

СРАВНИТЕЛЬНАЯ ОЦЕНКА АНТИКОНВУЛЬСАНТНОЙ АКТИВНОСТИ КУМАРИНОВ УМБЕЛЛИФЕРОНА, ОБТУСИФОЛА И ОТВАРА ИЗ НАДЗЕМНОЙ ЧАСТИ *HAPLOPHYLLUM OBTUSIFOLIUM*

УДК 615.322

© **О. Д. Барнаулов**

Институт мозга человека им. Н. П. Бехтерева РАН, Санкт-Петербург

Ключевые слова:

обтусифол; умбеллиферон; кумарины; максимальный электрошок.

Резюме

Кумарины обтусифол и умбеллиферон при энтеральном введении мало токсичны. Обтусифол даже в высоких дозах оказывает слабое противосудорожное действие в моделях максимального электрошока (МЭШ), титрования LD_{100} коразола. Кумарины не эффективны при инъекциях стрихнина и тиосемикарбазида. Они проявляют нейротоксическое действие, снижая адаптивное, безусловнорефлекторное поведение мышей, не препятствуя утрате условного рефлекса пассивного избегания (УРПИ) после МЭШ. Кумарины не конкурируют с синтетическими антиконвульсантами. Отвар надземной части *Haplophyllum obtusifolium* при энтеральном введении не токсичен, поскольку LD_{minimal} не определяется, не проявляет нейротоксических свойств, предупреждает утрату УРПИ, смерть животных при МЭШ, повышает толерантность к судорожно-смертельному действию коразола и стрихнина, то есть оказывает церебропротективное действие. Применение *Haplophyllum obtusifolium* в традиционных медицинах стран Азии не может быть объяснено только наличием в нем кумаринов и базируется на его церебропротективных свойствах.

Более полутора сотен лекарственных растений используют в традиционных медицинах стран Азии и в народных медицинах для лечения больных эпилепсией. Однако фитотерапия этих больных в научно-европейской медицине не осуществляется. Стандартом является длительное, порою пожизненное назначение синтетических антиконвульсантов, оказывающих отрицательное действие на когнитивно-мнестические функции, адаптивные, творческие, сексуальные потенции человека. Предпринятые нами экспериментальные исследования фармакологических свойств природных соединений, галеновых препаратов из лекарственных растений, относящихся к разным семействам и родам, имеющих твердую репутацию средств, эффективных при эпилепсии, подтвержденную нашими клиническими наблюдениями [1], позволили констатировать отсутствие у последних выраженных

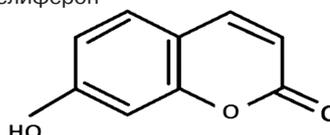
антиконвульсантных, но наличие церебропротективных свойств. В традиционных медицинах стран Азии одним из растений рода *Haplophyllum*, применяемых по широким показаниям [2], но в частности при эпилепсии, является цельнолистник туполистный *Haplophyllum obtusifolium* Ledeb. Химический состав его приведен в справочнике «Растительные ресурсы СССР» [3]. Из надземной части его фитохимиком Н. Ф. Гашимовым выделены кумарины умбеллиферон и его производное обтусифол [4], которые предположительно могут быть ответственны за эффективность растения при эпилепсии за счет антиконвульсантного действия.

Цель исследований: сравнить противосудорожную активность, токсичность, влияние на амнезию условного рефлекса пассивного избегания, нормальное безусловнорефлекторное исследовательское поведение мышей умбеллиферона, обтусифола, отвара надземной части цельнолистника туполистного.

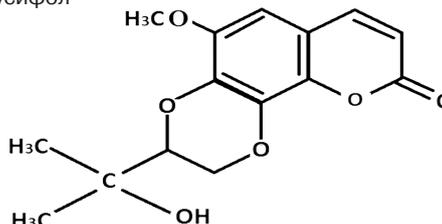
МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Н. Ф. Гашимовым были любезно представлены для исследований спектрографически чистые кумарины (рис. 1). Если обтусифол (хаптусинол) ограниченно растворим в воде (до 0,5% в холодной, до 1% при подогревании, возможно выпадение осадка), то умбеллиферон в воде практически не растворим.

Умбеллиферон



Обтусифол



■ Рисунок 1. Структурные формулы умбеллиферона и обтусифола

Поэтому приготавливали для каждого вещества 1 % водную эмульсию, используя в качестве эмульгатора Tween-80. Отвар 1 : 10 надземной части (н.ч.) цельнолистника туполистного (сем. Рутовые) готовили по правилам Государственной Фармакопеи. В контрольных группах вводили энтерально эмульсию Tween-80. Во всех группах использовали не менее 15–20 животных. Самцам мышей (19–25 г) линии SHR вводили превентивно через зонд в желудок эмульсии кумаринов в дозах 10–250 мг/кг или отвар в дозе 5 г/кг в пересчете на массу воздушно-сухого сырья. Недопустимость парентерального, в частности общепринятого внутривенного введения галеновых препаратов доказана нами ранее [5]. Существенным аргументом изучения последствий именно энтерального введения препаратов в эксперименте является и тот факт, что в клинической практике предназначаются они для перорального приема. Изучены последствия однократного за 30 мин до опыта и 7-дневного введения препаратов.

Общепринятый метод максимального электрошока (МЭШ) несколько модифицирован нами [5]. Вместо неудобных игольчатых, наглазничных электродов разработали пероральные электроды, позволяющие значительно сократить безопасность, время эксперимента, в 2 раза уменьшить параметры тока до 25–30 мА при частоте 50 гц, длительности воздействия 0,1 сек и вызывать тонические судороги у 100% животных без смачивания электродов и подкожного введения игл. Регистрировали количество выживших, не имевших судорог мышей, а также не утративших условный рефлекс пассивного избегания (УРПИ), выработанный у них за сутки до опыта. УРПИ вызывали общепринятым методом, помещая мышь на ярко освещенную площадку. Уходя сразу же в темное помещение, мышь получала болевое воздействие (электроток на сетке пола) и возвращалась на освещенную арену. Рефлекс вырабатывается с одного предъявления, при повторе ситуации животное в темное помещение не уходит. МЭШ «стирает» память о болевом раздражении и собственно УРПИ [6, 7]. После МЭШ регистрировали также время бокового положения, полной адинамии мышей. Метод внутривенного «титрования» LD₁₀₀ коразола применяли в его общепринятом варианте: 0,5% раствор его вводили медленно по 0,1 мл/20 сек в хвостовую вену мыши до наступления судорог. Предупреждение: чувствительность метода снижается при повышении концентрации раствора коразола. Тиосемикарбазид, блокатор синтеза гамма-аминомасляной кислоты, инъекцировали мышам внутривенно в дозе 17 мг/кг (супрамаксимальный тест). Учитывали латентный период (ЛП), количество судорожных припадков, время жизни. Раствор стрихнина инъекцировали внутривенно в дозе 2 мг/кг (супрамаксимальный тест). Учитывали ЛП, время жизни.

Токсичность препаратов рассчитывали графически по методу Миллера-Тэйтнера [8]. Нейротоксич-

ность регистрировали по подсчету двигательного компонента ориентировочного рефлекса (ДКОР) общепринятым методом «открытого поля», которым служило дно ванночки 30×50 см. В течение 3 мин регистрировали количество ориентировочных вставаний (вертикальный компонент ДКОР, наиболее уязвимый) и посещенных четвертей поля (горизонтальный компонент ДКОР). Выбор лекарств, угнетающих ЦНС, по их способности снижать и подавлять ориентировочный рефлекс, павловский рефлекс «что такое?», исследовательское поведение, адаптацию к новизне считаем грубой методической ошибкой. Такие препараты в первую очередь подавляют более уязвимые когнитивно-мнестические функции, интеллектуальные, творческие, сексуальные потенции. Поэтому подавление препаратом адаптации к новизне, безусловнорефлекторного поведения животных, лежащего в основе выживания особи и вида, считаем показателем его нейротоксичности. При статистической обработке результатов использовали преимущественно критерий t-Фишера–Стьюдента, а также контингентный критерий χ^2 и другие непараметрические методы статистики [9]. В качестве контрольных препаратов использовали слабый антиконвульсант триметин и бензодиазепиновое производное седуксен (диазепам).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

При энтеральном введении LD₅₀ обтусифола колебалась в значительных пределах. Представление о 50%-ной летальной дозе вещества как о какой-то постоянной величине ошибочно. LD₅₀ меняется в зависимости от пола, возраста, состояния животных, времени суток, а порою необъяснимо. Поэтому правильнее оценивать LD₅₀ лишь с точки зрения отнесения вещества к группам высоко-, средне- и малотоксичных веществ. Внутривенное, с нашей точки зрения, абсолютно не физиологичное введение позволило установить следующие LD₅₀ обтусифола: 1030±64, 334±20, 334±40 мг/кг (здесь и далее приведены средние±доверительный интервал). В дозе 120 мг/кг внутривенно обтусифол вызывает наркоз. Четырехкратное изучение острой токсичности обтусифола при энтеральном введении в казалось бы одинаковых условиях дало следующие цифры LD₅₀: 1280±282, 1455±295, 705±234, 690±96 мг/кг. Следовательно, обтусифол не является высокотоксичным веществом и находится в пограничной зоне средне- и малотоксичных веществ. Те же выводы можно сделать и относительно умбеллиферона, LD₅₀ которого варьировало при энтеральном однократном введении в пределах 745±238–1050±273 мг/кг. Даже минимальные летальные дозы для отвара н.ч. цельнолистника туполистного при энтеральном введении недостижимы. Поэтому продолжили исследование нейротоксичности сравниваемых препаратов. Обтусифол

■ Таблица 1. Сравнительная оценка влияния препаратов на действие максимального электрошока

Препарат, доза, срок введения	Количество мышей				Время бокового по- ложения и адинамии после судорог (мин), M±m
	В группе	Выживших	Без тониче- ских судорог	Сохранивших УРПИ	
Контроль (введение эмульсии Tween-80)	30	12	0	0	34±8
Обтусифол 10 мг/кг однократно 50 мг/кг 100 мг/кг	20	7	0	0	39±11
	20	9	3	2	29±8
	20	10	9*	3	33±11
Обтусифол 10 мг/кг 7 дней 50 мг/кг 100 мг/кг	15	5	0	0	26±9
	15	6	4	4	34±12
	15	7	7*	3	30±10
Умбеллиферон 10 мг/кг однократно 50 мг/кг 100 мг/кг	20	4	0	0	37±12
	20	8	0	0	36±9
	20	9	4	4	30±12
Умбеллиферон 10 мг/кг 7 дней 50 мг/кг 100 мг/кг	15	5	0	0	36±11
	15	6	3	3	26±8
	15	6	2	2	33±9
Отвар надземной части туполистника 5 г/кг однократно 7 дней	20	8	1	4	26±7
	20	15*	13*	15*	21±4*

* — $p < 0,05$ в сравнении с контролем

в дозе 10 мг/кг внутрь уменьшал количество вставаний и переходов в «открытом поле» через 30 мин. до 45 и 47% от контроля, а через 60 мин. его действие уже не обнаруживалось. В дозе 50 и 100 мг/кг он достоверно угнетал исследовательское поведение соответственно в течение 70 и 90–100 мин. Поскольку в дозах 100–120 мг/кг внутрибрюшинно обтусифол вызывает наркоз, все эти данные позволяют отнести его к нейротоксическим веществам. Умбеллиферон достоверно снижал вертикальный и горизонтальный компоненты ДКОР в дозах 50 и 100 мг/кг на 20 и 40 мин., уступая по нейротоксичности обтусифолу. В единичных опытах и не у всех животных в высоких дозах 250–300 мг/кг внутрибрюшинно умбеллиферон вызывал наркоз. Отвар н.ч. растения не влиял на исследовательское поведение животных, т.е. не проявлял нейротоксических свойств.

Результаты, приведенные в таблице 1, позволяют отметить отсутствие антиконвульсантной активности умбеллиферона при однократном и 7-дневном введении. Обтусифол в высокой дозе при однократном и недельном введении оказал умеренное противосудорожное действие, уступая в этом отношении триметину, который в дозе 100 мг/кг внутрь однократно предупредил гибель и тонические судороги у 17 из 20 мышей, не влияя на сохранность УРПИ и время адинамии. То же мы наблюдаем и у обтусифола, не увеличившего количество животных, сохранивших УРПИ и не сократившего

время адинамии. Очевидно, что антиконвульсантная активность не сопряжена с предупреждением повреждающего действия электротравмы на поведение животных, т.е. с церебропротективной активностью.

Отвар надземной части цельнолистника только при 7-дневном введении повысил толерантность мышей к повреждающему действию МЭШ как в отношении выживаемости, конвульсий, так и в отношении амнезии УРПИ и времени адинамии. Эти результаты подкрепляют теорию состояния неспецифической сопротивляемости (СНПС) организма, разработанную отечественным фармакологом Н.В. Лазаревым и его школой [10, 11]. Такое состояние вызывают классические адаптогены и другие растения при хроническом потреблении их препаратов. СНПС характеризуется повышением толерантности к ряду повреждающих воздействий и агентов, что подтверждается результатами, приведенными в таблице 2: отвар н.ч. цельнолистника увеличил LD_{100} коразола, ЛП судорог и время жизни мышей после инъекции стрихнина при 7-дневном, но не однократном введении. Церебропротективное действие отвара манифестируется защитой исследовательского, безусловнорефлекторного поведения (сохранностью УРПИ у 15 из 20 мышей), укорочением времени бокового положения и адинамии после МЭШ, а также увеличением количества выживших животных (табл. 1). Этими же свойствами можно объяснить и повышение толерантности

■ Таблица 2. Сравнительная оценка влияния фитопрепаратов на LD100 коразола при внутривенном титровании и судорожно-смертельное действие стрихнина

Препарат, доза, срок введения	LD100 коразола в процентах от контроля	Латентный период стрихниновых судорог в мин	Длительность жизни после инъекции стрихнина в мин, M±m
Контроль (введение эмульсии Tween-80)	76,8±11,0 мг/кг 100±14,3%	4,0±0,7	7,7±2,1
Обтусифол 50 мг/кг однократно 100 мг/кг 200 мг/кг	115±12 127±27 133±19*	4,0±0,9 5,1±0,7* 6,1±1,1*	6,9±1,6 11,2±5,8 10,5±4,2
Обтусифол 50 мг/кг 7 дней 100 мг/кг 200 мг/кг	102±23 118±22 134±28*	3,2±0,6 5,1±0,9 6,5±1,6*	6,5±2,5 8,8±1,9 11,1±4,7
Умбеллиферон 50 мг/кг однократно 100 мг/кг 200 мг/кг	98±25 107±17 118±19	4,8±0,6 5,3±1,1* 5,0±0,7	7,5±1,9 7,9±2,3 8,1±2,3
Умбеллиферон 50 мг/кг 7 дней 100 мг/кг 200 мг/кг	114±14 125±27 128±29	3,3±0,8 4,9±0,8 5,5±1,5*	9,2±3,5 8,4±2,8 12,1±4,9
Отвар надземной части туполистника 5 г/кг однократно 7 дней	105±22 140±18*	4,7±0,9 6,5±2,1*	6,7±1,7 12,2±4,1*

В группах использовано 15–20 животных; * — p≤0,05 в сравнении с контролем

животных к судорожно-смертельному действию коразола и стрихнина (табл. 2). Кумарины даже в высоких дозах (200–250 мг/кг) при однократном и курсовом введениях не влияли на ЛП судорог, вызванных тиосемикарбазидом, и время жизни животных. Отвар цельнолистника только при 7-дневном, но не однократном введении продлил время жизни с 61,5±5,8 до 89,6±17,2 мин., что сравнимо с действием седуксена в дозе 0,5 мг/кг внутрь однократно. В дозе 2,5 мг/кг седуксен, блокатор NMDA глутаматных рецепторов, полностью защищал всех животных от судорог и гибели при инъекции тиосемикарбазида.

Приведенные результаты совпадают со сведениями о депрессивном влиянии на ЦНС различных природных соединений, выделенных из видов цельнолистника [12]. Предположительно сочетание слабых антиконвульсантных и выраженных церебропротективных свойств отвара цельнолистника туполистного легло в основу его применения при эпилепсии в традиционных и народных медицинах.

ВЫВОДЫ

1. Антиконвульсантная активность отсутствует у умбеллиферона и слабо выражена у обтусифола даже в высоких дозах. Изученные кумарины проявляют свое нейротоксическое действие, снижая адаптацию мышей к новизне. Обтусифол и умбеллиферон в больших дозах при внутрибрюшинном введении вызывают наркоз. Как антиконвульсанты кумарины не могут конкурировать с триметином и седуксеном.

2. Отвар надземной части *Naplophyllum obtusifolium* при превентивном энтеральном курсовом 7-дневном введении мышам повышал резистентность мышей к коразолу, стрихнину, тиосемикарбазиду, максимальному электрошоку, увеличивая количество выживших после него животных, сохранивших условный рефлекс пассивного избегания, а также сокращая время адинамии. Экспериментально подтверждена правомерность применения в традиционных медицинах отвара надземной части *Naplophyllum obtusifolium* при эпилепсии, которое основано на наличии у него церебропротективных свойств.

ЛИТЕРАТУРА

1. Барнаулов О. Д., Поспелова М. Л. Фитотерапия в неврологии. СПб.: Н-Л, 2009; 280–317.
2. Кароматов И. Д. Простые лекарственные средства (опыт применения лекарственных средств натурального происхождения в древней, современной народной и научной медицине). Бухара: Дурдона, 2012.
3. Соколов П. Д. Растительные ресурсы СССР. Л.: Наука, 1988; 4: 13.
4. Абышев А. З., Гашимов Н. Ф. Химия природн. соед. 1979; 6: 845–50.
5. Барнаулов О. Д. Автореф. дисс. д-ра мед. наук. Ленинград, 1989.
6. Ильюченко Р. Ю., Чаплыгина С. Р. Лекарственные средства Дальнего Востока. Владивосток, 1972; (11): 83–5.
7. Weissman A. Arch. Intern. Pharmacodyn. et ther. 1965; 154 (1): 122–30.
8. Бельский М. Л. Элементы количественной оценки фармакологического эффекта. Л.: Медгиз, 1963.
9. Гублер Е. В., Генкин А. А. Применение критериев непараметрической статистики для оценки различий двух групп в медико-биологических исследованиях. М.: Медицина, 1969.

10. Лазарев Н. В. Казанский мед. журн. 1961; 5: 12–7.
11. Лазарев Н. В., Люблина Е. И., Розин М. А. Патол. физиол. и эксперим. терапия. 1959; 4: 16–21.
12. Растительные ресурсы СССР. Цветковые растения, их химический состав и использование. Семейства Rutaceae-Elaeagnaceae / Под ред. П. Д. Соколова. Л.: Наука, 1988.

COMPARATIVE ESTIMATION OF ANTICONVULSANT ACTIVITY OF CUMARINES UMBELLIFERONE, OBTUSIFOLE AND HAPLOPHYLLUM OBTUSIFOLIUM GRASS DECOCTION

O. D. Barnaulov

◆ **Summary:** Obtusifole and umbelliferone had low toxicity after enteral administration. Even high obtusifole doses demonstrated weak anticonvulsant activity in the models of maximal electroshock (MES) and pentamethylentetrasole seizures (LD₁₀₀). These coumarines were not effective in the models of strychnine- and thiosemicarboxide-induced convulsions. They revealed neurotoxic influence, reducing unconditioned reflex, normal adoptive mice behavior and did not prevent the loss of conditioned passive avoiding reflex (CPAR) after MES. These coumarines did not antagonize with synthetic anticonvulsants. The *Haplophyllum obtusifolium* grass decoction administered enterally was not toxic, because LD minimal might not be fixed. It had no neurotoxic properties, prevented the loss of CPAR and mortality after MES, elevated tolerance to convulsive-mortal pentamethylentetrasole and strychnine action. So this decoction demonstrated cerebroprotective properties. The use of *Haplophyllum obtusifolium* in traditional medicines of Asiatic states may not be explained by only coumarines. It is based on cerebroprotective properties of this medicine.

◆ **Key words:** obtusifole; umbelliferone; coumarines; maximal electroshock.

REFERENCES

1. Barnaulov O. D., Pospelova M. L. Fitoterapiya v neurologii [Herbal medicine in neurology]. SPb.: N-L, 2009; 280–317. (in Russian).
2. Karomatov I. D. Prostye lekarstvennye sredstva (opyt primeneniya lekarstvennykh sredstv natural'nogo iroiskhozhdeniya v drevney, sovremennoy narodnoy i nauchnoy meditsine) [Simple medicines (experience in the use of drugs of natural origin in ancient, modern folk and scientific medicine)]. Bukhara: Durdona, 2012. (in Russian).
3. Sokolov P. D. Rastitel'nye resursy SSSR [Plant resources of the USSR]. L.: Nauka, 1988; 4: 13. (in Russian).
4. Abyshev A. Z., Gashimov N. F. Khimiya prirodnykh soed [Chemistry of natural compounds]. 1979; 6: 845–50. (in Russian).
5. Barnaulov O. D. Avtoref. diss. d-ra med. nauk. Leningrad, 1989. (in Russian).
6. Il'yuchenok R. Yu., Chaplygina S. R. Lekarstvennye sredstva Dal'nego Vostoka [Medicines the Far East]. Vladivostok, 1972; (11): 83–5. (in Russian).
7. Weissman A. Arch. Intern. Pharmacodyn. et ther. 1965; 154 (1): 122–30.
8. Belen'kiy M. L. Elementy kolichestvennoy otsenki farmakologicheskogo effekta [Elements of a quantitative evaluation of the pharmacological effect]. L.: Medgiz, 1963. (in Russian).
9. Gubler E. V., Genkin A. A. Primenenie kriteriev neparametricheskoy statistiki dlya otsenki razlichnykh dvukh grupp v mediko-biologicheskikh issledovaniyakh [The application of the criteria of non-parametric statistics to assess differences between two groups in biomedical research]. M.: Meditsina, 1969. (in Russian).
10. Lazarev N. V. Kazanskiy med. zhurn. 1961; 5: 12–7. (in Russian).
11. Lazarev N. V., Lyublina E. I., Rozin M. A. Patol. fiziol. i eksperim. terapiya. 1959; 4: 16–21. (in Russian).
12. Rastitel'nye resursy SSSR. Tsvetkovye rasteniya, ikh khimicheskiy sostav i ispol'zovanie. Semeystva Rutaceae-Elaeagnaceae [Plant resources of the USSR. Flowering plants, their chemical composition and use. Family Rutaceae-Elaeagnaceae] / Pod red. P. D. Sokolova. L.: Nauka, 1988. (in Russian).

◆ Информация об авторе

Барнаулов Олег Дмитриевич — д. м. н., ведущий научный сотрудник. Институт мозга человека им. Н. П. Бехтерева РАН. 197376, Санкт-Петербург, ул. Акад. Павлова, д. 9а.
E-mail: barnaulovod@rambler.ru.

Barnaulov Oleg Dmitrievich — Dr. Med. Sci. (Pharmacology), Leading Researcher. N. P. Bekhtereva Institute of the Human Brain RAS. 197376, St. Petersburg, Acad. Pavlov St., 9a, Russia.
E-mail: barnaulovod@rambler.ru.