

<sup>1</sup> Інститут нейрохірургії ім. акад. А.П.Ромоданова АМН України, Київ,

<sup>2</sup> Київський національний університет ім. Тараса Шевченка,

<sup>3</sup> Київська медична академія післядипломної освіти ім. П.Л.Шурика

## ДОСЛІДЖЕННЯ ФРАКЦІЙНОГО СКЛАДУ НОВОГО ПРЕПАРАТУ ГРУПИ ТРОФІНОТРОПІВ – «ЦЕРЕБРАЛ»

**Ключові слова:** трофінотропіни, пептиди, протиінсультний препарат, фракціонування, гель-хроматографія

Проблема цереброваскулярних захворювань (ЦВЗ) є однією з найактуальніших у сучасній клінічній медицині в зв'язку зі значною частотою їх розвитку, великим відсотком інвалідизації та смертності [8].

Цереброваскулярна патологія та її ускладнення є найбільш поширеною за своїм перебігом та прогнозом для подальшого активного життя людини. Частота гострих ЦВЗ збільшується не тільки в економічно слабкорозвинених, а й у високорозвинених індустріальних країнах, таких як США та Японія. Щорічно у світі близько 15 млн, у США – 750 тис., Росії – 450 тис., Україні – 105–110 тис. осіб переносять первинний або повторний інсульт [6].

У нашій країні згідно з останніми даними центру медичної статистики МОЗ України близько 35,5 % усіх мозкових інсультів виникає в осіб працездатного віку. До кінця першого року після інсульту до праці повертаються приблизно 20 % осіб, що працювали до захворювання [3].

Інсульт є другою за частотою виникнення причиною смерті у світі. У 2005 р. він був причиною 5,7 млн фатальних випадків, прогнозується збільшення смертності від інсульту до 6,7 млн в 2015 р. та до 7,7 млн в 2030 р., якщо не будуть прийняті глобальні засоби з розв'язання цієї проблеми [9].

### **Сучасні підходи до терапії ЦВЗ, основні стратегії нейропротекції**

Мозок людини становить не більше 2 % від загальної маси тіла, але утилізує близько чверті всього кисню, що постачає організм, тому клітини головного мозку найбільш уразливі до кисневої недостатності, що є наслідком будь-якого ЦВЗ. При зниженні кровотоку в клітинах мозку спостерігаються зниження синтезу білка, селективна експресія генів, розвиток лактацидозу, формування вільних радикалів. У зоні набряку тканин мозку спостерігається гіпоксія та формується некроз, в основі якого лежить реакція глутамат-кальцієвого каскаду [4].

Медикаментозна нейропротекція або захист нейронів від травмивної дії ішемічного каскаду, нейрональної «смерті» на клітинному та молекулярному рівнях або корекція його наслідків має вагомим значенням як один з напрямів інтенсивної терапії гострої цереброваскулярної патології. Лікування будь-якого інсульту спрямоване на максимально можливе збереження морфофункціональної активності всього мозку, а не тільки безпосередньо ураженої ділянки. Тому метаболічний захист мозку є значущим компонентом базисної терапії ЦВЗ, у тому числі інсультів та їх особливо важких форм [1].

Із метою метаболічного захисту використовують лікарські засоби, що коригують енергетичний обмін у структурах мозку (пірацетам («Ноотропіл»), гаммалон («Аміналон»); антиоксиданти та антигіпоксанти (реланіум («Седуксен»), піридитол («Енцефабол»)); засоби, що мають нейротрансмітерну, нейротрофічну та нейромодулюючу дію («Церебралізін», «Кортексин», «Цитиколін» (цитидин-5'-дифосфохолін) – нейропротектори, нейротрофінотропні регуляторні фактори.

Останнім часом саме фармакологічним препаратам, які відносяться до ряду нового класу ноотропних засобів й активно беруть участь у нейрогенезі так званих нейротрофічних ростових факторів (НРФ), або нейротрофінів, приділяють значну увагу.

Крім відкритого першим фактора росту нервів до цього сімейства належать нейротрофічний фактор мозку нейротрофін-3, нейротрофін-4/5 (NT-3 и NT-4/5), лужний фактор

росту фібробластів (FGF) та ін. [11, 13].

Нейротрофінотропіни – це сімейство поліпептидів, які синтезуються у більшості церебральних структур у вигляді невеликих білків (не більше ніж 118 амінокислот) і належать до фізіологічно визначних пептидів, що регулюють ріст та диференціацію нейронів та забезпечують їх функціональну стійкість. У зрілому мозку НРФ здійснюють успішний захист дуже тендітних клітинних елементів від пошкодження, їм належить особлива роль у захисті та відновленні нейрональних структур при різноманітних (токсичних, ішемічних, травматичних) формах агресії. НРФ неопосередковано беруть участь у контролі над процесами апоптозу. Тож, можна стверджувати, що НРФ становлять групу факторів з полівалентною біологічною та фармакологічною дією.

### **Проблеми фармакологічної протекції ЦВЗ**

Концепція фармакологічної нейропротекції ЦВЗ на практиці виявилася досить складною медичною проблемою. Довготривалий пошук ефективних нейропротекторів не дав однозначних очікуваних позитивних результатів. Незважаючи на велику кількість експериментальних дослідів, у яких встановлено позитивні якості нових досліджуваних препаратів, у клінічних випробуваннях II і III фаз були виявлені значущі побічні ефекти, а застосування препаратів було недостатньо ефективним [7, 12]. При цьому токсичні ефекти зазвичай притаманні молекулам, що отримані методами хімічного синтезу, а препарати біологічного походження в процесі технологічної переробки та очищення втрачають первісну активність [2]. Крім того, для препаратів біологічного походження гостро стоїть проблема вивчення композиційного складу, без розв'язання якої препарат не можна просувати як фармацевтичний лікарський засіб.

Вочевидь, цим можна пояснити той факт, що сьогодні не існує клінічно задовільної нейропротекторної програми терапії гострого ішемічного інсульту, яка вірогідно підтверджувала би поліпшення закінчення захворювання на фоні застосування нейропротекторних засобів [10].

### **Завдання дослідження, об'єкти, методи та апаратура**

Метою цієї роботи є вивчення фракційного складу препарату з групи трофінотропінів – «Церебрал»; розроблений авторами [5] новий нейротропний протиінсультний препарат одержують з мозку свиней з експериментально відтвореним бінапівкульовим геморагічним інсультом (ГІ). Після виділення й обробки активної речовини отриманий препарат являє собою пептидний трофінотропний регуляторний фактор у відношенні цитокінів мозку, що активно утворюється клітинами ушкоджених тканин мозку в постінсультний (посттравматичний) період. Цей фактор прискорює процес відновлення і функції альтерованих нейронів, виявляє тригерну, нейроцитопротекторну, трофінотропну та антиоксидантну дію.

«Церебрал» запропоновано для лікування найгострішого і гострого періодів розвитку ГІ і фаз декомпенсації, у перспективі буде використаний для лікування неврологічних захворювань і станів, що супроводжуються надходженням крові в мозок чи у ліквор, органічних захворювань головного мозку (дитячий церебральний параліч, розсіяний склероз, СДАТ тощо).

Фракціонування досліджуваного та контрольного препаратів (контрольний препарат отримували з кори головного мозку інтактних тварин способом, аналогічним технології виділення препарату «Церебрал») проводили методом гель-хроматографії на колонці (1,5 x 50 см), заповненій сефадексом G-15 (фірма «Pharmacia», Швеція).

Ліофільно висушений вміст 5 ампул окремо препарату «Церебрал» та контрольного препарату розчиняли в 2 мл 0,9 % натрію хлориду, наносили на колонку, попередньо урівноважену в 0,1 М натрій-фосфатному буфері з рН 8,0 та злюювали зі швидкістю 15 мл/год.

Фракціонування проводили при температурі 4°C. Пробірки з окремими порціями елюату (збирали в кожному пробірці по 3 мл) накопичували, вимірювали оптичну густину на УФ-спектрофотометрі «НМ/Holochrome» (фірма «Gilson», Франція).

Для визначення молекулярних мас окремих фракцій отримували хроматограму молекулярно-масового розподілу для розчину порівняння, який містив маркери молекулярних мас (d,l-фенілаланін (М.м.=165), глутамилтриптофан (М.м.=351), лейциненкефалін (М.м.=556), окситоцин (М.м.=1007), ангіотензин I (М.м.=1297), бичачий сироватковий альбумін (компонент, що не утримується на колонці) (М.м.=66000) (фірма «Sigma», USA).

Розраховували об'єм утримування кожного з компонентів розчину порівняння ( $V_e$ ), приймаючи пік бичачого сироваткового альбуміну як мертвий об'єм ( $V_0$ ). Будували калібрувальний графік для залежності відношення ( $V_e/V_0$ ) від логарифма молекулярних мас.

Дослідження фракційного складу за молекулярно-масовим розподілом свідчить, що

I фракція складається з білків та олігопептидів з М.м більше за 1500 Да, II фракція містить поліпептиди з М.м. 1250–1070 Да, III фракція – пептиди з М.м. 680–370 Да, IV фракція – амінокислоти та низькомолекулярні пептиди з М.м. менше за 250 Да.

Статистичну обробку отриманих результатів проводили за допомогою програмного забезпечення «Statistica» (компанія «StatSoft», 2008).

### Результати дослідження та їх обговорення

Дослідження складу препарату «Церебрал» та контрольного препарату методом гель-фільтрації на сефадексі G-15 дає картину молекулярно-масового розподілу компонентів, що представлено на рис. 1. Значення оптичної густини нефракціонованих препаратів – «Церебрал» та контрольного препарату наведені в табл. 1.

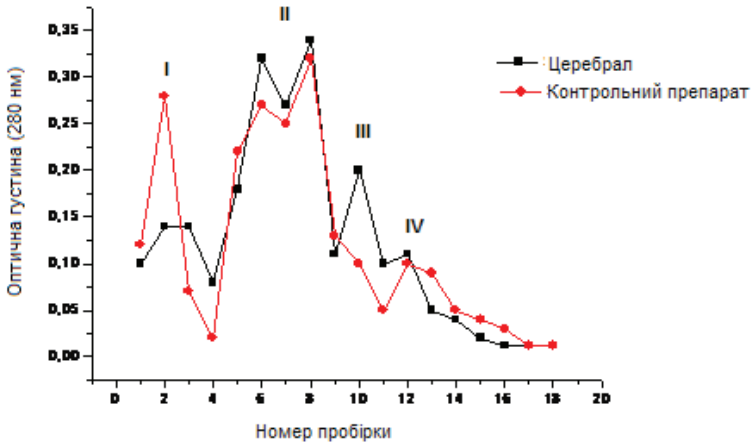


Рис.1. Фракційні склади препарату «Церебрал» та контрольного препарату

### Таблиця 1

Значення оптичної густини нефракціонованого препарату «Церебрал» та нефракціонованого контрольного препарату в діапазоні 200–350 нм

Довжина хвилі	Досліджуваний об'єкт	«Церебрал» (екстракт кори головного мозку дослідних тварин)	Контрольний препарат (екстракт кори головного мозку контрольних тварин)	P – вірогідність різниці середніх значень
200		2.55±0.03	2.63±0.03	>0.05
210		2.47±0.04	2.62±0.03	<0.01
220		1.62±0.10	1.80±0.06	>0.05
230		0.99±0.06	1.17±0.04	<0.05
240		0.57±0.03	0.66±0.02	<0.05
250		0.55±0.02	0.57±0.02	>0.05
260		0.62±0.02	0.56±0.02	>0.05
270		0.64±0.03	0.55±0.02	>0.05
280		0.46±0.02	0.51±0.02	>0.05
290		0.32±0.02	0.40±0.02	<0.02
300		0.21±0.01	0.28±0.02	<0.05
310		0.15±0.01	0.21±0.03	>0.05
320		0.12±0.01	0.16±0.03	>0.05
330		0.10±0.01	0.15±0.02	>0.05
340		0.09±0.01	0.13±0.02	>0.05
350		0.08±0.01	0.12±0.02	>0.05

Порівняльні спектри поглинання препарату «Церебрал» та контрольного препарату представлено на рис. 2

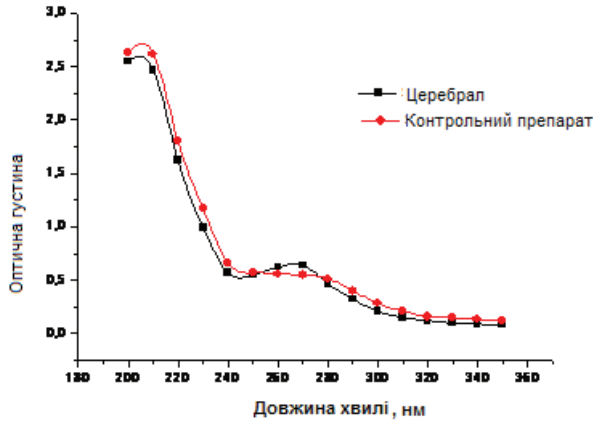


Рис. 2. Спектри поглинання препарату «Церебрал» та контрольного препарату

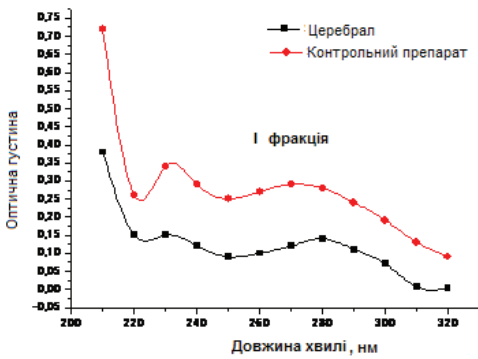
Експериментальні значення вимірів оптичної густини основних фракцій (I-IV) для препарату «Церебрал» та контрольного препарату наведено в табл. 2

**Таблиця 2**

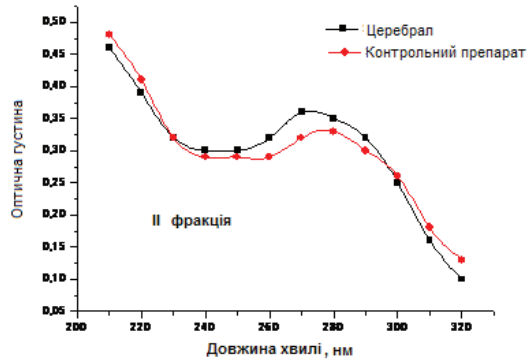
Значення оптичної густини фракцій I-IV препарату «Церебрал» та контрольного препарату в діапазоні 210–320 нм

Препарат	Номер фракції	Довжина хвилі, нм											
		210	220	230	240	250	260	270	280	290	300	310	320
Контрольний препарат	1	0,72	0,26	0,34	0,29	0,25	0,27	0,29	0,28	0,24	0,19	0,13	0,09
	2	0,48	0,41	0,32	0,29	0,29	0,29	0,32	0,33	0,3	0,26	0,18	0,13
	3	0,3	0,16	0,14	0,13	0,13	0,12	0,12	0,11	0,1	0,08	0,06	0,05
	4	0,27	0,19	0,15	0,14	0,13	0,12	0,11	0,1	0,09	0,08	0,07	0,06
«Церебрал»	1	0,38	0,15	0,15	0,12	0,09	0,1	0,12	0,14	0,11	0,07	0,006	0,003
	2	0,46	0,39	0,32	0,3	0,3	0,32	0,36	0,35	0,32	0,25	0,16	0,1
	3	0,36	0,26	0,23	0,22	0,21	0,21	0,22	0,22	0,19	0,16	0,12	0,1
	4	0,26	0,18	0,16	0,15	0,14	0,13	0,12	0,11	0,09	0,07	0,06	0,05

На рис. 3 (а–г) представлені порівняльні спектри оптичного поглинання фракцій, отриманих при гель-хроматографічному розділенні екстрактів кори головного мозку контрольних та дослідних груп тварин.



а)



б)

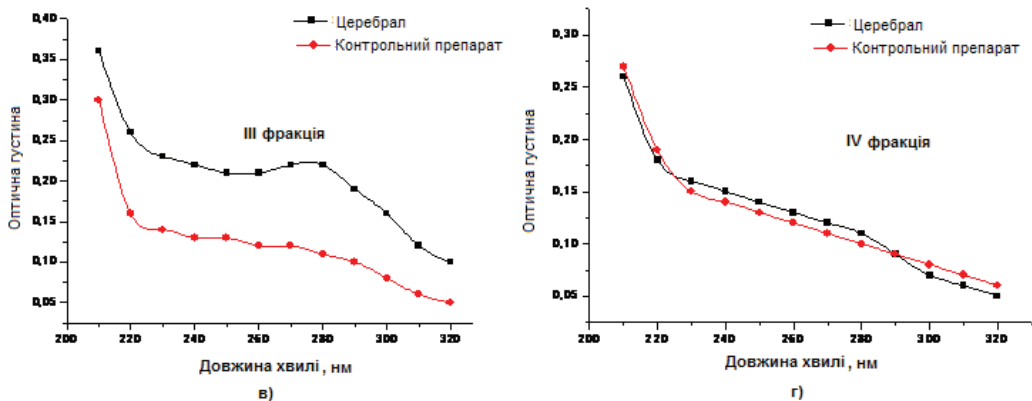


Рис. 3. Спектри поглинання окремих фракцій препарату «Церебрал» та контрольного препарату: а) I фракція; б) II фракція; в) III фракція; г) IV фракція

### В и с н о в к и

1. У роботі розглянуто результати, отримані при порівняльному дослідженні складу екстрактів кори великих півкуль головного мозку дослідних тварин («Церебрал») та контрольних тварин.

2. Спектри препарату «Церебрал» та контрольного препарату мають приблизно однаковий рівень оптичної густини, але максимум поглинання препарату «Церебрал» становить 270 нм, у той час як контрольний препарат має не чітко виражений максимум при 280 нм.

3. Екстракти кори головного мозку дослідних та контрольних тварин складаються з чотирьох основних пептидних фракцій. Дослідження фракційного складу за молекулярно-масовим розподілом свідчить, що I фракція складається з білків та олігопептидів з М.м. більше за 1500 Да, II фракція містить поліпептиди з М.м. 1250–1070 Да, III фракція – пептиди з М.м. 680–370 Да, IV фракція – амінокислоти та низькомолекулярні пептиди з М.м. менше за 250 Да.

4. Фракції I та III препарату «Церебрал» та контрольного препарату відповідно мають найбільші відмінності в спектрах: фракція I контрольного препарату містить більше високомолекулярних пептидів, ніж фракція I препарату «Церебрал», але якісний склад досить близький, що підтверджується максимумами поглинання при 230 нм та 270–280 нм.

5. II і III фракції препарату «Церебрал» містять пептиди середніх молекулярних мас, що характеризуються поглинанням при 270 нм, в той час як фракція III контрольного препарату відрізняється від фракції III препарату «Церебрал» низьким вмістом цих поліпептидів.

6. Фракції IV препарату «Церебрал» та контрольного препарату схожі та містять низькомолекулярні пептиди та амінокислоти.

Таким чином, результати дослідження переконливо свідчать про якісну різницю в здатності вмішувати (накопичувати) індивідуальні речовини пептидної природи мозком тварин, які успішно перенесли гострий інсульт, у порівнянні з мозком інтактних тварин.

1. Виленский Б.С. Инсульт. СПб: Мед. информ. агенство, – 1995. – 288 с.

2. Віничук С.М. Нейропротекція в гострий період мозкового інсульту: аналіз причин неефективності нейропротекторів при клінічних випробуваннях// Український медичний часопис. – № 3(65). – V–VI. – 2008. – С. 4–13.

3. Виничук С.Н. Новые возможности патогенетической коррекции ишемических поврежденных ткани головного мозга: взгляд на проблему// Український медичний часопис. – № 2(70). – III–IV. – 2009. – С. 17–22.

4. Гусев Е.И., Скворцова В.И. Ишемия головного мозга. – М.: Медицина, 2001. – 328 с.

5. Макаренко О.М., Корольов Ю.Н. Засіб «Церебрал» для лікування інсульту та спосіб його отримання. Патент України № 24299 від 07.07.1998, МКИ А61К 35/30.

6. Міщенко Т.С. // Журнал української асоціації боротьби з інсультом. – 2006. – Vol. 1. – Р. 3–7.

7. Arakawa S., Perera N., Donnan G.A. Neuroprotection in stroke. ACNR, 5(5). – 2005. – P. 10–11.

8. Brainin M., Bornstein N., Boysen G. And Demarin V. for the EFNS Task Force on Acute Neurological Stroke Care. Acute neurological stroke care in Europe: results of the European Stroke

Care Inventory// European Journal of Neurologi. – 2000. – Vol. 7. – P. 5–10.

9. *Culebras A.* Stroke is preventable catastrophic disease. // Журн. неврологии и психиатрии им. С.С.Корсакова (Приложение к журналу «Инсульт»). Материалы II Российского международного конгресса «Цереброваскулярная патология и инсульт», 2007. – С. 75–76.

10. European Stroke Organisation (ESO) Executive Committee; ESO Writing Committee, 2008.

11. *Miller M.D., Krangel M.S.* Biology and biochemistry of the chemokines: A family of chemotactic and inflammatory cytokines// Crit. Res. Immunol. – Vol.17. – 1992. – P. 12–18.

12. *Muir K.W., Teal P.A.* // J. Neurol., 252(9). – 2005. – P. 1011–1020.

13. *Voon Wee Young.* Cytokines, Astroglisis and Neurotrophism following CNS Trauma. In: Ransohoff, R.M.; Benveniste, E.N., eds. Cytokines and the CNS, New York-London-Tokyo: CRC Press; 1996. – P. 309–327.

Надійшла до редакції 26.05.2011.

*И.Г.Васильева, А.Н.Макаренко, Ю.Н.Королев, Ю.К.Карандеева*

#### ИССЛЕДОВАНИЕ ФРАКЦИОННОГО СОСТАВА НОВОГО ПРЕПАРАТА ГРУППЫ ТРОФИНОТРОПИНОВ – «ЦЕРЕБРАЛ»

**Ключевые слова:** трофинотропины, пептиды, противоинсультный препарат, фракционирование, гель-хроматография

Новый нейротропный противоинсультный препарат «Церебрал» получают из мозга свиней с экспериментально воспроизведенным биполушарным гемморагическим инсультом. После выделения и обработки активного вещества полученный препарат представляет собой пептидный трофинотропный регуляторный фактор в отношении цитокинов мозга, которые активно образуются клетками поврежденных тканей мозга в постинсультный (посттравматический) период.

При разделении на гель-хроматографической колонке получены 4 основные фракции препарата, для которых определены средние молекулярные массы. Выявленные отличия фракционного состава препарата «Церебрал» (экстракта коры головного мозга свиней, успешно перенесших биполушарный гемморагический инсульт) и контрольного препарата (экстракта коры головного мозга интактных животных) свидетельствуют о различной способности интактной и «обработанной инсультом» тканей мозга накапливать индивидуальные вещества пептидной природы.

*I.Vasileva, A.Makarenko, Yu.Korolov, Yu.Karandeyeva*

#### STUDY OF FRACTIONAL COMPOSITION OF THE NEW DRUG OF TROPHINOTROPINES GROUPS – CEREBRAL

**Key words:** trophinotropins, peptides, antistroke preparation, fractionation, gel chromatography

#### SUMMARY

New neurotropic drug of trophinotropines group Cerebral get from brain of pigs with experimentally reproduced hemorrhagic stroke. After extraction and processing of the active substance obtained preparation is a peptide trophinotropic regulatory factor for brain cytokines, which are actively produced by cells of damaged brain tissue in post-stroke (post-traumatic) period.

When it is splinted on the gel-chromatography column were obtained 4 general factions of the drug for which the average molecular weights was determined.

Identified differences between the fractional composition Cerebral (extract of the cerebral cortex of pigs successfully underwent hemorrhagic stroke) and the control of the drug (extract cortex of intact animals) show different abilities intact and “treated stroke “of brain tissue to accumulate individual substances of peptide nature.