

ОРИГИНАЛЬНАЯ СТАТЬЯ

СТРУКТУРНЫЙ АНАЛИЗ И ФЕРМЕНТАТИВНАЯ АНТИОКСИДАНТНАЯ АКТИВНОСТЬ НЕЙРОМЕТАБОЛИЧЕСКИХ ПРЕПАРАТОВ ПРИРОДНОГО ПРОИСХОЖДЕНИЯ: ЦЕРЕБРОЛИЗИНА, ЦЕРЕБРОЛИЗАТА, БИЛОБИЛА И АКТОВЕГИНА

STRUCTURAL ANALYSIS AND FERMENTATIVE ANTIOXIDANT ACTIVITY OF NEUROMETABOLIC PREPARATIONS OF NATURAL ORIGIN: CEREBROLYSIN, CEREBROLYSAT, BILOBIL, AND ACTOVEGIN

О.А. Громова¹, А.В. Скальный², О.М. Панасенко³
O.A. Gromova¹, A.V. Skalny², O.M. Panasenکو³

¹Ивановская государственная медицинская академия, просп. Ф. Энгельса 8, Иваново 153000 Россия.

²Автономная некоммерческая организация “Центр Биотической Медицины”, а/я 56; Москва 125047 Россия.

³НИИ физико-химической медицины, ул. М. Пироговская 1а, Москва 119828 Россия.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: макроэлементы, микроэлементы, супероксиддисмутаза, глутатионпероксидаза, каталаза, церебролизин, церебролизат, билобил, актовегин.

KEY WORDS: maior elements, trace elements, superoxiddismutase, glutationperoxidase, katalase activity, cerebrolysin, cerebrolysat, bilobili, actovegini.

РЕЗЮМЕ: Определена концентрация макроэлементов (Ca, K, Na, Mg, P) и микроэлементов (Al, As, Be, Bi, Cd, Co, Cr, Cu, Fe, Li, Mn, Mo, Ni, Pb, Se, Si, Sn, Ti, V, Zn) и общая активность антиоксидантных ферментов (супероксиддисмутаза, каталаза и глутатионпероксидаза) в нейропротекторах природного происхождения (церебролизин, производство EBEWE, Австрия, билобил производство KRKA, Словения, актовегин, производство NYCOMED, Норвегия, церебролизат, производство “Ферейн”, Россия).

ABSTRACT: Atomic emission analysis of neuroprotection (cerebrolysin, cerebrolysat, bilobil, actovegin) element content has detected a successful combination of trace elements with neuroactive and antioxidant properties in the drug. Concentration maior elements (Ca, K, Na, Mg, P) and trace elements (Al, As, Be, Bi, Cd, Co, Cr, Cu, Fe, Li, Mn, Mo, Ni, Pb, Se, Si, Sn, Ti, V, Zn) and superoxiddismutase, glutationperoxidase, katalase activity.

Введение

В последние годы нарастает информация о роли макроэлементов (МаЭ) и микроэлементов (МЭ) в функционировании центральной нервной системы (Райцес, 1981; Кон и др., 1986; Авцын и др., 1991;

Waggoner, 1999; Trace elements in man and animals, ТЕМА-10, 2000). “Точки приложения” действия металлов в центральной нервной системе (ЦНС) чрезвычайно многообразны, что обусловлено вовлечением элементов во многие физиологические и патологические нервно-психические и иммунологические процессы. Как показали исследования G.J. Beckett et al. (1991), селен входит в состав субъединицы (27,5 Да) глутатионпероксидазы — фермента, расщепляющего пероксиды, предохраняющего клетки и ткани от окислительного стресса (Beckett et al., 1991; Chaudiere et al., 1999; Mates et al., 1999).

Около 90 % меди, содержащейся в плазме, входит в состав церулоплазмина. На каждую молекулу последнего приходится 16 атомов меди, обуславливающих оксидазную активность этого белка. Церулоплазмин обладает также супероксиддисмутазной активностью, защищая компоненты крови от токсического действия активных форм кислорода (Waggoner, 1999). Кроме того, медь содержится в супероксиддисмутазе, дофамин-β-гидроксилазе, цитохром-С-оксидазе, аминоксидазе (Mates et al., 1999). Металлоферменты — оксидоредуктазы, трансферазы, супероксиддисмутаза и гидролазы содержат цинк, нейротропный витамин В12-кобальт. ДНК- и РНК-полимераза, кислая и щелочная фосфатаза, глутаминсинтетаза, а также некоторые супероксиддисмутаза регулируются марганцем (Кон и др., 1986). Магний — обязательный участник синтеза всех ней-

ропептидов в головном мозге, он входит в состав 13 металлопротеинов, более 300 ферментов, в том числе в состав глутатионсинтетазы, осуществляющей превращение глутамата в глутамин.

В неврологической практике, наряду с синтезированными нейропротекторами, применяются лекарства, полученные из природного сырья животного или растительного происхождения. Так в последнее время широкое применение нашли нейрометаболические препараты: церебролизин (комплекс аминокислот и низкомолекулярных пептидов, полученных из мозга свиньи), билобил (стандартизированный экстракт растения Гинкго Билоба), актовегин (дериват крови бычков), церебролизат (комплекс аминокислот и среднмолекулярных пептидов, полученных из мозга коров). Элементный состав последних представляет собой не только результат технологии изготовления, но и является следствием генетической и/или эволюционной трансформации элементов у природных объектов, из которых выделены указанные препараты, и может играть важную роль в реализации их нейропротекторного эффекта.

Целью работы было исследование элементного состава нейропротекторов природного происхождения: билобила, актовегина, церебролизина и церебролизата. Поскольку микроэлементы часто входят в состав простетических групп многих ферментов, в частности различных изоформ супероксиддисмутаз (Zn/Cu-, Mn-), глутатионпероксидазы (Se) и каталазы (Fe), играющих ключевые роли в антиокислительной защите клеток и тканей при различных патологиях (Ланкин и др., 1976; Кон и др., 1986; Aebi, 1984; Beauchamp et al., 1971; Beckett et al., 1993), то второй задачей работы было изучение активностей указанных ферментов в исследуемых препаратах.

Материалы и методы

Анализ 10 образцов препаратов церебролизина (производство EBEWE, Австрия), билобил (производство KRKA, Словения), актовегин (производство NYCOMED, Норвегия) и церебролизат (производство "Ферейн", Россия) на содержание 25 элементов (Al, As, Be, Bi, Ca, Cd, Co, Cr, Cu, Fe, K, Li, Mg, Mn, Mo, Na, Ni, P, Pb, Se, Si, Sn, Ti, V, Zn) проводили методом атомной эмиссионной спектроскопии с индукционно связанной аргоновой плазмой (АЭС-ФСР) на приборах ICAP-9000 "Thermo Jarrell Ash" (США).

Для проведения анализа образцы, представляющие собой жидкую лекарственную форму (церебролизин, актовегин, и церебролизат) разбавляли бидистиллированной водой в соотношении 1:3 по объему. Билобил, который представляет собой твердую лекарственную форму, предварительно освобождали от капсульной оболочки и из содержимого капсул (собственно из экстракта Гинкго Билоба) готовили раствор: навеску 0,1 г растворяли в 5 мл биди-

стиллированной воды. Элементы в церебролизине, актовегине и в церебролизате оценивали в мкг/мл, в билобиле в мкг/г.

Активность супероксиддисмутазы в препаратах определяли на спектрофотометре Hitachi-557 (Япония) при 25°C по кинетике ингибирования восстановления нитротетразолия синего при 560 нм супероксидным анион-радикалом, генерируемым в системе ксантин-ксантинооксидаза (Aebi, 1984). За единицу активности супероксиддисмутазы принимали количество фермента, необходимое для 50%-ного ингибирования реакции в условиях определения.

Активность глутатионпероксидазы в препаратах определяли при 25°C по методу (Ланкин, 1976), измеряя кинетику образования окисленного глутатиона (по окислению NADPH в сопряженной глутатионредуктазной реакции) с использованием гидропероксида трет-бутила в качестве субстрата в кинетическом режиме на химическом анализаторе Labsystems Oy FP-901 (Финляндия) при 340 нм. За единицу активности глутатионпероксидазы принимали количество фермента, необходимое для окисления 1 мкмоль восстановленного глутатиона в мин.

Активность каталазы измеряли по кинетике утилизации пероксида водорода при 240 нм на спектрофотометре Hitachi-557 (Япония) согласно методу, описанному в работе (Ланкин, 1976). Активность фермента выражали в мкмоль утилизированного H₂O₂ в минуту.

В фармакологических препаратах активность антиоксидантных ферментов определяли непосредственно в актовегине, церебролизине и церебролизате из расчета активностей на 1 мл препарата. В случае билобила содержимое капсулы предварительно суспендировали в дистиллированной воде, определение активностей проводили в суспензии из расчета на 1 мг содержимого капсулы.

Результаты и обсуждение

Используя метод атомной эмиссионной спектроскопии, нам удалось зарегистрировать в исследованных нейропротекторах целый спектр макро- и микроэлементов. Результаты анализа приведены в таблице 1. Так в актовегине были обнаружены МаЭ: Na, P, Ca, Mg и эссенциальные, нейроактивные микроэлементы — Si и Cu. Билобил содержал макроэлементы: Na, K, P, Ca, Mg и широкий спектр эссенциальных нейроактивных микроэлементов, а именно: Co, Si, Fe, Cu, Mn, Cr, Li и V. Церебролизин из 25 изученных элементов содержал следующие макроэлементы: Na, K, P, Ca, Mg. Эссенциальные нейроактивные микроэлементы в церебролизине представлены 11 компонентами: Se, Zn, Sn, Co, Si, Fe, Cu, Mn, Cr, Li, V. Церебролизат содержал только макроэлементы, а именно: Na, K, P и Ca. Такие элементы, как Al, Pb, Cd, Ni, и Ti присутствовали в пределах допустимых значений во всех исследуемых препаратах. Во всех исследованных препаратах в преде-

ТАБЛИЦА 1.

СОДЕРЖАНИЕ МАКРО- И МИКРОЭЛЕМЕНТОВ В АКТОВЕГИНЕ, ЦЕРЕБРОЛИЗАТЕ, БИЛОБИЛЕ И ЦЕРЕБРОЛИЗИНЕ, ЕДИНИЦЫ ИЗМЕРЕНИЯ.

№ п/п	Элемент	Актовегин ppm мкг/мл	Церебролизат, мкг/мл	Билобил, мкг/г	Церебролизин, мкг/мл
Макроэлементы					
1	Na	3600±126	4800±376	180,0±36,2	2043±144
2	K	—	2600±82	75,1±24,2	152±27
3	P	37±12	860±54	90,3±32,6	92,69±39,00
4	Ca	4,0±0,34	50,0±11,2	1100±102	61,94±23,10
5	Mg	15,9±9,3	—	670±65	21,94±10,20
Микроэлементы					
6	Si	11,0±2,3	—	21,0±2,3	7,15±2,10
7	Cu	0,0012*	—	3,3±0,9	0,0965*
8	Co	—	—	1,2±1,1	0,0112±0,0039
9	Fe	—	—	1800±206	0,453±0,132
10	Mn	—	—	2,7±1,1	0,0359*
11	Cr	—	—	1,70±0,46	0,0339*
12	Li	—	—	0,14*	0,0206*
13	V	—	—	0,25*	0,0198*
14	Se	—	—	—	0,1397*
15	Zn	—	—	—	0,1141*
16	Sn	—	—	—	0,0579*

* Примечание: Помеченных звездочкой элементов сильно варьировало в разных образцах. В таблице приведены максимально зарегистрированные значения обнаруженных элементов из 10 анализируемых проб.

лах обнаружения данным методом отсутствовали As, Be, Bi и Mo.

Для производства церебролизата используется мозговая ткань крупного рогатого скота, а именно взрослых коров, в том числе и старых, идущих в забой на мясокомбинатах. Для производства церебролизина — мозг молодых свиней. Мозговая ткань является, как известно, лидером по способности накапливать микроэлементы (Райцес, 1981; Авцын и др., 1991; ТЕМА-10, 2000). Большие различия в микроэлементном спектре церебролизина и церебролизата, по-видимому, кроются в особенностях технологии изготовления препаратов. При этом, в процессе изготовления церебролизина спектр эссенциальных микроэлементов максимально сохранен в конечном продукте (т.е. в растворе церебролизина в ампулах), в то время как в растворе церебролизата в ампулах он почти полностью утрачен. Результаты анализов свидетельствуют о том, что в разовой дозе нейропротекторов природного происхождения содержание макроэлементов и микроэлементов в сущности, невелико, по сравнению с препаратами специально созданными для восполнения дефицита макро- и микроэлементов. Тем не менее, при курсовом назначении церебролизина, актовегина и билобила нагрузка присутствующими в них

макро- и микроэлементами становится ощутимой. Так в течение 2-недельного курса лечения препаратом актовегин по 2 мл (22 мкг чистого кремния) внутримышечно, больной получает около 308 мкг биологического кремния, тогда как в 1 таблетке витаминно-минерального препарата Центрум содержится 10 мкг кремния в виде органических соединений (справочник Видаль, 2001). В 1 мл церебролизина присутствует до 0,1141 мкг цинка, который при условии парентерального введения имеет биодоступность приближающуюся к 100 %. Из раствора приготовленного из 1 шипучей таблетки препарата Супрадин Рош больной получает 3 мг солей цинка per os, при этом биодоступность препарата значительно колеблется (справочник Видаль, 2001).

В отличие от 1-го поколения макро- и микроэлементных комплексных препаратов, содержащих элементы в виде неорганических соединений (Сульфат цинка, Селенит натрия и т.д.) и более прогрессивного 2-го поколения препаратов, содержащих элементы в виде биоорганических соединений, нейропротекторы природного происхождения имеют ряд сходных черт с 3-м поколением элементсодержащих препаратов. Макро- и микроэлементы входящие в нейропротекторы являются составной частью легко усваиваемых организмом биологических соедине-

ТАБЛИЦА 2.

АКТИВНОСТЬ АНТИОКИСЛИТЕЛЬНЫХ ФЕРМЕНТОВ: СУПЕРОКСИДДИСМУТАЗЫ, КАТАЛАЗЫ И ГЛУТАТИОНПЕРОКСИДАЗЫ, ОБНАРУЖЕННАЯ В АКТОВЕГИНЕ, ЦЕРЕБРОЛИЗАТЕ, БИЛОБИЛЕ И ЦЕРЕБРОЛИЗИНЕ.

Фермент	Активность фермента			
	Актовегин ¹	Церебролизат ¹	Билобил ²	Церебролизин ¹
Супероксиддисмутаза	72,8 ± 7,1	20,9 ± 3	21,8 ± 5,4	556,8 ± 42,0
Глутатионпероксидаза	0	0	0	0
Каталаза	0	0	0	0

¹Активность выражена в Ед/мл препарата;

²Активность выражена в Ед/мг содержимого капсулы, в пересчете на 1 капсулу активность супероксиддисмутаза в препарате составляет 872 ± 64 Ед.

ний (нейропептидов, ферментов и аминокислот). Макро- и микроэлементы в препаратах 3-й генерации, как и в нейропротекторах природного происхождения “живые”, в том смысле, что значительно лучше усваиваются, распознаются клетками, в том числе и нейронами. Элементсодержащие препараты 3-го поколения, значительно реже дают такие побочные эффекты как привкус металлов во рту, изжогу встречающиеся при приеме препаратов 2-й, и особенно 1-й генерации. Нейропротекторы природного происхождения не обладают вышеперечисленными побочными эффектами. Если селен, входящий в состав препаратов 3-го поколения Триовит, Аурита размещен на дрожжах, то селен обнаруженный в составе Церебролизина расположен на биологических носителях животного происхождения. В связи с этим, нельзя исключить, что обнаруженные нами элементы, входящие в нейропротекторы природного происхождения (церебролизин, актовегин, билобил, церебролизат), отчасти могут определять их фармакологическую активность, и наряду с аминокислотами, нейропептидами, ферментами являться их действующим началом.

Вторая задача нашего исследования состояла в оценке активности важнейших антиокислительных ферментов: супероксиддисмутаза, глутатионпероксидаза, и каталазы в исследуемых препаратах.

Как видно из таблицы 2, мы не обнаружили в исследуемых препаратах глутатионпероксидазной и каталазной активности. В то же время, все исследованные препараты в той или иной мере обладали супероксиддисмутазной активностью. Примечательно, что наибольшую активность проявлял церебролизин (556,8 ± 42,0 Ед/мл), в составе которого мы обнаружили все микроэлементы, входящие в простетические группы разных типов супероксиддисмутаза: Cu, Zn, Mn (см. рис. 1). Билобил, содержащий Cu и Mn, но не содержащий Zn, а также актовегин, содержащий только Cu, обладали менее выраженной активностью. Наконец, церебролизат, в составе которого микроэлементы отсутствовали полностью, проявлял минимальную супероксиддисмутазадную активность (см. таблицы 1,2).

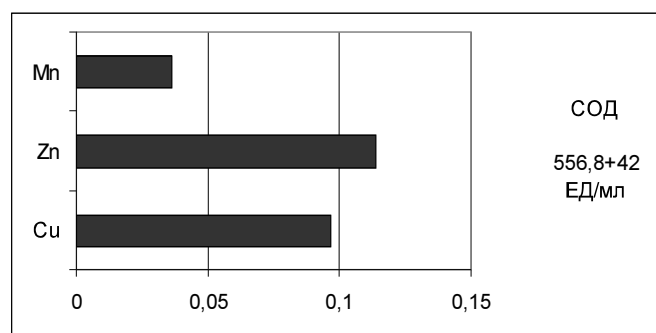


Рис. 1. ОБЩАЯ АКТИВНОСТЬ СУПЕРОКСИДДИСМУТАЗЫ И КОНЦЕНТРАЦИЯ МЭ — MN, ZN, CU, ВХОДЯЩИХ В СОД1 И СОД2 — В ЦЕРЕБРОЛИЗИНЕ.

Выводы

1. Анализ, проведенный методом атомной эмиссионной спектроскопии показал, что природные нейропротекторы: актовегин, билобил и церебролизин содержат в своем составе, как МаЭ, так и некоторые МЭ. В то же время в составе церебролизата МЭ обнаружены не были. Элементный состав нейропротекторов природного происхождения имеет большие отличия, которые по всей вероятности, зависят не только от состава сырья используемого для изготовления препарата, но и от технологии производства лекарства.

2. Анализ активности антиокислительных ферментов (супероксиддисмутаза, глутатионпероксидаза и каталазы) показал, что исследованные нейропротекторы обладали лишь супероксиддисмутазадной активностью. При этом, наибольшую активность проявлял церебролизин, в составе которого были обнаружены все микроэлементы, входящие в простетические группы разных типов супероксиддисмутаза: Cu, Zn, Mn. Церебролизат, в составе которого микроэлементы отсутствовали полностью, обладал минимальной супероксиддисмутазадной активностью. Относительно высокая супероксиддисмутазадная активность, обнаруженная в церебролизине, билобиле и актовегине может являться составной частью бо-

лее высоких антиоксидантных возможностей этих препаратов, в частности, по сравнению с церебролизатом, активность супероксиддисмутазы в котором крайне низкая.

Авторы приносят благодарность профессору В.З. Ланкину за обсуждение материалов статьи.

Литература

- Авцын А.П., Жаворонков А.А., Риш М.А., Строчкова Л.С. 1991. Микроэлементозы человека: этиология, классификация, органопатология. М.: Медицина. 496 с.
- Кон Р., Рот К., 1986. Ранняя диагностика болезней обмена веществ. М.: Медицина. 637 с.
- Ланкин В.З., Гуревич С.М., Котелевцева Н.В., Тихазе А.К., Герасимова Е.Г. 1976. Роль перекисей липидов в патогенезе атеросклероза. Детоксикация липоперекисей глутатионпероксидазной системой в аорте // Вопр. мед. Химии. Т.22. № 3. С.392–395.
- Райцес В.С. 1981. Нейрофизиологические основы действия микроэлементов. Л.: Медицина, 152 с.
- Лекарственные препараты в России. 2001. Справочник ВИДАЛЬ. 7-е изд. М: Астра-Фарм-Сервис. 1536 с.
- Aebi H. 1984. Catalase in vitro. // *Method. Enzymol.* Vol.105. P.121–126.
- Beauchamp C., Fridovich I. 1971. Superoxide dismutase: improved assays and an assay applicable to acrylamide gels // *Anal. Biochem.* Vol.44. P.276–287.
- Beckett GJ., Peterson FE., Choudhury K., et al. 1991. Interrelationships between selenium and thyroid hormone metabolism in the rat and man // *J. Trace. Elem. Electrolytes Health Dis.* Vol.5. P.265–267.
- Chaudiere J., Ferrari-Iliou R. 1999. Intracellular antioxidants: from chemical to biochemical mechanisms // *Food Chem. Toxicol.* Vol.37. P.949–962.
- Haddad E.H. 1999. Neutropenia restores virulence to an attenuated Cu, Zn superoxide dismutase-deficient *Haemophilus ducreyi* strain in the swine model of chancroid // *Infect. Immun.* Vol.67. P.5345–5351.
- Mates J.M., Perez-Gomez C., Nunez de Castro I. 1999. Antioxidant enzymes and human diseases // *Clin. Biochem.* Vol.32. P.595–603.
- Minotti G., Aust S.D. 1989. The role of iron in oxygen radical mediated lipid peroxidation // *Chem. Biol. Interact.* Vol.71. P.1–19.
- Trace elements in man and animals 10. 2000. / Roussel A.M., Anderson R.A., Favrier A.E. (eds.). Kluwer Academic. 1172 p.
- Waggoner D.J., Bartnikas T.B., Gitlin J.D. 1999. The role of copper in neurodegenerative disease // *Neurobiol. Dis.* Vol.6. P.221–230.