

## ДЕЙСТВИЕ АНТИКОНВУЛЬСАНТОВ НА СИСТЕМУ ОКСИДА АЗОТА

Л. А. ГРОМОВ<sup>1</sup>, И. Ф. БЕЛЕНИЧЕВ<sup>2</sup>, Л. Г. ГОНЧАР-ЧЕРДАКЛИ<sup>1</sup>,  
Г. А. ЖЕРНОВАЯ<sup>2</sup>

<sup>1</sup>ГУ «Институт фармакологии и токсикологии НАМН Украины», Киев;

<sup>2</sup>Запорожский государственный медицинский университет, Украина;

e-mail: llrr@ukr.net

*Изучено влияние фенобарбитала, карбамазепина, вальпроата натрия, депакина, топирамата и ламотриджина на содержание стабильного метаболита NO и активность NO-синтазы в тканях головного мозга белых крыс. Установлено, что при действии карбамазепина, вальпроата натрия, топирамата и ламотриджина активность NO-синтазы и уровень стабильного метаболита NO в тканях мозга снижаются. При введении фенобарбитала количество стабильного метаболита NO не изменяется, а активность NO-синтазы возрастает. Обсуждается участие системы оксида азота в механизме действия изученных противосудорожных средств.*

*Ключевые слова: антиконвульсанты, оксид азота, NO-синтаза.*

Согласно современным представлениям оксид азота (NO) относится к регуляторам функций организма и определяется в различных тканях, в том числе в нейронах, глиальных и сосудистых элементах головного мозга.

В физиологических условиях центральной нервной системы NO выполняет нейромедиаторную и нейромодуляторную роль в синаптической передаче на уровне пре- и постсинаптической мембраны. Кроме того, NO проявляет функцию вторичного внутриклеточного мессенджера с вовлечением гуанилатциклазной сигнальной системы [1].

Электрофизиологически «эпилептизация» нейрона заключается в снижении величины мембранного потенциала за счет изменения трансмембранного ионного тока, что влечет за собой генерацию потенциала действия, гиперсинхронизация которого реализуется в развитии судорожного разряда нейронов мозга и клиническим судорожным припадком [2].

Уровень возбудимости нейронов зависит от соотношения влияний активирующих и тормозных нейромедиаторных систем, нарушение функционирования которых может приводить к повышению судорожной готовности мозга. Принимая во внимание, что оксид азота оказывает модулирующее влияние на специализированные постсинаптические рецепторы, а также способствует высвобождению медиаторов, главным образом глутамата, из пресинаптического депо, оправданным яв-

ляется представление об участии NO в эпилептогенезе [3, 4].

Исследования в этом направлении показали, что при различных экспериментальных моделях судорожных состояний (хемо-, электро- и аудиоиндуцированные судороги) в тканях мозга возрастает уровень оксида азота [5, 6].

В связи с этим возникает вопрос о возможной противосудорожной активности антагонистов системы NO, которая состоит: из субстрата синтеза NO-L-аргинина, фермента биосинтеза оксида азота – NO-синтазы – и конечного биологически активного продукта – NO. Эта система в полной мере присутствует в головном мозгу [7].

Не менее важен вопрос о влиянии антиконвульсантов на уровень NO и активность NO-синтазы в тканях мозга. Такая постановка проблемы может способствовать более полному пониманию механизмов противосудорожного действия антиконвульсантов и также служить экспериментальным доказательством участия системы оксида азота в патогенезе эпилепсии [8–10].

В настоящее время исследования такого плана немногочисленны и неоднозначны.

Целью данной работы является изучение влияния антиконвульсантов на содержание NO и активности NO-синтазы в левом и правом полушариях головного мозга. Последнее представляет интерес в связи с четко установленным фактом наличия функциональной,

морфологической и нейрoхимической асимметрии мозга [11, 12]. В то же время известно, что механизмы действия психотропных веществ связаны, главным образом, с их влиянием на различные нейрoхимические звенья синаптической передачи. Поэтому теоретически различные нейрoпсихофармакологические средства могут преимущественно (доминантно) действовать на левое или правое полушария мозга [13].

### Материалы и методы

В эксперименте использовано 36 белых беспородных крыс обоего пола массой 180–200 г., полученных из вивария ГУ «Институт фармакологии и токсикологии АМН Украины. Все экспериментальные процедуры и оперативные вмешательства осуществлялись в соответствии с «Положением об использовании животных в биомедицинских исследованиях», которое согласовано с положениями «Европейской конвенции по защите позвоночных животных, используемых для экспериментальных и научных целей». Животным опытных групп ( $n = 6$  для каждого исследуемого препарата) внутрибрюшинно вводили антиконвульсанты в эффективных экспериментальных противосудорожных дозах: фенobarбитал – 20 мг/кг, карбамазепин – 150 мг/кг, ламотриджин – 30 мг/кг, топирамат – 300 мг/кг, вальпроат натрия (депакин хроно) – 155 мг/кг в виде водной суспензии с твином-80. Контрольная группа ( $n = 6$ ) внутрибрюшинно получала дистиллированную воду с твином-80. Через 60 мин после введения препаратов животных декапитировали под легким эфирным наркозом и извлекали головной мозг (правое и левое полушария мозга без мозжечка). Каждое полушарие тщательно промывали в 0,9%-ом охлажденном растворе KCl и измельчали в жидком азоте в ступке. Цитоплазматическую фракцию выделяли методом дифференциального центрифугирования на рефрижераторной центрифуге Sigma 3-30k (Германия) при 1000 g 10 мин затем при 1400 g 10 мин при +4 °C.

*Определение стабильных метаболитов монооксида азота в тканях головного мозга по Гриссу. Принцип метода.* Стабильными метаболитами монооксида азота – являются нитриты, которые, реагируя с реактивом Грисса, образуют стойкий окрашенный комплекс, имеющий максимум поглощения при длине волны 540 нм [14].

*Проведение исследования.* К 0,2 мл цитозольной фракции мозга добавляли 2,0 мл депротенизатора (750 мг ZnSO<sub>4</sub> + 100 мг NaOH

до 100 мл H<sub>2</sub>O), тщательно перемешивали и инкубировали 15 мин при температуре 27–30 °C. Затем пробы центрифугировали при 1500 g в течение 20 мин (при температуре 15 °C). Надосадок количественно переносили в чистую пробирку и добавляли 1 мл реактива Грисса (10 г в 90 мл 12,5% уксусной кислоты). Пробы оставляли на 15 мин при комнатной температуре, после чего спектрофотометрировали при 540 нм против смеси 2 мл H<sub>2</sub>O + 1 мл реактива Грисса. Количество стабильного метаболита NO (NO<sub>2</sub><sup>-</sup>) рассчитывали по калибровочной кривой с пересчетом на общий протеин и выражали в мкМ/г протеина.

*Определение активности NO-синтазы (NOS).* Обязательным в исследовании системы оксида азота является определение активности/экспрессии NOS. В настоящее время известны 3 изоформы NOS.

Для определения общей активности NOS в гомогенате головного мозга использовали спектрофотометрический метод. Измерение абсорбции проводили на спектрофотометре Biochrom Ltd (UK).

*Принцип метода.* В основе метода определения общей активности NO-синтазы лежит стехиометрическое окисление NADPH в процессе реакции образования NO из L-аргинина. Убыль NADPH эквимолярна количеству образующегося NO, которую регистрировали спектрофотометрически при длине волны 340 нм [14].

Инкубационная смесь содержала: 25 мМ трис-HCl, 5 мМ MgCl<sub>2</sub>, 1 мМ CaCl<sub>2</sub>, 1 мМ NADPH, 1 мМ L-аргинина (pH = 7,4), общий объем доводили дистиллированной водой до 1 л. NADPH готовили extempore.

*Проведение исследования.* 2,9 мл инкубационной смеси (37 °C) помещали в кварцевую кювету (1 см), реакцию запускали добавлением 0,1 мл цитозольной фракции мозга и хорошо перемешивали. Абсорбцию измеряли сразу, а затем через 4 мин при длине волны 340 нм. Активность NOS выражается в нМ/мин·мг протеина по формуле:

$$C = \frac{4 \cdot \Delta E \cdot 1000}{6,22a},$$

где C – активность NOS; a – содержание протеина в пробе, мг; 6,22·10<sup>-3</sup> – коэффициент микромолярной экстинкции восстановленной формы пиридиновых нуклеотидов при длине волны 340 нм и ширине кюветы 1 см; ΔE – изменение абсорбции раствора за 4 мин.

Количество протеина в пробе определяли по методу Лоури.

Полученные результаты представляли в виде среднеарифметического ( $M$ ) и стандартной ошибки ( $m$ ), с учетом количественной выборки ( $n$ ). Достоверность различия средних значений оценивали с использованием  $t$ -критерия Стьюдента. Различия считались достоверными при  $P \leq 0,05$ . Все расчеты проводились с использованием программы Statistica 6.0.

### Результаты и обсуждение

Проведенные исследования показали отсутствие различий в содержании оксида азота в левом и правом полушариях мозга (табл. 1).

При введении карбамазепина, ламотриджина и топирамата уровень NO равномерно снижается как в левом, так и в правом полушариях, о чем свидетельствует снижение содержания его стабильного метаболита –  $\text{NO}_2^-$ . Под влиянием вальпроата натрия содержание  $\text{NO}_2^-$  достоверно снижается только в левом полушарии (табл. 1).

При действии фенobarбитала достоверных изменений в уровне  $\text{NO}_2^-$  в обоих полушариях по сравнению с контролем не обнаружено.

Биосинтез оксида азота ассоциируется, в первую очередь, с активностью NOS. Поэтому мы провели исследования по определению активности этого фермента в тканях левого и правого полушарий головного мозга. Достоверных различий в активности NOS в левом и правом полушариях не обнаружено. Установлено, что ламотриджин, топирамат и вальпроат натрия снижают активность NOS в обоих полушариях мозга (табл. 2). Карбамазепин также снижает активность фермента, но только в одном – правом полушарии (табл. 2).

Таким образом, полученные данные показывают, что под влиянием ламотриджина,

Таблица 1. Влияние антиконвульсантов на уровень  $\text{NO}_2^-$  в тканях мозга белых крыс ( $n = 6$ )

Условия опыта	$\text{NO}_2^-$ , мкМ/г протеина	
	Полушария головного мозга	
	Левое	Правое
Контроль	$4,14 \pm 0,02$	$4,14 \pm 0,03$
Карбамазепин	$3,69 \pm 0,07^*$	$3,84 \pm 0,03^*$
Ламотриджин	$3,88 \pm 0,04^*$	$3,85 \pm 0,05^*$
Топирамат	$3,89 \pm 0,03^*$	$3,88 \pm 0,04^*$
Вальпроат натрия	$4,04 \pm 0,03^*$	$4,1 \pm 0,04$
Фенobarбитал	$4,18 \pm 0,02$	$4,17 \pm 0,05$

\* Достоверно по отношению к контролю,  $P < 0,05$

Таблица 2. Действие антиконвульсантов на активность NOS в тканях мозга белых крыс ( $n = 6$ )

Условия опыта	NOS, нМ NADPH/мин·мг протеина	
	Полушария головного мозга	
	Левое	Правое
Контроль	$1,67 \pm 0,19$	$2,23 \pm 0,22$
Карбамазепин	$1,72 \pm 0,18$	$1,66 \pm 0,14^*$
Ламотриджин	$0,74 \pm 0,10^*$	$0,72 \pm 0,15^*$
Топирамат	$0,50 \pm 0,13^*$	$0,59 \pm 0,13^*$
Вальпроат натрия	$0,22 \pm 0,04^*$	$0,30 \pm 0,06^*$
Фенobarбитал	$6,20 \pm 0,24^{* \#}$	$4,63 \pm 0,24^*$

\* Достоверно по отношению к контролю,  $P < 0,05$

#  $P < 0,05$  между правым и левым полушариями головного мозга

топирамата, вальпроата натрия и карбамазепина в тканях мозга содержание  $\text{NO}_2^-$  снижается, что, вероятно, связано со снижением активности NOS.

В отличие от указанных антиконвульсантов фенobarбитал не снижает, а повышает активность NOS с преимущественным действием в левом полушарии (табл. 2) – при этом активность фермента в левом полушарии повышается почти в 4 раза, в правом – в 2 раза. По всей видимости, фенobarбитал, являясь антиоксидантом, модулирует экспрессию редоксчувствительного фактора транскрипции NF- $\kappa$ B, регулируя активность NOS. Промотор iNOS имеет два участка связывания NF- $\kappa$ B. Поэтому активирующее/депримирующее влияние фенobarбитала на активность NOS может быть дозозависимым и определяется его анти-/прооксидантными свойствами.

Надо полагать, что конечный функциональный результат определяется уровнем NO, а не активностью NOS и изменение его количества в пределах 10%, вероятно, уже достаточно для изменения функциональных проявлений. Различия выраженности ингибирующего действия изученных антиконвульсантов, как было указано выше, предположительно связаны с их селективным влиянием на различные изоформы NOS.

Полученные результаты свидетельствуют о своеобразии оксидазотного звена механизма действия фенobarбитала. Этот препарат не влияет на уровень стабильного метаболита NO –  $\text{NO}_2^-$  – в тканях мозга, но повышает

активность NOS. Можно предположить, что фенобарбитал оказывает селективное влияние на NOS эндотелия сосудов головного мозга. Этим можно объяснить и более выраженное действие фенобарбитала на активность NOS левого полушария, так как левая сонная артерия в диаметре превышает правую (по анатомическим данным), что определяет большую интенсивность локального кровотока левого полушария [15].

Относительно карбамазепина, ламотриджина, топирамата и вальпроата натрия следует отметить: во-первых, неравномерную выраженность ингибирующего действия их на активность NOS головного мозга. В наших опытах определялась общая активность NOS, включающая активность различных изоформ (нейрональная, индуцибельная и эндотелиальная NOS). Поэтому можно предположить, что полученные данные о гетерогенности ингибирующего действия изученных антиконвульсантов на активность NOS связаны с их селективным влиянием на различные изоформы энзима. Во-вторых, степень ингибирующего действия указанных антиконвульсантов на активность NOS не коррелирует со степенью снижения уровня  $\text{NO}_2^-$  в мозгу. Под влиянием карбамазепина, ламотриджина, топирамата, вальпроата натрия содержание  $\text{NO}_2^-$  в мозгу снижается на ~ 10%, тогда как активность NOS снижается соответственно на 17, 63, 78 и 110%.

Полученные результаты позволяют сделать вывод о том, что функционально-биохимическая система оксида азота является одним из звеньев в механизме противосудорожного действия антиконвульсантов. Этот вывод основывается на данных, согласно которым судорожные состояния развиваются на фоне повышения уровня оксида азота в мозгу экспериментальных животных [16], а антагонист системы оксида азота — 7 нитроиндазол — оказывает противосудорожное влияние [17, 18]. Наши исследования показали, что карбамазепин, ламотриджин, топирамат и вальпроат натрия снижают активность NOS и содержание  $\text{NO}_2^-$  в мозгу животных, то есть также оказывают ингибирующее влияние на систему оксида азота.

При этом следует отметить, что инициация судорожной активности не является результатом прямого влияния  $\text{NO}_2^-$  на генерацию возбуждающего постсинаптического

потенциала (ВПСП), а действует опосредованно через глутаматергическую систему. Известно, что глутамат относится к активирующим медиаторам синаптической передачи, а оксид азота способствует высвобождению глутамата из пресинаптического депо [19]. Следовательно, снижение активности системы оксида азота под влиянием антиконвульсантов может уменьшить действие  $\text{NO}_2^-$  на пресинаптическое высвобождение глутамата и, таким образом, оказывает противосудорожное влияние.

Необходимо также подчеркнуть преимущественное (доминантное) действие вальпроата натрия на содержание  $\text{NO}_2^-$  в левом полушарии, а карбамазепина на активность NOS в правом полушарии мозга. Эти данные важны с позиции развития представлений о межполушарной психофармакологии [20] и могут иметь значение в практической эпилептологии, так как понятно, что если очаг эпилептогенной активности локализуется в одном полушарии, а антиконвульсант преимущественно действует в другом, то вряд ли можно ожидать терапевтического успеха.

#### ДІЯ АНТИКОНВУЛЬСАНТІВ НА СИСТЕМУ ОКСИДУ АЗОТУ

*Л. А. Громов<sup>1</sup>, І. Ф. Бєленічев<sup>2</sup>,  
Л. Г. Гончар-Чердаклі<sup>1</sup>, Г. А. Жернова<sup>2</sup>*

<sup>1</sup>ДУ «Інститут фармакології та токсикології НАМН України», Київ;

<sup>2</sup>Запорізький державний медичний університет, Україна;  
e-mail: llrr@ukr.net

Досліджено вплив фенобарбіталу, карбамазепіну, вальпроату натрію, депакіну, топірамату і ламотриджину на вміст стабільного метаболіту NO і активність NO-синтази в тканинах головного мозку білих щурів. Встановлено, що за дії карбамазепіну, вальпроату натрію, топірамату і ламотриджину активність NO-синтази та рівень стабільного метаболіту NO в тканинах мозку знижуються. У разі введення фенобарбіталу кількість стабільного метаболіту NO не змінюється, а активність NO-синтази зростає. Обговорюється участь системи оксида азоту в механізмі дії досліджуваних протисудомних засобів.

**Ключові слова:** антиконвульсанти, оксид азоту, NO-синтаза.

## EFFECT OF ANTICONVULSANTS ON THE NITRIC OXIDE SYSTEM

L. A. Gromov<sup>1</sup>, I. F. Belenichev<sup>2</sup>,  
L. G. Gonchar-Cherdakli<sup>1</sup>, G. A. Zhernovaja<sup>2</sup>

<sup>1</sup>SI Institute of Pharmacology and Toxicology, National Academy of Medical Sciences of Ukraine, Kyiv;

<sup>2</sup>Zaporizhia State Medical University, Ukraine;  
e-mail: llrr@ukr.net

The effect of phenobarbital, carbamazepine, valproate sodium, depakine, topiramate and lamotrigine on the content of NO and NO-synthase activity in white rat brain tissues has been studied. It was established that the action of carbamazepine, valproate sodium, topiramate and lamotrigine decreases the activity of NO-synthase and the level of NO in the brain tissues. The amount of NO does not change while NO-synthase activity increases with the introduction of phenobarbital. The involvement of nitric oxide in the mechanism of action of the studied anticonvulsant drugs is discussed.

**Key words:** anticonvulsants, nitric oxide, NO-synthase.

1. Зозуля Ю. А., Сенько Л. Н. // Журн. АМН України. — 2000. — 6, № 1. — С. 3–25.
2. Одинак М. М., Дыскин Д. Е. Эпилепсия: этиопатогенез, клиника, дифференциальная диагностика, медицинское лечение. — СПб.: Политехника, 1997. — 233 с.
3. Мотавкин П. А., Дудина Ю. В. // Дальневост. мед. журн. — 2005. — № 1. — С. 109–112.
4. Зозуля Ю. А. // Журн. Акад. мед. наук України. — 2007. — 13, № 2. — С. 201–215.
5. Ebert U., Wlaz R., Loscher W. // Eur. J. Neurosci. — 2000. — 12. — P. 4195–4231.
6. Башкатова В. Г., Вицкова Г. Ю., Наркевич В. Б. и др. // Бюл. эксперим. биол. мед. — 1998. — 125, № 1. — С. 26–29.
7. Bashkatova V., Narkevich V., Vitskova G., Vanin A. // Prog. Neuropsychopharmacol. Biol. Psychiatry. — 2003. — 27, N 3. — P. 487–492.
8. Aarts M. M., Tymianski M. // Curr. Mol. Med. — 2004. — 4, N 2. — P. 137–147.
9. Башкатова В. Г., Мелдрум Б., Чапман А. и др. // Нейрохимия. — 2001. — 18, № 4. — С. 258–261.
10. Rajasekaran K., Jayakumar R., Venkatachlam K. // Brain Res. — 2003. — 979, N 1–2. — P. 85–97.
11. Arato M., Frecska E., Maccrimmon D. J. et al. // Prog. Neuropsychopharmacol. Biol. Psychiatry. — 1991. — 15. — P. 759–764.
12. Боголепова Н. Н. Функциональная межполушарная асимметрия. — М.: Научный мир, 2004. — 728 с.
13. Takei Y., Nishikawa Y., Tachibana M. et al. // Brain Dev. — 2004. — 26, N 3. — P. 176–183.
14. Чекман И. С., Губский Ю. И., Громов Л. А. др. Доклиническое изучение специфической активности потенциальных нейропротективных препаратов / Методические рекомендации Государственного Фармакологического Центра МОЗ Украины. — Киев, 2010. — 81с.
15. Александрин В. В., Кожура В. Л., Новодержкина И. С. / Сб. статей Всероссийской научной конференции с международным участием «Структурно-функциональные нейрохимические закономерности асимметрии и пластичности — 2006». — 2006. — С. 290–296.
16. Paul V., Ekambaran P. // Indian J. Physiol. Pharmacol. — 2003. — 47, N 4. — P. 400–406.
17. Luszczki J. J., Czuczwar M., Gawlik P. et al. // J. Neural. Transm. — 2006. — 9. — P. 1435–1463.
18. Manning P., Cookson M. R., Mc Neil C. J. et al. // Brain Res. — 2001. — 911, N 2. — P. 203–210.
19. Haspolat S., Mihci E., Coskun M. et al. // J. Child. Neurol. — 2002. — 17, N 10. — P. 749–751.
20. Громов Л. А., Евтушенко О. А., Танасова И. Н. // Журн. АМН України. — 2007. — 13, № 1. — С. 346–353.

Получено 27.06.2012