

# ФАРМАКОЛОГИЯ СЕРДЕЧНО-СОСУДИСТОЙ СИСТЕМЫ

## СРАВНИТЕЛЬНОЕ ИЗУЧЕНИЕ АНТИИНСУЛЬТНОЙ АКТИВНОСТИ ЦЕРЕБРАЛА И ЕГО ОТДЕЛЬНЫХ СУБФРАКЦИЙ В ЭКСПЕРИМЕНТЕ

А. Н. Макаренко<sup>3</sup>, Н. С. Косицин<sup>1</sup>, И. В. Назимов<sup>2</sup>, М. М. Свинов<sup>1</sup>,  
Е. В. Голобородько<sup>1</sup>, Н. В. Пасикова<sup>1</sup>

Проведен сравнительный анализ состава препаратов церебрал, церебролизин и церебролизат-М. По числу компонентов и их количественному содержанию церебрал существенно отличается от церебролизина и церебролизата-М. В опытах на белых крысах на модели двустороннего геморрагического инсульта исследована эффективность отдельных фракций и субфракций церебрала. По показателям общего состояния, восстановления поведенческой активности и морфологическим показателям наиболее выраженное антиинсультное действие выявлено при изучении фракции 1 церебрала. Из этой фракции выделены 3 субфракции. Наиболее перспективными для дальнейшего изучения оказались вещества, составляющие субфракцию 1.2.

**Ключевые слова:** экспериментальный геморрагический инсульт, антиинсультное действие, церебрал, хроматография, экспериментальная фармакотерапия инсульта, нейротропная, фракции и субфракции церебрала

### ВВЕДЕНИЕ

Изучение механизмов действия комплексных нейрометаболических препаратов, антиоксидантов природного происхождения, органопрепаратов, наиболее перспективных для лечения цереброваскулярных заболеваний, сдерживается из-за отсутствия точных данных об их качественном и количественном составе, а также в связи с затруднениями при стандартизации этих препаратов, особенностями технологии их получения, вариабельностью параметров используемого сырья, отсутствием сведений о ведущем фармакологическом агенте. Остается малоизученной роль остальных веществ смеси в усилении или ослаблении основного лечебного эффекта [3].

Одной из актуальных задач является выявление активного начала в виде индивидуальных веществ, входящих в состав комплексных препаратов и обладающих противоишемным действием.

Сложный состав и полифармакологический характер действия не являются в настоящее время препятствием для изучения известных нейрометаболических препаратов [3, 14] или разрабатываемых потенциальных лекарственных композиций [10, 14]. Интерес к данной группе определяется значением регуляторных, нейротрофических ростовых факторов, которые могут быть применены для лечения ряда острых цереброваскулярных и хронических нейродегенеративных заболеваний [9].

Одним из перспективных новых лекарственных средств является церебрал. В предыдущих исследованиях показана его эффективность [6]. В экспериментах на мелких лабораторных животных установлено, что церебрал оказывает влияние на содержание NGF и иммунную систему [1, 2]. Однако точно не известно, какое именно вещество (или вещества), входящие в состав этого поликомпонентного лекарственного средства, определяют его фармакологическую активность.

Таким образом, стоит задача выделения индивидуального вещества содержащегося в препарате, обладающего основным противоишемным действием.

Целью настоящей работы явилось проведение сравнительного биохимического анализа церебрала и аналогичных препаратов — церебролизина и церебролизата-М, а также разделение церебрала на отдельные фракции и субфракции и изучение их эффективности.

Методы исследования

### МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Для химического анализа использовали образцы церебрала (ОАО “Днепрофарм”, Украина), представляющие лиофильно высушенный препарат в стеклянных ампулах, который после растворения *ex tempore* в дистиллированной воде использовали в виде носовых капель. Стандартизация данного средства осуществлена после предварительного изучения фракционного и аминокислотного состава [4]. В качестве препаратов сравнения использованы антиинсультные средства церебролизин и церебролизат-М.

Содержимое ампул анализировали либо непосредственно, отбирая по 15 мкл из 1 мл раствора, содержа-

<sup>1</sup> Институт высшей нервной деятельности и нейрофизиологии РАН, Москва, 117845, ул. Бултерова, 5а.

<sup>2</sup> Институт биоорганической химии им. акад. Шемякина и Овчинникова, Москва, 117846, ул. Волгина, 22.

<sup>3</sup> Институт фармакологии и токсикологии АМН Украины, Киев, 03057, ул. Эжена Потье, 14.

щегося в ампуле (церебролизин, церебролизат-М), либо предварительно растворяя сухой порошок в 1 мл деионизированной воды (церебрал) и отбирая для анализа 15 мкл полученного раствора. Для аналитических целей указанные препараты разделяли хроматографически в приборе Милихром А-02 (“Эконова”, Россия), использовались колонки размером 2 × 70 мм, заполненные сорбентом Nucleosil C18, размер частиц 5 мкм.

Препаративную наработку фракций церебрала проводили из содержимого 15 ампул лиофильно высушенного препарата, которое растворяли в 5 мл воды, “озвучивали” в ультразвуковой бане, центрифугировали 20 мин (4000 об/мин). Препаративную хроматографию проводили на колонке Lichrosorb RP-18 (10 × 250 мм, зерно 10 мкм) в системе, содержащей 0,1 % трифторуксусную кислоту и ацетонитрил в градиенте концентрации ацетонитрила от 0 до 100 % по схеме.

Фракции элюата детектировали на приборе Kratos 570 на двух длинах волн (210 и 280 нм).

Для последнего этапа работы, который заключался в определении антиинсультной активности фракций церебрала, выделенные хроматографически фракции концентрировали лиофилизацией до объема 1–2 мл, повторно хроматографировали и лиофилизировали.

Антиинсультную активность веществ, входящих в отдельные фракции и субфракции церебрала, изучали в опытах на 102 белых половозрелых крысах-самцах линии Вистар, массой 250–300 г. У опытных крыс (в отличие от контрольных ложнопериоперированных) использовали апробированный ранее в хронических опытах на различных видах животных авторский метод моделирования биполушарного интрацеребрального геморрагического инсульта, близкий к острым цереброваскулярным расстройствам человека [5]. В отличие от известных методов моделирования [7] использовали стереотаксическую технику для повреждения мозга изогнутым мандреном-ножом, введенным в направляющей игле билатерально в *s. interna*, с последующим введением в зону разрушения ткани 0,04–0,06 мл аутокрови животного. Это позволяет стандартизировать инсульт (ОНМК) по объему и степени деструкции

области *s. interna* без повреждения других отделов центральной нервной системы и оболочек мозга.

Эксперименты на животных и их содержание в виварии осуществляли согласно международным требованиям [12]. В течение недели всех крыс подвергали хэндлингу, приучали к процедуре интраназального и внутрибрюшинного введения препарата, подвергали общему неврологическому тестированию и обучали тонким манипуляционным движениям. Затем животные были распределены на опытные группы и контрольные. Двухсторонний геморрагический инсульт моделировали в области внутренней капсулы с координатами (Н 4 мм, L 3,0 мм, А – 1,5 мм) от брегмы по атласу [13]. Контрольная группа состояла из 10 ложнопериоперированных животных, а у контрольной инсультной группы (9 животных) и других опытных групп (по 9 животных в каждой) моделировали инсульт. В течение последующих 10 сут животным контрольной группы и инсультной контрольной группы вводили интраназально и внутрибрюшинно 0,85 % раствор натрия хлорида. Крысы 1, 2, 3, 4-й опытной группы получали соответственно фракции 1, 2, 3, 4 церебрала. В следующей серии животные опытных групп (также по 9 животных) получали соответственно субфракции 1, 2, 3, выделенные из наиболее активной антиинсультной фракции церебрала.

В раннем постинсультном периоде (первые 3 недели) у крыс изучали динамику изменения массы тела, оценивали их поведение по тестам на тонкие манипуляционные движения по Whishaw [15], “открытое поле” и “норковый рефлекс” — на общедвигательную и ориентировочно-исследовательскую активность. Поведенческое тестирование проводили в течение 21 дня после операции, после чего мозг животных забирали для морфологических исследований.

Оценку объема инсультного повреждения, степени нейродегенеративных процессов и контроль топологии очага внутримозговой гематомы проводили по фронтальным срезам мозга. Мозг крыс фиксировали интракардиальной перфузией 4 % раствора параформальдегида на 0,1M фосфатном буфере (pH 7,4), обезвоживали, заливали в парафин и делали срезы на микротоме “Historange” (LKB) толщиной 6 мкм с шагом 200 мкм, после чего срезы окрашивали по методу Ниссля. Морфологическую картину отцифровывали на морфометрической установке Axoplan 2 (“Zeiss”, Германия). Затем реконструировали и вычисляли объем инсультного повреждения с использованием программы KS-300 (“Zeiss”, Германия) и Imac-Pro Plus 3.

Полученные поведенческие и морфологические данные были сведены в электронные таблицы Excel, статистический анализ проводили с использованием программ Excel и Statistica.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

*Аналитическое изучение фракционного состава*

Схема хроматографии

Время, мин	Скорость, мл/мин	Трифторуксусная кислота, %	Ацетонитрил, %	Кривая градиента для насоса Waters 510
0	2	100	0	—
2	2	100	0	6
10	4	100	0	6
15	4	100	0	6
20	4	50	50	6
26	4	0	100	6
35	4	0	100	6
38	4	100	0	6
40	4	100	0	6

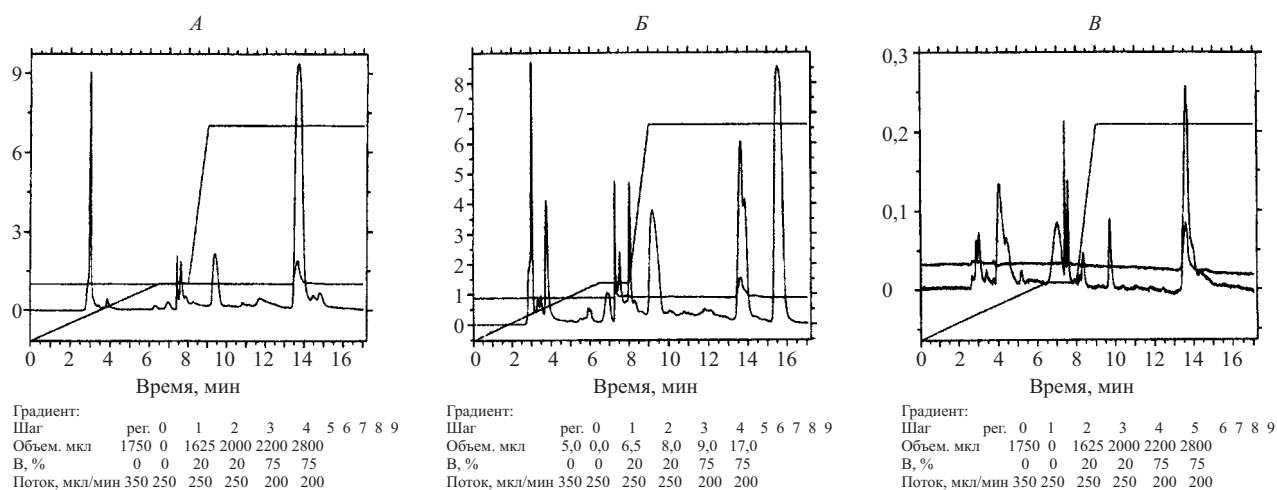


Рис. 1. Разделение церебролизина (А), церебролизата-М (Б) и церебрала (В).

Хроматограф "Милихром А-02", колонка — 2,0 × 70 мм, сорбент — "Нуклеосил С18", диаметр зерна — 5 мк, растворитель А — 0,1 % трифторуксусная кислота, растворитель В — ацетонитрил. Градиент Б — 0 – 20 % (объем элюента — 1625 мкл, скорость потока — 250 мкл/мин), 20 % (2000 мкл, 250 мкл/мин), 20 – 75 % (2200 мкл, 200 мкл/мин), 75 % (3800 мкл, 200 мкл/мин). Двухволновое детектирование при 210 и 280 нм, температура анализа 35° С.

Установлено, что церебрал представляет сложное поликомпонентное средство. По спектру компонентов церебрал, полученный из мозга свиней с моделированным геморрагическим инсультом, существенно отличается от полученного из интактного мозга свиней церебролизин и церебролизата-М, полученного из мозжечка коров (рис. 1).

Все препараты были разделены методом обращенно-фазовой жидкостной хроматографии в одинаковых условиях. На хроматограмме всех препаратов присутствуют три группы пиков с приблизительно равными интервалами элюирования с колонки. Эти группы пиков резко различаются между собой по числу и количественному содержанию компонентов (см. рис. 1).

Церебрал и церебролизат-М содержат значительно большее число составляющих, чем церебролизин. При этом наибольшее число компонентов у всех препаратов находится в средней группе пиков.

Вид хроматограмм препаратов объясняется как видовыми особенностями (церебрал и церебролизин получают из мозга свиней, церебролизат-М — из мозга крупного рогатого скота), так и различием технологии получения церебролизина (ферментативный гидролиз белков мозга свиньи плюс кислотный гидролиз), церебролизата-М — ферментативным гидролизом белков мозжечка, и исключением указанных видов гидролиза (церебрал). Введение кислотного гидролиза в схему производства церебролизина приводит к резкому уменьшению числа больших и средних пептидов и увеличению количества свободных аминокислот. Поэтому в сравнительном плане по количеству компонентов церебрал и церебролизат-М отличаются от церебролизина, содержащего значительно меньшее количество пептидных веществ. Церебрал обогащен пептидами больше, чем церебролизин и церебролизат-М. В свою очередь соотношение количества пеп-

тидов и свободных аминокислот в церебрале значительно выше, чем у церебролизата-М.

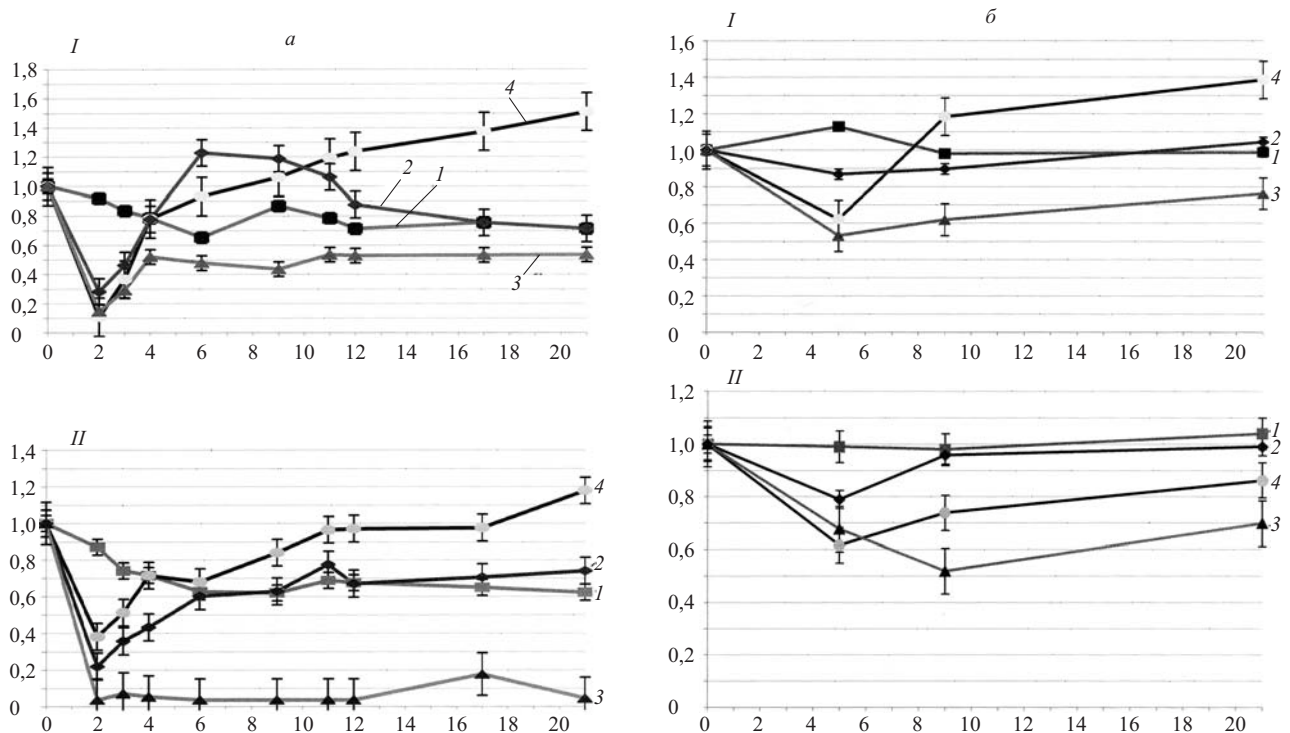
#### Поведенческие исследования

В ходе выполнения I серии поведенческих и фармакологических исследований установлено, что максимально специфическим действием для животных с внутримозговой гематомой обладает 1-я фракция. В свою очередь она была разделена на 3 субфракции, и во II серии установлено, что именно 2-я субфракция (1.2) оказывает более выраженное антиинсультное действие, чем вещества, входящие в другие субфракции церебрала.

При проведении первой серии исследований гибель опытных крыс отмечалась только в группах, получавших вещества 4-й фракции церебрала: первое животное погибло на 7-е сут, а второе — на 14-е после операции. Эти данные коррелировали с изменением массы тела опытных и контрольных крыс. Ложнооперированные животные последовательно наращивали массу тела, а крысы всех опытных групп после операции существенно ее теряли. В последующем быстрее всего восстановили массу до предоперационного уровня животные 4-й группы (7 дней после операции), а медленнее всех — животные из 2-й группы (18 дней). Крысы из 1-й и 3-й групп восстановили массу к 12-у дню наблюдения.

Характерной чертой динамики изменения ориентировочно-исследовательской активности интактных контрольных животных с течением времени является постепенное уменьшение количества посещенных квадратов и норковых движений и дальнейшая стабилизация этих параметров, начиная с 5-го опыта, на уровне  $79 \pm 7$  и  $64 \pm 12$  % соответственно от исходного значения, рис. 2, а ( $p < 0,05$ ).

Животные с экспериментальным геморрагическим инсультом в раннем послеоперационном периоде



**Рис. 2.** Динамика послеоперационной ориентировочно-исследовательской активности по тестам: *а* — “открытое поле” (I) и “норковый рефлекс” (II) и *б* — на тонкие манипуляционные движения (по Whishaw).

По оси ординат: *а* — нормированное к предоперационному значению: среднее значение количества пересеченных квадратов в каждой группе (I) и среднее значение количества исследованных норк в каждой группе (II); *б* — нормированное к предоперационному значению: общее количество движений передней лапой у животных контрольной и опытных групп (I) и отношение положительных движений ко всем движениям у животных контрольной и опытных групп (II). По оси абсцисс — дни до и после операции. В легенде обозначены группы животных. 1 — контрольная группа (ложнооперированные животные, получавшие плацебо). Опытные группы, перенесшие геморрагический инсульт: 2 — антиинсультная группа (группа, получавшая фракцию с максимальным специфическим антиинсультным действием). 3 — “негативная” группа (группа, получавшая фракцию с минимальным специфическим антиинсультным действием). 4 — контрольная инсультная группа (группа, получавшая плацебо).

были малоподвижными, что выражалось в резком уменьшении регистрируемых показателей ориентировочно-исследовательской и двигательной активности в тесте “открытое поле”: количестве посещенных квадратов (уменьшение на  $90 \pm 7,4\%$ ,  $p < 0,05$ ), стоек, норковых движений (см. рис. 2, *а*). Последующая динамика восстановления этих показателей у животных, получавших отдельные фракции и субфракции препарата, и у контрольных инсультных животных имеет различный характер.

Характерная особенность поведенческих изменений в постинсультный период у контрольной инсультной группы заключалась в нарастании ориентировочно-исследовательской и общедвигательной активности, начиная с 4–6-го дня моделирования инсульта, которая перерастала в гиперактивность (как по показателю количества посещенных квадратов, так и по количеству стоек и “норковых” движений) с максимумом на 21-й день. По показателю посещенных квадратов это нарастание носило практически линейный характер.

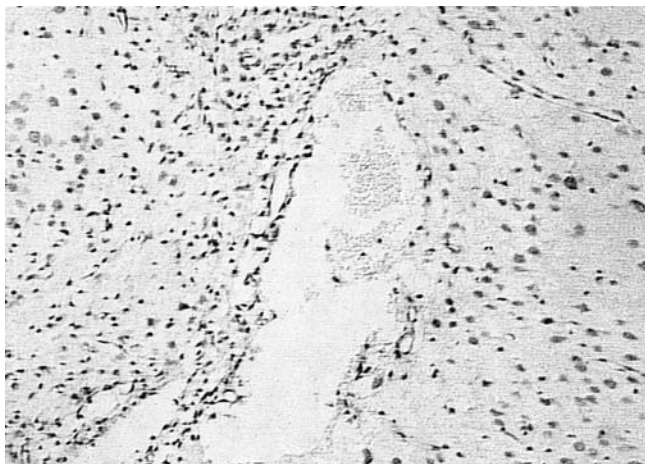
У животных, получавших фракцию с максимальным антиинсультным действием, также наблюдается гиперактивность. Однако эта гиперактивность (в частности, по показателю посещенных квадратов) достига-

ет максимума уже на 6-й постинсультный день, а затем восстанавливается до нормальных значений уже к 12–17-у дню опыта (рис. 2, *а*, I). Количество “норковых” движений восстанавливается уже к 5-у дню и далее не отличается от контрольных ( $p < 0,05$ ).

У групп, получавших фракции с минимально специфическим действием, ориентировочно-исследовательская активность была значительно ниже, чем у описанных выше групп и не восстанавливалась вплоть до 21-го дня после моделирования геморрагического инсульта ( $p < 0,05$ ).

В тестах на тонкие манипуляционные движения оценивались два показателя. Первый — общее количество движений конечностью, совершенных в кормушку. Второй — отношение результативных движений ко всем движениям конечности (включая и нерезультативные). Вторым показателем оценивает эффективность данной манипуляции. После предварительного обучения к моменту операции эти два показателя достигали насыщения и колебались вокруг константной величины ( $p < 0,05$ ).

У ложнооперированных контрольных животных с течением времени количество движений в кормушку и эффективность этих движений в послеоперационном



**Рис. 3.** Микрофото очага геморрагического инсульта во внутренней капсуле через 21 день после его моделирования. Видна образовавшаяся лакуна с гемосодержащими элементами. Окраска по методу Ниссля. Ок. 10. Об. 20.

периоде оставалась неизменной ( $101 \pm 4$  и  $96 \pm 14$  % соответственно,  $p < 0,05$ ), (см. рис. 2, б).

У контрольной инсультной группы в послеоперационный период наблюдалось сначала снижение на  $38 \pm 1$  %,  $p < 0,05$  общего количества движений конечностью, а на 21-й день после операции — увеличение на  $39 \pm 1,3$  %,  $p < 0,05$  этих движений сверх нормы. При этом эффективность манипуляций не восстанавливалась до 21-го дня после моделирования геморрагического инсульта. У групп животных, получавших фракцию с максимально специфическим антиинсультным действием, происходило полное восстановление как общего количества движений конечностью, так и эффективности манипуляции к 21-у послеоперационному дню ( $p < 0,05$ ), см. рис. 2, б.

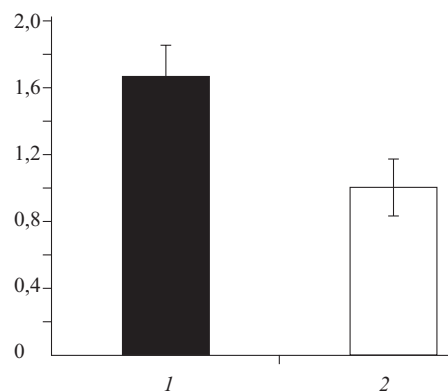
У групп животных, получавших фракции с минимальным антиинсультным действием, показатели были значительно хуже, чем у вышеописанных групп и по течению восстановления были схожими как и в тесте “открытое поле”.

У остальных групп животных, получавших другие фракции и субфракции препарата, в тестах “открытое поле” и на тонкие манипуляционные движения наблюдались изменения поведенческой активности промежуточного характера, сходные с инсультным контролем или с группами, получавшими фракции, которые усугубляли течение инсультного состояния.

#### Морфологические исследования

В очаге поражения наблюдали образование лакун, заполненных гемосодержащими элементами, а также скопления олигодендроцитов, астроцитов и микроглии. Наблюдалось большое количество эндотелиальных клеток вследствие гиперваскуляризации очага поражения. Происходило расширение кровеносных сосудов (рис. 3).

Объемы повреждений, регистрируемых на 21-й день после моделирования экспериментального гемор-



**Рис. 4.** Средний объем инсультного повреждения, регистрируемого на 21-й день опыта.

1 — геморрагический инсульт; 2 — геморрагический инсульт при терапевтическом воздействии фракции с максимально специфическим антиинсультным действием, по оси ординат — объем повреждений, мм<sup>3</sup> ( $p < 0,01$ ).

рагического инсульта, у животных, получавших фракцию 1 с максимально специфическим антиинсультным действием, были значительно ниже ( $p < 0,01$ ) по сравнению с животными, получавшими плацебо, что говорит о морфологическом нейропротекторном действии этой фракции церебрала (рис. 4).

Следует отметить также, что крысы, получавшие активную фракцию препарата, более успешно наращивали массу в послеоперационный период.

Таким образом, на основании полученных поведенческих и морфологических данных можно полагать, что церебрал и его фармакологически активная субфракция 1.2 оказывают выраженное антиинсультное действие.

Пептидные факторы активно синтезируются при экспериментальной мозговой травме и внутримозговой геморрагии [14, 16]. Усиление синтеза и секреции NGF и, видимо, других нейротрофинов повышает выживание и восстановление неврологического статуса у животных при экспериментальной травме мозга и внутримозговых геморрагиях [11, 14]. Таким образом, поиск эндогенных антиинсультных средств для терапии острых цереброваскулярных заболеваний является научно обоснованным [8].

Ранее было показано, что церебрал усиливает выработку мРНК NGF [2]. Это может быть одним из механизмов его антиинсультного действия, через который происходит приостановка развития нейродегенеративных процессов. Такой механизм мы называем трофическим.

## ВЫВОДЫ

1. По количеству компонентов церебрал и церебролизат-М отличаются от церебролизина, содержащего значительно меньшее количество пептидных веществ. Церебрал обогащен пептидами больше, чем церебролизин и церебролизат-М.

2. Из cerebrala получены вещества, положительно влияющие на морфологическую картину постинсультного очага и улучшающие общее состояние организма, а также восстанавливающие поведенческую активность крыс в раннем постинсультном периоде.

3. По поведенческим реакциям в тестах “открытое поле”, “норковый рефлекс”, тесту на тонкие манипуляционные движения, а также по полученным морфологическим данным, наиболее перспективными для последующего исследования антиинсультного фактора являются вещества, входящие в состав фракции 1 и субфракции 1.2 cerebrala.

Работа выполнена при поддержке гранта РФФИ № 04-04-49398.

## ЛИТЕРАТУРА

1. В. Г. Аркадьев, Л. В. Новик, А. Ю. Пустоваров и др., *Экспер. и клин. фармакол.*, **65**(2), 20 – 23 (2002).
2. И. Г. Васильева, А. Н. Макаренко, Н. Г. Чопик, *Трансплантология*, **3**(2), 69 – 74 (2002).
3. О. А. Громова, А. В. Скальный, О. М. Панасенко, *Микроэлементы в медицине*, **2**(1), 23 – 27 (2001).
4. А. Н. Макаренко, Ю. Н. Королев, С. В. Касьянов, *Арх. психиатрии*, № 2, 3, 138 – 143 (1998).
5. А. Н. Макаренко, Н. С. Косицын, С. В. Карпенко, В. А. Мишина, А. С. № 1767518 СССР, А1 (1990).
6. А. Н. Макаренко, И. Г. Васильева, Е. С. Галанта и др., *Экспер. и клин. фармакол.*, **67**(1), 44 – 47 (2004).
7. Р. С. Мирзоян, М. Б. Плотников, А. С. Саратиков, и др., *Руководство по экспериментальному (доклиническому) изучению новых фармакологических веществ*, Москва (2000), сс. 159 – 161.
8. L. Benowitz, *Eur. J. Neuropsychopharm.*, **10**(4), 12 – 32 (2000).
9. P. L. S. Chan and N. H. G. Holford, *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.*, № 41, 625 – 659 (2001).
10. J. Chaudiere and R. Ferrari-Iliou, *Food Chem. Toxicol.*, **37**, 949 – 962 (1999).
11. J. H. Garcia, *Brain Pathol.*, No. 7, 1151 – 1161 (1997).
12. *Guide for the Care and Use of Laboratory Animals*, National Academy Press, Washington DC (1996).
13. G. Paxinos and Ch. Watson, *The rat brain in stereotaxic coordinates*, Acad. Press, Sydney (1982).
14. G. A. Rosenberg, O. Scremin, E. Estrada, and W. T. Kyner, *Stroke*, No. 23, 1767 – 1773 (1992).
15. I. Q. Whishaw, W. T. O'Connor, and S. B. Dunnett, *Brain*, № 109, 805 – 843 (1986).
16. M. Xue and M. R. Del Bigio, *Neurosci Lett.*, No. 283, 230 – 232 (2000).

Поступила 18.03.04

## A COMPARATIVE STUDY OF ANTISTROKE ACTIVITY OF THE NEW DRUG “CEREBRAL” AND ITS FRACTIONS IN RATS

A. N. Makarenko<sup>1</sup>, N. S. Kositsyn<sup>2</sup>, I. V. Nazimov<sup>3</sup>, M. M. Svinov<sup>2</sup>, E. V. Goloborod'ko<sup>2</sup>, and N. V. Pasikova<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Institute of Pharmacology and Toxicology, Academy of Medical Sciences of Ukraine, 03057 Kiev, Ukraine;

<sup>2</sup> Institute of Higher Nervous Activity and Neurophysiology, Russian Academy of Sciences, ul. Butlerova 5a, Moscow, 117845 Russia;

<sup>3</sup> Shemyakin – Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, Russian Academy of Sciences, ul. Volgina 22, Moscow, 117846 Russia

The effect of the new drug “cerebral” and its fractions 1–3 on the model of bilateral hemorrhagic stroke in white rats was studied with reference to the action of cetrolysin and cetrolysate-M. With respect to the general functional state, behavioral activity restoration, and morphological data, the most pronounced antistroke action was observed for the cerebral-1 fraction. This fraction was further separated into three subfractions. The most promising test results were obtained for the 1.2 subfraction, which was selected for the further investigation.