Следующим этапом данной работы явилось изучение нейропротекторной активности экстракта АС, который вводили внутривентриально в дозе 200 мг/кг в течение 14 дней до индукции ишемии, вызванной ОСМА. Утверждается, что среди структур головного мозга именно кортекс, гиппокамп и стриатум являются более уязвимыми к ишемическому повреждению головного мозга. Гистологический анализ срезов головного мозга мышей с ОСМА, проведённый через 60 мин после индукции ОСМА, показал формирование зоны инфаркта в слоях гиппокампуса и стриатума, что соответствует данным, полученным другими авторами на модели ОСМА мышей [3].

Морфометрический анализ ишемической области в гиппокампсе выявил, что после ОСМА у животных, получавших физиологический раствор, объём инфаркта составлял  $125,9 \pm 8,7 \mu\text{m}^3$ . При этом экстракт АС в дозе 200 мг/кг после хронического введения значительно уменьшал объём очага ишемического поражения (в среднем на 45 % ( $p < 0,01$ ),  $55,9 \pm 2,9 \mu\text{m}^3$ ), по сравнению с группой с ОСМА (рис. 2).

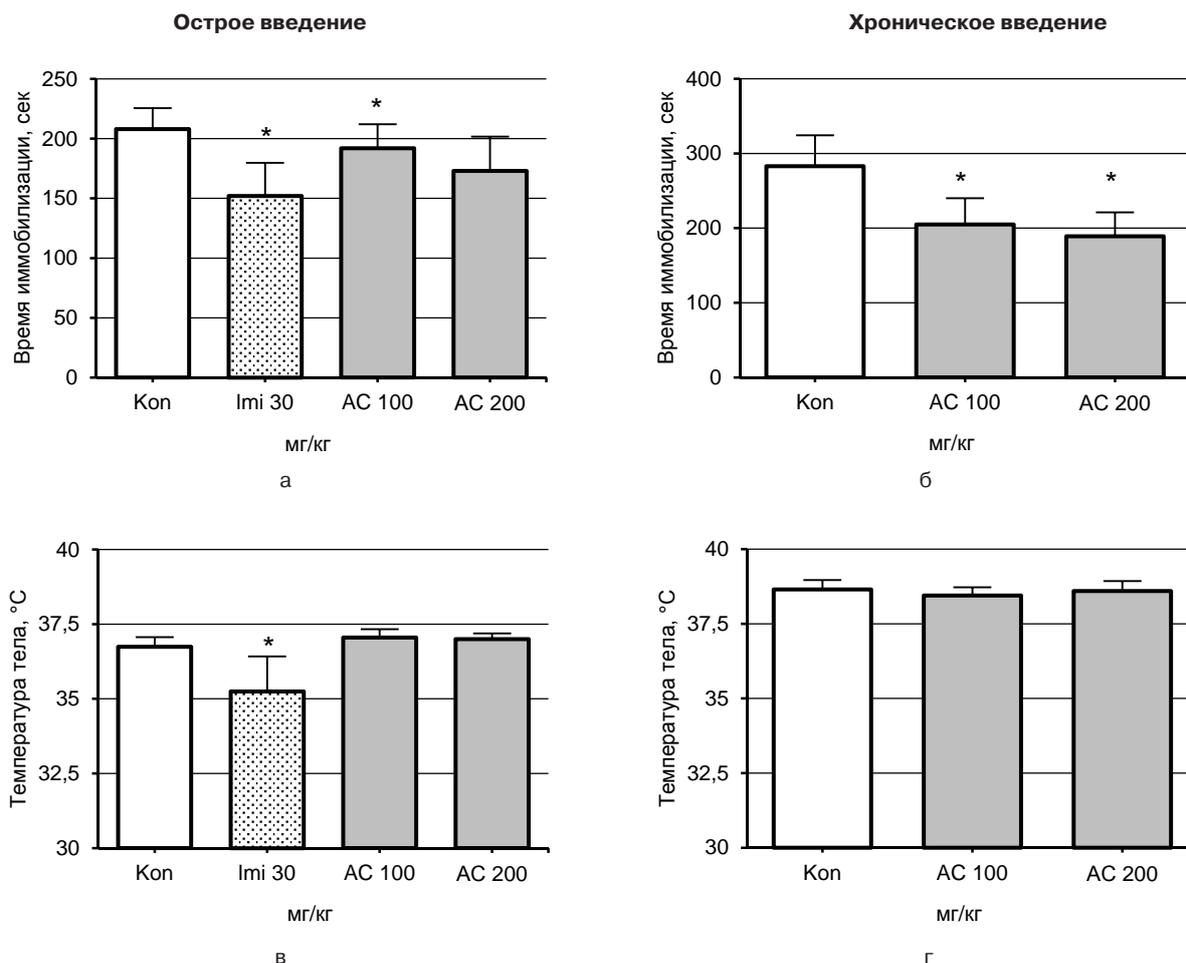
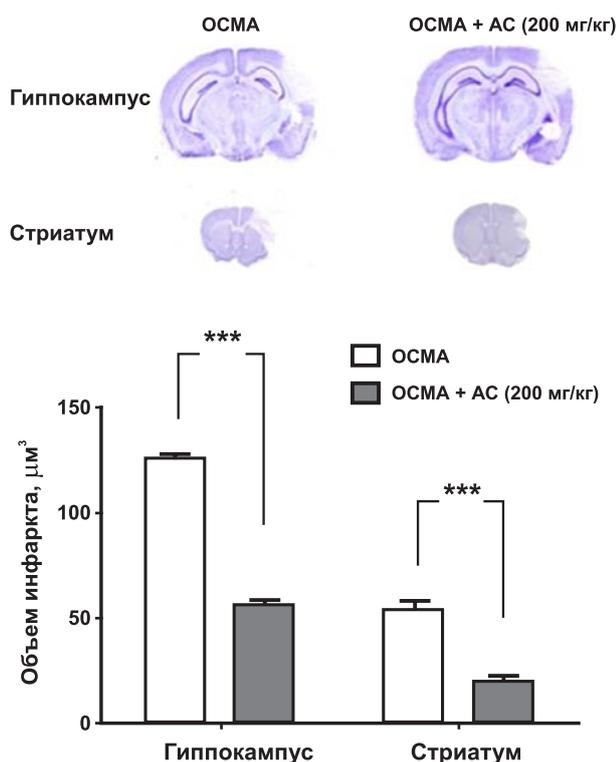


Рис. 1. Влияние экстракта спаржи кохинхинской (АС) и имипрамина (Imi) на время иммобилизации мышей (а, б) и температуру их тела (в, г).

Fig. 1. *Asparagus cochinchinensis* extract (AC) and Imipramin (Imi) effects on immobility (а, б) and mice's body temperature (в, г) in the tail suspension test.



**Рис. 2.** Влияние экстракта спаржи кохинхинской (АС) на фокальную ишемию, вызванную ОСМА у мышей с леволатеральным профилем моторной асимметрии. Срезы мозга (2 мм) окрашены крезилем фиолетовым (cresyl violet). Неокрашенные участки мозга соответствуют зоне инфаркта.

**Fig. 2.** Infarct size in mice 1 h after permanent occlusion of the right middle cerebral artery (MCAO).

В области стриатума объём очага ишемического поражения в группе с ОСМА составлял  $53,8 \pm 13,7 \mu\text{m}^3$ , и введение экстракта АС в дозе 200 мг/кг до индукции ОСМА существенно снизило объём инфаркта на 37 % ( $p < 0,01$ ), по сравнению с группой ОСМА, – до  $19,7 \pm 14,6 \mu\text{m}^3$ .

Таким образом, хроническое введение сапонина АС до индукции фокальной ишемии головного мозга мышей существенно снижает объём ишемического повреждения в области гиппокампуса и стриатума и оказывает защитное действие, вызывая восстановление после неврологического дефицита.

При изучении содержания цитокинов в сыворотке крови было показано, что уровень  $\text{TNF}\alpha$  резко повышается после индукции ОСМА, по сравнению с контролем (мыши ложнопериорированных групп). При однократном введении экстракта АС в дозе 200 мг/кг повышенное содержание  $\text{TNF}\alpha$ , индуцируемое ОСМА, снижается, не проявляя статической значимости, по сравнению с группой ОСМА (табл. 1). Из таблицы видно, что при введении экстракта АС до индукции ОСМА повышенный уровень цитокина IL-6 почти не изменился, по сравнению с показателем группы ОСМА, причём уровень цитокина IL-6 резко повышается после операционной процедуры, по сравнению с контрольной группой.

**Таблица 1**  
Влияние экстракта *Asparagus cochinchinensis* на уровень цитокинов IL-6,  $\text{TNF}\alpha$ , после окклюзии среднелобковой артерии

**Table 1**  
Plasma concentrations of  $\text{TNF}\alpha$  and IL-6 (pg/ml) in mice 1 h after sham-surgery or permanent middle cerebral artery occlusion (MCAO)

Группа	$\text{TNF}\alpha$ , пк/мл	IL-6, пк/мл
1-я (контрольная)	$6,9 \pm 0,85$	$0,861 \pm 0,09$
2-я (ложнопериорированная)	$16,26 \pm 1,7$	$1,385 \pm 0,68^\#$
3-я (ОСМА)	$34,38 \pm 5,8^*$	$1,24 \pm 0,56$
4-я (ОСМА + Экстракт АС)	$26,11 \pm 5,5$	$1,1 \pm 0,71$

**Примечание.** # – различия между ложнопериорированной и контрольной группами статистически значимы при  $p < 0,05$ ; \* – различия между ложнопериорированной и ОСМА группами статистически значимы  $p < 0,05$ .

Существует утверждение, что при ишемическом повреждении в течение 6 часов повышается уровень  $\text{TNF}\alpha$ , IL-1, IL-6 цитокинов, и считается, что содержание цитокинов моделирует размер зоны инфаркта [8]. Однако многочисленные исследования демонстрируют нейропротекторное действие цитокинов  $\text{TNF}\alpha$ , IL-6 при ишемии мозга у экспериментальных животных [2]. Другими авторами было отмечено, что цитокины  $\text{TNF}\alpha$ , IL-6 значительно уменьшают размер инфаркта после индукции ОСМА у мышей [4]. Утверждается, что в ранний период ишемического повреждения воспалительный процесс необходим для последующего восстановления ткани [6], следовательно, подавление выделения цитокинов препятствует восстановлению ткани.

Опираясь на эти данные, нельзя чётко утверждать, что экстракт АС не проявляет противовоспалительное действие при ишемическом повреждении. Скорее всего, нейропротективное действие экстракта АС играет моделирующую роль в изменении уровня цитокинов при ишемии мозга.

### ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Данное исследование демонстрирует антиишемическую и антидепрессантную активность экстракта спаржи кохинхинской (АС).

Работа выполнена при поддержке гранта 15AT05CC336 Министерства образования, культуры, науки и спорта Монголии.

### Благодарности

Мы благодарны за неоценимую помощь и поддержку профессорам А. Беккер (Институт фармакологии и токсикологии, Магдебург, Германия) и М. Амбага (Медицинский институт, Монголия) в исследовании действия экстракта АС. Выражаем также благодарность профессору Е.Н. Асомовой (НИИ фармакологии и регенеративной медицины, Россия) за полезные консультации.

### ЛИТЕРАТУРА REFERENCES

1. Ладыгина Е.Я., Сафронич Л.Н., Отрященко-ва В.Э., Баландин И.А., Гринкевич Н.И., Сорокина А.А.,

Сокольский И.Н., Глызин В.И., Молодожникова Л.М., Митин Ю.С., Самылина И.А., Ермакова В.А. Химический анализ лекарственных растений: уч. пособие для фармацевтических вузов. – 1983. – С. 52–53.

Ladygina EYa, Safronich LN, Otryashenkova VE, Balandin IA, Grinkevich NI, Sorokina AA, Sokolskiy IN, Glyzin VI, Molodozhnikova LM, Mitin YuS, Samylina IA, Ermakova VA. (1983). Chemical analysis of medicinal plants [*Khimicheskiy analiz lekarstvennykh rasteniy*], 52-53.

2. Clausen BH, Lambertsen KL, Babcock AA, Holm TH, Dagnaes-Hansen F, Finsen B. (2008). Interleukin-1beta and tumor necrosis factor-alpha are expressed by different subsets of microglia and macrophages after ischemic stroke in mice. *J Neuroinflammation*, 5, 46. doi: 10.1186/1742-2094-5-46.

3. Kolodziej A, Stumm R, Becker A, Holtt V. (2008). Endogenous opioids inhibit ischemia-induced generation of immature hippocampal neurons via the  $\mu$ -opioid receptor. *Eur J Neuroscience*, 27, 1311-1319, doi:10.1111/j.1460-9568.2008.06111.x.

4. Lambertsen KL, Clausen BH, Babcock AA, Gregeresen R, Fenger C. (2009). Microglia protect neurons against

ischemia by synthesis of tumor necrosis factor. *J Neurosci*, 29, 1319-1330,

5. Lee JH, Lim HJ, Lee CW, Kim HP. (2015). Methyl Protodioscin from the roots of asparagus chochinensis attenuates airway inflammation by inhibiting cytokine production. *Evid Based Complement Alternat Med*, 12, doi:10.1155/2015/640846.

6. Lo EH. (2008). A new penumbra: transitioning from injury into repair after stroke. *Nat Med*, 14, 497-500. doi:10.1038/nm1735.

7. Robinson RG. (1998). The clinical neuropsychiatry of stroke: cognitive, behavioral and emotional disorders following vascular brain injury. Cambridge, 481 p.

8. Whiteley W, Jackson C, Lewis S, Lowe G, Rumley A, Sandercock P, Wardlaw J, Dennis M, Sudlow C. (2009). Inflammatory markers and poor outcome after stroke: a prospective cohort study and systematic review of interleukin-6. *PLoS Med*, 6 (9), e1000145. doi.org/10.1371.

9. Zarrindast MR, Sadeghi S, Sahebgharani M. (2003). Influence of  $\alpha$ -adrenoceptor agonists and antagonists on imipramine-induced hypothermia in mice. *Pharmacol Toxicol*, 93, 8-53. doi: 10.1034/j.1600-0773.2003.930107.x.

**Сведения об авторах**  
**Information about the authors**

**Жалсрай Алдармаа** – кандидат биологических наук, старший научный сотрудник, Институт традиционной медицины и технологии (210646, Монголия, г. Улан-Батор, ул. Чингисхана, 214; e-mail: jaldarmaa@gmail.com)

**Zhalsrai Aldarmaa** – Candidate of Biological Sciences, Senior Research Officer, Institute of Traditional Medicine and Technology (210646, Mongolia, Ulaanbaatar, ul. Genghis Khan, 214; e-mail: jaldarmaa@gmail.com)

**Санжиева Людмила Цымпиловна** – кандидат биологических наук, доцент кафедры зоологии и экологии, ФГБОУ ВО «Бурятский государственный университет» (670000, г. Улан-Удэ, ул. Смолина, 24а; e-mail: ltssanzh@gmail.com)

**Sanzhieva Lyudmila Tsympilovna** – Candidate of Biological Sciences, Associate Professor at the Department of Zoology and Ecology, Buryat State University (670000, Ulan-Ude, ul. Smolina, 24a; e-mail: ltssanzh@gmail.com)