

В. В. Цивунін<sup>1</sup>, С. Ю. Штриголь<sup>1</sup>, Т. В. Горбач<sup>2</sup>

## Вплив потенційного антиконвульсанта – сухого екстракту рутки Шлейхера – на вміст нейротрансмітерних амінокислот у головному мозку мишей

<sup>1</sup>Національний фармацевтичний університет, м. Харків

<sup>2</sup>Харківській національний медичний університет

**Ключові слова:** лікарські рослини, екстракт, миші, головний мозок, амінокислоти

За даними ВООЗ, епілепсія та інші судомні розлади відносяться до числа найрозповсюдженіших патологічних станів центральної нервової системи. Захворюваність варіює в широких межах та складає в середньому від 10 до 220 осіб на 100 000 населення [1, 2].

Сучасні можливості фармакотерапії епілепсії з застосуванням відомих лікарських препаратів не зменшують актуальність проблеми. Існуючі методи лікування недостатньо ефективні та дозволяють досягти значного покращання, рідше – регресу клінічних проявів хвороби не більше ніж у 50–70 % пацієнтів [1, 3]. Незважаючи на широкий асортимент сучасних протисудомних препаратів, дотепер залишається високим відсоток хворих, у яких не вдається досягти ремісії. Неefективність терапії при застосуванні більш ніж двох схем різних комбінацій протіепілептичних засобів у граничних добових дозах, розвиток побічних ефектів (частіше за все з боку ЦНС), що суттєво знижують якість життя пацієнта, – усе це зумовлює актуальність розробки нових препаратів із протисудомною дією [1, 3, 4].

Передумовою для розробки ефективних лікарських засобів є вивчення механізмів розвитку судом [5]. Доведено, що розвиток пароксизмів можуть спричиняти пригнічення ГАМК-ергічного гальмування та (або) посилення глутамат/аспартат (Glu/Asp)-обумовленої трансмісії. Лікарські засо-

би, які здатні до потенціювання ГАМК-опосередкованої трансмісії чи інгібування Glu/Asp-зумовленої передачі, пригнічують фокальний міжнападний епілептогенез та перехід до фокальної судомної активності, а препарати, що вибірково пригнічують Glu/Asp-обумовлене збудження, є ефективними інгібіторами розвитку судомних генералізованих нападів [5, 6].

Отже, важливо, аби перспективний протисудомний засіб чинив комплексний вплив на церебральний уміст як збуджувальних (глутамат, аспартат), так і гальмівних (ГАМК) амінокислот [5].

Зібрано значну доказову базу щодо наявності протисудомної активності в низки рослин та препаратів на їхній основі [7]. Зокрема, за результатами скринінгу антиконвульсивних властивостей окремих представників вітчизняної флори, встановлено виразний протисудомний ефект сухого екстракту рутки Шлейхера (*Fumaria schleicheri* Soy.-Willem., *Fumariaceae*) (СЕРШ) [8], отриманого шляхом екстракції водою згідно з вимогами ДФУ. У подальших поглиблених дослідженнях на експериментальних моделях пароксизмів із різним патогенезом досліджено профіль антиконвульсивної активності СЕРШ [9], однак нейрохімічні механізми протисудомної дії фітопрепарату залишаються нез'ясованими.

**Мета дослідження** – встановити вплив СЕРШ на вміст нейротрансмітерних амінокислот, зокрема ГАМК, глутамату та аспартату, у головному мозку мишей.

**Матеріали та методи.** Дослідження проводили на 29 білих мишах-самцях

масою 22–28 г. Тварин утримували в стандартних умовах віварію ЦНДЛ НФаУ відповідно до санітарно-гігієнічних норм та принципів Європейської конвенції з захисту лабораторних тварин (Страсбург, 1986 р.) [10, 11]. Миші перебували у віварії за температури 19–24 °С, вологості не більше 50 %, природного світлового режиму «день-ніч» у пластикових клітках на стандартному харчовому раціоні з вільним доступом до води та їжі [12]. Перед експериментом їх випадковим чином розподілили на 3 групи: 1 – контроль (n = 11); 2 – група тварин, що отримували водний розчин СЕРШ (n = 8); 3 – група тварин, що отримували препарат порівняння натрію вальпроат (n = 10). Тварини експериментальних груп отримували внутрішньошлунково водний розчин СЕРШ в умовно ефективній антиконвульсивній дозі 100 мг/кг [8] та референс-препарат (сироп «Депакін», Санофі-Авентіс, Франція) у дозі 300 мг/кг [9] протягом 3 діб, востаннє за 30 хв до декапітації. Мишам контрольної групи вводили внутрішньошлунково воду очищену в аналогічному об'ємі (0,1 мл на 10 г маси тіла).

Евтаназію тварин виконували шляхом дислокації шийних хребців [11]. Тварин декапітували, негайно вилучали головний мозок та зважували його на торсійних вагах, заморожували рідким азотом і подрібнювали до порошокподібного стану. Далі здійснювали екстрагування 96 % етанолом при нагріванні на водяній бані та центрифугування з наступним випаровуванням досуха. Водні розчини сухого

залишку піддавали хроматографічному розділенню за допомогою високовольтного електрофорезу [13]. Кількісне визначення нейротрансмітерних амінокислот проводили за допомогою аналізатора біохімічного напівавтоматичного Stat Fax (USA).

Статистичну обробку отриманих результатів проводили методами варіаційної статистики з використанням програми STATISTICA 8.0 та розрахунком таких показників: середнього значення, стандартної похибки середнього; достовірності відмінностей між групами порівняння за параметричним критерієм Стьюдента (t) у випадках нормального розподілу, непараметричним критерієм Манна-Уїтні (U) за його відсутності; довірчого інтервалу (p); відмінності вважали достовірними при  $p < 0,05$ . Закономірності зв'язку між окремими показниками аналізували за коефіцієнтом кореляції Спірмена.

**Результати та їх обговорення.** Профілактичне введення СЕРШ спричиняло достовірні зміни кількісного вмісту всіх досліджуваних амінокислот у головному мозку тварин (таблиця). Так, під впливом фітопрепарату рівень гальмівного медіатора ЦНС – ГАМК – зростав у 2,3 рази ( $p < 0,001$ ), тим часом як вміст збуджувальних амінокислот глутамату та аспартату зменшувався на 8,3 % ( $p < 0,01$ ) та 30,8 % ( $p < 0,001$ ) відповідно.

На тлі натрію вальпроату спостерігали статистично значуще не лише відносно контролю, а й відносно групи тварин, що отримували СЕРШ, збільшення рівня ГАМК у головному мозку

Таблиця

*Уміст нейротрансмітерних амінокислот за впливу сухого екстракту рутки Шлейхера та натрію вальпроату в головному мозку мишей ( $M \pm m$ )*

Група тварин, умови досліджу	n	Уміст амінокислот, мкмоль/г тканини		
		ГАМК	глутамат	аспартат
Контроль	11	2,08 ± 0,06	9,62 ± 0,20	5,30 ± 0,12
СЕРШ, 100 мг/кг	8	4,84 ± 0,20***/###	8,82 ± 0,15**/###	3,67 ± 0,19***/###
Натрію вальпроат, 300 мг/кг	10	7,13 ± 0,21***	6,29 ± 0,40***	5,82 ± 0,17*

*Примітка.* СЕРШ – сухий екстракт рутки Шлейхера, ГАМК – γ-аміномасляна кислота, \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$ , \*\*\* $p < 0,001$  – статистично значущі відмінності з контролем, \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$ , \*\*\* $p < 0,001$  – статистично значущі відмінності з показником на тлі натрію вальпроату.

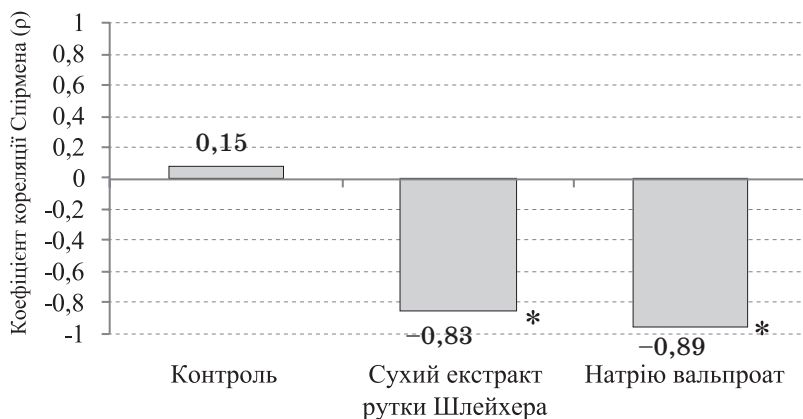


Рис. 1. Кореляційний зв'язок між вмістом ГАМК та глутамату в головному мозку мишей у нормі та під впливом сухого екстракту рутки Шлейхера та натрію вальпроату

Примітка. Тут і на рис. 3: \*статистично значущий зв'язок ( $p < 0,05$ ).

мишей у 3,4 та 1,5 разу відповідно. Отримані результати підтверджуються даними про переважно ГАМК-ергічні механізми протисудомної дії препаратів вальпроєвої кислоти [5]. Також натрію вальпроат спричиняв достовірне зменшення вмісту глутамату на 34,6 % ( $p < 0,001$ ), більше того, на тлі його прийому спостерігали невелике (8,9 %), однак через низьку дисперсію показника статистично значуще відносно контролю ( $p < 0,05$ ) зростання рівня аспартату.

Кореляційний аналіз показав, що між вмістом провідного гальмівного медіатора ГАМК та основного збуджувального трансмітера ЦНС глутамату в

головному мозку мишей, що отримували СЕРШ та натрію вальпроат, існує сильний від'ємний зв'язок ( $\rho = -0,83$ ,  $p < 0,05$  та  $\rho = -0,89$ ,  $p < 0,05$  відповідно) (рис. 1). У мишей групи контролю між рівнем ГАМК та глутамату спостерігали слабкий позитивний зв'язок ( $\rho = 0,15$ ).

Дані рисунка 2 свідчать про слабкий кореляційний зв'язок між вмістом ГАМК та аспартату в групі контролю ( $\rho = 0,07$ ) та на тлі натрію вальпроату ( $\rho = -0,24$ ), а також від'ємний зв'язок середньої сили ( $\rho = -0,50$ ) у групі тварин, що отримували СЕРШ.

У мишей групи контролю між вмістом збуджувальних амінокислот глута-

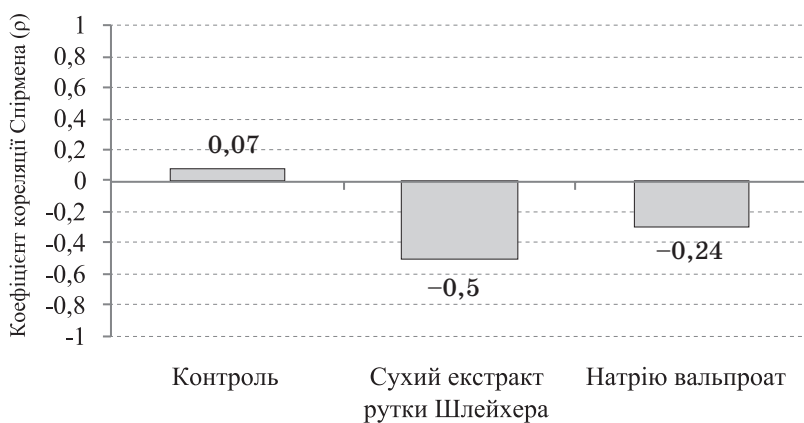
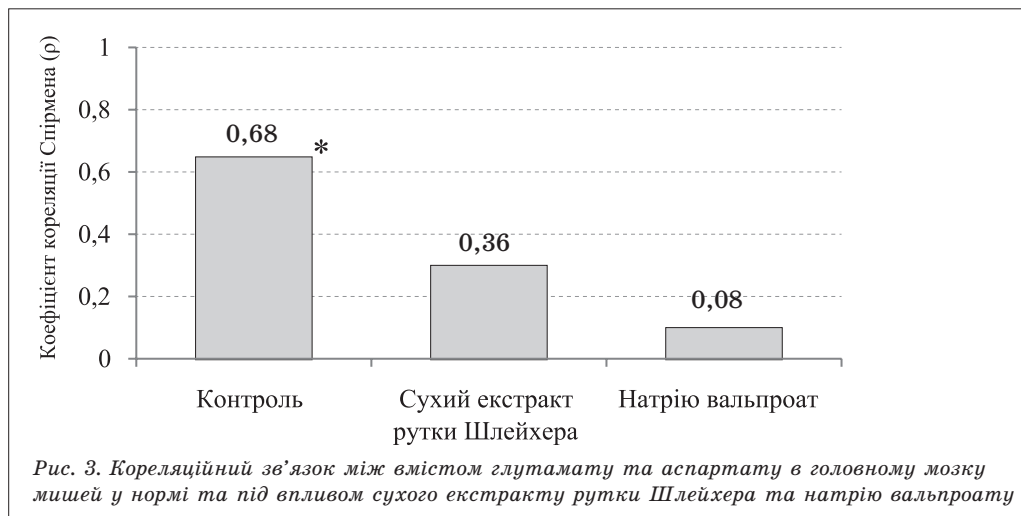


Рис. 2. Кореляційний зв'язок між вмістом ГАМК та аспартату в головному мозку мишей у нормі та під впливом сухого екстракту рутки Шлейхера та натрію вальпроату



мату та аспартату існує достовірний позитивний зв'язок середньої сили ( $\rho = 0,68$ ,  $p < 0,05$ ) (рис. 3). У тварин, які отримували СЕРШ, сила зв'язку була дещо меншою ( $\rho = 0,36$ ), а під впливом натрію вальпроату досягала мінімуму ( $\rho = 0,08$ ).

Нейрохімічний профіль дії СЕРШ може бути пов'язаний із впливом як окремих біологічно активних компонентів екстракту, так і з синергізмом їх ефектів. Зокрема, флавоноїдна фракція, що представлена здебільшого флавонолами та флавонами, здатна чинити модулюючий вплив не лише на ГАМК-барбітурат-бензодіазепіновий рецептор, але й разом із алкалоїдами (зокрема, протопіном) може впливати на активність ферментів глутаматдекарбоксилази та ГАМК-дезамінази. Не виключено, що білково-полісахаридний комплекс та окремі амінокислоти СЕРШ можуть бути субстратом для синтезу нейроактивних амінокислот *de novo* [7, 8].

Таким чином, отримані результати свідчать про виразний вплив як СЕРШ, так і натрію вальпроату на баланс церебральних трансмітерних амінокислот у бік підвищення вмісту гальмівних та зменшення рівня збуджувальних. Цей

вплив може, з одного боку, сприяти протисудомній активності, а з іншого – протидіяти механізмам ексайтотоксичності. Кореляційний аналіз показав залучення СЕРШ до нейрохімічних процесів обміну медіаторних амінокислот у ЦНС. Найзначущий вплив СЕРШ та натрію вальпроату виявляють на ланку ГАМК-глутамат, що спричиняє зсув рівноваги «збудження-гальмування» у ЦНС у бік останнього.

## Висновки

1. Уперше досліджено вплив сухого екстракту рутки Шлейхера (СЕРШ) на вміст нейротрансмітерних амінокислот у головному мозку мишей.

2. Встановлено, що СЕРШ виявляє значний вплив на обмін гальмівних та збуджувальних амінокислот у ЦНС, а саме значно збільшує рівень ГАМК і зменшує вміст глутамату та аспартату, а також створює сильний від'ємний зв'язок у парі ГАМК-глутамат і середньої сили – у парі ГАМК-аспартат, зменшує позитивний зв'язок у парі глутамат-аспартат.

3. Визначено подібність медіаторних механізмів дії СЕРШ та відомого антиконвульсанта натрію вальпроату.

1. Марценковский И. А. Некоторые современные аспекты лечения эпилепсий / И. А. Марценковский // Здоров'я України. – 2006. – № 23. – С. 43–45.
2. Эпилепсия. Информационный бюллетень № 999 [Электронный ресурс] / Всемирная организация здравоохранения [сайт]. – Режим доступа: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs999/ru/> (18.01.2015). – Загол. з екрана.
3. Броди М. Течение и рациональная терапия эпилепсии / М. Броди // Международный неврологический журнал. – 2005. – № 4. – С. 72–83.
4. Харчук С. М. Рациональная фармакотерапия эпилепсии: традиционные и новые подходы к преодолению старых проблем / С. М. Харчук // Здоров'я України. – 2007. – № 11/1. – С. 16–17.

5. Antiepileptic drugs and mechanisms of epileptogenesis. A review / R. Mutani [et al.] // The Italian Journal of Neurological Sciences. – 1995. – V. 16. – № 3. – P. 217–222.
6. Pitkänen A. Mechanisms of epileptogenesis and potential treatment targets / A. Pitkänen, K. Luksa // The Lancet Neurology. – 2011. – V. 10. – № 2. – P. 173–186.
7. Plants and Plant Products with Potential Anticonvulsant Activity – A Review / Suresh Kumar [et al.] // Pharmacognosy Communications. – 2012. – V. 2. – № 1. – P. 3–99.
8. Скринінгове дослідження протисудомної активності сухих екстрактів із 8 видів рослин родин Solanaceae, Papaveraceae, Lamiaceae та Polemoniaceae / В. В. Цивунін, С. Ю. Штриголь, Ю. С. Прокопенко, В. А. Георгіянець // Клінічна фармація. – 2012. – Т. 16, № 4. – С. 47–50.
9. Експериментальне визначення спектра протисудомної дії перспективних антиконвульсантів рослинного походження / В. В. Цивунін, С. Ю. Штриголь, Ю. С. Прокопенко, Е. Л. Торянік // Український біофармацевтичний журнал. – 2014. – № 3 (32). – С. 45–49.
10. Доклінічні дослідження лікарських засобів: метод. рекомендації / під ред. О. В. Стефанова. – К., 2001 – 527 с.
11. Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств / Под ред. докт. мед. наук А. Н. Миронова. – Часть первая. – М. : Гриф и К, 2012. – 944 с.
12. Deacon R. M. Housing, husbandry and handling of rodents for behavioral experiments / R. M. Deacon // Nature Protocols. – 2006. – V. 1. – № 2. – P. 936–946.
13. Зайцева Г. Н. Метод хроматографического разделения аминокислот (определение ГАМК и глутаминовой кислоты) / Г. Н. Зайцева, Н. Н. Тюленева // Лабораторное дело. – 1958. – № 3. – С. 24–30.

**В. В. Цивунін, С. Ю. Штриголь, Т. В. Горбач**

### **Вплив потенційного антиконвульсанта – сухого екстракту рутки Шлейхера – на вміст нейротрансмітерних амінокислот у головному мозку мишей**

Досліджено вплив потенційного антиконвульсанта – сухого екстракту рутки Шлейхера (СЕРШ) – на вміст гальмінічних та збуджувальних амінокислот у головному мозку мишей. Тваринам у профілактичному режимі протягом 3 діб внутрішньошлунково вводили водний розчин СЕРШ у умовно ефективній антиконвульсивній дозі 100 мг/кг та препарат порівняння – натрію вальпроат (сироп «Депакін») у дозі 300 мг/кг. Через 30 хв після останнього введення препаратів мишей піддавали евтаназії, негайно заморожували головний мозок рідким азотом, подрібнювали та екстрагували. У витягах визначали вміст ГАМК, глутамату та аспартату.

Встановлено, що за профілактичного введення СЕРШ спричинив достовірні зміни кількісного вмісту всіх досліджуваних амінокислот у головному мозку тварин. Уміст ГАМК зростає у 2,3 рази, а глутамату та аспартату зменшувався на 8,3 % та 30,8 % відповідно. Натрію вальпроат спричиняв значне збільшення рівня ГАМК у головному мозку мишей у 3,4 рази, а також достовірне зменшення вмісту глутамату на 34,6 % та зростання рівня аспартату на 8,9 %.

Кореляційний аналіз показав, що між вмістом ГАМК та глутамату в головному мозку мишей, що отримували СЕРШ та натрію вальпроат, існує сильний від'ємний зв'язок. Між вмістом ГАМК та аспартату в групі контролю та на тлі натрію вальпроату існує слабкий кореляційний зв'язок, а також від'ємний зв'язок середньої сили у групі тварин, що отримували СЕРШ.

Результати свідчать про виразний вплив як СЕРШ, так і натрію вальпроату на баланс нейротрансмітерних амінокислот у головному мозку мишей у бік підвищення вмісту гальмінічних та зменшення рівня збуджувальних. Кореляційний аналіз свідчить про значний вплив СЕРШ на процеси обміну медіаторних амінокислот у ЦНС.

Отже, СЕРШ, подібно до класичного антиконвульсанта натрію вальпроату, виявляє значний вплив на обмін гальмінічних та збуджувальних амінокислот у ЦНС, а саме значно збільшує рівень ГАМК і зменшує вміст глутамату та аспартату, а також його дія характеризується сильним від'ємним кореляційним зв'язком у парі ГАМК-глутамат і середньої сили – у парі ГАМК-аспартат, ослаблюється позитивний зв'язок у парі глутамат-аспартат.

*Ключові слова: лікарські рослини, екстракт, миші, головний мозок, амінокислоти*

**В. В. Цивунін, С. Ю. Штриголь, Т. В. Горбач**

### **Влияние потенциального антиконвульсанта – сухого экстракта дымьанки Шлейхера – на содержание нейротрансмиттерных аминокислот в головном мозге мышей**

Исследовано влияние потенциального антиконвульсанта – сухого экстракта дымьанки Шлейхера (СЭДШ) – на содержание тормозных и возбуждающих аминокислот в головном мозге мышей. Животным в профилактическом режиме в течение 3 суток внутривентрикулярно вводили водный раствор СЭДШ в условно эффективной антиконвульсивной дозе 100 мг/кг и препарат сравнения – натрия вальпроат (сироп «Депакин») в дозе 300 мг/кг. Через 30 мин после последнего введения препаратов мышей подвергали евтаназии, немедленно замораживали головной мозг жидким азотом, измельчали и экстрагировали. В извлечениях определяли содержание ГАМК, глутамата и аспартата.

---

Установлено, что при профилактическом введении СЭДШ приводил к достоверным изменениям количественного содержания всех исследуемых аминокислот в головном мозге животных. Содержание ГАМК возрастало в 2,3 раза, а глутамата и аспартата уменьшалось на 8,3 и 30,8 % соответственно. Натрия вальпроат приводил к значительному увеличению уровня ГАМК в головном мозге мышей в 3,4 раза, а также достоверному уменьшению содержания глутамата на 34,6 % и росту уровня аспартата на 8,9 %.

Корреляционный анализ показал, что между содержанием ГАМК и глутамата в головном мозге мышей, получавших СЭДШ и натрия вальпроат, существует сильная отрицательная связь. Между содержанием ГАМК и аспартата в группе контроля и на фоне натрия вальпроата существует слабая корреляционная связь, а также отрицательная связь средней силы в группе животных, получавших СЭДШ.

Результаты свидетельствуют о выраженном влиянии как СЭДШ, так и натрия вальпроата на баланс нейротрансмиттерных аминокислот в головном мозге интактных мышей в сторону увеличения содержания тормозных и уменьшения уровня возбуждающих. Корреляционный анализ свидетельствует о значительном влиянии СЭДШ на процессы обмена медиаторных аминокислот в ЦНС.

Таким образом, СЭДШ, подобно классическому антиконвульсанту натрия вальпроату, оказывает значительное влияние на обмен тормозных и возбуждающих аминокислот в ЦНС, а именно значительно увеличивает уровень ГАМК и уменьшает содержание глутамата и аспартата, а также его действие характеризуется сильной отрицательной корреляционной связью в паре ГАМК-глутамат и средней силы – в паре ГАМК-аспартат, ослабляется положительная связь в паре глутамат-аспартат.

*Ключевые слова:* лекарственные растения, экстракт, мыши, головной мозг, аминокислоты

**V. V. Tsyvunin, S. Yu. Shtrygol', T. V. Gorbach**

### **The influence of the potential anticonvulsant – dry extract of *Fumaria Schleicheri* – on the content of neurotransmitter amino acids in mice brain**

The influence of the potential anticonvulsant – dry extract of *Fumaria Schleicheri* (FSDE) – on the content of inhibitory and excitatory amino acids in the brain of mice has been studied. Water solution of FSDE at the conditionally effective anticonvulsive dose of 100 mg/kg and the reference drug of sodium valproate (syrup «Depakine», Sanofi Aventis) at the dose of 300 mg/kg were administered intragastrically in the preventive regimen for 3 days. Mice were sacrificed, thirty min after the last administration, the brain was immediately removed and frozen with liquid nitrogen, powdered and extracted. The content of GABA, glutamate and aspartate was determined in the obtained extracts.

It was found that under administration of FSDE there were significant changes in the quantitative content of all studied amino acids in the mice brain. The GABA level was increased by 2,3 times, and the glutamate and aspartate levels were decreased by 8,3 and 30,8 %, respectively. Sodium valproate significantly increased the level of GABA in the brain of mice by 3,4 times, as well as a significantly decreased the content of glutamate by 34,6 % and increased the level of aspartate by 8,9 % compared to control group.

Correlation analysis showed that there is a strong negative relationship between GABA and glutamate levels in the brain of mice treated with FSDE and sodium valproate. Between GABA and aspartate levels in the control group and in the background of sodium valproate there were a weak correlations and negative correlation of medium strength in the group of animals treated FSDE.

The results indicated a pronounced influence both FSDE and sodium valproate on the balance of neurotransmitter amino acids in the intact mice brain. Correlation analysis proved a significant influence of FSDE on processes of the exchange of neurotransmitter amino acids in the CNS.

It was found that FSDE, as the classic anticonvulsant sodium valproate, has a significant impact on the exchange of inhibitory and excitatory amino acids in the central nervous system. It greatly increased the level of GABA and decreased the content of glutamate and aspartate, as well as formed a strong negative correlation in a pair of GABA-glutamate and medium – in a pair of GABA-aspartate, while weakened the positive relationship in a pair of glutamate-aspartate.

*Key words:* medicinal plants, extract, mice, brain, amino acids

Надійшла: 27.01.2015 р.

---

**Контактна особа:** Цивунін Вадим Володимирович, аспірант, кафедра фармакології, Національний фармацевтичний університет МОЗ України, буд. 53, вул. Пушкінська, м. Харків, 61002. Тел. : + 38 0 57 706 30 69. Електронна пошта: tsyvunin-vad@ukr.net