

Klinički centar "Novi Sad", Institut za sudsku medicinu, Novi Sad¹
Medicinski fakultet Novi Sad,
Zavod za fiziologiju²
Zavod za anatomiju³
Institut za mentalno zdravlje, Beograd⁴
Prirodno-matematički fakultet Novi Sad
Departman za hemiju⁵

Originalni naučni rad
Original study
UDK 612.82.085:[633.8:581.19]

UTICAJ EKSTRAKTA GINKO BILOBE NA EKSPERIMENTALNI MODEL EPILEPSIJE

EFFECTS OF GINKGO BILOBA EXTRACT ON AN EXPERIMENTAL MODEL OF EPILEPSY

Vladimir PILIJA¹, Vesna IVETIĆ², Marija MIHALJ³, Saveta DRAGANIĆ-GAJIĆ⁴ i Mira POPOVIĆ⁵

Sažetak - U tradicionalnoj kineskoj medicini korišćeni su ekstrakti ginko bilobe u lečenju različitih patoloških stanja organizma. U proteklih 10 godina biohemijskim analizama otkriveni su konstituenti ekstrakta koji su našli primenu u klasičnoj medicini. Saznanja o svojstvu ove biljke dala su nov podstrek za izučavanje i bolje poznavanje dejstva aktivnih komponenti iz ekstrakta ginko bilobe na centralni nervni sistem. Otuda je cilj našeg istraživanja bio da ispitamo dejstvo ginko bilobe na centralni nervni sistem, praćenjem njegovog uticaja na eksperimentalno izazvanu epilepsiju. Za ispitivanje uticaja ekstrakta ginko bilobe na eksperimentalni (kindling) model epilepsije, registrovana je bioelektrična aktivnost (EEG). Rezultati istraživanja govore u prilog prokonvulzivnog efekta ginko bilobe.

Ključne reči: Ginko biloba; Epilepsija; Centralni nervni sistem; Elektroencefalografija; Činčila

Uvod

Ginko biloba, biljka iz familije *Ginkgoaceae*, privlači čovekovu pažnju preko 2000 godina. U tradicionalnoj kineskoj medicini korišćeni su ekstrakti ove biljke u lečenju kašlja, astme i dijareje [1].

U poslednjih 10 godina biohemijskim analizama otkriveni su konstituenti ekstrakta koji su našli primenu i u klasičnoj medicini. Danas se zna da ginko biloba sadrži: flavonoide, ginkolide A, B i C, bilobalide i ginkoličnu kiselinu [2,3].

Aktivne supstance iz ekstrakta ostvaruju prvenstveno uticaj na muskarinske receptore i nešto manji na adrenergične receptore. Eksperimentalno je dokazano da primena ekstrakta ginko bilobe inhibiše opadanje broja muskarinskih i α_1 adrenergičkih receptora (koje se fiziološki odvija tokom života) i istovremeno poboljšava preuzimanje holina u sinapsama i otklanja toksične slobodne radikale. Ovi efekti su najmanifestniji u predelu limbičkog mozga, prvenstveno hipokampusa [4,5]. U poslednje vreme analiziraju se i potencijalni efekti ginko bilobe na NMDA (N-metil-D-aspartat) receptore i posredstvom njih uticaj na epileptogena pražnjenja [6].

Cilj ovog rada bio je da se utvrdi uticaj ekstrakta ginko bilobe na eksperimentalnu epilepsiju.

Materijal i metode

Ispitivanja su izvedena na deset kunića srednje evropske rase činčila. Upotrebljavani su polno zreli kunići, oba pola, starosti od 2.5 do 3 meseca, telesne mase oko 3 kilograma. U istraživanju je korišćen zaštićeni nemački preparat *Gingium*. Rastvor

je standardizovan tako da 1 ml sadrži 40 mg suvog ekstrakta iz lišća ginko bilobe (35-67:1). Ekstrakcija je vršena uz pomoć 60 vol.% acetona. Jedan mililitar preparata sadrži: 8,8-10,8 mg ginko-flavonol-glikozida i 2-2,8 mg terpena s laktonskim prstenom (ginkolidi i bilobalidi).

Za ova istraživanja vršena je priprema životinja u dve faze. U prvoj fazi pripreme, eksperimentalnoj životinji je uz upotrebu lokalne anestezije odstranjivana koža i meko tkivo nad kostima lobanje. Nakon obavljenog operativnog zahvata primenjivana je antibiotska terapija, radi zaštite od infekcije. U drugoj fazi pripreme vršena je implantacija i fiksiranje elektroda eksperimentalnim životinjama. Korišćene su dve vrste elektroda: površne i duboke. Površne elektrode, uvedene su do unutrašnje površine kosti lobanje (*lamina interna*). Duboke elektrode su, posle pažljivog odstranjenja lamine interne i probijanja tvrde moždanice (*dura mater cranialis*), uvedene do CA₁ regiona hipokampusa (*regio III hippocampi proprii*).

Prvog dana posle implantacije elektroda pristupalo se formiranju epileptičnog žarišta. Formiranje epileptičnog žarišta (kindling žarište) izvedeno je elektrostimulacijom hipokampusa pravouglim električnim stimulima intenziteta 2V, frekvencije 50 Hz i dužine trajanja impulsa 2,5 ms. Elektrostimulacija se izvodila u toku 2 minuta; pauza između pojedinih elektrostimulacija bila je 20 minuta. Svakog eksperimentalnog dana ponavljano je 5 elektrostimulacija hipokampusa. Nakon poslednje elektrostimulacije svakog eksperimentalnog dana registrovana je bioelektrična aktivnost u toku najmanje 15 do 30 minuta. Registracija sumarne bioelektrične

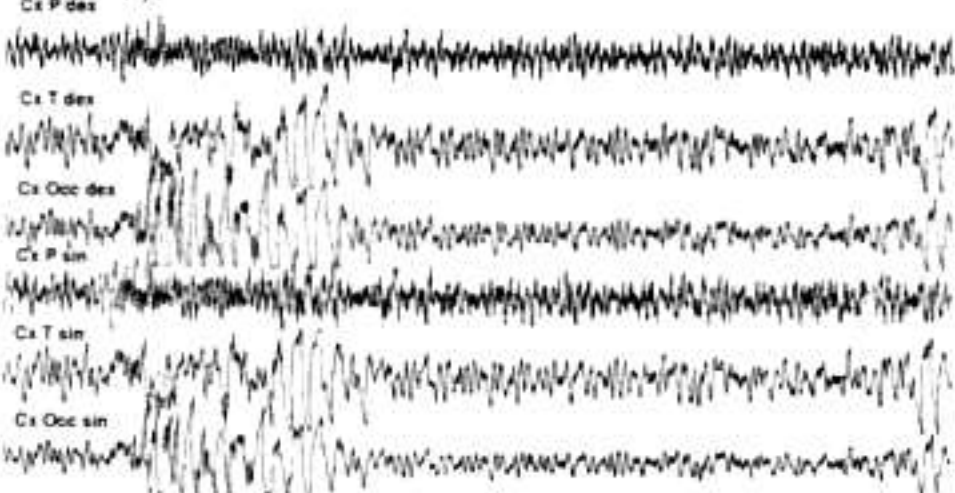
Skraćenice

NMDA	- N-metil-D-aspartat
GABA	- gama-amino-buterna-kiselina
CA3	- cornu ammonis, regio III hippocampi proprii

aktivnosti mozga vršena je monopolarno pomoću elektroencefalografa. U eksperimentu se vodilo računa koji hipokampus je stimulisan. Kod jedne eksperimentalne životinje stimulisan je isti hipokampus tokom celog toka istraživanja. Na taj način, kod pet životinja izvođena je elektrostimulacija desnog, a kod pet levog hipokampusa. Nakon formiranja epileptogenog žarišta, s pojedinom životinjom izvedeno je maksimalno 5 registracija. U toku svakog eksperimentalnog dana prvo je vršena jedna elektrostimulacija hipokampusa, a zatim je registrovana sumarna bioelektrična aktivnost. Preparat *Gingium* je primenjivan intramuskularno u pojedinačnoj dozi od 1 ml na kg telesne mase, odnosno ukupno 120 mg suvog ekstrakta ginkgo bilobe. Kunići kod kojih je formirano *kindling* žarište obeležavani su rimskim brojevima uz pridodat sufiks k (Ik -Xk). Tokom registracije EEG-a korišćena je brzina pokretanja papira na elektroencefalografu od 15 mm/s i rede od 30 mm/s. EEG zapis analiziran je vizuelnim putem uz pomoć Shutzovog brojača. U vremenskom intervalu od 60 minuta pre i 60 minuta posle primene ekstrakta ginkgo bilobe posmatrani su i upoređivani specifični grafoelementi (oštri talasi, šiljak talas kompleksi i druge paroksizmalne manifestacije).

Rezultati

Ponavljane elektrostimulacije kod svih eksperimentalnih životinja rezultirale su razvojem *kindling* žarišta i registracijom u elektroencefalogramu grafoelemenata karakterističnih za epilepsiju (zaoštavanje talasa i pojava vretena sa zaoštrenim talasima, Slika 1).

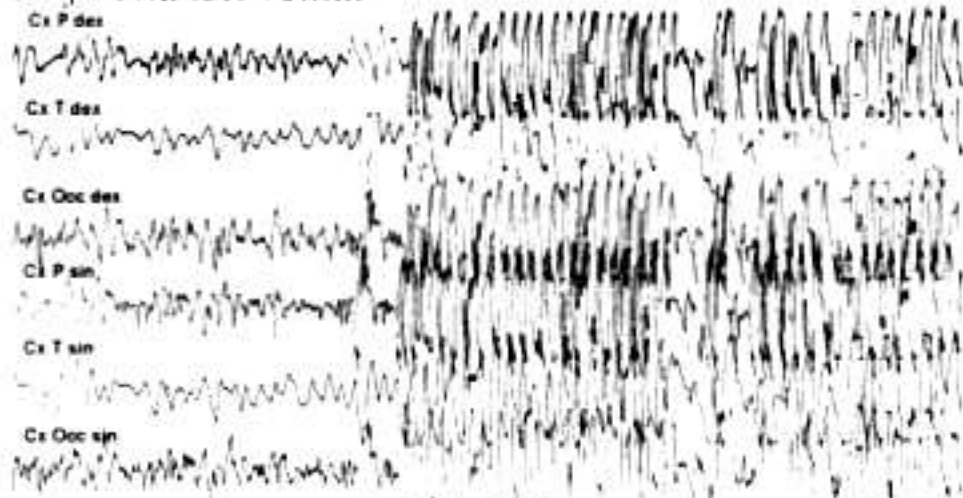


Slika 1. Spontana bioelektrična aktivnost pre davanja ginkgo bilobe kod *kindling* epilepsije

Fig. 1. Spontaneous bioelectrical activity before application of ginkgo biloba in kindling epilepsy

Kod 60% kunića kod kojih je formirano *kindling* žarište prva elektroencefalogramski uočena epileptogena pražnjenja razvijala su se neposredno po prestanku izvođenja elektrostimulacije hipokampu-

sa. Paroksizmalno pražnjenje specifičnog tipa bilo je na strani stimulisanog hipokampusa. Pojedina epileptogena pražnjenja su trajala različito ne samo kod različitih kunića već i za vreme jednog eksperimenta kod istog kunića i nisu prema mestima izbijanja bila istovetna.



Slika 2. Generalizovana epileptogena aktivnost oko 30 minuta nakon primene ginkgo bilobe

Fig. 2. Generalised epileptogenic activity around 30 minutes after application of ginkgo biloba

Statističkom obradom podataka utvrđeno je da su vrednosti "p" manje od 0,05, kada se porede podaci za period pre i posle primene ginkgo bilobe, odnosno da je postojala statistički značajno veća učestalost paroksizmalnih pražnjenja nakon primene ginkgo bilobe. Kod većine ispitivanih eksperimentalnih životinja, kako pre tako i posle primene ginkgo bilobe, epileptogena pražnjenja češće su se uočavala difuzno ili generalizovano nego lokalno (Slika 2). Broj oštarih, strmih i drugih manifestacija specifičnog pražnjenja 60 minuta pre aplikacije ginkgo bilobe i 60 minuta nakon primene prikazan je u Tabeli 1.

Tabela 1. Spontana epileptogena pražnjenja pre i posle primene ginkgo bilobe

Table 1. Spontaneous epileptogenic discharge before and after application of ginkgo biloba

	Ik	IIk	IIIk	IVk	Vk	VIk	VIIk	VIIIk	IXk	Xk
A	10	14	8	11	9	10	10	12	10	12
B	11	18	17	24	15	12	13	14	17	15

Rimskim brojevima označeni su kunići. Arapskim brojevima prikazan je broj epileptogenih pražnjenja.

A - Pre primene ekstrakta ginkgo bilobe; B - Posle primene ekstrakta ginkgo bilobe.

Roman numerals are for rabbits. Arabic numerals are for number of epileptogenic seizures.

A - before application of ginkgo biloba extract; B - after application of ginkgo biloba extract

Diskusija

Primenjeni model eksperimentalne *kindling* epilepsije s formiranjem žarišta u hipokampusu odbran je zbog izrazito niskog praga hipokampusa za epileptička pražnjenja. Pri određivanju parametara elektrostimulacije korišćeni su podaci da intenzitet

elektrostimulusa mora biti potpražni i da se stimulusi moraju ponavljati dovoljno dugo u pravilnim razmacima. Formirana žarišta uzrokovala su prvo fokalno hipersinhrono pražnjenje mase neurona koje se širilo na druge strukture i ponavljano javljalo u raznim elektroencefalogramski paroksizmalnim manifestacijama.

Naše rezultate moguće je objasniti direktnim delovanjem konstituenata ginko bilobe na GABA (gama-aminobuterna kiselina) receptore pri čemu se ostvaruje inhibicija hloridne propustljivosti i ostvaruje prokonvulzivno dejstvo. Pri analizi dobijenih rezultata od značaja su podaci o moždanoj strukturi u kojoj se odvija promena transmitterskih sistema. Tako je Sasaki sa saradnicima [7] 2002. godine ustanovio da tretman s bilobalidima rezultira signifikantnim povećanjem nivoa glutamata, aspartata, gama-aminobuterne kiseline i glicina u hipokampusu. Na nivou kortikalnih regiona povećava se sadržaj gama-aminobuterne kiseline, a smanjuje nivo aspartata, dok se u predelu strijatum povećava sadržaj glicina. Prokonvulzivna dejstva koja su uočena u našim istraživanjima odgovaraju zapažanjima Sasake i saradnika, da bilobalidi u hipokampusu povećavaju količinu glutamata i aspartata, a ukoliko bi se povećao i sadržaj gama-aminobuterne

kiseline, aktivnost struktura mozga bi se menjala u drugom pravcu.

Dobijeni rezultati se mogu tumačiti i analizom aktivnosti NMDA receptora prvenstveno limbičkih struktura mozga posle primene ekstrakta ginko bilobe. Prema rezultatima iz literature, posredstvom NMDA receptora ginko izaziva suprimaciju epileptogene aktivnosti [8]. Štaviše izvedeni su eksperimenti na životinjama u kojima je pokazano da bilobalidi kao konstituenti ekstrakta ginko bilobe, deluju inhibitorno na NMDA receptore čime se smanjuje hiperaktivnost neurona [9]. Sasvim suprotno, naši rezultati govore o prokonvulzivnom dejstvu ekstrakta ginko bilobe što odgovara kliničkom zapažanju da se epileptogena pražnjenja češće javljaju kod pacijenata koji dobijaju preparate na bazi ekstrakta ginko bilobe.

Zaključak

Na osnovu dobijenih rezultata naših istraživanja može se izvesti zaključak da ekstrakt ginko bilobe ispoljava prokonvulzivno dejstvo. Ovaj efekat bi se mogao dovesti u vezu s nekim flavonoidima i još uvek nedovoljno istraženim terpenima s laktonskim prstenom [10].

Literatura

1. Schulz V, Hansel R, Tyler V. Rational phytotherapy. 4th ed. Berlin: Springer-Verlag; 2001.
2. Alaoui-Youssefi A. Antineoclastic effects of ginkgo biloba extract (EGB 761) and some of its constituents in irradiated rats. *Mutat Res* 1999;445:99-104.
3. Weichel O, Hilgert M, Chatterjee E. Bilobalide, a constituent of ginkgo biloba, inhibits NMDA induced phospholipase A2 activation and phospholipid breakdown in rat hippocampus. *Naunyn Schmiedeberg's Arch Pharmacol* 1999;360(6):609-15.
4. Kleijnen J, Knipschild P. Ginkgo biloba. *Lancet* 1992; 1136-9.
5. Chatterjee SS, Noeldner M. Behavioral observations demonstrating influence of the extract of Ginkgo biloba (Egb 761) on some specific central cholinergic systems. Abstract for the SPRING MEETING Of the Deutsche gesellschaft fuer pharmakologie und toxikologie. 1989:69-70.
6. Weichel O, Hilgert M, Chatterjee SS, Irehr M, Klein J. Bilobalide a constituent of Ginkgo biloba inhibits NMDA induced phospholipase A2 activation and phospholipid breakdown in rat hippocampus. *Proceedings of the 8th international congress of pharmacology*. Tokyo; 1999:484.
7. Sasaki K, Hatta S, Wada K, Itoh M, Yoshimura T, Haga M. Effects of chronic administration of bilobalide on amino acid levels in mouse brain. *Cell Mol Biol* 2002;48(6):681-4.
8. Le Bars PL, Kastelan J. Efficacy and safety of Ginkgo biloba extract. *Public Health Nutr* 2000;3 (4A):495-9.
9. Spinella M. Herbal medicines and epilepsy: the potential for benefit and adverse effects 2001;2(6):524-32.
10. Ganger AS. Ginkgo biloba precipitating epileptic seizures. *Age Ageing* 2001;30:523-5.

Summary

Introduction

The active ingredients of ginkgo biloba extracts were determined by biochemical analyses in the last ten years and they are widely used in classical medicine. The active substances of ginkgo biloba extract, mostly affect muscarinic receptors and adrenergic receptors to a lesser degree. Recently, potential effects of ginkgo biloba on NMDA receptors and on epileptogenic seizures have been considered. The main goal of this research was to investigate effects of ginkgo biloba extracts on the experimental model of epilepsy.

Material and methods

The research was carried out on chinchilla rabbits. GINGIUM solution was used with 40 mg in 1 ml of dry extract of ginkgo

biloba leaves. The epileptogenic area was formed by stimulating hippocampus. Bioelectrical activity was registered 60 minutes before the epileptogenic area was formed as well as 90 minutes later. Ginkgo biloba extract was given via IM, in a single daily dose of 1 ml/kg/BW.

Results

A statistically significantly higher frequency of paroxysmal seizures was established after usage of ginkgo biloba.

Conclusion

According to the results obtained in this research, we can conclude that ginkgo biloba extracts have a proconvulsive activity.

Key words: Ginkgo Biloba; Epilepsy; Central Nervous System; Electroencephalography; Chinchilla

Rad je primljen 30. I 2003.

Prihvaćen za štampu 24. II 2004.

BIBLID.0025-8105:(2004):LVII:11-12:541-544.