

ОЦЕНКА ЭФФЕКТИВНОСТИ ПРИМЕНЕНИЯ СУХОГО ЭКСТРАКТА СОЛОДКИ ГОЛОЙ В УСЛОВИЯХ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ МОДЕЛИ БОЛЕЗНИ АЛЬЦГЕЙМЕРА

А. В. Кошкина, О. В. Волкова, Ю. О. Федотова, Д. А. Бараненко

Факультет пищевых биотехнологий и инженерии Университета ИТМО, Санкт-Петербург

Целью исследования было определение эффективности хронического применения сухого очищенного экстракта корней солодки голой в низкой (1 раз в сутки в течение 28 дней внутрибрюшинно в дозе 0,5 мг/кг) и высокой (1 раз в сутки в течение 28 дней внутрибрюшинно в дозе 5,0 мг/кг) дозах на процессы обучения и память в условиях экспериментальной модели болезни Альцгеймера. Наряду с этим, оценивали эффекты хронического введения сухого очищенного экстракта корней солодки голой на активность ацетилхолинэстеразы и бутирилхолинэстеразы в головном мозге, а также на активность ферментов антиоксидантной системы в крови (супероксиддисмутазы, каталазы и глутатионпероксидазы).

Введение сухого экстракта солодки голой в высокой дозе (5,0 мг/кг) улучшало пространственное обучение в водном тесте Морриса и улучшало непространственное обучение в тесте УРПИ, а также снижало активность ацетилхолинэстеразы и бутирилхолинэстеразы в коре головного мозга и повышало активность супероксиддисмутазы, каталазы, глутатионпероксидазы в сыворотке крови, соответственно, при экспериментальной болезни Альцгеймера. Комбинированное применение сухого очищенного экстракта солодки голой в высокой дозе совместно с галантамином гидробромидом в значительно большей степени активировало способность животных к непространственному и пространственному обучению, а также усиливало активность ферментов антиоксидантной системы в крови, одновременно существенно снижало активность ацетилхолинэстеразы и бутирилхолинэстеразы в коре головного мозга при экспериментальной болезни Альцгеймера.

Таким образом, применение сухого экстракта солодки голой в сочетании с галантамином гидробромидом можно рассматривать как перспективный подход для восстановления когнитивных процессов, активности ферментов холинергической системы головного мозга и активности ферментов антиоксидантной системы при экспериментальной модели болезни Альцгеймера.

Ключевые слова: солодка голая, болезнь Альцгеймера, ацетилхолинэстераза, бутирилхолинэстераза, ферменты антиоксидантной системы, β -(25-35)-амилоид

ВВЕДЕНИЕ

Болезнь Альцгеймера (БА) является многофакторным и, на сегодняшний день, необратимым нейродегенеративным заболеванием, этиология и патогенез которого до сих пор остаются до конца не известными [3,13]. В настоящее время, существует несколько гипотез, с помощью которых, предприняты попытки объяснить патофизиологию БА, включая гипотезу амилоидогенеза, гипотезу нарушения кальциевого гомеостаза, гипотезу нарушения энергетического обмена, гипотезу индукции окислительного стресса и гиперфосфорилирования тау-белка [13]. Несмотря на большое количество данных, благодаря которым возникли эти гипотезы, механизмы, лежащие в основе БА и факторы, ответственные за прогрессирование этого заболевания остаются неясными [3,13].

Широкая распространенность БА в сочетании с отсутствием патогенетически направленных и эффективных фармакологических препаратов на сегодняшний день, диктует необходимость изыскания новых терапевтических тактик и подходов в лечении БА [13,14]. Кроме того, терапевтические стратегии для лечения БА, основанные только на терапии только одного конкретного компонента патогенеза БА, могут быть недостаточными [14].

В последние годы значительно возрос интерес к разработке новых терапевтических методов лечения и профилактики различных заболеваний, в том числе и БА, с использованием препаратов растительного происхождения [2,8]. В этой связи внимание исследователей привлекает такое известное и широко применяемое в медицине растение как солодка голая (*Glycyrrhiza glabra* L., семейство Бобовые). Установлено, что разнообразные биологически активные соединения, содержащиеся в корнях солодки, оказывают широкий спектр биологических и физиологических эффектов на организм человека [7]. В настоящее время многочисленные исследования направлены на изучение влияния компонентов солодки голой на мозг человека [7,9]. Так, показано, что сухой экстракт солодки голой стимулирует рост нервных дендритов гиппокампа, оказывает противосудорожное действие, проявляет антиоксидантную активность, ингибируя процессы свободнорадикального окисления липидов, влияет на функциональную активность нейромедиаторных систем, а также оказывает положительное влияние на процессы обучения и памяти [4,6,9,11,15]. Ранее, нами было также установлено антиамнестическое действие сухого очищенного экстракта солодки голой у овариоэктомированных крыс [1].

Учитывая вышеизложенное, основная цель настоящего исследования состояла в изучении эффективности хронического применения сухого очищенного экстракта корней солодки голой на процессы обучения и память в условиях экспериментальной модели БА. Наряду с этим, другая цель нашего исследования заключалась в оценке эффектов хронического введения сухого очищенного экстракта корней солодки голой на функциональную активность ацетилхолинэстеразы и бутирилхолинэстеразы в головном мозге, а также на активность ферментов антиоксидантной системы в крови.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Экспериментальная работа была выполнена на 100 самцах крыс линии Вистар в возрасте 2,5-3 месяца, массой 180-200 г, выращенных в питомнике «Рапполово» (Санкт-Петербург, Россия). Все эксперименты выполнены с соблюдением рекомендаций по этике работы с лабораторными животными, отраженными в уставе European Communities Council Directive (86/609 EEC). Животных содержали согласно правилам GLP при проведении доклинических исследований в РФ (ГОСТ 3 51000ю396 и 1000.4.-96).

В исследованиях был использован полученный нами в лабораторных условиях на факультете пищевых биотехнологий и инженерии Университета ИТМО (Санкт-Петербург) сухой очищенный экстракт солодки голой. С помощью методов ЯМР, масс-спектропии, ВЭЖХ и тонкослойной хроматографии было выявлено наличие глицирризиновой кислоты в большом количестве, 18-глицерретовой кислоты, флавоноидов (ликвиритина и ликвиритигенина), халконов и изофлавонов.

Экспериментальную модель БА создавали путем введения бета-амилоида (фрагмент аминокислотного остатка 25-35) (Bachem AG) в четвертый желудочек мозга [5]. Бета-амилоид вводили с помощью инъекционной иглы размером G27, которую продвигали на глубину 3,8 мм в соответствии с атласом мозга крысы [5]. Бета-амилоид инъецировали со скоростью 1,2 микролитра/мин с помощью шприца Гамильтона в суммарной дозе 15 микрограмм агрегированного бета-амилоида в 5 мкл стерильной бидистиллированной воды. Животным контрольной группы в четвертый желудочек мозга вводили 5 мкл стерильной бидистиллированной воды. Модель деменции Альцгеймеровского типа у крыс развивалась на 15 сутки после операции.

Сухой очищенный экстракт корней солодки голой вводили в двух разных дозах – низкой (0,5 мг/кг, внутривнутрибрюшинно) и высокой (5,0 мг/кг, внутривнутрибрюшинно) на основании

предыдущих наших исследований в течение 28 дней [1]. Введение сухого экстракта корней солодки голой осуществляли спустя 14-ти дневного постоперационного периода, т.е. начиная с 15-го дня после создания модели БА, ежедневно, 1 раз в день в объеме 0,1 мл на 100 г массы тела животного. В качестве позитивного фармакологического контроля был выбран хорошо известный ингибитор ацетилхолинэстеразы – галантамина гидробромид (Сигма, США), который вводили в дозе 1,0 мг/кг, внутривентриально, 1 раз в день, в течение 28 дней. Контрольные животные получали физиологический раствор в эквивалентном объеме.

Было сформировано 6 групп самцов крыс по 10 особей в каждой: 1 – контрольные интактные крысы, получавшие физиологический раствор; 2 – интактные крысы, получавшие галантамина гидробромид; 3 – интактные крысы, получавшие сухой экстракт солодки голой в дозе 0,5 мг/кг, внутривентриально; 4 – интактные крысы, получавшие сухой экстракт солодки голой в дозе 5,0 мг/кг, внутривентриально; 5 – крысы с экспериментальной моделью БА, получавшие физиологический раствор; 6 – крысы с экспериментальной моделью БА, получавшие галантамина гидробромид; 7 – крысы с экспериментальной моделью БА, получавшие сухой экстракт солодки голой в низкой дозе (0,5 мг/кг, внутривентриально); 8 – крысы с экспериментальной моделью БА, получавшие сухой экстракт солодки голой в высокой дозе (5,0 мг/кг, внутривентриально); 9 – крысы с экспериментальной моделью БА, получавшие сухой экстракт солодки голой в низкой дозе в сочетании с галантамином; 10 – крысы с экспериментальной моделью БА, получавшие сухой экстракт солодки голой в высокой дозе в сочетании с галантамином.

Для изучения эффектов сухого экстракта солодки голой на процессы обучения и памяти в условиях экспериментальной модели БА были использованы разные парадигмы. Для оценки непространственного обучения был выбран тест условной реакции пассивного избегания (УРПИ), а для пространственного обучения – водный лабиринт Морриса [5]. Изменение структуры поведения под влиянием сухого экстракта солодки голой у крыс с моделью экспериментальной БА регистрировали в стандартном тесте «открытое поле». Биохимические тесты по определению активности ацетилхолинэстеразы (АХЭ) и бутирилхолинэстеразы (БХЭ) в коре головного мозга проводили с использованием тест-наборов *in vitro* Abscam ab241010 (Китай) и Abscam ab138871 (Китай), соответственно, на биохимическом анализаторе Sapphire 400 (Sapphire, Япония). Активности АХЭ и БХЭ выражали в ммоль/мин/г ткани. Активности супероксиддисмутазы (СОД) и глутатионпероксидазы (ГПО) в сыворотке крови определяли с помощью тест-наборов Randox и Ransel (Randox Laboratories Ltd, Великобритания), соответственно, согласно инструкциям производителя на биохимическом анализаторе ThermoFisher Multiscan FC (ThermoFisher, Германия). Активность СОД (Ед/мг белка) рассчитывалась как отношение рассчитанной активности (Ед/л) на концентрацию белка в пробе (мкг/мл). Активность ГПО выражалась в ммоль/мин/л, при этом одна единица активности фермента определялась как окисление 1 мкмоль НАДФН за минуту. Активность каталазы (КАТ) оценивали посредством спектрофотометрическим методом с использованием спектрофотометра Shimadzu UV-2401PC (Shimadzu, Япония), основанном на измерении скорости разложения перекиси водорода КАТ за минуту [105].

Данные экспериментов подвергали статистическому анализу с применением пакета статистических программ SPSS 10.0 (StatSoft, Inc) с использованием двухфакторного дисперсионного анализа при $P < 0.05$ с использованием теста Тьюки. При отсутствии нормального распределения, выполняли тест Краскала-Уоллиса. В диаграммах значения представлены в виде $M \pm m$, где: M – среднее арифметическое, m – среднеквадратичная ошибка среднего арифметического.

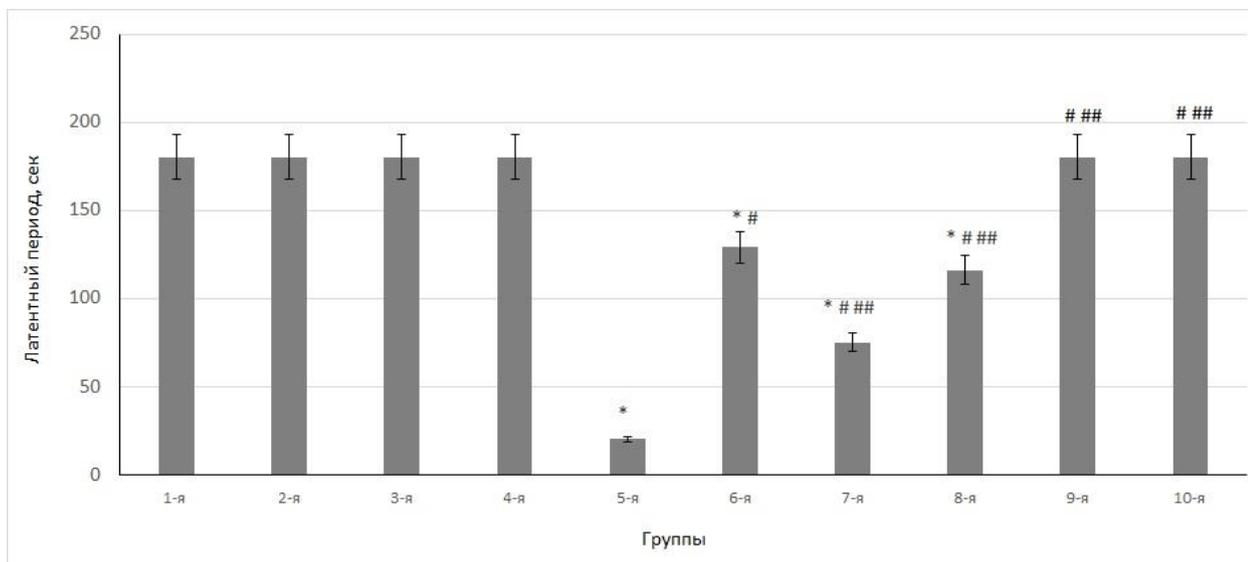
РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

В ходе экспериментальных исследований установлено, что внутривентриальное введение галантамина гидробромид или сухого экстракта солодки голой как в низкой, так и

в высокой дозах, однотипно не меняют параметры воспроизведения УРПИ и значения ЛП поиска скрытой платформы в водном лабиринте Морриса у крыс, принадлежим к группам 2, 3 и 4, по сравнению с контрольными животными ($p > 0,05$, рис. 1 и 2).

У крыс с экспериментальной БА (группа 5) в тесте УРПИ выявлено резкое снижение ЛП захождения животного в светлую камеру через 24 часа после обучения по сравнению с группой интактных крыс (группа 1) ($p < 0,05$). Аналогичные данные об ухудшении способности животных с экспериментальной БА к пространственному обучению в тренировочной и опытной сессиях также отмечались и в водном тесте Морриса по сравнению с контрольной группой ($p < 0,05$, рис. 1 и 2). Наряду с этим, в группе 5 были отмечены выраженное снижение общей двигательной активности, исследовательской активности и представленности груминга по сравнению с группой интактных крыс (группа 1) ($p < 0,05$, табл. 1).

В группе крыс с экспериментальной БА, получавших галантамина гидробромид, происходило увеличение значения показателя воспроизведения УРПИ по сравнению с группой крыс с экспериментальной БА (группа 5) ($p < 0,05$, рис. 1).

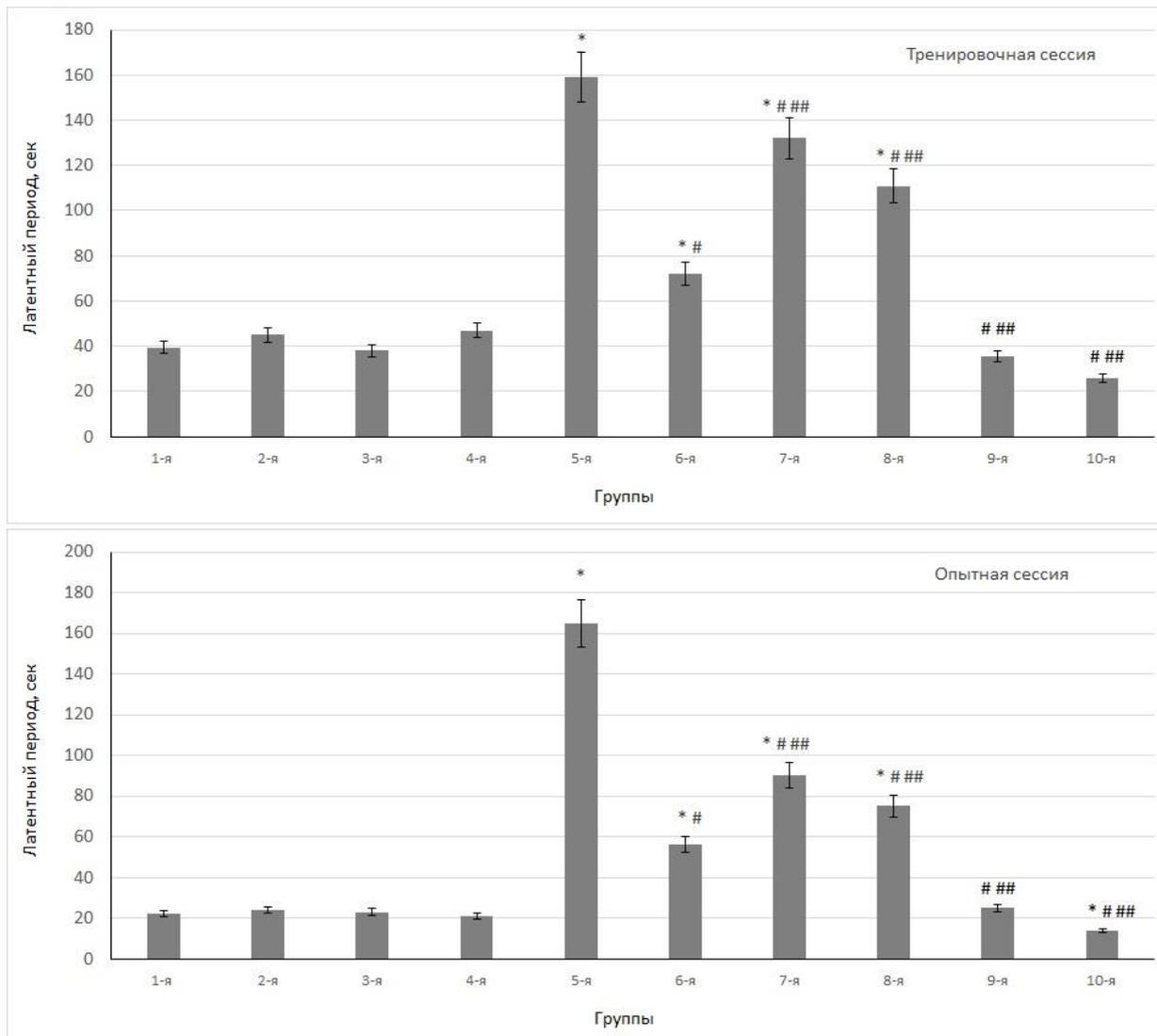


Сухой экстракт солодки голой в низкой дозе (0,5 мг/кг, внутривенно), введенный изолированно или в комбинации с галантамином, также вызывал повышение параметра воспроизведения УРПИ по сравнению с группой крыс с экспериментальной БА (группа 5), хотя этот показатель и был достоверно ниже по сравнению со значениями позитивного и интактного контролей ($p < 0,05$, рис. 1). У животных 8-ой группы, которым вводили сухой экстракт солодки голой в высокой дозе (5,0 мг/кг, внутривенно), показатель воспроизведения УРПИ статистически значимо повышался по сравнению с группой 5 ($p < 0,05$). Сочетанное введение галантамина гидробромида и сухого экстракта солодки голой в высокой дозе приводило к суммации антиамнестических эффектов обоих веществ, что выражалось в восстановлении способности животных с экспериментальной БА к непространственному обучению, причем данный показатель был сопоставим по значению с таковым в группе 1 ($p < 0,05$, рис. 1).

При введении галантамина гидробромида крысам с экспериментальной БА ЛП поиска скрытой платформы в одном тесте Морриса уменьшался по сравнению с группой 5 ($p < 0,05$, рис. 2). На фоне введения сухого экстракта солодки голой в обеих дозах наблюдалось достоверное снижение ЛП поиска скрытой платформы по сравнению с группой крыс с экспериментальной БА (группа 5) ($p < 0,05$, рис. 2). Комбинированное введение галантамина гидробромида и сухого экстракта солодки голой в низкой дозе снижало ЛП поиска скрытой платформы по сравнению с группой 5 ($p < 0,05$, рис. 2). ЛП поиска скрытой платформы у

крыс, получавших сухой экстракт солодки голой в высокой дозе совместно с галантамином гидробромидом, был ниже по сравнению с группой 5, позитивным и интактным контролями.

Хроническое введение галантамина гидробромида повышало исследовательскую активность и груминговый компонент поведения у крыс с экспериментальной БА по



сравнению с группой 5 ($p < 0,05$, табл. 1). У крыс с экспериментальной БА сухой экстракт солодки голой в низкой дозе (0,5 мг/кг, внутривбрюшинно, группа 7) индуцировал рост общей двигательной и исследовательской активности, а также представленности груминга по сравнению с группой крыс с экспериментальной БА (группа 5) ($p < 0,05$, табл. 1). На фоне введения сухого экстракта солодки голой в высокой дозе (5,0 мг/кг, внутривбрюшинно, группа 8) отмечалось полное восстановление всех регистрируемых поведенческих параметров по сравнению с группой 5 ($p < 0,05$, табл. 1). Аналогичные закономерности были выявлены и в группах крыс, получавших сухой экстракт солодки в обеих дозах в комбинации с галантамином гидробромидом. Характерно, что значения общей двигательной активности, исследовательской активности и груминговых реакций были идентичны сходным показателям в контрольной группе ($p < 0,05$, табл. 1).

Биохимические исследования показали, что у крыс с экспериментальной БА (группа 5) отмечалось повышение активности АХЭ и БХЭ, при одновременном снижении всех ферментов антиоксидантной защиты (СОД, КАТ и ГПО) в коре головного мозга по

Влияние хронического введения сухого очищенного экстракта солодки голой на поведение крыс с экспериментальной болезнью Альцгеймера в тесте «открытое поле»

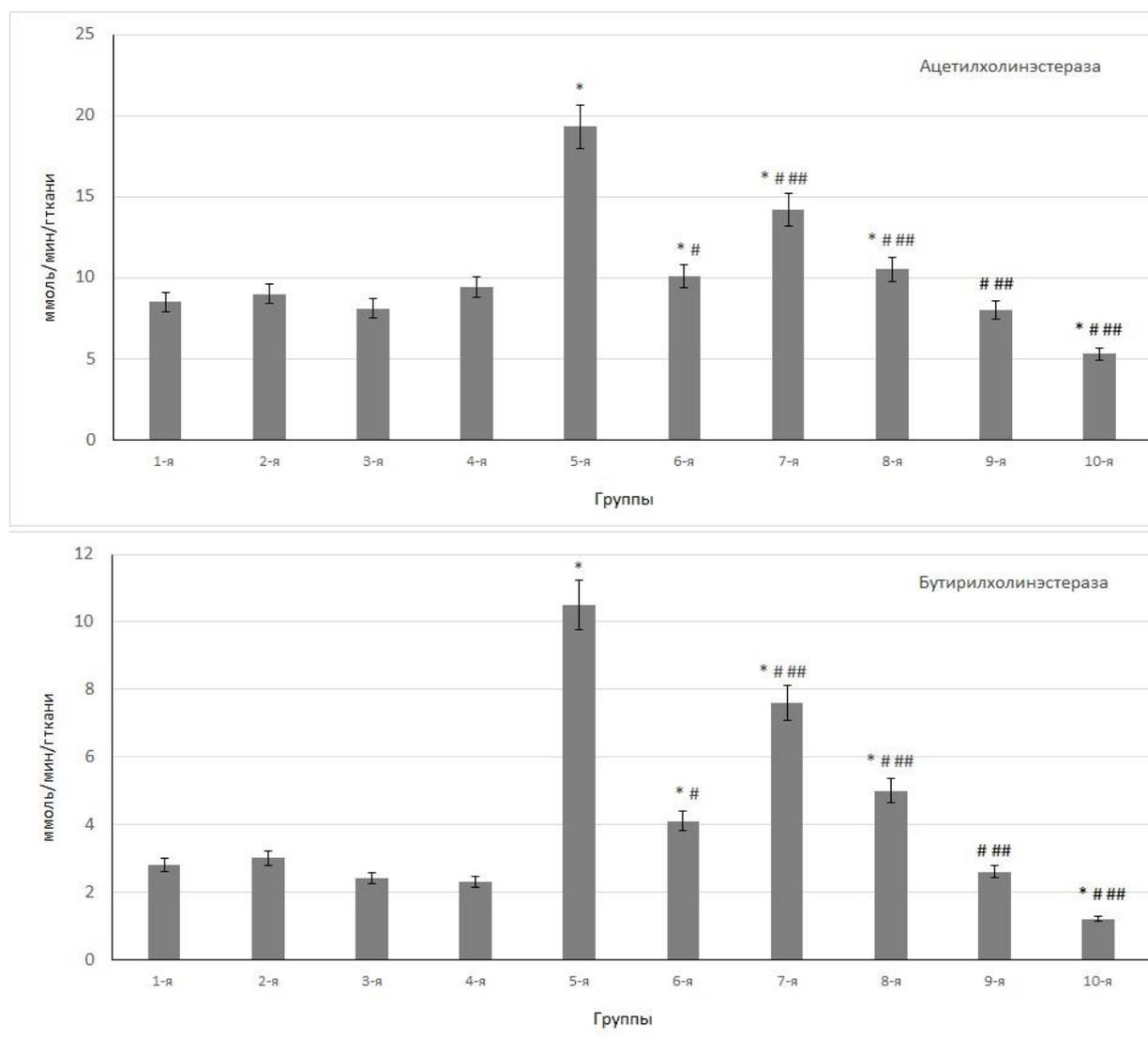
Группы животных	Перемещение, раз	Вставание, раз	Груминг, раз
Интактные крысы + Физ. раствор (контроль)	62,5 ± 5,8	11,0 ± 0,8	3,2 ± 0,3
Интактные крысы + галантамин	70,9 ± 3,4	12,2 ± 0,8	3,4 ± 0,7
Интактные крысы + СОЭС 0,5 мг/кг	64,5 ± 5,6	13,5 ± 0,6	3,2 ± 0,2
Интактные крысы + СОЭС 5,0 мг/кг	78,1 ± 5,7	12,7 ± 0,8	3,1 ± 0,8
Крысы с ЭБА + физ. раствор	35,7 ± 2,9*	5,3 ± 0,8*	0,6 ± 0,2*
Крысы с ЭБА + галантамин	55,3 ± 4,2#	9,2 ± 0,8#	2,6 ± 0,5#
Крысы с ЭБА + СОЭС 0,5 мг/кг	49,5 ± 2,4#	10,8 ± 2,6#	3,0 ± 0,2#
Крысы с ЭБА + СОЭС 5,0 мг/кг	68,7 ± 3,2#	11,2 ± 0,8#	3,4 ± 0,8#
Крысы с ЭБА + галантамин + СОЭС 0,5 мг/кг	66,5 ± 3,8#	13,1 ± 1,2#	3,2 ± 0,3#
Крысы с ЭБА + галантамин + СОЭС 5,0 мг/кг	71,0 ± 6,5#	12,2 ± 1,6#	3,5 ± 0,2#

Примечание: ЭБА – экспериментальная болезнь Альцгеймера, СОЭС – сухой очищенный экстракт солодки голой; * – $p < 0,05$, достоверное отличие от контрольных интактных крыс; # – $p < 0,05$, достоверное отличие от крыс с ЭБА, получавших физиологический раствор (патологический контроль).

сравнению с группой интактных крыс (группа 1) ($p < 0,05$, рис. 3 и табл. 2). Длительное введение сухого экстракта солодки голой дозо-зависимо понижало активности АХЭ и БХЭ в гомогенатах коры головного мозга у крыс с экспериментальной БА по сравнению с патологическим контролем (группа крыс с экспериментальной БА), получавшими физиологический раствор ($p < 0,05$, рис. 3 и табл. 2), хотя эти показатели и были достоверно ниже позитивного и интактного контролей. Комбинированное введение галантамина гидробромида и сухого экстракта солодки голой в низкой дозе снижало активности АХЭ и БХЭ по сравнению с группой 5 ($p < 0,05$, рис. 3 и табл. 2). Активности АХЭ и БХЭ у крыс с экспериментальной БА, получавших сухой экстракт солодки голой в высокой дозе совместно с галантамином гидробромидом, были ниже по сравнению с группой 5, позитивным и интактным контролями, соответственно.

Параллельно, у крыс групп 7 и 8 также отмечалось дозо-зависимое повышение активностей СОД, КАТ и ГПО в сыворотке крови по сравнению с патологическим контролем ($p < 0,05$, табл. 2). Галантамина гидробромид и сухой экстракт солодки голой в низкой дозе повышали активности СОД, КАТ и ГПО у крыс с экспериментальной БА по сравнению с группой 5 ($p < 0,05$, табл. 2). Показатели активности СОД, КАТ и ГПО у крыс, получавших сухой экстракт солодки голой в высокой дозе совместно с галантамином

гидробромидом, были выше по сравнению с группой 5, позитивным и интактным контролями, соответственно ($p < 0,05$, табл. 2).



Проведенное исследование позволило выявить дозо-зависимый антиамнестический эффект сухого экстракта солодки голой в тестах УРПИ и водном лабиринте Морриса. Причем, в водном тесте Морриса и в парадигме УРПИ был обнаружен аддитивный антиамнестический эффект применения сухого экстракта солодки голой в высокой дозе в сочетании с галантамином гидробромидом у крыс с экспериментальной БА, который превосходил антиамнестические эффекты галантамина гидробромида или сухого экстракта солодки голой в этой же дозе, введенных отдельно друг от друга. Параллельно с улучшением выполнения когнитивных тестов, у крыс с экспериментальной БА при введении сухого экстракта солодки в низкой или высокой дозах также наблюдалось дозо-зависимое восстановление структуры поведения, характерной для интактного контроля. При этом, эффекты сухого экстракта солодки голой на поведение превосходили поведенческие эффекты галантамина гидробромида у крыс с экспериментальной БА в тесте «открытое поле». Тем не менее, какого-либо суммарного позитивного эффекта при введении сухого экстракта солодки в разных дозах и галантамина гидробромида на поведение у крыс с экспериментальной БА в тесте «открытое поле» выявлено не было. Полученные данные позволяют сделать вывод о том, что аддитивный корректирующий эффект при совместном использовании сухого экстракта солодки голой и галантамина гидробромида в большей

степени реализуется на когнитивные функции, чем на поведенческие реакции. Кроме того, сухой экстракт солодки голой *per se* способен в зависимости от применяемой дозы корректировать или полностью восстанавливать нарушенную структуру поведения у крыс с экспериментальной БА до параметров интактного контроля, в отличие от действия галантамина гидробромида.

Таблица 2

Влияние хронического введения сухого очищенного экстракта солодки голой на активность ферментов антиоксидантной системы в сыворотке крови у крыс с экспериментальной болезнью Альцгеймера

Группы животных	СОД, Е/мг белка	КАТ, моль/мин×л	ГПО, ммоль/мин×л
Интактные крысы + Физ. раствор (контроль)	0,30 (0,23-0,36)	4,2 (3,5-4,7)	610,2 (405,1-683,5)
Интактные крысы + галантамин	0,40 (0,27-0,48)	4,0 (2,6-4,8)	626,2 (487,4-699,5)
Интактные крысы + СОЭС 0,5 мг/кг	0,33 (0,18-0,51)	4,1 (2,4-4,3)	647,2 (507,7-700,1)
Интактные крысы + СОЭС 5,0 мг/кг	0,48 (0,26-0,55)	4,9 (3,8-5,0)	628,1 (437,3-690,7)
Крысы с ЭБА + физ. раствор	0,11 (0,05-0,23)*	1,2 (0,8-3,2)*	236,7 (213,1-394,1)*
Крысы с ЭБА + галантамин	0,22 (0,17-0,35)*#	2,9 (2,3-3,7)*#	532,5 (345,6-583,4)*###
Крысы с ЭБА + СОЭС 0,5 мг/кг	0,15 (0,10-0,27)*#	1,8 (1,2-4,1)*###	304,9 (300,3-414,4)*###
Крысы с ЭБА + СОЭС 5,0 мг/кг	0,20 (0,18-0,30)*#	2,7 (1,6-3,5)*###	467,0 (345,6-583,4)*###
Крысы с ЭБА + галантамин + СОЭС 0,5 мг/кг	0,31 (0,21-0,37)###	4,1 (2,9-4,4)###	624,2 (412,2-698,9)###
Крысы с ЭБА + галантамин + СОЭС 5,0 мг/кг	0,58 (0,34-0,71)*###	5,6 (3,4-6,2)*###	785,5 (563,4-806,2)*###

Примечание: ЭБА – экспериментальная болезнь Альцгеймера, СОЭС – сухой очищенный экстракт солодки голой, СОД – супероксиддисмутаза, КАТ – каталаза, ГПО – глутатионпероксидаза; * – $p < 0,05$, достоверное отличие от контрольных интактных крыс; # – $p < 0,05$, достоверное отличие от крыс с ЭБА, получавших физиологический раствор (патологический контроль); ## – $p < 0,05$, достоверное отличие от крыс с ЭБА, получавших галантамина гидробромид (позитивный контроль). Данные представлены в виде $M \pm m$, количество животных в группах – $N=10$.

Когнитивные эффекты применения сухого экстракта солодки сопровождались улучшением биохимических показателей активностей ферментов холинергической системы и антиоксидантной системы защиты. Так, изолированное введение сухого экстракта солодки голой дозо-зависимо корректировало параметры активностей АХЭ и БХЭ в коре головного мозга, а также существенно улучшало показатели активностей СОД, КАТ и ГП в сыворотке крови у крыс с экспериментальной БА. Сочетанное введение сухого экстракта солодки голой в низкой дозе с галантамина гидробромидом полностью нормализует параметры ферментов антиоксидантной системы и холинергической системы головного мозга у крыс с

экспериментальной БА до значений контрольной интактной группы. В то же время, при введении сухого экстракта солодки голой в высокой дозе в сочетании с галантамином гидробромидом однонаправленно проявляется аддитивный сходный корригирующий эффект обоих веществ у крыс с экспериментальной БА, что приводит к еще большему падению активностей АХЭ и БХЭ (ниже уровня контрольной группы) и росту активностей ферментов антиоксидантной системы (выше уровня контрольной группы) по сравнению с интактным контролем. Биохимические данные позволяют говорить о том, что корректирующие когнитивные эффекты применения сухого экстракта солодки голой изолированно или в комбинации с галантамином гидробромидом сопровождается аналогичными корректирующими изменениями в степени активностей ферментов холинергической системы и антиоксидантной системы защиты.

Одной из стратегий терапии БА являются мероприятия, направленные на подавление степени активации окислительного стресса и восстановление функций холинергической системы [14]. Широко применяемые ингибиторы ацетилхолинэстеразы имеют ограничения в использовании, вследствие развития ряда побочных эффектов при их длительном использовании, включая тошноту, диарею и рвоту, а также гепатотоксическое действие на печень [14]. Арсенал антиоксидантных препаратов, купирующих проявления окислительного стресса при БА, также немногочислен [14]. Учитывая вышеизложенное, весьма перспективен и актуален поиск дополнительных средств, преимущественно растительного происхождения для коррекции проявлений БА [2,8]. В этой связи внимание исследователей привлекает солодка голая (*Glycyrrhiza glabra* L.) [6,7]. Так, показано, что экстракт солодки голой стимулирует рост нервных дендритов гиппокампа, улучшает память, оказывает противосудорожное действие, проявляет антиоксидантную активность, ингибируя процессы свободнорадикального окисления липидов, влияет на функционирование нейромедиаторных систем, а также оказывает гепатопротекторное действие [6,9-12,15]. Результаты исследований показывают, что перечисленные выше эффекты солодки голой на головной мозг во многом обусловлены действием таких компонентов солодки, как глицирризин, глицерретовая кислота, ликвиритигенин и глабридин [7].

Экспериментально установлено, что водный экстракт корня солодки голой стимулирует рост нервных дендритов гиппокампа. Так, при пероральном введении водного экстракта солодки голой самцам крыс линии Вистар в дозах 150,0 мг/кг и 225,0 мг/кг обнаружено усиление дендритной арборизации в апикальных и базальных дендритов в пирамидальных нейронах гиппокампа в поле СА₃ [4]. На экспериментальной модели БА с использованием β -амилоида (1-42) у мышей *in vitro* и *in vivo* были выявлены позитивные эффекты глицирризина или ликвиритигенина на процессы обучения и памяти, а также на биохимические показатели ферментов антиоксидантной системы, что выражалось в усилении их ферментативной активности [15]. Согласно данным литературы, водный экстракт солодки голой в дозах (75, 150, 225, и 300 мг/кг, перорально), введенный перорально в течение 6 недель, проявляет антиамнестическое действие в различных когнитивных тестах и на фармакологической модели амнезии, обусловленной введением диазепама. У старых мышей была выявлена способность глицирризина, введенного перорально, восстанавливать способность животных к пространственному обучению в тесте в водном Морриса в условиях моделирования патологии, сходной с БА [6,7]. В исследованиях *in vitro* показано, что синтетические производные глицирризина и глицирризиновой кислоты могут проявлять ингибирующие свойства в отношении ферментов АХЭ и БХЭ [9,10,12]. При изучении противосудорожных эффектов водного и спиртового экстрактов солодки голой (100, 200, and 400 мг/кг, перорально) была найдена их способность повышать активность СОД и КАТ в головном мозге [15]. Было выявлено, что при введении глабридина в дозах 2,0 и 4,0 мг/кг, перорально, отмечалось резкое снижение активности АХЭ головного мозга у мышей на модели скополаминовой амнезии [7,9]. Принимая во внимание роль воспалительных и окислительных процессов в прогрессирование нейродегенеративных расстройств, улучшение функции памяти и обучения могут быть также связаны с

противовоспалительными и антиоксидантными свойствами биологически активных веществ, содержащихся в солодке голой [6,7]. Данные литературы указывают на то, что производные глицирризина дозо-зависимо стимулируют активность протеинкиназы А (ПКА), которая играет важную роль в трансдукции сигнала, участвующего в функции клетки, путем ферментного фосфолирования специфических полипептидов. Стимулирование фосфорилирования ПКА может быть связано с биохимическими и молекулярными механизмами действия глицирризина. Исследования показали, что дефицит памяти, индуцированный ингибированием ПКА, может быть связан с измененной передачей в холинергической нейромедиаторной системе. По-видимому, под влиянием глицирризина происходит стимуляция ПКА, что приводит к увеличению синтеза и высвобождения ацетилхолина и как следствие, улучшения памяти [7].

Можно полагать, что выявленные нами позитивные когнитивные эффекты сухого очищенного экстракта солодки голой и биохимическая коррекция активности ферментов антиоксидантной системы и холинергической системы головного мозга, обусловлены ее комплексным составом, в котором есть глицирризин, глицерретовой кислоты, ликвиритигенин и глабридин, а также ряд других биологически активных соединений. Однако для четкого и однозначного ответа на вопрос о том, какой именно компонент или группа компонентов в составе солодки голой ответственны за позитивные эффекты сухого экстракта солодки голой при экспериментальной БА необходимо проведение дальнейших молекулярно-биохимических исследований.

Таким образом, применение сухого экстракта солодки голой в сочетании с галантамином гидробромидом можно рассматривать как перспективный подход для восстановления когнитивных процессов, активности ферментов холинергической системы головного мозга и активности ферментов антиоксидантной системы при экспериментальной модели БА. Причем, сочетанное введение ингибиторов АХЭ и препаратов растительного происхождения на основе солодки голой может предотвращать и устранять нежелательные токсичные побочные эффекты ингибиторов АХЭ на гепатобилиарную систему [11]. Целесообразно также проведение дальнейших исследований, посвященных изучению возможности применения препаратов солодки голой для их использования в качестве дополнительных средств в комплексной терапии БА.

ВЫВОДЫ

1. Хроническое введение сухого экстракта солодки голой в низкой дозе (0,5 мг/кг, внутрибрюшинно, 1 раз в день, 28 дней) улучшает пространственное в водном тесте Морриса и улучшает непространственное обучение в тесте УРПИ при экспериментальной БА.

2. Хроническое введение сухого экстракта солодки голой в низкой дозе (0,5 мг/кг, внутрибрюшинно, 1 раз в день, 28 дней) снижает активность ацетилхолинэстеразы и бутирилхолинэстеразы в коре головного мозга и повышает активность супероксиддисмутазы, каталазы, глутатионпероксидазы в сыворотке крови.

3. Изолированное введение сухого экстракта солодки голой в высокой дозе (5,0 мг/кг, внутрибрюшинно, 1 раз в день, 28 дней) улучшает пространственное в водном тесте Морриса и улучшает непространственное обучение в тесте УРПИ при экспериментальной БА.

4. Введение сухого экстракта солодки голой в высокой дозе (5,0 мг/кг, внутрибрюшинно, 1 раз в день, 28 дней) снижает активность ацетилхолинэстеразы и бутирилхолинэстеразы в коре головного мозга и повышает активность супероксиддисмутазы, каталазы, глутатионпероксидазы, соответственно.

5. Комбинированное введение сухого экстракта солодки голой в низкой дозе (0,5 мг/кг, внутрибрюшинно, 1 раз в день, 28 дней) и галантамина гидробромид (1,0 мг/кг, внутрибрюшинно, 1 раз в день, 28 дней) улучшает пространственное в водном тесте

Морриса и улучшает непространственное обучение в тесте УРПИ при экспериментальной БА, снижает активность ацетилхолинэстеразы и бутирилхолинэстеразы в коре головного мозга и повышает активность супероксиддисмутазы, каталазы, глутатионпероксидазы в сыворотке крови при экспериментальной БА.

б. Комбинированное введение сухого экстракта солодки голой в высокой дозе (5,0 мг/кг, внутривнутрибрюшинно, 1 раз в день, 28 дней) и галантамина гидробромида (1,0 мг/кг, внутривнутрибрюшинно, 1 раз в день, 28 дней) улучшает пространственное в водном тесте Морриса и улучшает непространственное обучение в тесте УРПИ, снижает активность ацетилхолинэстеразы и бутирилхолинэстеразы в коре головного мозга и повышает активность супероксиддисмутазы, каталазы, глутатионпероксидазы в сыворотке крови при экспериментальной БА.

ЛИТЕРАТУРА

1. M. Akram, A. Nawaz *Neural Regeneration Res.* **12**(4): 660-670 (2017). Алц и травы
2. V. Cavallucci, M. D'Amelio, F. Cecconi *Mol. Neurobiol.* **45**(2): 366-378 (2012).
3. K. K. Chakravarthi, A. Ramakrishna *J. Nat. Sci. Biol. Med.* **5**(1): 25-29 (2014).
4. J. Fedotova, V. Soultanov, T. Nikitina, T. Roschin, N. Ordayn *Phytomed.* **19**: 451-456 (2012).
5. S. Gonzalez-Reyes, J.J. Santillan-Cigales et al. *Epilepsy Res.* **126**: 126-133 (2016)
6. H. Hosseinzadeh, M. Nassiri-Asl Pharmacological Effects of Glycyrrhiza spp. and its Bioactive Constituents: Update and Review. *Phytother. Res.* **12**(29): 1868-1886 (2015).
7. H.G. Kim, M.S. Oh *Cur. Pharmaceut. Des.* **18**: 57-75 (2012).
8. Y.H. Ko, S.H. Kwon, S.Y. Lee, C.G. Jang *Arch. Pharm. Res.* **40**(10): 1209-1217 (2017).
9. R.T. Liu, J.T. Tang, L.B. Zou, J.Y. Fu et al. *Eur. J. Pharmacol.* **669**: 76-83 (2011). Liu, R.T.
10. S.M. Park, S.H. Ki, N.R. Han, I.J. Cho et al. *Biol. Pharm. Bull.* **38**(2):184-192 (2015).
11. S. Schwarz, S.D. Lucas, S. Sommerwerk, R. Csuk *Bioorg. Med. Chem.* **22**(13): 3370-3378 (2014).
12. W. Thies, L. Bleiler *Alzheimer's Dement.* **7**(2): 208-244 (2011).
13. K.H. Wong, M.K. Riaz, Y. Xie, X. Zhang et al. *Int. J. Mol. Sci.* –**20**(2): pii: E381 (2019). Wong K.H. Review of current strategies for delivering Alzheimer's disease drugs across the blood-brain barrier / K.H. Wong, M.K. Riaz, Y. Xie, X. Zhang et al. *Int. J. Mol. Sci.* –**20**(2): pii: E381 (2019).
14. L.H. Zeng, H.D. Zhang, C.J. Xu, Y.J. Bian et al. *J. Zhejiang Univ. Sci. B.* **14**(11):1004-1012 (2013).
15. H. Zhao, S.L. Wang, L. Qian, J.L. Jin et al. *CNS Neurosci. Ther.* **19**(2): 117-124 (2013).

ESTIMATION OF DRY EXTRACT OF GLYCYRRHIZA GLABRA EFFICACY FOR APPLICATION AT EXPERIMENTAL MODEL OF ALZHEIMER'S DESEASE

A.V. Koshkina, O.V. Volkova, Yu.O. Fedotova, D.A. Baranenko

Faculty of Food technologies and engineering Department of Chemistry and Molecular biology, ITMO University, 49 Kronversky pr., St. Petersburg 197101, Russia

Abstract. The aim of this study was determination of chronic application efficacy for dry extract of Glycyrrhiza glabra at low (1 time in day for 28 days, i.p., 0,5 mg/kg) and high (1 time in day for 28 days, i.p., 5,0 mg/kg) doses on learning and memory processes on

experimental model of Alzheimer's disease. Moreover, dry extract of *Glycyrrhiza glabra* effects on activity of acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase in the cortex and activity of antioxidant system enzymes (superoxiddismutase, catalaza and glutathioneperoxidase) at experimental model of Alzheimer's disease were tested. Administration of dry extract of *Glycyrrhiza glabra* at high dose (5,0 mg/kg, i.p.) improved on spatial learning in water Morris maze and non-spatial learning in passive avoidance performance test, as well as decreased acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase activities in the cortex and increased superoxiddismutase, catalaza and glutathioneperoxidase activities in the blood, respectively, at experimental model of Alzheimer's disease. The combined administration of dry extract of *Glycyrrhiza glabra* in high dose with galantamine hydrobromide more markedly stimulated ability of animals to spatial and non-spatial learning, and amplified antioxidant system enzymes activities in the blood, simultaneously markedly reduced antioxidant system enzymes at experimental model of Alzheimer's disease. Thus, chronic application for dry extract of *Glycyrrhiza glabra* in combination with galantamine hydrobromide might be beneficial approach for restoration of cognitive processes, activity for enzymes of cholinergic system and activity of antioxidant system enzymes Alzheimer's disease.

Key words: *Glycyrrhiza glabra*, Alzheimer's disease, acetylcholinesterase, butyrylcholinesterase, antioxidant system enzymes, β -(25-35)-amyloid

Подписи к рисункам

Рисунок № 1. Влияние хронического введения сухого очищенного экстракта солодки голой, введенного изолированно или в комбинации с галантамином гидробромидом, на воспроизведение УРПИ у крыс с экспериментальной болезнью Альцгеймера.

Ось X – группы животных,

Ось Y – латентный период, сек

Группы животных: 11 – контрольные интактные крысы, получавшие физиологический раствор; 2 – интактные крысы, получавшие галантамина гидробромид; 3 – интактные крысы, получавшие сухой экстракт солодки голой в дозе 0,5 мг/кг, внутрибрюшинно; 4 – интактные крысы, получавшие сухой экстракт солодки голой в дозе 5,0 мг/кг, внутрибрюшинно; 5 – крысы с ЭБА, получавшие физиологический раствор; 6 – крысы с ЭБА, получавшие галантамина гидробромид; 7 – крысы с ЭБА, получавшие сухой экстракт солодки голой в низкой дозе (0,5 мг/кг, внутрибрюшинно); 8 – крысы с ЭБА, получавшие сухой экстракт солодки голой в высокой дозе (5,0 мг/кг, внутрибрюшинно); 9 – крысы с ЭБА, получавшие сухой экстракт солодки голой в низкой дозе в сочетании с галантамином; 10 – крысы с ЭБА, получавшие сухой экстракт солодки голой в высокой дозе в сочетании с галантамином.

Примечание: ЭБА – экспериментальная болезнь Альцгеймера, СОЭС – сухой очищенный экстракт солодки голой; * – $p < 0,05$, достоверное отличие от контрольных интактных крыс; # – $p < 0,05$, достоверное отличие от крыс с ЭБА, получавших физиологический раствор (патологический контроль); ## – $p < 0,05$, достоверное отличие от крыс с ЭБА, получавших галантамина гидромид (позитивный контроль). Данные представлены в виде $M \pm m$, количество животных в группах – $N=10$.

Рисунок № 2. Влияние хронического введения сухого очищенного экстракта солодки голой, введенного изолированно или в комбинации с галантамином гидробромидом, на непространственное обучение в водном тесте Морриса.

Ось X – группы животных,

Ось Y – латентный период, сек

Группы животных: 11 – контрольные интактные крысы, получавшие физиологический раствор; 2 – интактные крысы, получавшие галантамина гидробромид; 3 – интактные крысы, получавшие сухой экстракт солодки голой в дозе 0,5 мг/кг, внутрибрюшинно; 4 – интактные крысы, получавшие сухой экстракт солодки голой в дозе 5,0 мг/кг, внутрибрюшинно; 5 – крысы с ЭБА, получавшие физиологический раствор; 6 – крысы с ЭБА, получавшие галантамина гидробромид; 7 – крысы с ЭБА, получавшие сухой экстракт солодки голой в низкой дозе (0,5 мг/кг, внутрибрюшинно); 8 – крысы с ЭБА, получавшие сухой экстракт солодки голой в высокой дозе (5,0 мг/кг, внутрибрюшинно); 9 – крысы с ЭБА, получавшие сухой экстракт солодки голой в низкой дозе в сочетании с галантамином; 10 – крысы с ЭБА, получавшие сухой экстракт солодки голой в высокой дозе в сочетании с галантамином.

Примечание: ЭБА – экспериментальная болезнь Альцгеймера, СОЭС – сухой очищенный экстракт солодки голой; * – $p < 0,05$, достоверное отличие от контрольных интактных крыс; # – $p < 0,05$, достоверное отличие от крыс с ЭБА, получавших физиологический раствор (патологический контроль); ## – $p < 0,05$, достоверное отличие от крыс с ЭБА, получавших галантамина гидромид (позитивный контроль). Данные представлены в виде $M \pm m$, количество животных в группах – $N=10$.

Рисунок № 3. Влияние хронического введения сухого очищенного экстракта солодки голой, введенного изолированно или в комбинации с галантамином гидробромидом на активность ацетилхолинэстеразы и бутирилхолинэстеразы в коре головного мозга у крыс с экспериментальной болезнью Альцгеймера.

Ось X – группы животных,

Ось Y – концентрация, ммоль/мин/г ткани

Группы животных: 11 – контрольные интактные крысы, получавшие физиологический раствор; 2 – интактные крысы, получавшие галантамина гидробромид; 3 – интактные крысы, получавшие сухой экстракт солодки голой в дозе 0,5 мг/кг, внутрибрюшинно; 4 – интактные крысы, получавшие сухой экстракт солодки голой в дозе 5,0 мг/кг, внутрибрюшинно; 5 – крысы с ЭБА, получавшие физиологический раствор; 6 – крысы с ЭБА, получавшие галантамина гидробромид; 7 – крысы с ЭБА, получавшие сухой экстракт солодки голой в низкой дозе (0,5 мг/кг, внутрибрюшинно); 8 – крысы с ЭБА, получавшие сухой экстракт солодки голой в высокой дозе (5,0 мг/кг, внутрибрюшинно); 9 – крысы с ЭБА, получавшие сухой экстракт солодки голой в низкой дозе в сочетании с галантамином; 10 – крысы с ЭБА, получавшие сухой экстракт солодки голой в высокой дозе в сочетании с галантамином.

Примечание: ЭБА – экспериментальная болезнь Альцгеймера, СОЭС – сухой очищенный экстракт солодки голой, АХЭ – ацетилхолинэстераза, БХЭ – бутирилхолинэстераза; * – $p < 0,05$, достоверное отличие от контрольных интактных крыс; # – $p < 0,05$, достоверное отличие от крыс с ЭБА, получавших физиологический раствор (патологический контроль); ## – $p < 0,05$, достоверное отличие от крыс с ЭБА, получавших галантамина гидромид (позитивный контроль). Данные представлены в виде $M \pm m$, количество животных в группах – $N=10$.