

**ЎЗБЕКИСТОН РЕСПУБЛИКАСИ ОЛИЙ ВА ЎРТА МАХСУС
ТАЪЛИМ ВАЗИРЛИГИ**

**МИРЗО УЛУҒБЕК НОМИДАГИ
ЎЗБЕКИСТОН МИЛЛИЙ УНИВЕРСИТЕТИ**

Қўлёзма ҳуқуқида

УДК:577.152.34.

Жўрабоев Махсуджон Муродиллаевич

**ҚОРАМОЛНИНГ МИЯСИДАН ФИЗИОЛОГИК ФАОЛ
ПЕПТИДЛАРНИ АЖРАТИШ**

5А – 420109 - Биокимё

Магстр

академик даражасини олиш учун ёзилган

ДИССЕРТАЦИЯ

Илмий раҳбар:

б.ф.д. проф. Валихонов М.Н.

Тошкент – 2012

М У Н Д А Р И Ж А

КИРИШ	3
I-БОБ. АДАБИЁТЛАР ШАРҲИ.....	8
1.1.Қорамол бош мия нерв тўқималари ва уларнинг кимёвий таркиби.....	8
1.2. Қорамол бош миясининг биологик таркиби.....	9
1.3 Қорамол организмидаги биологик фаол моддалар.....	11
1.4. Нерв тўқималарининг олигопептидлари(нейропептидлар).....	17
1.5. Қорамол бош миясининг нейрогормонлари	18
II-БОБ.ТАДҚИҚОТ ОБЪЕКТЛАРИ ВА УСЛУБЛАРИ.....	28
2.1.Тадқиқот объекти.....	28
2.2.Илмий ишда фойдаланиладиган реактивлар.....	28
2.3.Илмий ишда фойдаланиладиган ускуналар.....	28
2.4. Қорамол бош миясидан церебролизиннинг ажратиб олиш.....	28
III-БОБ.НАТИЖАЛАР ВА МУҲОКАМА.....	31
3.1. Церебролизин таркибидаги пептидларнинг аниқлаш.....	31
3.2. Пептид фракциясини масс – спектрини олиш.....	32
3.3.Пептид компонентларининг хроматографияда бўлинишини аниқлаш.....	34
3.4. Пептид таркибидаги аминокислоталарнинг кетма – кетлигини ўрганиш.....	35
3.5.Церебролизиннинг пептидли фракцияси.....	35
3.6.Церебролизиннинг ёғ кислотали таркиби.....	36
3.7.Нерв ўсиш омили.....	43
3.8.Церебролизиннинг фармакологик хусусиятларини ўрганиш.....	48
ХУЛОСА.....	54
ФОЙДАЛАНИЛГАН АДАБИЁТЛАР РЎЙХАТИ.....	56

КИРИШ

Мавзунинг долзарблиги. Терапияда ферментлар ва бошқа оксил – пептид табиатли физиологик фаол моддаларни қўллаш қадимий тажрибаларга эга замонавий тиббиёт оксил – пептид табиатли физиологик фаол моддалардан иборат бўлган юқори даражада тозаланган препаратларни клиник тиббиётнинг турли хил сохаларида янада кўпроқ, кўп қирррали тиббий даво воситаси сифатида қўллашига сабаб, уларнинг жуда юқори фаоллиги ва ўзига хослигидадир. Фавқулотда Цереброваскуляр патология инсультнинг дунё бўйлаб кенг тарқалганлиги шунингдек нейродегенератив касалликларнинг қарилик деменцияси Альцгеймер ва Ходжкин касалликларинг ортиши билан боғлиқ ходисалар нейронларни ишемиядан ҳимоя қилувчи дори воситаларини излаш учун муҳим бўлган қизиқишни уйғотади. Нейропротектив ва нейротрофик пептидлар янги изланиш йўллари очмоқдалар ва янги самарали нейротрофик ва модулятор хусусиятли дори воситаларини излаб топиш бугунги куннинг долзарб муаммолардан биридир.

Тиббиёт амалиётида синтетик нейропротекторлар билан бир қаторда табиий хомашёдан тайёрланган ўсимлик ва ҳайвонлардан олинадиган дори воситалари ҳам қўлланилади. Бугунги кунда жаҳонга маълум бўлган ва кенг қўлланиладиган дори воситалари цитофлавин ва билобил (ўсимлик флавоноидларидан олинган) кортексин ва актовогин (бузоқ ва чўчқанинг бош миясининг мағзидан олинган) шунингдек бугунги кунда шу мақсадларда кенг қўлланилаётган чўчқа ва қорамол бош миясидан олинган пептидлар ишлатилмоқда. Бунинг ёрқин вакили церебролизиндир. У чўчқа ва қорамол бош мияси мағзини экстракция қилиш йули билан ажратиб олинади. Унинг таркибида 85% аминокислоталар ва 15% пептитидлар бор. 1мл церебролизин эритмасини 1г ҳайвон миясидан олинади. Дори воситасининг бошланғич таъсири бўлиб церебролизин таркибига кирувчи ўзига хос аминокислоталар ва пептилар ҳисобланади. Церебролизин пептидларининг молекуляр

массаси 10000 Да дан ошмайди. Бу ўз навбатида анафилактик жараёнлар кузатилишини олдини олади. Шунингдек гематоэнцефалик барьерни орқали энгил ўтиб олишни ва бош миёна нейронларининг метаболизмида фаол боғланишни таъминлайди.

Муаммонинг ўрганилганлик даражаси. Сут эмизувчиларнинг бош миёна таркибида нейропептидлар мавжуд бўлиб улар регулятор ва модуляторли таъсирни амалга оширади, умумий, биргаликдаги мураккаб ва кўпинча турли йўналишдаги молекуляр биокимёвий механизмлардаги дезинтеграцияни йўқотади, уларнинг нормал балансини тиклайди. Бунда асосий рольни эндоген регулятор Марказий нерв системаси функцияли нейропептидлари ўйнайди. Уларнинг молекулалари қисқа аминокислата занжири кўринишида бўлади. Ўзидан йирикрок оксил молекуласи протеолиз (процессинг) ферментларидан келиб чиқувчи пептидлардан «кесилади» фақат «керакли вақтда керакли жойга» организм талабидан келиб чиқиб таъсир кўрсатади.

Организм ички муҳитнинг қандайдир ўзгаришига жавобан нейропептидларнинг эндоген шаклланиши қатор бошқа пептидларнинг ажралишига олиб келади. Бунда нейропептид бошқа пептидлар учун индуктор вазифасини ўтайди. Агар уларнинг биргаликдаги таъсири бир йўналишга эга бўлса у холда самара умумий ва давомий бўлади.

Пептидни чиқиши бир қанча бошланғич тартибдаги регулятор пептидлар билан бошқарилиши мумкин. Шундай қилиб пептид регуляторли континум деб аталувчи пептидларнинг самарали кетма-кетлик йиғиндисини ҳосил қилади. Унинг алоҳида жиҳати шундан иборатки, ҳар бир бошқарувчи регуляторли пептид бошқа қатор пептидларни пайдо бўлишини индукциялайди ёки ингибирлайди, натижада у ёки бу пептиднинг биринчи самараси вақт бўйича занжирли ёки босқичли жараёнларда ривожланади.

Нейропептидлар структурасининг аҳамияти шундан иборатки уларга турли хил ҳужайра рецепторлари учун мўлжалланган бир қанча лиганд

гурухларнинг таъсири ҳисобланади. Бу уларнинг полифункционаллигини билдирадиган молекуляр ходисалардан биридир. Тадқиқотларнинг кўрсатишича нейропептидларнинг физиологик фаоллиги аналогик таъсирга эга бўлган пептид бўлмаган бирикмаларнинг фаоллигидан анча мунча юқори ҳисобланади. Нейропептидлар ажратилиш жойига боғлиқ ҳолда медиаторлик функциясини амалга ошириши мумкин (бир хужайрадан бошқасига сигнал бериш), алоҳида гурух нейронларининг реактивлигини модуляциялаш, гормонлар ишлаб чиқаришни тўхтатиш ёки стимуллаш, тўқима метаболизмини бошқариш ёки физиологик фаол моддаларнинг самарали функциясини бошқаради.

Маълумки нейропептидлар цитокининларнинг шамоллашга қарши фаоллигини бошқара оладилар, улар буни рецепторларинг фаоллик модуляцияси орқали амалга оширадилар. Бунда цитокинларнинг нормал балансини тиклаш, алоҳида цитокин системалари таъсирига нисбатан самаралироқ боради. Қоидага мувофиқ нейронларнинг цитокинли самаралари азот оксидининг генерациясига ва бошқа оксидант жараёнларга уларнинг таъсири билан биргаликда боради.

Кўпчилик нейропептидлар нейротрофик ўсиш хусусиятини таъсирли намоён қилади. Нейропептидларни гематоэнцефалик тўсиқ орқали осон ўтишишини ҳисобга олсак (ўсиш омиллари полипептид занжирларидан фарқли ўлароқ) уларни терапевтик аҳамиятини юқорилигини эътироф этиш қийин эмас.

Диссертациянинг мақсади:

- Сут эмизувчилар (қўй, чорва моллари ва чўчқа) бош миясидаги пептидларни ажратиб олиш ва уларнинг тадқиқ қилиш.
- Сут эмизувчилар бош миясидаги бир таркибли пептидларни умумий функционал гуруҳий масублигини аниқлаш.
- Қўй, йирик шохдор чорва моллари ва чўчқани бош миясидаги пептидларни структуравий функционал хусусиятларини қиёслаб ўрганиш.

Диссертациянинг вазифалари:

- Сут эмизувчилар бош миясидаги пептидлардан субстанция тайёрлаш;
- Сут эмизувчилар бош миясидаги пептидларини структура ва функцияларини ўрганиш;
- Сут эмизувчилар бош миясидаги пептидлари бўйича фундаментал тадқиқотлар ўтказиш учун илмий ҳамда умумлаштирилган ва қайта ишланган материалларни тўплаш ва уларни яратиш.

Тадқиқот объекти ва предмети. Тадқиқот материали қорамоллар исобланади. Қорамолларнинг бош қисмини танасидан ажратилади ва тадқиқот сифатида фойдаланиш мақсадида қорамолнинг бошини калла суягидан ажратиб олиб нерв, хужайра ва тўқималаридан ташкил топган қисмини ўрганиш учун олинади.

Тадқиқот усуллари. Илмий тадқиқот иши юпқа қатламли хроматография ва Масс–спектрометрия усуллари орқали амалга оширилди.

Илмий янгилиги. Биринчи мартаба Ўзбекистонда соф ҳолатда қорамолнинг миясидан физиологик фаол пептид – яъни церебролизин ажратиб олинди. Шунингдек, масс-спектрометрия усули ёрдамида қормол миясидан ажратиб олиган пептидларининг аминокислота таркиби ўрганилди.

Тадқиқот натижаларининг амалий аҳамияти. Қорамолларнинг миясидан ажратиб олинган физиологик фаол пептид – церебролизинни ҳар томонлама ўрганиб, одамлар орасида учрайдиган Цереброваскуляр патология инсульт, қарилик деменцияси, Альцгеймер ва Ходжкин касалликларини даволаш мақсадида турли ҳил дори – дармонлар тайёрлаш ва кенг миқёсда қўллашдан иборатдир.

Магистрлик диссертациясининг тузилиши ва ҳажми . Диссертация уч бобдан иборат бўлиб: адабиётлар шарҳи, материаллар ва методлар, натижалар ва уларнинг таҳлил, хулосалар, адабиётлар рўйхати ва иловадан ташкил топган.

Диссертация ҳажми. Диссертация компьютерда терилган 60 саҳифадан иборат бўлиб, 9 та расм ва 5 та жадвали ўз ичига олган. Адабиётлар рўйхати 36 та илмий иш ва китоблар, 4 та интернет маълумотларидан иборат.

I-БОБ. АДАБИЁТЛАР ШАРҲИ

1.1. Қорамол бош мия нерв тўқималари ва уларнинг кимёвий таркиби.

Ҳайвонларда турли хил ҳужайра ва тўқималар мавжуд бўлиб, булардан биз учун қорамолнинг бош миясидаги нерв тўқималаридаги нейрогормонларнинг тадқиқ қилишдан иборатдир. Нерв тўқималари ҳам организмдаги бошқа тўқималар сингари ўзига хос тузилишга эга бўлиб, организмнинг ҳаётчанлигида ҳамда унда ўтадиган физиологик ва паталогик жараёнларда муҳим роль ўйнайди, чунки фақат нерв системасининг ёрдамидагина организм ташқи атроф муҳитдаги ўзгаришларни сезади, ўзаро боғланиш ҳосил қилади ва унга тегишли реакциялар беради. Бусиз организмнинг ҳаёт кўриши ҳам мазмунсиздир. Тирик организмлардаги нерв системаларининг иш фаолиятини ўрганишда рус олимлари И.П.Павлов ва И.М.Сеченов, А.В.Палладинларнинг хизматлари катта.

Лекин шуни эътиборга олиш керакки, нерв тўқималари биокимёсини ўрганиш услубий жихатдан анча қийиндир. Бунинг сабабини қуйидагича изохлаш мумкин: биринчидан, бу тўқималар турли хил вазифаларни бажарувчи бир-бирларидан фарқ қиладиган қисмлардан, яъни бош мия, орқа мия, мияча, узунчоқ мия, нерв тугунлари ва бошқа атрофдаги нервлардан ташкил топган бўлиб, улар организмда шундай жойлашганки, уларда кимёвий таҳлиллар ўтказиш учун уларни шикастлантирмасдан туриб ажратиб олиш ниҳоятда қийин. Иккинчидан, нерв тўқималари тирик организмдан четда ўзининг нормал ҳолатини тезда йўқотади. Учинчидан, уларнинг таркибида бошқа бирикмаларга нисбатан ўрганилиши бир оз оғирроқ бўлган липопротеидлар кўп. Нерв тўқималарида ўтадиган физиологик жараёнлар, яъни уларнинг қўзғалиши ёки

тормозланиши миянинг катта яримшарлар пўстлоқларида жуда тез ва қисқа муддат ичида ўтадики, уларда бўладиган муҳим биокимёвий ўзгаришларни текшириб кўриш қийин. Шунинг учун ҳам нерв тўқималарини биокимёси ҳозирга қадар ҳам тўлиқлигича ўрганилмаган деб айтиш мумкин.

Қорамол бош миясидаги нерв тўқималарининг кимёвий таркибига эътибор қилинганда уларни жуда мураккаб кимёвий таркибли эканлигига ишонч ҳосил қилиш мумкин. Чунки улар турли хил физиологик жараёнларин бажарувчи морфологик қисмлардан иборат бўлиб, ҳар бир қисми ўзига хос, муҳим кимёвий таркибга эга. Бу биринчи навбатда миянинг кулранг моддаси ҳамда оқ моддаси ва атрофдаги нерв тўқималарига тегишлидир. Сув миянинг асосий қисмининг, яъни кулранг моддасининг 80% ни, оқ моддасининг эса 63% ни ташкил этади. Липидларнинг миқдори кўп эканлиги юқорида айтилди. Улар миянинг кулранг қисмида 25% га қадар, оқ қисмида 40% га қадар ва атрофдаги нервлар таркибида ундан ҳам кўпдир.

Минерал моддалардан эса қуйидаги ионлар Na^+ , K^+ , Mg^{++} , Ca^{++} , Cl^- , HCO_3^- , H_2PO_4^- ҳамда темир, мис, алюминий, рух, марганец, йод ва олтингугуртларни кўрсатиш мумкин. Буларнинг мия ва нерв тўқималарида тарқалиши ҳам бир хил эмас.

1.2. Қорамол бош миясининг биологик таркиби

Мия ва нерв тўқималарининг турли қисмларида оқсил моддаларининг миқдори ҳам турличадир. Бош миянинг кулранг қисми айниқса оқсил моддаларга анча бой, нерв толаларида эса оқсил озроқ. Бундан ташқари улардаги оқсиллар турлари жиҳатидан ҳам бир-бирларидан фарқ қилади.

1891 йилда рус олими И.Я. Данилевский биринчи мартаба нерв тўқималари оксилларининг ичида оддий ҳамда мураккаб оксиллар бор эканлигини исботлаб берган. У миянинг кулранг моддасидан фосфорли глобулин ва ишқорда яхши эрийдиган оксил модда нейтروстроминни ажратиб олиб, таркибини ўрганди.

Мия ва нерв тўқималарининг таркибида, тери ва жун таркибида учрайдиган креатин оксил моддасига ўхшайдиган, нерв тўқималарига мустахкамлик берадиган нейрокреатин оксил моддаси бор эканлиги ҳам аниқланган.

Мия таркибидаги оксиллар асосан ёғ ва ёғсимон моддалар билан мураккаб комплекс бирикма ҳосил қилган бўлади. Улар сувда ва органик эритувчиларда эрувчанлик хусусиятларига қараб икки гуруҳга бўлиб ўрганилади, яъни протеолипидлар ва липопротеидлар. Булардан протеолипидлар фақатгина органик эритувчиларда яхши эриш хусусиятига эга. Буларга оксил моддаларни денатурацияга учратадиган моддалар таъсир эттирилганда липидлар ажралиб чиқади. Мия таркибида учрайдиган липоидларга фосфатидлар, церобразидлар, холестерин кабиларни мисол қилиб кўрсатиш мумкин. Оз миқдорда бўлсада нейтрал ёғлар бор эканлиги маълум. Мия таркибида липид ва липоидларнинг бўлиши табиий ҳолатда унинг таркибида ёғ кислоталарининг ҳам борлигидан далолат беради.

Нерв тўқималарининг таркибида оксил, липид ва липоидлардан ташқари углеводлар (гликоген ва глюкоза) ҳам бор эканлигини А.Л. Шабдаш деган олим текширган. 1921 йилда рус олими Б.И. Словцев эса, мия ва нерв тўқималарининг таркибида гликолизни юзага чиқарадиган жуда кўп оксил-ферментлар тўплами бор эканлигини аниқлади. Буларга амилаза, мальтаза, лактаза, сахараза, фосфорилаза, ҳар хил фосфатазалар, липаза,

лецитиназа, нуклеаза, протеазалар, холиэстеразалар, золимацетилаза, карбонакгидраза, каталаза, пероксидаза, цитохром системаси, дегидрогеназалар, пирозум кислотасини декарбоксилловчи, уч карбон циклида ҳамда аминокислоталар алмашинувида иштирок этувчи ферментларни кўрсатиш мумкин.

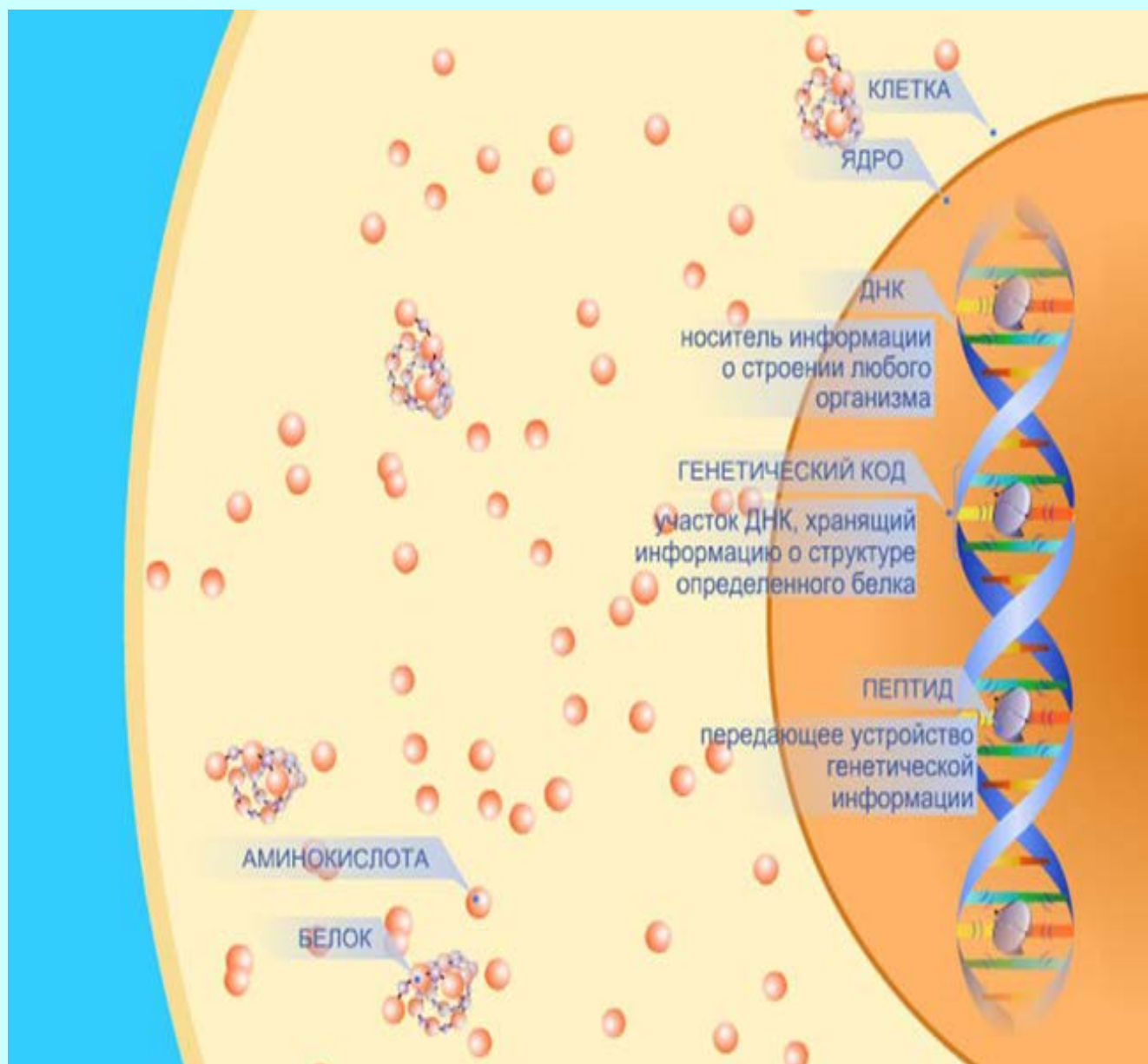
Демак, қорамол бош миясининг нерв тўқималари таркибидаги жойлашган юқоридаги оксил–пептидлар, аминокислоталар, ёғлар, углеводлар ва бошқа бир қатор органик ва аорганик моддалардан биз учун керак бўлган пептид табиатига мансуб бўлган нейрогормонларни ажратиб олишдир.

1.3 Қорамол организмидаги биологик фаол моддалар

Пептид ва оксиллар одам ва ҳайвонлар организмидаги метаболитик жараёнлар натижасида ҳосил бўладиган ва ниҳоятда катта аҳамият касб этувчи биологик фаол моддалар бўлиб ҳисобланади. Пептидлар пептид боғи воситасида икки ёки ундан ортиқ α -аминокислоталарнинг бирикишидан ҳосил бўлган органик бирикмалардир. Уларнинг синтезланиши асосида конденсация жараёни ётади ва шу сабабли улар α -аминокислоталарнинг поликонденсацияланиш маҳсулотлари.

Пептид ва метин гуруҳлардан ташкил топган занжир тармоқланган бўлиб, уларнинг кетма-кетлигидан иборат бўлади.

Пептидлар таркибидаги аминокислоталар сонига қараб ди -, три -, тетра ва бошқа гуруҳларга бўлинади. Пептидлар ўн ва ўнга яқин аминокислоталарни сақловчилари олигопептидлар, ундан ортиқ аминокислоталар тутувчилари полипептидлар деб аталади. Пептидларнинг эллиқдан ортиғи оксилларни ташкил ётади. Пептидлар табиатда ва хужайрада кенг тарқалган ва турли функцияни бажаради (1-расм).



1- расм. Хужайрада пептидларнинг тарқалиш

Анчагина гормонлар (кортикотропин, окситоцин, рилизинг гормонлар, инсулин, гастрин, эндорфинлар), антибиотиклар, бир қатор ҳайвон ва ўсимлик заҳарлари пептидлар қаторига киради.Энг содда пептидлардан дипептид – энсерин ва карнозин мушакларда мавжуд. Организмда кенг учрайдиган оксидловчи-қайтарувчи омил ва кофермент глутатион трипептиддир. Миядан руҳий ҳолатга, нерв фаолиятига таъсир этадиган қатор нейропептидлар ажратиб олинган.

Пептид ва оксиллар α -аминокислоталарнинг ўзаро пептид боғлари орқали бирикиши натижасида ҳосил бўлган моддалар бўлиб ҳисобланади. Уларнинг синтезланиши асосида конденсация жараёни ётади ва шу сабабли улар α -аминокислоталарнинг поликонденсацияланиш маҳсулотлари ҳисобланади.

Пептидларга шартли равишда, ўзида 50 тагача α -аминокислота қолдиғи сақлаган моддалар киритилади. Пептидлар ўз навбатида қуйидаги гуруҳларга бўлинади:

1. Олиго пептидлар ўзида 10 тадан ортиқ бўлмаган аминокислота қолдиғи сақловчи пептидлар.
2. Полипептидлар ўзида 10 тадан ортиқ, аммо 50 тадан ошмайдиган аминокислота қолдиғи сақловчи пептидлар.

Одатда полипептидда α -аминокислоталар сони 50 тага яқинлашиб борган сари пептид ўз аҳамиятини йўқота бошлайди ва бундай тушунчалар «синоним тушунча» сига айланади.

Пептид ва оксилларнинг кимёвий хоссалари ва биологик фаоллиги уларнинг таркибига кирган аминокислоталарнинг табиати, миқдорий нисбатлари ва полипептид занжирида жойлашув таркибига боғлиқ бўлади.

Пептид ва оксилларнинг таркибини аниқлашни 2 та катта гуруҳга шартли равишда бўлиш мумкин.

1. Пептид боғлари кислотали ёки ишқорий шароитда кўпгина аминокислоталарга парчаланиб кетганлиги, уларни аминокислоталарини

гидролиз жараёни одатда кислотали шароитда олиб борилади. Бундай шароитда ҳам баъзи аминокислоталар таркибий ўзгаришга учрайди.

Юқорида кўрсатилган сабабларга кўра кўп ҳолларда ферментатив гидролиз услубидан фойдаланилади ва бунда қўлланилган ферментлар – пептидазалар деб аталади. Пептидазалар таъсири табиатига қараб 2 турга бўлинади.

1. Эндопептидазалар – пептид ва оқсилларни ички қисмидаги пептид боғларни гидролизловчи.

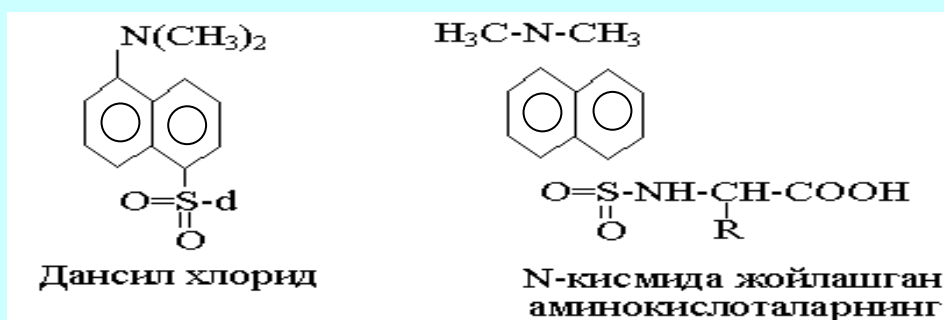
2. Экзопептидазалар – пептид ва оқсилларнинг ички қисмдаги пептидни N ёки C – қисми якинида жойлашган пептид боғларини гидролизловчи ферментлар.

Масалан: карбоксипептидаза - A оқсилларни C - қисмидан бошлаб гидролизлайди.

Қатор ферментлар маълум бир аминокислота иштирокида ҳосил бўлган пептид боғларини гидролизлаш табиатига эга бўладилар. Масалан: трипсин-лизин ёки аргининдан ҳосил бўлган пептид боғларни, химотрипсин, тирозин ва триптофан аминокислоталаридан ҳосил бўлган пептид боғларни гидролизлайди. Пептид ва оқсилларнинг таркибини аниқлашни 2 усули улардаги аминокислота жойлашув кетма - кетлигини аниқлашдан иборат бўлади.

Бу усулда турли моддалардан фойдаланилади. Бу моддаларнинг ўзаро ўхшаш хоссалари улар пептидларни N - қисми билан таъсирлашуви бўлиб ҳисобланади.

Фенилизотиоцинат ёрдамида аниқлашни Эдман реакцияси деб аталади. Юқоридагилардан ташқари аминокислоталар кетма-кетлигини аниқлашда



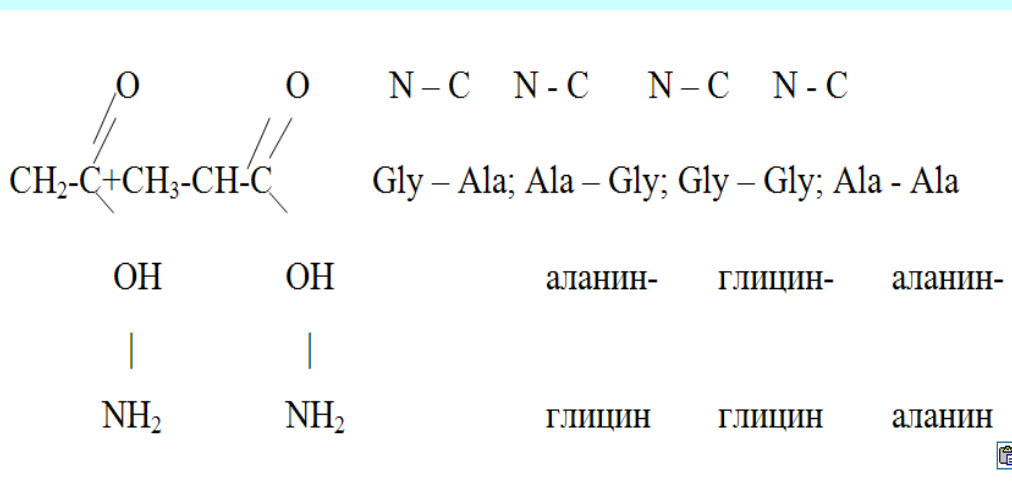
Дансил услубидан ҳам фойдаланилади.

Пептид боғининг тузилиши. Пептид боғидаги карбоксил гурухининг углерод атоми sp^2 -гибридланиш холида бўлади, азот атомидаги бўлинмаган электрон булут $C=O$ гурухининг П-электронлари билан таъсирлашган 3 та марказли система ҳосил бўлади ва унда электрон булут электроманфийлиги катта элемент томон силжийди.

Бу ўз навбатида атомлараро боғ узунлигини ўзгартиради. $C=O$ боғ узунлиги 0,121 дан 0,124 нм гача узаяди; $C-N$ боғ узунлиги эса 0,147 нм дан то 0,132 нм гача камаяди.

Пептид боғи ясси тузилишга эга бўлиб 1 сатх текисликда ётади, оқибатда $C-N$ боғи конформация бўлиш табиатига эга бўлмай қолади. Пептид боғининг бундай тузилиши ва аминокислоталар радикаллариининг ўзаро транс ҳолатда жойлашганлиги уларнинг ўзаро мумкин қадар узоқда жойлашувини таъминлайди.

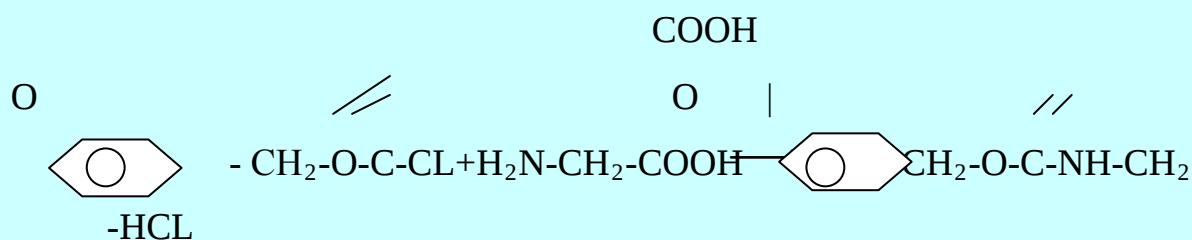
Пептидларнинг синтезланиш. Аминокислоталардан пептид ва оксилларнинг турли биологик фаол моддаларни *in vitro* шароитда олиниш имкониятини яратади. Аммо шу билан 1 қаторда турли таркиб ва тузилишга эга бўлган кўпгина моддалар аралашмаси бўлишига олиб келади. Масалан: глицин ва α -аланин аралашмалари 4 та дипептид ҳосил қилади.



Ўз навбатида 3 та аминокислотадан 6 та трипептид, 4 та аминокислотадан, 24 тетрапептид, 20 та аминокислота 10^{14} -пептид ҳосил қилиши мумкин.

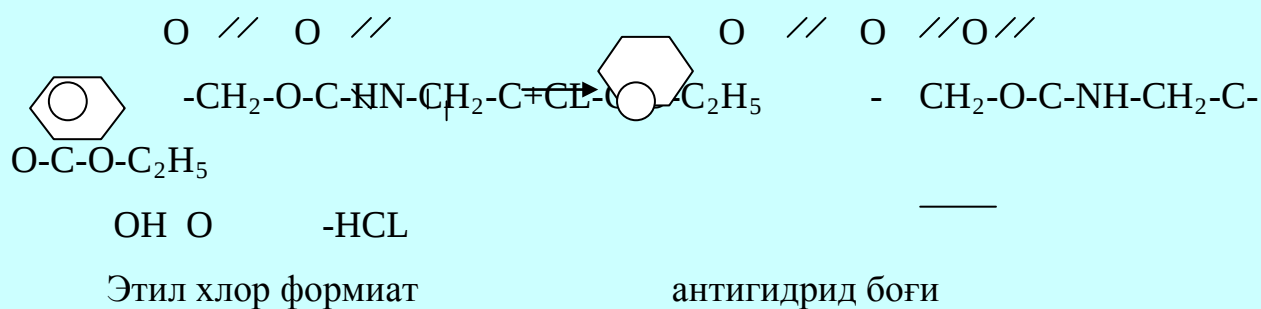
Ана шу сабабларга кўра пептид синтези боғи ҳосил қилишда иштирок этувчи гуруҳларни фаоллаштириш ва химоя орқали амалга оширилади.

1. NH_2 гуруҳини химоя қилиш.

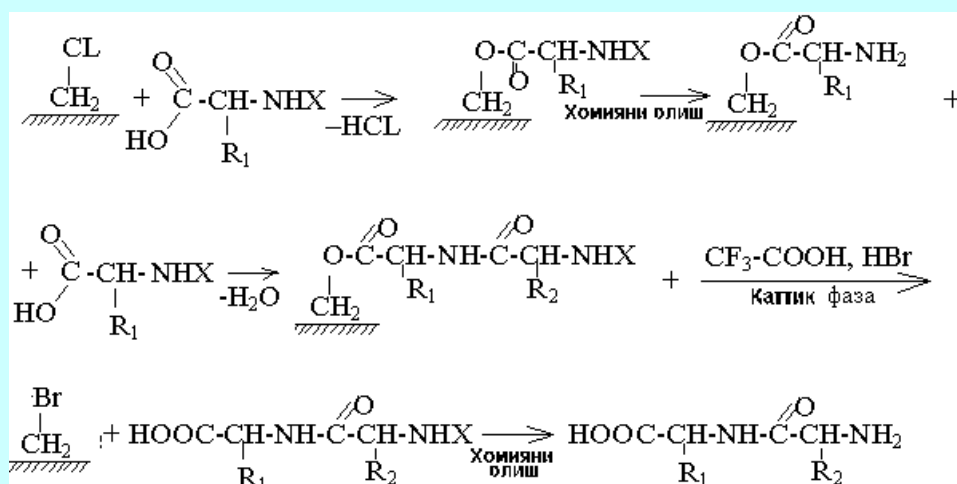


карбо бензоокси хлорид

2. COOH -гуруҳини активлаш



Ҳосил бўлган моддаларнинг % миқдорларини ошириш мақсадида каттик фазага услуби ишлаб чиқилди.



Нейропептидлар бош мия тўқималарида катта миқдорда учрайди ва уларнинг умумий номи энкефалинлар деб аталади.

1.4. Нерв тўқималарининг олигопептидлари (нейропептидлар)

Охирги вақтларда мия функцияларини бошқаришда иштирок этувчи бир қатор пептид факторлари топилди. Жуда кўп пептидлар очилди, улар нерв тўқималарига жуда паст концентрасияда таъсир қилади, модуляторлик функциялари сифатини оширади ва нейромедиатор гормонли тўқимлар ҳисобланади. Олигопептидлар ҳайвонларни бир қатор феъл-атворларига оид бўлган реакцияларни ўзгартиради ва уларнинг хотира механизмига боғланишини мустахкамлайди. Пептидларнинг нейронал фаоллигини кузатишлар натижсида уларнинг алоҳида вазифаси, шунингдек пептидларнинг классификацияси, нейропептидларни ҳосил бўлишида ноаниқ саволларга дуч келинади ва унга жавобан оқсил молекулаларининг парчаланиши ёки синтезланиши жараёнлари билан тушинтириш мумкин. Бу бирикмаларнинг янги ва кутилмаган функциялари очади.

1.5. Қорамол бош миясининг нейрогормонлари .

Бош миянинг функциялари ва метаболизмида аминокислота ва пептидлар асосий вазифаларда иштирок этадилар. Бош мия тўқималари барча аминокислоталар, ҳужайра қурилишини асоси бўлган оқсиллар, синтез қилинадиган бир неча липидлар, бир қанча гормонлар, витаминлар, нуклеотидлар, биологик фаол аминлар, пептид ва бошқа ҳаёт учун керакли бўлган бошқа моддалардан ташкил топган. Бош мияда унча катта бўлмаган энергия манбаини ҳосил қилишдаги аминокислотани роли, аминокислота, бевосита глутамин гуруҳга циклик трикарбон кислота билан боғланиши

натижасида ҳосил бўлади. Охириги вақтларда изланишлар натижасида шундай нуқтаи назарлар ўрнатилдики унга мувофиқ, функционалли аминокислота мумкин қадар бир нечта участкаларидаги синапсли қисимларида жуда тоза нейро суюқликлар нерв ҳужайраларида ҳосил бўлади.

Пептидларни нерв системасидаги функциялари жуда кам ўрганилган. Уларнинг алоҳида таъсир этиши, қаерга тез таъсир этиши нерв тўқималарида, бир-биридан фарқ қиладиган медиатор ва модуляторда бажарадиган роли, нерв алоқаларида бирга қатнашиш ва амалга оширишда, уларнинг таъсири нейронал фаолликка ва ҳайвонларда ўзини тиклаш реакцияларини ўзгаришлари билан ифодаланади.

Нейропептидлар қорамол бош мияси тўқималадида катта миқдорда учрайди ва уларнинг номини энкефалинлар деб аталади. Буларга гипоталамик нейрогормонлар, гипоталамус, глутатион, тиролеберин ва церебролизинлар киради.

Гипоталамик нейрогормонлар. Аденогипофизнинг марказий томирларида гипофиздан секреция қилинадиган ва гипофизнинг тропгормонлари чиқарилишини кучайтирадиган ёки сусайтирадиган пептид табиатига эга гормонлар туркуми ҳисобланади.

Гипоталамик нейрогормонлар организм ҳаётининг барча функцияларини ростлаб туришда қатнашади ва марказий нерв системасининг олий бўлимлари билан эндокрин система орасидаги алоқаларни таъминлаб туради. Гипоталамик нейрогормонлар рилизинг гормонлар деб ҳам аталади.

Гипоталамус. Миядаги кўрув бўртиғининг остки қисми миянинг ўртасида жойлашган бўлиб, кўзнинг ҳаёти учун энг муҳим жараёнларни таъминлайди ва бошқаради. Гипоталамус гипофиз ва вегетатив нерв системаси орқали жинсий безлар билан узвий боғланган бўлиб, бир бутун гипоталамик – гипофизар-эндокрин системани ташкил қиладди. У ажратиб чиқарадиган махсус гормонлар – нейрогормонлар бошқа безларга таъсир этиб, уларни бир тартибда ишлашга ундайди. Одамнинг ички муҳитида

содир бўладиган барча жараёнларнинг бир меъёردа боришини таъминлайди. Моддалар алмашинуви, юрак - қон томир, овқат ҳазм қилиш, ажратиш системалари ва ички секреция безлари фаолиятини, уйқу, сергаклик, ҳаяжонланиш механизмларини ҳамда ташқи муҳитга мослаштириш каби кўпдан - кўп ҳаётӣ жараёнларни бошқаради.

Церебролизин - нейроактив элементларининг алмашинишига ва металл сақловчи ферментларнинг фаоллигига таъсир кўрсатади. Церебролизин кўпроқ маълум ва кенг қўлланиладиган ва келиб чиқиши табиӣ бўлган препаратдир. У нейропротектор, антиоксидант ва нейротрофик самарага эга. Нисбатан осон гематоэнцефалик тўсқдан ўтиб нерв хужайраларигача етиб боради. Бу билан церебролизиннинг тадқиқот ўтказилаётган препаратлардан яъни нерв ўстирувчи омиллар, мия нейронларини ўстирувчи омиллардан фарқ қилади. Чунки бу йирик молекулалар гематоэнцефалик тўсқдан ўта олмайдилар. Бунинг натижасида улар жуда кичик терепевтик потенциалга эга. Бу вақтда юқори технологик ва церебролизин ишлаб чиқариш жараёнининг сақланиши, экстрактни нейротрофик таркибини деградациядан асрайди. Бироқ кўп тиббий тадқиқодлар церебролизиннинг нейротрофик фаоллигини таъминловчи ва унинг таъсир қилиш механизми ҳали тўлиқ аниқланмаганлиги боис ишлар секинлик билан давом этар эди. Сўнгги йилларда кўзга кўринарли даражадаги ҳолатлар пайдо бўла бошлади. Янги маълумотлар пайдо бўла бошлагач церебролизиннинг антиоксидант самараси, таъсир кўрсатувчи нейротрофик фаоллик микроэлементлар гомеостази, антиапаптоз самара MAP 2 оқсили даражасини ошиши ва алмашинувини нормаллашувига сабаб бўлади. Церебролизиннинг физиологик самарасини тушунишда олдинга силжишлар бўлишига қарамасдан препаратда мавжуд бўлган олигопептидлар таркибини аниқлаш, таъсири, препаратни текшириш натижасида ҳосил бўлган липид, ёғ кислоталари чўкмалари ва улар металлларини ионли даражасига таъсири,

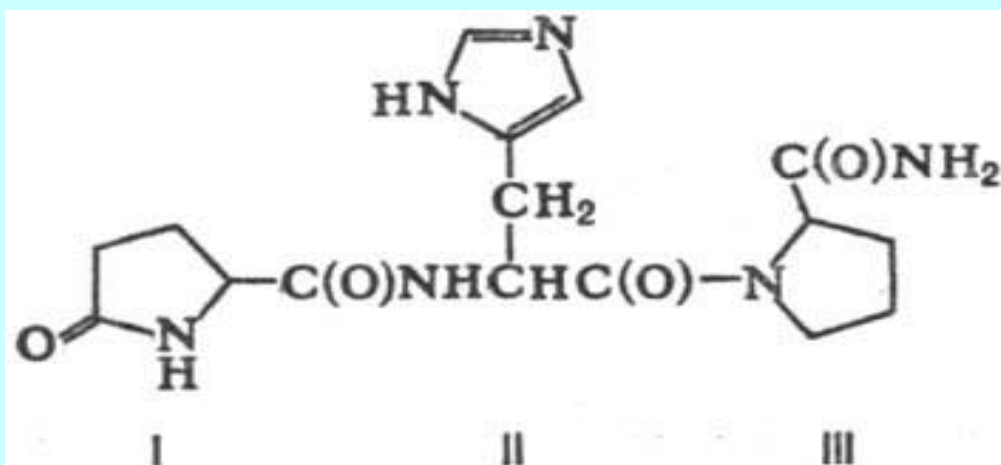
шунингдек препаратни таъсиридан юқори самара олиш мақсадида ва услубини аниқлаш билан боғлиқ бир қатор саволлар мавжуддир.

Церебролизин - таркибида 85% аминокислоталар ва 15% пептитидлар бор. 1мл церебролизин эритмасини 1г хайвон миясидан олинади. Дори воситасининг бошланғич таъсири бўлиб церебролизин таркибига кирувчи ўзига хос аминокислоталар ва пептилар ҳисобланади. Церебролизин пептидларининг молекуляр массаси 10000 Д дан ошмайди. Бу ўз навбатида анафилактик жараёнлар кузатилишини олдини олади. Шунингдек гематоэнцефалик барьерни орқали енгил ўтиб олишни ва бош мия нейронларининг метаболизмида фаол боғланишни таъминлайди.

Церебролизин олигопептидлардан ташкил топган бўлиб, уларнинг молекуляр массаси 6000 – 7000 Да дан 10000 Да гача бўлади. Церебролизин пептиди таркибини кузатишлар натижасида унинг таркибида : тиролиберин (Glu-His-Pro), глутатион (Gly-Cys-Glu), коллаген (Gly-Pro-Hyp) ва энкефалин (Tyr-Gly-Gly-Phe) пептидларидан ташкил топганлиги маълум бўлди.

Церебролизин таркибидаги трипептид тиролиберин (аминокислота тузилиши тартиби Glu-His-Pro) нинг асосий вазифаси гипофиз безидан тиротропин гормонини ажралишини кучайтиради ва ўсиш гормони кортикотропинни ишини кучайтиради (Гомазков О.А., 2001, Одинак М.М., Цыган Н.В., 2005; Monga V, 2008).

Тиролиберин [тиреотроп-рилизинг-фактор (гормон)], гипоталамуснинг пептидли гармони. Тиролиберин молекуласининг массаси 362 мол. бўлиб, учта аминокислотадан ташкил топган. Улар пироглутамин (ф-ла I), гистидин (II) ва пролинамиддир (III). Тиролибериннинг структура формуласи ҳозирча аниқ эмас. Тиролиберин одам ва ҳайвон организмнинг гипоталамусида синтез қилиниб, қон орқали гипофизни стимуллаб триотроп гормонини ишлаб чиқилишини кучайтиради ва у ўз набатида организмдаги йод моддаси миқдорини бошқарувчи тироксин ва трийодтиронинни ишлаб чиқувчи қалқонсимон без функциясини бошқаради.



Тиролиберин бундан ташқари гипофиздан ажраладиган пролактин ва соматотропинни рағбатлантиради.

Тиролибериннинг таъсир қилиш механизми гипофизнинг фаол тизимлари аденилатциклаза ва циклик аденозинмонофосфат орқали амалга оширилади. Тиролебериннинг таъсир қилиши ҳужайра рецепторлари имидазолли гистидин халқаси орқали боғланиши билан ифодаланади.

Тиролиберинлар фақатгина бош миянинг гипоталамусда синтезланмай, балки ошқозон ичак соҳаларида ҳам ҳосил бўлади. Тиролебериннинг ишлаб чиқарилишини марказий нерв системасидаги реакция натижасида бошқарилади. Бир қанча тиролиберинлар нерв системасининг ҳужайраларида топилган ва уларнинг функциялари ўрганилиб нейропептидлар гуруҳига киритилган.

Қон плазмаси ва тўқималарда тиролиберинлар юқори ферментатив афаолликка эгадир. Тиролиберинларнинг одам қон плазмасида миқдори 4 минг тани ташкил этади.

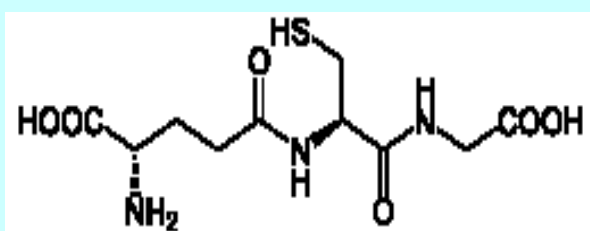
Тиролеберинларнинг юқори фаолликка эга бўлган синтетик шакилларини кимёвий йўллар билан синтез қилиб олинган ва бугунги кунда тиббиётда синтетик препаратлар сифатида қўлланилиб келинмоқда.

Церебролизин таркибидан ажратиб олинган яна бир тирпептид глутатион (аминокислотали тузилиши Gly-Cys-Glu) бўлиб, у ҳам кучли биологик фаол антиоксидант ҳисобланади. Глутатион – одам организмида кенг тарқалган олигопептид бўлиб, барча ҳужайра ва тўқимларда, буйрак усти безларида, эритроцитларда, бош мия суюқлигида, мияда, кўз гавҳарида мавжуддир.

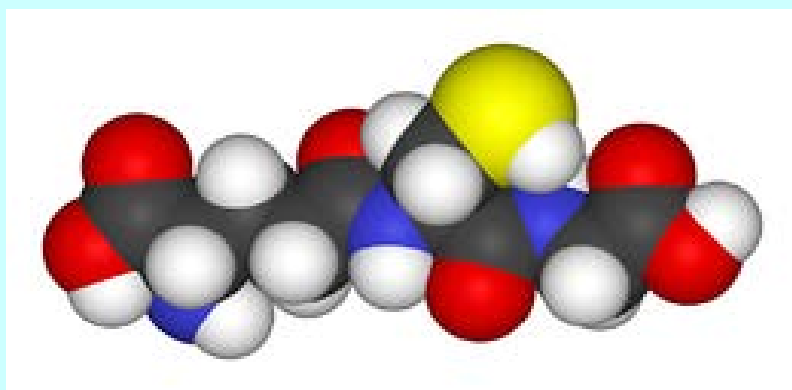
Глутатионнинг ўзига хос муҳим функцияларидан бири оксидланиш–қайтарилиш реакцияларида иштирок этишидир. Яна бир муҳим функцияларидан глутатион одам организмида оксилларнинг ва аскорбат кислотанинг тузилишининг тикланишида иштирок этишидир.

Глутатион.

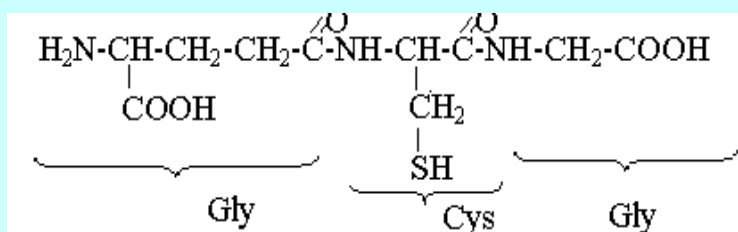
Глутатионнинг структура формуласи



Глутатионнинг уч томонлама схемаси



Глутатионнинг қайтарилган шакли

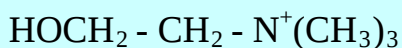


α -Глутамил-цистенил-глицин. Глутатион (2-амино-5-{{2-[(карбоксиметил)амино]-1-(меркаптоэтил)-2-оксоэтил}амино}}-5-оксопентанолли кислота, англ. glutathione, GSH) — бу уч пептидли γ - глутамилцистеинглициндир. Глутатион асосан унча мураккаб бўлмаган бир нечта амина гуруҳларни ташкил этган цистеин ва карбоксилли гуруҳларни ташкил этган ён занжирли глутаматли пептид боғларидан ташкил топган. Глутатион асосон ҳужайрадаги ҳар - хил ёт моддаларни аниқлашдан иборат. Глутатион фақатгина ҳужайрани ҳимоя қилишдан эмас балки ҳар—хил токсик моддалар, эркин радикалларни ва уларни ҳужайралар аро редокс жараёнини аниқлайди.

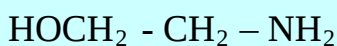
Церебролизин таркибидан ажратиб олинган яна бир трипептид энкефалин (аминокислотак тузилиш тартиби Tyr-Gly-Gly-Phe) бўлиб, у нерв системасининг периферик қисмини кенг диапозонда ишлашини таъминлайди.

Энкефалин бошқа пептидлар билан ҳосил қилган бирикмалари орқали оғриқни сезувчи, таъсирланишни кўзғотиши ва адаптация жараёнларини бошқаради (Rohliff С., 2001). Энкефалин ҳосил қилган бирикмаларидан бири лейцин - энкефалиндир. Лейцин — энкефалин аминокислоталардан ташкил топган бўлиб, унинг тузилиши формуласи куйдагичадир : Н- Tyr-Gly-Gly-Phe-Leu-ОН. Лейцин-энкефалин жуда кўп соматик функцияларни бошқариб туриш вазифасини бажаради (Громова О.А., 2004, Северин Е,С., 2005, Rohliff С., 2001).

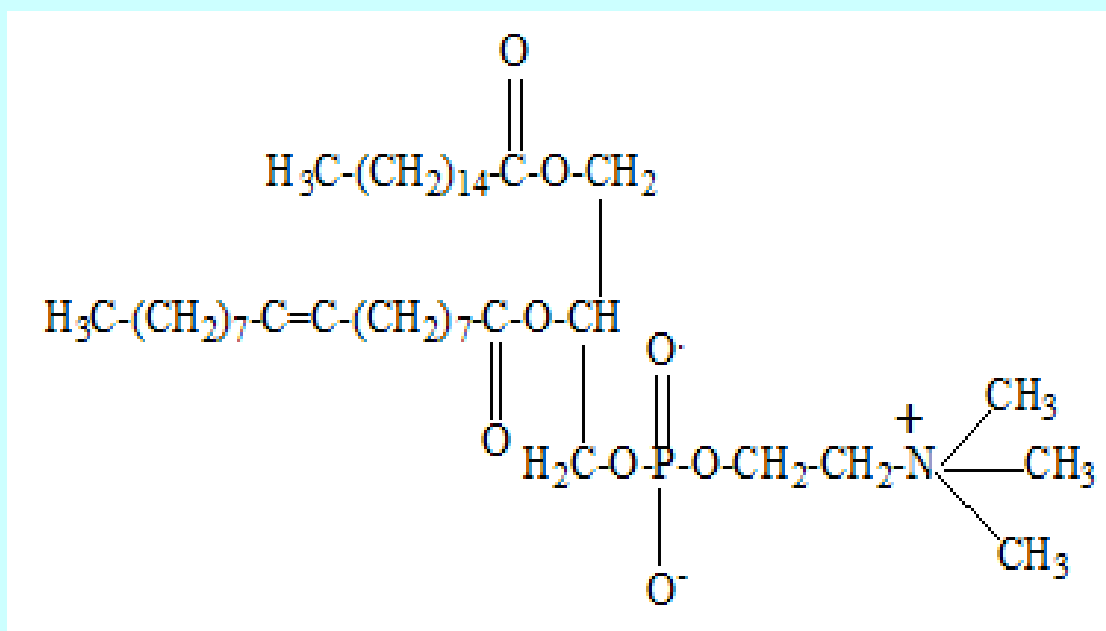
Лецитин ва кефалин мия тўқимасидан ажратиб олинади. Турли манбалардан олинган лецитин ва кефалиннинг структураси бир хилдир. Лецитин таркибидаги азот асоси холин метилланган оксиэтил аммонийдир:



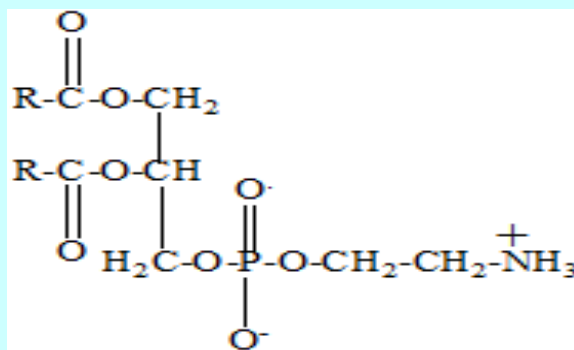
Кефалин таркибига оксиэтиламин ёки коламин киради :



Фосфоацилглицеринлардаги ёғ кислоталар, кўпинча, табиий ёғ таркибидаги узун занжирли (пальмитат, стеарат, олеат, линолеат ва бошқалар) кислоталарнинг ўзгинасидир, лекин лецитин молекуласида тўртта кўш боғ тутувчи арахидонат кислота ҳам бўлиши мумкин. Миядан олинган фосфатидлар таркибида (нисбатан кўп миқдорда) C_{22} қаторига кирадиган тўйинмаган ёғ кислоталарнинг тутиши билан фарқланадилар. Лецитинларнинг кўпчилигидаги икки молекула ёғ кислотанинг бири тўйинган, иккинчиси тўйинмаган бўлса ҳам, уларнинг орасида фақат тўйинган ёки фақат тўйинмаган ёғ кислота тутувчи вакиллари ҳам учрайди. Жигар ва тухум сариғидан олинган лецитинларда ҳам иккала типга тегишли ёғ кислоталари бор, улар глицериннинг маълум углерод атомларига бириккан: тўйинмаган ёғ кислота δ - ҳолатда, тўйинган ёғ кислота эса фақат α – ҳолатда бўлади. Лецитин ва бошқа глицерофосфатидлар фосфат кислота ва азот асоси α - ҳолатда бўлганидан, α - фосфатид деб аталади:



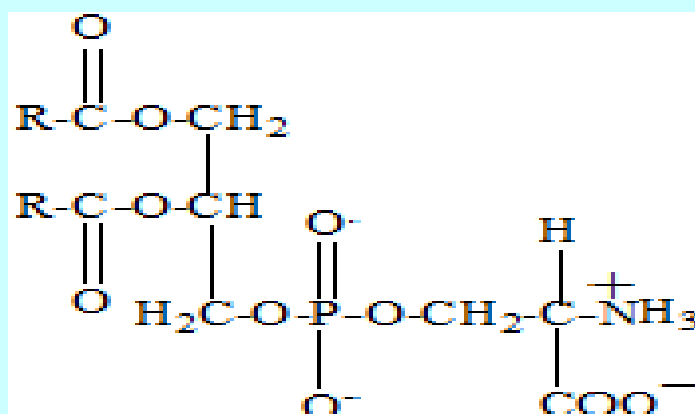
Фосфатидилхолин (лецитин)



Фосфатидилэтаноламин (Кефалин)

Лецитин ва бошқа глицерофосфатидлар молекуласида глицериннинг δ - углероди атрофида асимметрия маркази бор. Табиатда учрайдиган – лецитин ва структураси ўнга яқин бўлган бирикмалар Л-А – глицерофосфат ҳосилаларидир. Лецитин ва кефалин структурасида яна шу нарсага эътибор бериш керакки, улар диполь ионлар бўлиб, таркибидаги фосфат кислотанинг манфий заряди тўртламчи азотнинг мусбат заряди билан нейтралланиб туради, лекин этаноламин таркибидаги аминогруппа холиндаги тўртламчи азотга қараганда кучсизроқ асосли бўлганидан, кефалинлар баъзан кўпроқ кислота табиатга эга.

Серин – фосфатидлар таркибида азотасоси ўрнида оксиаминокислота – серин туради: церебролизин таркибидан ажратиб олинган яна бир трипептид Коллогенга ўхшаш пептид бирикма бўлиб унинг аминокислотали таркиби қуйдагича бўлади: Gly-Pro-Hyp. Бу пептид коллаген ва бошқа оксилларни синтез қилинишида қўлланилади.



II-БОБ.ТАДҚИҚОТ ОБЪЕКТЛАРИ ВА УСЛУБЛАРИ.

2.1. Тадқиқот объекти.

Тадақиқот материали қорамоллар ҳисобланади. Қорамолларнинг бош қисмини танасидан ажратилади ва тадақиқот сифатида фойдаланиш мақсадида қорамолнинг бошини калла суягидан ажратиб олиб нерв, ҳужайра ва тўқималаридан ташкил топган қисмини ўрганиш учун олинади.

2.2. Илмий ишда фойдаланиладиган реактивлар.

Илмий тадақиқот ишида фойдаланилган кимёвий моддаларга: совук ацетон, сирка кислотаси ва изопропионат спирти.

2.3. Ускуналар.

Илмий тадақиқот ишида қуйидаги лаборатория асбоб ва ускуналаридан фойдаланилди: ҳужайра ва тўқималар деворини бузишда ишлатиладиган гомогенизатор ёки ультратовуш, лиофил қуритгич аппарати, эксикатор, марлили филтёр, центрифуга аппарати, гелъ - филтрация ва колонкалар киради.

2.4. Қорамол бош миясидан церебролизиннинг ажратиб олиш.

Ҳужайра компонентларини ажратиб олиш. Қорамол бош миясининг ҳужайра структур компонентларини ҳосса ва хусусиятларини ўрганишда асосий мақсад биокимёвий таҳлил ва экспериментда етарли миқдорда нисбатан тоза материал олишдир. Одатда бундай мақсад учун кўп сонли ҳужайра популяцияси ёки маълум миқордаги тўқима керак бўлади.

Қорамол бош миясининг ҳужайра органоидларини ажратиб олиш бўйича қўлланиладиган стандарт усулларни дастлабки босқичи махсус ажратиб олиш муҳитида гомогенизатор ёки ультратовуш ёрдамида

майдалашдир. Ажратиб олиш муҳити сифатида сахароза, маннит ёки совуқ ацетонда ва шу сингари нисбатан инерт органик моддалар маълум рН кўрсаткичли буфер эритмада эритилади. Эритманинг осмотик кучи, рН, таркибидаги реагентлар ажратиладиган хужайра органоидига таъсир қилмаслиги керак. Ажратиб олиш жараёнидаги ҳамма операциялар совуқ хона (0+4°C) ёки совуқ шароитда олиб борилиши керак. Гомогенизацияда олинган суспензияни фракциялашдан кейинги босқичи совутгичли центрифугада дифференциал центрифугалашдан иборатдир.

Ажратиш жараёнда ажратилувчи компонентларни физик ёки кимёвий хоссаларга асосланади. Хужайра органоидларини фракциялашда ажратилувчи заррачалар ҳажми, шакли, зичлиги орасидаги фарқларга асосланади.

Центрифугалаш жараёнида заррачаларни ҳаракати R радиусли зичликка эга бўлган заррача центрифуга пробиркасига солинган бўлса ундаги суюқ муҳит ρ_0 зичликка ва μ е қовушқоқликка эга бўлса, ундаги суюқ муҳит ρ_f зичликка μ е қовушқоқликка эга бўлади. Бу пробиркани центрифугага жойлаштириб ω бурчак тезлигида айлантирилса қуйидаги тенгламадан фойдаланиб заррачалар ҳаракат параметрларини ҳисоблаб чиқиш мумкин.

$$G\pi\omega_e R u_r = \frac{4\pi R^3}{3} G(\rho_0 - \rho_f)$$

U_r - радус бўйича заррачани тезлиги

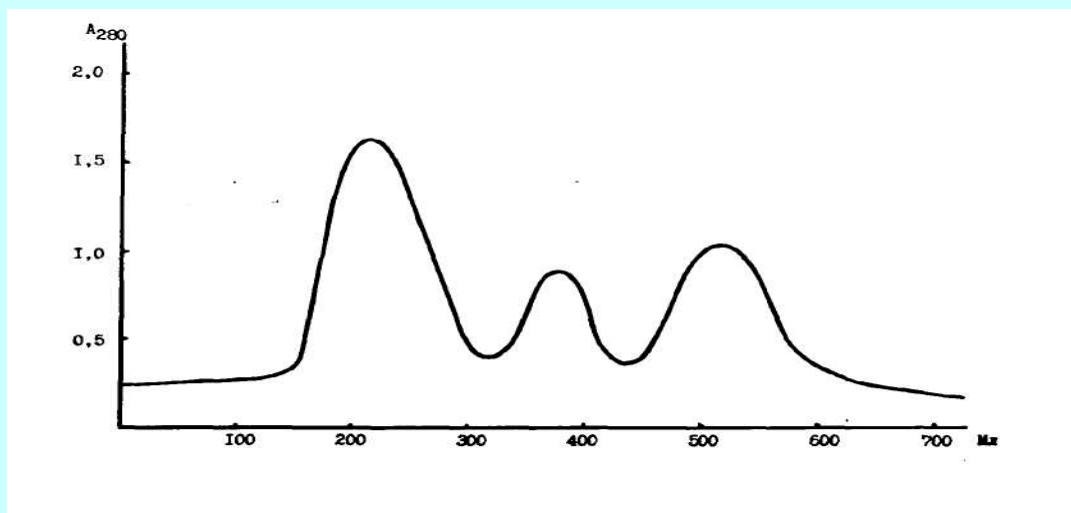
G- марказдан қочма куч

Центрифуга ротори катта бурчак тезлиги билан айланганда G - тезланиш 600-600000 гача g га етиши мумкин.

Турли размер ва зичликка эга бўлган сферик заррачалар центрифуга пробиркасида бир хил масофани ҳар- хил вақт давомида ўтайди.

Центрифугалаш тугагандан сўнг олинган гомогенатнинг лиофиль курутгич апаратига уланади. Лиофиль курутгичида гомогенат 24 соат

мобайнида туради. Пептидларни ажратиб олишни 2,5x100смли гелфилтрация каллонкасида Г-25 сефаддекс билан 60мл/соат оқим тезлигида амалга оширдик. Бунинг учун 500мг қуритилган бош мия экстрактини 0,3%ли сирка кислотасининг минимал ҳажмда эритиб, центрифугалаб калонкага киритдик. Олинган хроматограмма 3 – расмда берилган.



3–расм. Қорамол бош мияси экстракти (500мг) 2,5x100см калонкада Г-25 сефаддекс билан 0,3%ли сирка кислотасида 60мл/соат оқим тезлигидаги гелъ филтрацияси. Сизгирлиги 2 ОБ (оптик бирлик). Нур ютилиш кўрсатгичи 280 нм.

Кичик молекуляр массали пептидлар (М.М. 5000-10000Да) иккинчи пикда кўриниши тасдиқланган. Бу фракция лиофилда қуритилгандан кейинги биологик фаолликни аниқловчи тадқиқотлар шу намуна асосида олиб борилади.

III-БОБ.НАТИЖАЛАР ВА МУҲОКАМА

3.1. Церебролизин таркибидаги пептидлари аниқлаш.

Церебролизин таркибидаги пептидларнинг аниқлаш учун бир нечта экспериментал методлардан фойдаланилади. Экспериментал жараёнлар асосан 4 босқичли бўлимдан ташкил топган бўлиб, уларга:

- препаратни тозалаш;
- пептидли фракцияни масс - спектрда аниқлаш;
- пептид компонентларининг хроматографияда бўлинишини аниқлаш;
- пептид таркибидаги аминокислоталарнинг кетма–кетлигини ўрганиш;

3.2. Пептид фракциясини масс – спектрини олиш.

Масс – спектрлар Reflex IV (Bruker, Германия) MALDI-TOF жиҳозида рефлексорли режимда, 377 нм тўлқин узунлигга эга азотли лазердан фойдаланилди ва 9 Гц частота импульсли мусбат ионлар режимида ушланиб қолиш вақти анализаторда – 200 н сек, тезлаштирувчи электродда кучланиш 20,0 кВт , йиғувчи электродда - 16,5 кВт, фокусирловчи линзада 9,5 кВт, рефлексорда – 23,0 кВт бўлади. Масс–спектрометр параметрлари m/z 0 дан 4000 диапазон учун оптималлаштирилган эди, пептидлар масс – спектрларнинг калибровкали константаларини аниқлаш учун фойдаланилади. Олинган пептидларнинг масс–спектрлари кўшимча равишда маълум массасига кўра ички стандартга кўра калибровкаланди. Хар бир масс–спектр лазерли нурланиш қуввати таъсирида намунанинг хар бир нуқтасида ўртача 300 йиғилма олишда ҳамма намуна учун матрица сифатида 65 мг/мл 2,5 – дигидроксибензой кислотанинг (Fluka, Германия) 20 % ли ацетонитрилда 0,1 % ли трифтор уксус кислота (Merck, Германия) ва ундан кейин 0,3 мкг ли намунани пўлат нишонли юзага киритилади. Юзага (Bruker Daltonic, Германия) Biomek 2000 дозатор – роботом 0,5-1,5 мл (Beckman Coulter) орқали киритдик. 0.3 мкл матрица эритмани кўшдик ва ҳавода

куритдик. Қайта кристалланган 1 – 2 марта 0.3 мкл матрица эритмаси қуйдик. Ора – орада ховода куритдик. 10 марта кристалнинг катталашгунча ва кўзга кўрингунча давом эттирдик. Барча қўлланилган эритмалар хатто сув (Merck, Германия) ҳам махсус масс–спектрометрик татқиқот учун мўлжалланган.

Пептидли фракциянинг масс-спектра аниқлаш. Церебролизин пептиди қорамол ва чўқаларнинг бош мияси экстрактидан олинади. Церебролизин пептидини ҳозирги кунда жуда кенг қўлланилиб келинаётган масс–спектрометрия методидан фойдаланиб препарат таркибини текширилганда концентрланган юқори молекуляр брикмалар ва уларнинг молекуляр массаси ўзгариш чегаралари 6000 – 7000 Да ни кўриш мумкин (Расм – 4).



Текширишлар натижасида церебролизин пептиди таркибидаги аминокислоталарнинг ичида энг энгил пептидли фракцияларининг

молекуляр массаси 500 Да гача бўлиши, церебролизин пептиди таркибидаги тиролеберин, глутатион, энкефалин ва бошқа бир қатор дипептидлар типлари яъни ala – pro, Val – glu ва бошқалар аниқланди.

Олинган натижаларга қаралганда церебролизин фракцияси таркибида енгил дипептидлардан ўнга яқини аниқланиб ушланган. Бу дипептидларнинг молекуляр массаси 500 Да гача бўлади ва бу пептидлар ala – pro, Val – glu , ala- gln ва бошқа аминокислоталардан ташкил топган. Церебролизин таркибидаги енгил дипептидли фракцияларнинг биологик функциялари хали тўлиқ аниқланмаган. Тахминан церебролизин таркибидаги дипептидларнинг аминокислоталари бирикиб юқори тузилишли пептид структураларини ҳосил қилиш мумкин.

Дипептид ва нейропептидлар тиролеберин, глутатион, энкефалин пептидлари ва энг кўп тарқалган енгил пептид фракциялари (200-500 Да гача) церебролизиннинг ташкил этади. Енгил пептидлар фракцияси орасидаги узун занжирлили пептидларнинг 2–4 та аминокислота ташкил этади.

Масс–спектрограммада аниқланган церебролизин экстрактини кейинги типларида 500 да дан 1500 Да гача бўлган пептидли фракциялари жойлашганлигини кўриш мумкин. 500–1500 Да орасида жойлашган узун пептидларни таркибида 5–10 тагача аминокислоталар ташкил этади ва уларнинг биологик фракциялари юқори бўлади, енгил пептидли фракцияларга қараганда.

Тўзсизлантириш. Пептидларнинг тўзсизлантириш центрифуга аппарати ёрдамида мини колонкадан ўтказилади. 0.75 4.5 см ли (Raining Instrument, США) мини колонкага , 2 мл G-10 (Pharmacia, Швеция) сефедекс қуйилади, метанол: сув (85:15 нисбатдаги) деконтрланган аралашмаси, ўша эритмадан 160 мкл томчилатиб қуйилади ва центрифугада тезлаштирилади 1 минут 1000 г да. Бу жараённинг қайта такрорланади, қайсики эритмада 150 мкл қолмагунича. Кейин намунадан 160 мкл томчилаб гелга киритилади ва

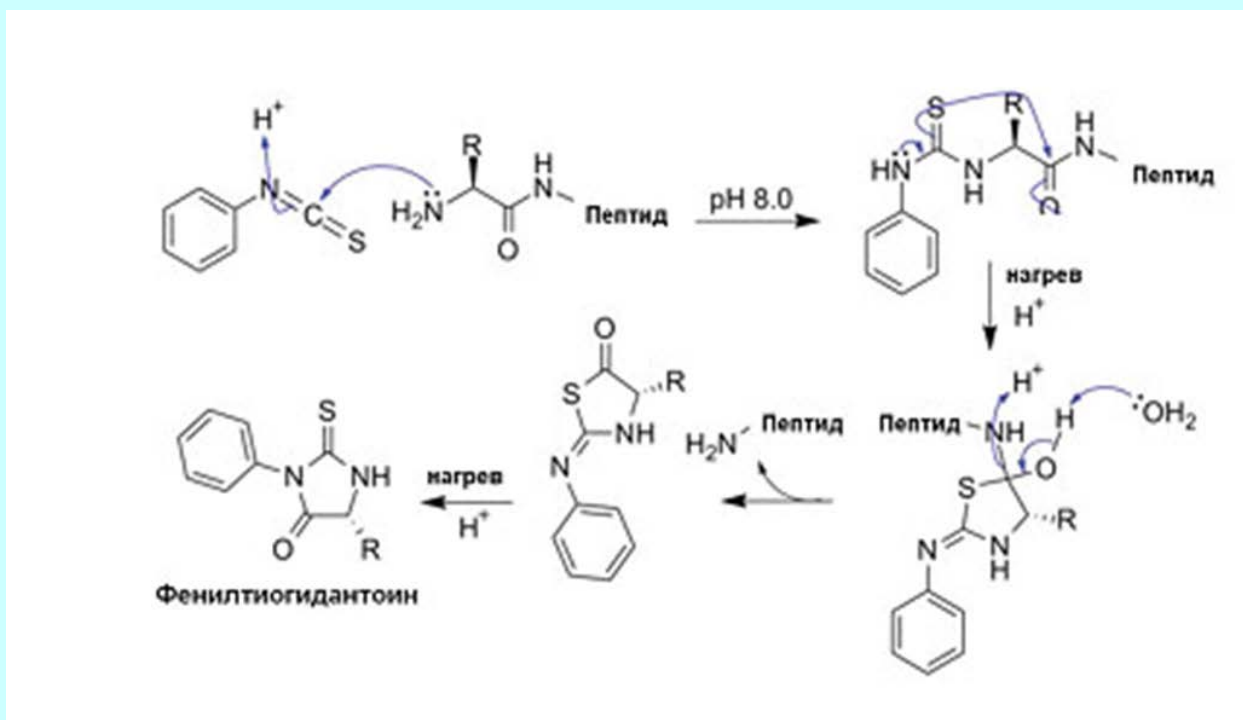
центрифугаланади, юқорида ёзилганидек. Гель бир марта ишлатиб бўлинганидан сўнг алмаштирилади. Бу жараён (чора тадбирдан сўнг) оксил йўқолиши 35 % дан кўп бўлмади.

3.3. Пептид компонентларининг хроматографияда бўлинишини аниқлаш.

Пептид компонентларининг хроматографик бўлинишини П.Г. Лохова ва хаммуаллифлар ишлаган усул орқали ўрганилади. Юқори фаолликдаги суюқлик хроматография, хроматография апарати AGILENT ни диасорб C16T (Элсико,Россия) калонкасидан фойдаланилади. Оқиш тезлиги 0,8 мл/минни ташкил этади, наъмуна ҳажми 50 – 1000 мкл, $t = 20$ С га яқин. Фракциянинг УФ-детекторини 214 нм частота тўлқинли чизиғи ёрдами билан кузатиб борилади.

3.4. Пептид таркибидаги аминокислоталарнинг кетма – кетлигини ўрганиш.

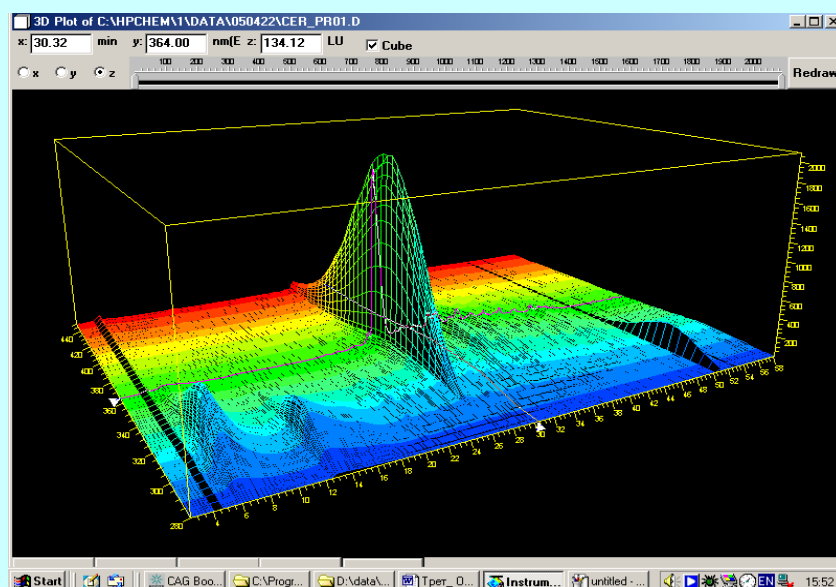
Пептид таркибидаги аминокислоталарнинг охириги – N учларини топишда Protein/Peptide Sequencer (модели 477A, Applied Biosystems, США) асбобидан фойдаланилади. Фенилтиогидантоинни (ФТГ) идентификациялаш анализатор 120A PTH Analyzer (Applied Biosystems, США) али амалга оширилади. Эдман ишлаб чиққан алоҳида усул шундан иборатки пептид таркибида автоматик равишда ишлайдиган аминокислоталар кетма – кетлигини ва оксил таркибида жойлашган полипептид занжирининг бузилиш усулларини аниқлади. Эдман ишлаб чиққан метод аминокислота қолдиғидаги азот учларини кетма–кет узиши ва ФТГ кўринишидаги ФТГ аминокислоталарини идентификациялаб кўчириб, юқори фаолликка эга бўлган суюқлик хроматографиядан фойдаланилади. Хулоса қилиб шуни айтиш мумкинки , фенилтиоцианат аминокислотадаги асосий занжирдаги N – учларини кетма – кет келишини бошқариш 5 – расмда кўрсатилган.



4 – расим. Эдманнинг химиявий реакцияси.

3.5. Церебролизиннинг пептидли фракцияси.

Церебролизиннинг пептидли фракциясини олиш учун юқори фаоликка эга бўлган суюқлик хроматографиясидан фойдаланилади. Бу усулдан фойдаланиб церебролизиннинг таркибидаги бирикмаларнинг уч тамонлама хроматографиясини 6 – расмда кўришимиз мумкин.

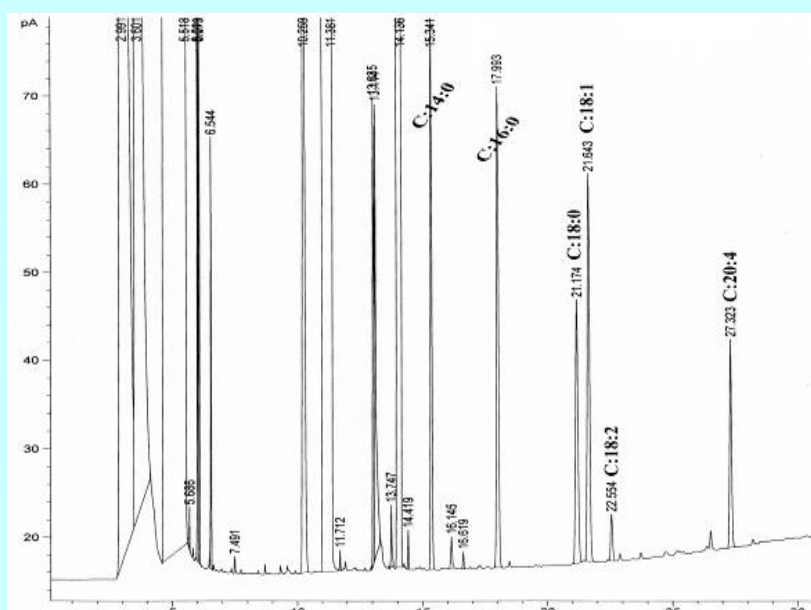


6 - расм. Церебролизин пептидини уч ўлчамли спектри. (FPF-1070) фирма «EBEVE» Австрия), базаси ВЭЖХ ва FLD детекторидан фойдаланилади.

Церебролизин препаратини таркиби уч гуруппали бирикмаларга бўлинади ва уларнинг қуйдагича номланади: гидрофилли (ушланиб қолган вақт (RT)<5 минут), нейтралли (RT 5 дан 20 минут гача) ва лиофильли (RT>20 минут).

3.6. Церебролизиннинг ёғ кислотали таркиби.

Церебролизиннинг ёғ кислотали таркибини аниқлашда газ– суюқлик хроматографияси методидан фойдаланиб церебролизиннинг қуйдагича хроматограммасини оламыз. Расм – 6.



Расм – 7. Церебролизиннинг ёғ кислотали хроматограммаси.

Церебролизиннинг таркибини стандарт аниқланишидан сўнг миристилли, пальмитионли, пальмитолеинли, стеаринли, олеинли, линолли ва арахидонатли ёғ кислоталари борлиги аниқланди. Уларнинг концентрацияси ва айрим умумий ўлчамлари 1 – жадвалда келтирилган.

1 – жадвал

Церебролизиннинг ёғ кислотали таркиби ($M \pm m$; $n=10$).

Церебролизин таркибидаги идентификацияланган ёғ кислоталари ва уларнинг концентрацияси $p < 0,05$.		
№	Концентрация, мкг/мл образ ($n=10$)	Ёғ кислоталар тартиби
1	$20,5 \pm 2,14$	Миристоил кислота (C:14:0)
2	$25,0 \pm 1,21$	Пальмитин кислота (C:16:0)
3	$5,6 \pm 0,76$	Пальмитолеин кислота (C:16:1)
4	$45,0 \pm 0,13$	Стеарин кислота (C:18:0)
5	$3,5 \pm 0,12$	Олеин кислота (C:18:1)
6	$1,5 \pm 0,09$	Линол кислота (C:18:2)
7	$1,1 \pm 0,06$	Арахидон кислота (C:20:4)

Ёғ кислоталарининг ҳосил бўлишида фосфолипидлар ёки триглицеридлар иштирок этади. Ёғ кислоталари таркибида тахминан 150 мкг фосфолипид ва 100 мкг триглицерид ёки 1 мл уларнинг аралашмаси бўлади.

Мантиқан тахмин қилиб кўрсак , фракцияни идентификациялангандан кейин триглецириддан ташкил топганлигини кўришимиз мумкин. Бу тахмин газ хроматографиясида олинган натижа орқали исботланади. Яъни 1 мл церебролизин 100 мкг триглецириддан ташкил топган.

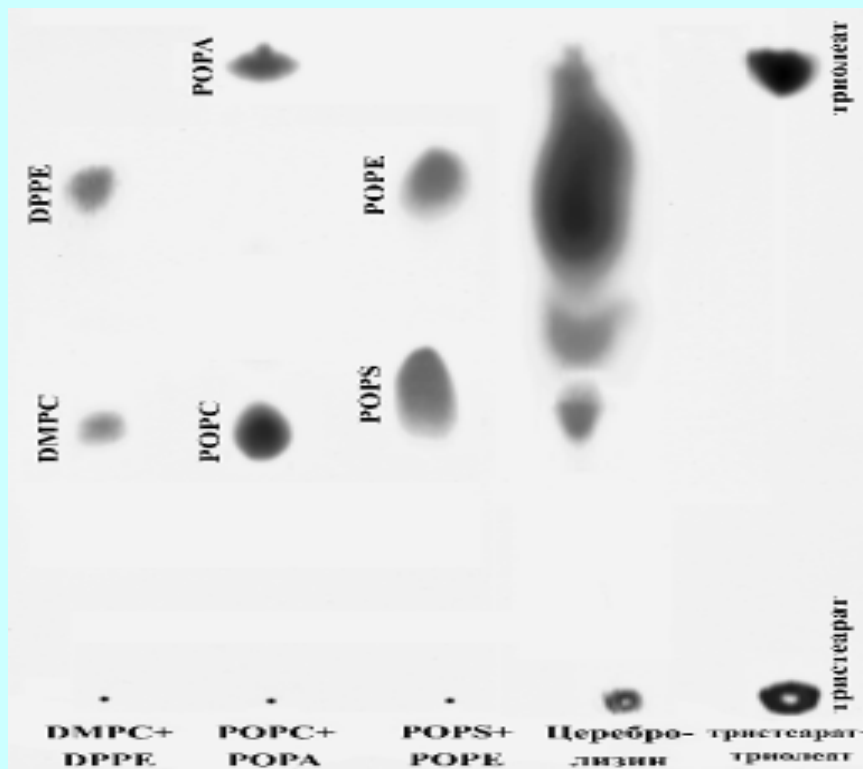
Церебролизин спектридаги фосфолипидлардан энг аҳамиятлилари стеринли С:18:О (45,0 мкг/мл) ва палмитил кислотаси С:16:О (75 мкг/мл) дир. Церебролизинда аниқланган миристил кислотаси (20,5 мкг/мл) ҳам муҳим аҳамиятга эга. Бу кислота сигналларни ўзаро таъсирини бошқаради. Хужайра мембрана таркибидаги Ca^{2+} ионларини алоқаларини бошқаради. Линоеант кислота церебролизин таркибида унча катта бўлмаган миқдорда 13,5 мкг/мл учрайди. У ёғда эрувчи витамин А, Д, Е ва К ларнинг оксидланишдан сақлайди ва транспорт вазифасини бажаради.

Церебролизинда фосфолипидларнинг сақланиши. Кузатишлар натижаси шуни кўрсатадики, церебролизинни 0,6 мл фосфатли буфер эритмасида 12 мкг фосфор моддаси, $\frac{1}{2}$ метанол–хлораформ ва 9,4 мкг фосфолипид борлигини билдиради.

Церебролизиннинг фосфолипидли тузилишини юпқа қатламли хроматография тахлили, церебролизин препарати экстрактини қорамол миясини махсус фосфолипидларини идентификацияланганда сфингомиелин:диацилфосфоэтанолламин (фосфатидилэтанолламин, кефалин) диацилфосфосерин (фосфатидилсерин, фосфосерин) ташкил этганлигини кўрсатади. Текширишлар тристеарат глицерин ва унинг ёнида идентификация бўлмайдиган фракция борлигини аниқланди.

Бўяш интенсивлигидан келиб чиққан ҳолда 1 мл наъмунадан экстрагирланувчи ва юпқа қатламли хроматографияда бўлинувчи модданинг йиғинди миқдори ~ 110 мкг фосфолипидларга мос келади, лекин препарат экстрактида фосфор анализи 9.4 мкг фосфолипидлар тўғри келди. Эритувчи системада триглецирид билан ҳар – хил ёғ кислоталари тестли тизимларда, церебролизин пластинканинг ҳамма жойларида тарқалиши

(пастда – тристеарат глицерин, юқорида – триолеат глицерин) 7 – расимда кўрсатилган.



Расм -7. 1 мл церебролизин экстрактини юпқа қатламли хроматографияси.

Аниқланилаётган церебролизинни ташкил этган кейинги фосфолипидлар синфига диацилфосфоэтаноламин, диацилфосфосерин ва яна тристеарат глицериндир. Концентрацияли фосфолипид ~ 10 мкг/мл ни ташкил этади. Бундан шундай хулоса чиқариш мумкинки, идентификацияланган фракция триглицериддан ташкил топган. Кузатиш олиб борилган аппаратдан олинган аниқ натижа 97 мкг/мл триглицерид ташкил этишини кўрсатади.

Хроматографик бўлиниш натижаларига караганимизда, барча концентрацияли пептидли фракцияларнинг таркибида 500–1500 Да ли участкаларидаги пептидлар 5мг/мл ни ташкил этади. Пептидларнинг сифатли ажратишда турли вариантларда ишлаш ва қисқа диапозонли, негаки препаратларнинг ишлаб чиқишда мия экстрактларининг стандартлаштирилиши, специфик пептидларнинг концентрацияси бўйича эмас балки аминокислоталар миқдори бўйича ўтказилади. Нима бўлганда ҳам церебролизиннинг ўрганилаётган намунасидаги пептидлар таҳлили уларда ўта муҳим нейропептидлар борлигини кўрсатади. 2- жадвалда масс–спектр таҳлили чўққилари кўрсатилган .

2 – жадвал.

Церебролизиннинг пептидли фракцияси ва молекуляр массасининг 500 - 1500 Да ли диапозони	
№ Фракция	масс – спектрни асосий чўққилари
2	402, 430, 528, 540, 607, 625.
4	402, 416, 430, 500, 540, 562, 607, 647, 678, 789
5	402, 430, 513, 540, 569, 607, 625, 700
6	387, 402, 416, 431, 500, 540, 592, 607, 625, 700
7	386, 402, 431, 500, 545, 607
8	408, 423, 432, 441, 545, 562, 609, 693, 765, 823, 944, 964, 1034, 1066, 1152
9	432, 694, 721, 807, 823, 943, 1219, 1257, 1310

2-жадвалдан кўриниб турибдики, церебролизин препарати фракцияларини ҳамма ўрганилган таркибини ҳар–хил пептидлар ташкил этади. Ўрганилаётган фракция таркибидаги барча пептидларнинг жойлашиш тартиби ва чўққисида ҳосил қилган ўринларини кўришимиз мумкин. Пептидлар таркибида жайлашган аминокислоталарнинг аниқлаш учун Эдман методикасидан фойдаланишимиз, идентификация қилиб олинган пептидларнинг маълумот баъзасини NCBI ва Swiss – Prot аппарати ёрдами билан аниқлаймиз. Олинган натижалар 3-жадвалда кўрсатилган. Церебролизин фрагменти таркибида фақат ser – ser – gly – ile , ABC – оксил транспорти синфига киради. Қолган барча идентификация қилиб ўрганилган пептидлар нейропептидлар гуруҳига киритилади. Пептиднинг ABC – оксил транспортли фрагменти неро пептидлар деб аталмайди , бу оксил фрагменти нейрон мембранасида жуда юқори ва муҳим вазифаларни бажариши аниқланди. Бундан кейинги кузатишлар натижасида церебролизин пептидлари нерв ҳужайра ва тўқималарида асосий вазифаларни бажариши ўрганилди.

3-жадвал.

Церебролизин фракциясининг идентификация ва тадқиқ қилинган пептидлари				
Пептид	Фракция	ММ (эксп.), Да*	ММ (теор.), Да*	Пептид идентификацияси NCBI/ Swiss – Prot
ser-ser-phe-gly-ile (SSFGI)	2, 4, 5, 6, 7, 8	540- 545	542	XP_001924499; ABC- Оксил транспорти
gly-glu-phe-ser-val (GEFSV)	2, 4, 5, 6, 7, 8	607 -609	607	Q29074; NGF
asn-ser-tyr-cys-	8,9	823	820	Q29074; NGF

thr-thr-thr (NSYCTTT)				
tyr-gly-gly- phe-leu (YGGFL)	6	592	588	P01214; - неоэндорфин- динорфин
gly-gly-phe- Лей-arg (GGFLR)	5,6	569 - 592	582	P01214; - неоэндорфин- динорфин
tyr-gly-gly- phe-met (YGGFM)	2,4,5,6,7	607	606	prf761141A -эндорфин, prf0506562A -эндорфин, prf764744A -эндорфин, P01192 опиомеланокортин
pro-gln-arg-phe (PQRF)	5	569	579	ACQ82801; нейропептид VF
cys-cys-arg- gln-lys (CCRQK)	4	678	670	O77668; нейропептид орексин (гипокретин)
trp-thr-leu-asn- ser-ala-gly-tyr (WTLNSAGY)	8	944	950	P07480; галанин

3.7. Нерв ўсиш омили.

NGF нерв тармоқларининг қайта тикланиши ва ривожланиши учун зарур. Хусусан NGF симпатик ва сенсор нейронларнинг дифференциациялари ва бўлинишини рағбатлантиради. TrkA (тирозинкиназа A) ва LNGFR (қуйи афинли ретцептор NGF) типдаги махсус ретцепторларни боғлайди. Протолитик қайта ишлашдан ўтган NGF дифференциацияси ва бўлинишига стимуллайди. LNGFR типдаги ретцепторлар билан таъсирлашиб апоптоз чақириши мумкин.

NGF молекуласи рибосомада синтезланадиган молекуласи 229 аминокислотани ўз ичига олади ва сигнал пептидидан пропептид ва шахсий NGF пептидидан ташкил топган бўлади. Сигнал пептид ва полипептид протеолитик қайта ишлаш жараёнида кесилади ва 110 – 229 пептид

фрагменти нейронларда секрецияланади. Шахсий нейротроф ҳаракатни мана шу NGF фрагменти амалга оширади.

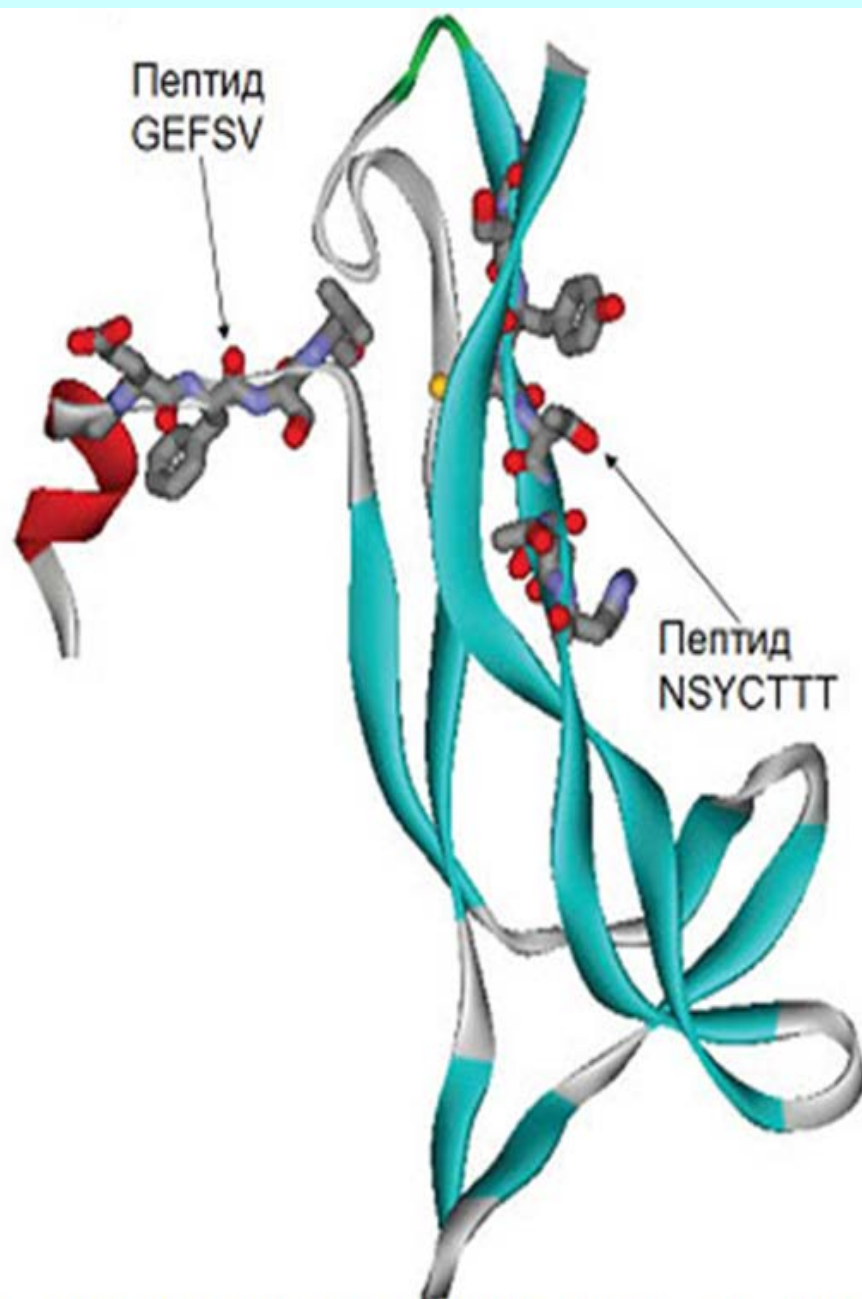
4-жадвал.

4 – жадвал. Чўчка полипептиди струстураси NGF		
Полипептид қисми	Аминокислота номери	Молекула ҳолати
Сигналли пептид	1 – 6	██
Пропептид	7-109	██████
NGF	110 - 229	██████

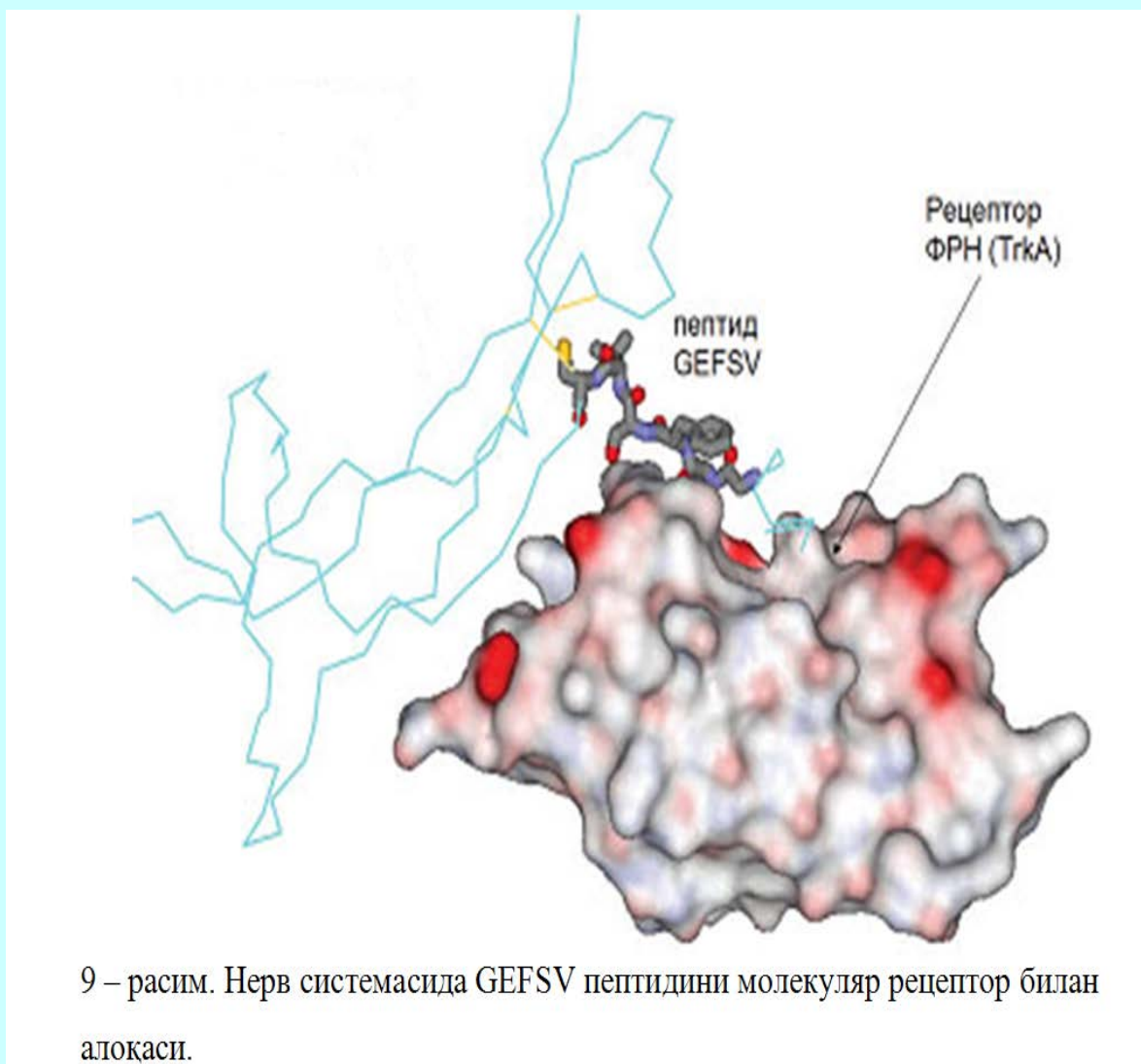
Цереболизин таркибидан иккита протеолид секреция қилинган молекуласи NGF: GEFSV, умумий пептид қолдиғи 119 – 123 та ва NSYCTTT ни умумий пептид қолдиғи 186 – 192 ни ташкил этган пептидларнинг аниқланган. Бу пептидлар протеолидда специфик бўлмаган NGF одамнинг ўсиши ва ривожланишидаги жараёнларига тегишли аминокислотали NGF фрагментидир. 4 – жадвалда церебролизин пептидининг NGF структураси таҳлили кўрсатилган.

Церебролизин NGF структурасида бу иккала пептиднинг тарқалиши ҳеч қандай функционал белгини билдирмай функционалли маълумотларнинг муносабатларини аниқлашда ва уларнинг бир бутун қилиб бирлаштирилган функционал харита NGF дир.

5 - жадвал. Чўчканинг интегрirlанган функционал NGF картаси				
Оксил элементи структураси	Компактли модули 131 - 161 165 -190 192 - 214	8 бетта- стрэнд Дисульфид 124-189 167-217 177-219	Цитокин модел тузилишининг тўлиқ PDB (1WWW), маълумот	Димер
Функционал сайт (3D)	Заряднинг умумий маркази 129-131 162-164	сийрак конформация 115-127*	Димер 117-123* 178-181 185-188* 195-197 219-224 Рецептор 111-115 119-123* 128-130 161-163	125 134 139 164 178 202 204
Функционал сайт (1D)	PS00248 сийрак пептид 183-192*	—	GEFSV* ва NSYCTTT* пептидининг 50 та организма тенглаштирилганда	134 139 164
Фолдинг оксили	Заряд маркази «+»:129- 131, 162-164 «-»: 129, 163-166	Модулнинг ўзаро таъсири 195 199-202 208-213	—	Фолдинг механизми 192-214 131-161



8- расим. Нерв хужайраси молекуласининг структурасида пептидларнинг тарқалиши ва тажрибада аниқланган церебролизиннинг пептидди боғламлари.



NGF карталарнинг функцияли интегрирлашган биоинформатик таҳлили тадқиқот қилинаётган пептидлар фракцияси ҳақида қатор асосланган хулосалар қилиш имкониятини беради. Хусусан 4-жадвалда кўрсатилган 2 пептид оксил – оксил таъсирли оксил турғунлигига кўра аҳамиятга эга. GEFSV (119-123) камёб конформацияга эга NSYCTTT (186-192) аминокислотанинг таркиби камёблиги билан ҳарактерланса NGF 2 пептиднинг функционал аҳамиятини кўрсатиши демер ҳисобланади. Пептид NSYCTTT барча маълум NGF сигнатуранинг қисми ҳисобланади. Унверсал мотив NGF [GSRE]-C-[KRL]-G-[LIVT]-[DE]-X(3)-[YW]-X-S-X-C (номер PS00248 маълумотлар баъзаси бўйича PROSITE) NGF 176 дан 189 гача аминокслоталар қолдиқ структурасида жойлашган.

NGF рецептори билан таъсир моделини анализда берилганларга асосланган ҳолда GEFSV (119-123) пептиди бевосита рецептор молекуласи билан таъсирлашиш беради. Бунда улар нейротрофик фаолликка эгадир. Ҳақиқатда NGF пептид сақловчи пептидлар ва NGF га ўхшаш фаолликка эга бўлган модели пептидлар маълум. NGF димер ичидаги ўзаро таъсир тахлили шуни кўрсатадики GEFSV (119-123) ва NSYCTTT (186-192) пептидлар димерланиши мумкин ва рецептор билан ҳамкорликда ҳаракат қилиши мумкин. Рецептор билан пептидларнинг боғланиш константасини ошириш кейинги GEFSV пептидни биологик фаоллигини оширилишини кўрсатади.

3.8. Церебролизининг фармокологик хусусиятларини ўрганиш.

Церебролизининг оқ сичқон ҳаракатланиш фаоллигига таъсири.

Церебролизинни ҳаракатланиш фаоллигига таъсирини тажрибада ўрганиш оқ сичқонлар устидаги тажрибаларда Лапин усули бўйича олиб борилди (Лапин ва бошқалар, 1994й). У ерда ҳайвон линияларинг кесишиши ойнали қопқоқ остида 1 дақиқада диаметри 20 см ва баландлиги 22 см да олиб борилади. Тадқиқотлар кунига бир марта намунавий тажрибада дори воситасини киритиш доирасида ўтказилди. Препарат кунинга 1 марта 20мг/кг дозада томчилаб (п/к) 7 кун мобайнида киритилди. Намунавий сичқонларга натрий хлоридлили физиологик эритма керакли ҳажмда киритилди ва тажрибаларни 2 қисмда ўтказилди ҳар бир тажрибада 5 тадан эркак жинсли оғирлиги 19-22 г бўлган сичқонлар ишлатилди.

1–қисмдаги тадқиқотлар шуни кўрсатдики, 1 мартадан церебролизинни 20 мг/кг дозада киритилганда уларнинг ҳаракатланиш фаоллиги намунавий сичқонларнинг фаоллигидан фарқ қилмади. Намунавий тажрибадаги сичқонлар 1 дақ. да 12.4(10,2-15,) кесиб ўтиш ҳаракатларини қилган бўлса биз текшираётган сичқонлар эса 1 дақ. да 10.4 (8,6-12,6)

ҳаракатлар қилади. 4 кун мобайнида церебролизинни юқорида кўрсатилган дозада киритилгандан сўнг физиологик эритма олган намунавий сичқонларда ҳарактланиш активлиги амалий жиҳатдан ўзгаргани йўқ ва у 12,8(10,6-15,5) лига қолган бу вақтда эса биз тадқиқот ўтказётган сичқонларнинг ҳаракатланиш фаоллиги 21,2 (17,6-25,7) кесиб ўтиш ҳаркатларини қилишга улгиришган бу эса камида 2 марта ҳаракат фаоллигини ошганини билдиради.

2–қисмдаги тадқиқотда ц еребролизин 10мг/кг дозада 3 кун мобайнида киритилдаи. Церебролизин кўрсатилган дозада 3 кун мобайнида киритилгандан сўнг намунавий гуруҳдаги 16.4 а тадқиқот гуруҳида 34 лиги аниқланди бу эса ўз навбатида 2.1. баробар катталигини кўрсатади.

Церебролизинни оқ сичқонларнинг жисмоний чидамлилигига таъсири. Тадқиқотлар айланувчи ўзакда олиб борилди. Намунавий тададқиқотда церебролизинни 1 марта 20 мг/кг дозада киритилганда намунавий гуруҳ айланувчи ўзакда ўртача гуруҳ бўйича -38(31,4-46,0) мин туриб берди. Тадқиқот ўтказилаётган сичқонларда эса бир марта церебролизин киритилгандан сўнг бир соат ўтиб 32 (26.4-38,7) мин туриб беришди. Яъни намунавий тадқиқотдаги сичқонлар билан ўртадаги фарқи бўлмади. 4 кун давомидида намуна гуруҳига киритилгандан сўнг улар 44 (36,4-53,2) мин. туриб берди, 4 кун мобайнида церебролизин қабул қилаётган адқиқот ўтказилаётган гуруҳида эса -70 (57,9-84,7) мин айланувчи ўзакда туриб беришди ёки бу кўрсаткич 60% намунавий гуруҳга нисбатан ортиқ ва биринчи кунги тадқиқотларга нисбатан 2,2 боробар ортди. Шундай қилиб церебролизинни 20мг/кг дозада томчилаб п/к юбориш оқ сичқонларда жисмоний юкламадаги жисмоний чидамлиликини икки баробар оширди.

Церебролизининг натрий –этаминал билан чақирилган уйқуга таъсири. Тадқиқотлар оқ сичқонларда ўтказилди уларга 2 кун мобайнида 20мг/кг томчилаб церебролизин эритмаси киритилди, натрий-этаминал 40 мг/кг дозда к/б киритилди. Тадқиқотлар шуни кўрсатдики намунавий гуруҳда 5та сичқонда 3 (60%) тасида уйқу бошланди ва барча гуруҳдаги сичқонлардаги

уйқу 20 дақиқани ташкил қилди. Бу вақтда тажриба ўтказилаётган сичқонларда эса церебролизин киритилган фонда барча 5 та сичқонларда уйқу кузатилди ва уйқунинг давомийлиги 6 дақиқани ташкил қилди. Ёки бу 3,3 баробар намунавий сичқонларга нисбатан кўпроқдир. Шундай қилиб церебролизин натрий этаминални уйқу самарадорлигини анча оширди.

Церебролизиннинг ваҳима ҳиссиётига таъсири. P.Sanberg et al (1991), тажрибалари бўйича эркак ва урғочи жинсли, оғирлиги 150-170г гача бўлган каламушларда ўтказилган. Нажасли болюслар сони саналган, бирламчи ҳолатни ўзгариши билан яъни ҳайвонларни одатий қафаслардан стол устига олинганда ёки биттадан симли қафасларга солинганда одатда уларни сони ортади. Агар намунада нажасли болюслар сони 1 соат ичида одатий қафасда одатда 1та каламуш учун 1,0-1,2 тага тўғри келса, экспериментал ҳонага олиб чиқиш кўринишида одатий ҳолатни ўзгариши ва биттадан жойлаштиришда бу сон 1 соат ичида идиш остида 5-7 тага етиши мумкин.

Олиб борилган тадқиқотда каламушлар 1 соатда ўзларининг одатий қафасларида 1,2 та нажасли болюслар ташладилар бошқа ҳолатда эса 5-8 та болюс ташлашди. Церебролизинни бир маротаба 10мг/кг томчилаб п/к юборгандан сўнг каламушлар одатий қафасда 3,2 болюс (аҳлат) ажратишди. Намунавий калушлар физиологик эритма киритилгандан сўнг эса -1,4 болюс ажратишди. Шундай қилиб церебролизин киритилгандан 2 соат ўтгач аниқ ваҳима ҳиссётини уйғотди бу ажратилган болюс сонини 2,6 марта ошишишидан кўриниб турибди. 4 кун мобайнида церебролизин эритмаси киритилгандан сўнг биринчи ҳолатдаги болюс (аҳлат) лар сони 1,2 ни ташкил қилди ва алоҳида қафасларга солиш вақтида 1,8 та болюсларни ташкил қилди. Бу вақтда намунавий гуруҳда бу кўрсаткичлар 1,0-5,0 та болюс (аҳлат) ни ташкил қилди. Бундан кўриниб турибдики церебролизин бир марта киритилганда болюс (аҳлат) лар сони биринчи ҳолатнинг ўзида 260 %га оширган ва 4 кун давомида қабул қилганда эса болюс (аҳлат) лар сони 1,2 ни,

алоҳида ажратиш вақтида эса 1,8 ни ташкил қилган, бундан кўринадики препарат ваҳима ҳиссиётини камайтирган.

Карозолнинг титратиш (талваса) ҳаракатига церебролизинни таъсири. Маълумки, карозол гамма аминомой кислотанинг (ГАМК) нинг антогонисти ҳисобланади ва тадқиқотларда титроқ (талваса) чақириш учун қўлланилади. Бу тадқиқот тажрибасида церебролизинни 3 кун давомида 70мг/кг дозада киритилган карозол таъсиридан пайдо бўлган титроқга (талвасага) таъсири ўрганилди. Бунда 3 та кўрсаткичга алоҳида эътибор берилди. Латент – яширин давр (талваса) титроқ ҳаракатини бошланиши, титроқ (талвасани) намоён бўлиши ва карозол дозасини ишлатилишида сичқонларни ўлиши. Намунавий тажрибада карозолли титроқ (талваса) 5,7 дақиқадан сўнг 100% сичқонларда бошланди, 5 та сичқондан 3таси нобуд бўлди. 60% да 3 кун мобайнида церебролизин қабул қилган сичқонларда эса титроқнинг (талваса) латент даври 13 дақиқани ташкил қилди, яъни 2,4 марта кечроқ бошланди, бунда титроқ 5 та сичқондан 3 тасида кузатилди (60%). Сичқонларни нобуд бўлиши кузатилмаганлиги тасдиқланди. Шундай қилиб церебролизин барча 3 хил тест буйича 2-2,5 боробар ГАМК карозол антагонистини заҳарли самарасини камайтирди.

Стрихниннинг титратиш (талваса) ҳаракатига церебролизинни таъсири.

Оқ сичқонлар устида ўтказилган тажрибаларда церебролизиннинг стрихнинли титраш (талваса) ҳаракатига церебролизиннинг таъсирини ўрганишда 1мг/кг дозада киритилганда намунавий сичқонларда латентли давр 3,5 дақиқада бошланди. Титраш (талваса) 100% сичқонларда кузатилди ва 5 та сичқондан 3 таси нобуд бўлди (60%), бироқ 3 кун мобайнида олдиндан церебролизин қабул қилган сичқонларда латент даври 7,5 дақиқани ташкил қилди бу 2 марта катта дегани. Намунавий сичқонларга қараганда 1та сичқонда титраш (талваса) кузатилди. 5 тадан битта 20% демакдир. Ўлим умуман қайд этилмади. Шундай қилиб церебролизин сичқонларни стрихниннинг токсик самарасига чидамлилигини оширди.

Стрихнин глицеринли рецепторларнинг блокатори сифатида 2- ва 5 марта тест сифатида ишлатилди.

Марказий М холинорецепторлар сезгирлигига церебролизиннинг таъсири. Маълумки марказий М – холинорецепторларни рағбатлантириш учун ареколиндан фойдаланилади. У тажрибаларда қалтирашни келтириб чиқаради. Бундай самарани баҳолаш учун қалтираш давомийлиги аниқланади. Тадқиқотларда акреколин 10мг/кг дозада томчилаб киритилганда сичқонларда қалтираш келиб чиқади. У ўртача 16 (13-19) дақ. давом этди. Тажриба ўтказилган сичқонларда эса уч кун мобайнида 20мг/кг томчилатиб церебролизин қабул килгандан сўнг қалтираш 27 (22,3-32,7) дақ. ёки 69% га кўпроқ давом этганлиги тасдиқланди. Шундай қилиб церебролизин марказий М-холинорецепторлар сезгирлигини оширди.

Изоляцияланган аъзоларни нейрорецепторларининг таъсирчанлигига церебролизиннинг таъсири. Церебролизиннинг денгиз чўчқасини изоляцияланган ичагидаги М- холинорецепторларга серотонин ва гистамин рецепторларига таъсири ўрганилди. Церебролизиннинг 10^{-6} г/мл фонида ичак спазми юқорилиги карбахолин ва серотонин киритишда ўзгармади, гистамин таъсирида эса спаз даражаси бир мунча ортди (25%га).

ХУЛОСА

1. Церебролизиннинг таркибида 85% аминокислоталар ва 15% пептидлар бор.

2. Қорамол бош миясини кимёвий таркибини: минерал моддалар, ионлар Na^+ , K^+ , Mg^{++} , Ca^{++} , Cl^- , HCO_3^- , H_2PO_4^- ҳамда темир, мис, алюминий, рух, марганец, йод ва олтингугуртлар ташкил этади.

3. Церебролизинниг пептидли фракциясида 500 – 1500 Да дан то 10000 Да гача бўлган массадаги пептидлар учрайди.

4. Церебролизин пептиди таркибини кузатишлар натижасида унинг таркибида: тиролиберин (Glu-His-Pro), глутатион (Gly-Cys-Glu), коллаген (Gly-Pro-Hyp) ва энкефалин (Tyr-Gly-Gly-Phe) пептидларидан ташкил топган.

5. Церебролизин фосфолипид ва сфингомиелин фосфотидилсерин ва фосфотидилэтанолламин, тристеарат глицерин 10 мкг/мл, триглицерид 97 мкг/мл ни, кейинги аниқланган ёғ кислоталар: стеарин (~45,0 мкг/мл), миристоил, пальмитин (~25,0 мкг/мл), пальмитолеин (—5,6 мкг/мл), олеин (~3,5 мкг/мл), линол (~1,5 мкг/мл) ва арахидон (~1,1 мкг/мл) кислоталари ташкил этади.

6. Церебролизиннинг таркибини стандарт аниқланишидан сўнг таркибида миристилли, пальмитионли, пальмитолеинли, стеаринли, олеинли, линолли ва арахидонатли ёғ кислоталари борлиги аниқланди.

7. Кузатишлар натижаси шуни кўрсатадики, церебролизинни 0,6 мл фосфатли буфер эритмасида 12 мкг фосфор моддаси , $\frac{1}{2}$ метанол – хлораформ ва 9,4 мкг фосфолипид борлигини билдиради.

8. Церебролизин препарати экстрактини қорамол миясини махсус фосфолипидларини идентификацияланганда сфингомиелин, диацилфосфоэтанолламин (фосфатидилэтанолламин, кефалин) диацилфосфосерин (фосфатидилсерин, фосфосерин) ташкил этганлигини кўрсатади. Текширишлар тристеарат глицерин ва унинг ёнида идентификация бўлмайдиган фракция борлигини кўрсатди

.ФОЙДАЛАНИЛГАН АДАБИЁТЛАР РЎЙХАТИ

1. Алексеева Л. А. Значение белков и пептидов цереброспинальной жидкости в клинической лабораторной диагностике и патогенезе нейроинфекционных заболеваний у детей /Автореф.дисс....докт.биол.наук, СПб., 2003 .- 42 стр.
2. Бурякова А. В. Содержание глутаминовой кислоты и ее производных в спинномозговой жидкости у детей с острыми нейроинфекциями. / Автореф. дисс...канд.мед. наук-Л.,1973.- 16 стр.
3. Борисенко Г.Г, Громова О.А., Баранов Ю.В., Третьяков В.Е. Липиды и жирные кислоты в составе препарата Церебролизин. Журн. Неврология и псих. им. С.С. Корсакова, 2007. —19-29 стр.
4. Буреш Я., Бурешова О., Хьюстон П.; Методики и основные эксперименты по изучению мозга и поведения / Пер. с англ. М.: Высшая школа, 1991.-399 стр.
5. Верещагин Н.В., Лебедева Н.В. Легкие формы мультиинфарктной деменции: эффективность церебролизина. //Сов. мед. -1991. -N.11. 6-8 стр.
6. Верещагин Н. В., Суслина З. А., Тимербаева С.А. с соавт. Лечение и предупреждение расстройств познавательной функции у больных артериальной гипертонией и атеросклерозом.//Тер.архив., №4,2001.- . 1-8 стр
7. Громова О.А., Красных А.М., Гусев Е.И., Никонов А.А. Витаминная активность церебролизина //Ж-л неврологии и психиатрии, №5, 2005.- 59-61 стр.
8. Использование Церебролизина в неврологической и психиатрической практике // Сборник статей.-Унтерах,1998.- 129 стр.
9. Карасев В.В. Клинико-патогенетическое значение белково-пептидных компонентов цереброспинальной жидкости при бактериальных гнойных менингитах у детей./ Автореф. дисс...канд. мед. наук.-СПб,2002.- 18 стр.
10. Росин Ю.А. Биоэлектрическая активность и гемодинамика головного мозга при острых нейроинфекциях у детей: критерии диагностики и

прогнозирования нейрологических осложнений. /Автореф. дисс. докт. мед. наук.- СПб, 1999.- 32 стр

11. Скрипченко Н.В. Применение лейкоцитарной взвеси в терапии тяжелых форм бактериальных нейроинфекций у детей / Автореф.дисс. канд.мед.наук.- СПб,1993.-15 стр.

12. Сорокина М.Н., Иванова В.В., Скрипченко Н.В. Бактериальные гнойные менингиты у детей.-М.: Медицина, 2003.- 376 стр.

13. Тактика реабилитации и диспансеризации больных, перенесших острые нейроинфекции.//Пособие для врачей /под ред.Н.В. Скрипченко.- СПб, 2005.- 40 стр.

14. Катаев А.С., Громова О.А., Кудрин А.В., Волков А.Ю.. Изменение микроэлементного гомеостаза в некоторых отделах головного мозга у крыс при назначении препарата Магне В6 // Неврология и психиатрия им. С.С.Корсакова, 2003, - №5, 47-49 стр.

15. Катаев А.С., Громова О.А., Кудрин А.В., Волков А.Ю.. Изменение содержания цинка в головном мозге крыс при интраназальном введении церебролизина // Неврология и психиатрия им. С.С. Корсакова - 2004, №1, 63-64 стр.

16. Громова О.А., Катаев А.С., Третьяков В.Е., Машковский С.А., Гусев Е.И., Валькова В.А., Никонов А.А., Глибин А.И.. Олигопептидная мембранная фракция церебролизина// Неврология и психиатрия им. С.С. Корсакова - 2006, №3, 93-98 стр.

17. Громова О.А., Катаев А.С., Сотникова Н.Ю., Кудрин А.В.. Протективная роль церебралтзин-индуцированной продукции металлотионеинов-1 и -2 в ответ на развитие церебральной очаговой ишемии у крыс // Журнал Цитокины и воспаление, 2005, №1, 47-49 стр.

18. Громова О.А., Гусев Е.И., Никонов А.А., Катаев А.С.. Витаминная активность препарата церебролизин // Судинийі захворювання головного

мозку, журнал Української асоціації боротьби з інсультом, 2006, №3, 50-57 стр.

19. Катаев А.С., Громова О.А., Красных Л.П., Гусев Е.И., Никонов А.А.. Витаминный состав церебролизина. // сб. трудов Съезд неврологов Ярославль, 2006, 29 мая- 2 июня.

20. Катаев А.С.. Влияние интраназального введения церебролизина и сульфата цинка на распределение кобальта в головном мозге крыс. // Материалы научно-практической конференции студентов и молодых ученых ИВГМА «Неделя науки – 2006», 2006 г..

21. Церебролизин в современной нейротрофической терапии // Мат-лы XI Международной конференции «Новые стратегии в неврологии» (Судак, АР Крым, 26–29 апреля 2009 г.). www.neuro.health-ua.com

22. Gromova OA, Kataev A.S., Sotnikova NYu, Kudrin, A.V.. Antioxidant properties of cerebrolysin // Rus. J. Of Immunology//2004, №1, P. 16-19page.

23. Sotnikova NY, Gromova, OA, Kataev A.S.. Trace element status of the brain in rats following cerebrolysin administration // Journal of Trace Elements in Biology and Medicine, 2004, Vol.21,N3, 3-5 page.

24. Kataev A.S., Kudrin A.V., Gromova O.A.. Trace element status of the brain in rats following cerebrolysin administration // Journal of Trace Elements in Biology and Medicine, - 2003, Vol,19, №5, 43-47 page.

25. Veinbergs I., Mante M., Mallory M., Masliah E. Neurotrophic effects of Cerebrolysin in animal models of excitotoxicity // Neural Transm. Suppl. — 2000. — V. 59. — 273-280 page.

26. Riley C., Hutter-Paier B., Windisch M. et al. A peptide preparation protects cells in organotypic brain slices against cell death after glutamate intoxication // J. Neural Transm. — 2006. — V. 113, № 1. — 103-110 page.

27. Wronski R., Tompa P., Hutter-Paier B. et al. Inhibitory effect of a brain derived peptide preparation on the Ca⁺⁺-dependent protease, calpain // J. Neural. Transm. — 2000. — V.107, № 2. — 145-157 page.

28. Zhou Y., Wang Y., Kovacs M. et al. Microglial activation induced by neurodegeneration: a proteomic analysis // *Mol. Cell Proteomics*. — 2005. — V. 4, № 10. — 1471-1479 page.
29. Windisch M., Fruhwirth M., Grygar E., HutterPaier B. Cerebrolysin normalizes MAP2 homeostasis after glutamate induced neuronal cell death // *J. Neural Trans.* — 2000. — V. 107, № 2. — 145-157 page.
30. Rockenstein E., Adame A., Mante M. et al. The neuroprotective effects of Cerebrolysin in a transgenic model of Alzheimer's disease are associated with improved behavioral performance // *J. Neural Transm.* — 2003. — V. 110, № 11. — 1313-1327 page.
31. Mu Y., Lee S.W., Gage F.H. Signaling in adult neurogenesis // *Curr. Opin. Neurobiol.* — 2010 May 12 [Epub ahead of print].
32. Tatebayashi K., Takekawa M., Saito H. A docking site determining specificity of Pbs2 MAPKK for Ssk2/Ssk22 MAPKKKs in the yeast HOG pathway // *EMBO J.* — 2003. — V. 22. — 3624-3634 page.
33. Rockenstein E., Adame A., Mante M. et al. Amelioration of the cerebrovascular amyloidosis in a transgenic model of Alzheimer's disease with the neurotrophic compound cerebrolysin // *J. Neural Transm.* — 2005. — V. 112, № 2. — 269-282 page.
34. Hutter-Paier B., Grygar E., Frühwirth M. et al. Further evidence that Cerebrolysin protects cortical neurons from neurodegeneration in vitro // *J. Neural Transm. Suppl.* — 1998. — V. 53. — 363-372 page.
35. Haninec P., Dubový P., Šámal F. et al. Reinnervation of the rat musculocutaneous nerve stump after its direct reconnection with the C5 spinal cord segment by the nerve graft following avulsion of the ventral spinal roots: a comparison of intrathecal administration of brain-derived neurotrophic factor and Cerebrolysin // *Experimental Brain Research*. — 2004. — V. 159, № 4. — P. 425-432 page.

36. Stoeckli E., Zou Y. How are neurons wired to form functional and plastic circuits? Meeting on Axon Guidance, Synaptogenesis & Neural Plasticity // EMBO Rep. — 2009. — V. 10, № 4. — 326-330 page.

37. Интернет маълумотлари:

www.neuro.health-ua.com

www.cerebrolysin.com.ua

www.tistr.or.th

www.aibs.org

