Распределение мексидола в структурах головного мозга, его клеточных элементах и субклеточных фракциях

А.В. ШУЛЬКИН, Е.Н. ЯКУШЕВА, И.В. ЧЕРНЫХ

Рязанский государственный медицинский университет имени академика И.П. Павлова, Рязань

The distribution of mexidol in the rat's brain and its subcellular fractions

A.V. SHCHULKIN, E.N. YAKUSHEVA, I.V. CHERNYKH

Pavlov Ryazan State Medical University, Ryazan

Цель исследования — изучение проникновения мексидола через гематоэнцефалический барьер (ГЭБ) в разные отделы головного мозга и митохондрии клеток. **Материал и методы.** Использовали препарат мексидол ООО НПК «Фармасофт» (Россия). Изучали проникновение в ткань коры больших полушарий, мозжечка, таламуса и продолговатого мозга и распределение между митохондриальной и цитоплазматической фракциями нервных клеток. Концентрацию мексидола в плазме крови и ткани мозга животных анализировали методом высокоэффективной жидкостной хроматографии. **Результаты и заключение.** Установлено, что мексидол проникает через ГЭБ в разные отделы головного мозга крыс. Наибольшая его концентрация определяется в ткани коры больших полушарий. Внутри нервных клеток мексидол обнаруживается как в цитоплазматической, так и в митохондриальной фракциях.

Ключевые слова: *мексидол, фармакокинетика, гематоэнцефалический барьер, кора больших полушарий, мозжечок, таламус, продолговатый мозг, митохондрии, высокоэффективная жидкостная хроматография.*

Objective: To study the penetration of mexidol through the blood-brain barrier into different brain compartments and cell mitochondria. **Material and methods.** The study was carried out on adult male Wistar rats using the drug mexidol («Farmasoft» Russia). The penetration of mexidol into different compartments of the brain (the cortex, cerebellum, thalamus and medulla) and distribution between mitochondrial and cytoplasmic fractions of the cerebral cortex was studied. The concentration of mexidol in blood plasma and brain tissues was measured using HPLC. **Results and Conclusion.** Mexidol penetrated through the blood-brain barrier into brain compartments of rats with the maximal accumulation in the cortex. In the brain cortex cells, mexidol was identified in the cytoplasmic and mitochondrial fractions.

Key words: *mexidol, pharmacokinetics, blood-brain barrier, cortex, cerebellum, thalamus, medulla, mitochondria, HPLC.*

Гипоксия лежит в основе многих неврологических заболеваний [1]. Для купирования возникающих в этом случае метаболических нарушений необходимо обеспечить как можно более раннюю коррекцию энергетического обмена и восстановление клеточного гомеостаза. Одними из самых перспективных и эффективных лекарственных препаратов, применяемых с этой целью, являются антигипоксанты и антиоксиданты, способные предотвращать, уменьшать или ликвидировать проявления гипоксии благодаря поддержанию энергетического обмена в режиме, достаточном для сохранения структуры и функциональной активности клеток [2]. Среди таких препаратов наибольшая эффективность отмечается у веществ, проникающих в митохондрии и являющихся энергетическими субстратами (производные янтарной кислоты), а также прямых антиоксидантов [3]. К числу последних относится мексидол (2-этил-6-метил-3-гидроксипиридина сукцинат) — оригинальный отечественный антиоксидант и антигипоксант.

Наиболее выраженный терапевтический эффект мексидол оказывает при цереброваскулярных и нейродегенеративных заболеваниях, таких как ишемический и геморрагический инсульты, хроническая ишемия мозга, черепно-мозговая травма, болезни Альцгеймера и Паркинсона [4, 5]. Для повышения эффективности и безопасности фармакотерапии с использованием мексидола важным является дальнейшее исследование его фармакокинетики, в частности изучение процессов проникновения через гематоэнцефалический барьер (ГЭБ) и в митохондрии, где реализуется его основное действие.

Цель настоящего исследования — изучение проникновения мексидола через ГЭБ в разные отделы головного мозга, а также в митохондрии клеток.

Материал и методы

Исследование было проведено на половозрелых крысах-самцах линии Wistar массой 220—300 г, полученных из питомника «Столбовая».

© Коллектив авторов, 2014

*e-mail: alekseyshulkin@rambler.ru

Изучение проникновения мексидола через ГЭБ было выполнено на 36 крысах. Мексидол вводили животным внутрижелудочно с помощью металлического зонда в дозе 200 мг/кг массы в форме суспензии на очищенной воде [6]. Через 30 мин, 1, 1,5, 2, 3 и 4 ч после введения препарата проводилась эвтаназия животных под эфирным наркозом (по 6 животных на каждую временну́ю точку).

Для исследования были взяты следующие отделы головного мозга: кора лобных долей больших полушарий, мозжечок, таламус и продолговатый мозг. Кроме того, бралась кровь из брюшной аорты в объеме 5 мл в гепаринизированные пробирки.

Образцы крови центрифугировали при 3000 об/мин. Ткань мозга гомогенизировали в 0,01 М трис-HCl буферном растворе в соотношении 1:10 в течение 1 мин на гомогенизаторе DIAX 900, после чего центрифугировали при 3000 об/мин в течение 10 мин.

Исследование распределения мексидола между митохондриальной и цитоплазматической фракциями коры больших полушарий было выполнено на 10 животных. Мексидол вводили животным перорально в дозе 200 мг/кг массы с последующей эвтаназией под эфирным наркозом через 1,5 и 2,0 ч (по 5 животных на каждую временну́ю точку). Образцы коры больших полушарий мозга гомогенизировали в 0,01 М трис-HCl буферном растворе, приготовленном на 0,05% растворе сахарозы в соотношении 1:10 в течение 30 с на гомогенизаторе Поттера на холоде. Полученный гомогенат центрифугировали при 3000 об/мин в течение 10 мин. Надосадочный слой подвергали дифференциальному центрифугированию на холоде при 12 000 об/мин для осаждения митохондрий, после чего надосадочный слой отбирали для дальнейшего анализа (цитоплазматическая фракция). Осадок разводили в 1 мл трис-HCl буфера, добавляли 2 объемных процента тритона X-100, гомогенизировали на гомогенизаторе DIAX 9000 (митохондриальная фракция).

Концентрацию мексидола в плазме крови, гомогенатах исследуемых отделов мозга, а также в митохондриальной и цитоплазматической фракциях коры больших полушарий крыс определяли методом высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ). Для экстракции мексидола к 1 мл исследуемого образца добавляли 3 мл этилацетата (Acros organics), перемешивали на приборе Vortex и помещали на встряхиватель для пробирок Shaker на 10 мин, затем центрифугировали при 3000 об/мин в течение 10 мин. Органический слой упаривали на роторно-вакуумном испарителе (Heidolph instruments). Сухой остаток растворяли в 300 мкл подвижной фазы и 100 мкл раствора вводили в хроматограф [6].

Анализ проводили на высокоэффективном жидкостном хроматографе Beckman Coulter (США) с ультрафиолетовым спектрофотометрическим детектором при длине волны 296 нм в изократическом режиме по оригинальной методике. При анализе использовали хроматографическую колонку Beckman 4,6×150 мм (зернение 5 мкм). Температура разделения была 28 °С; скорость потока — 0,5 мл/мин. Подвижная фаза состояла из ацетонитрила (Chem-lab) и воды в объемном отношении 20:80 с добавлением 0,05% триэтиламина (Chem-lab) и ортофосфорной кислоты («ХИММЕД») до pH 4,3. Время удерживания мексидола в данных условиях составило 18,1 мин.

Для статистической обработки результатов применяли программу Statistica 7.0. Характер распределения полученных данных оценивали по критерию Шапиро—Уилка. Достоверность различий между группами, имеющими нормальное распределение показателей, рассчитывали по критерию Стьюдента; при распределении данных, отличном от нормального, — по критерию Манна—Уитни. Связь между концентрацией мексидола в плазме крови животных и его содержанием в гомогенатах разных отделов головного мозга определяли по коэффициенту корреляции Пирсона. Для данных, имеющих нормальное распределение, рассчитывали среднее арифметическое значение (*M*) и стандартное отклонение (*SD*), для данных, распределение которых отлично от нормального, — медиану (*Me*), верхний и нижний квартиль (25%; 75%).

Результаты

Основные результаты, касающиеся распределения мексидола в гомогенатах разных отделов головного мозга крыс, представлены в **таблице**. Максимальная концентрация мексидола в плазме крови крыс была отмечена через 30 мин после перорального введения препарата. В течение последующих 4 ч его содержание постепенно снижалось. Пик концентрации мексидола в гомогенате коры больших полушарий крыс отмечался через 1 ч после перорального введения препарата. Концентрация оставалась повышенной через 1,5 и 2 ч и снижалась в течение 3-го и 4-го часа. Наибольший уровень мексидола в гомогенате мозжечка крыс фиксировался через 30 мин после перорального введения препарата, затем его содержание снижалось через 1 и 1,5 ч, вновь повышаясь на 2-й час опыта и снижаясь к 4-му часу эксперимента. У некоторых животных через 4 ч концентрация мексидола была ниже предела детектирования. Максимальная концентрация мексидола в гомогенате таламуса крыс отмечалась через 30 мин после введения препарата, в дальнейшем его содержание постепенно снижалось, и у ряда животных уже через 3 ч оно было ниже предела детектирования. Концентрация мексидола в гомогенате продолговатого мозга крыс постепенно увеличивалась, достигая максимума через 1—1,5 ч после введения препарата, а затем постепенно снижалась к 4-му часу наблюдения. В ходе исследования выявлено, что уровень мексидола в гомогенате коры больших полушарий крыс через 1 ч после введения превышал его содержание в гомогенатах мозжечка на 245,4% ($p<0,05$), таламуса — на 131,8% ($p<0,05$), продолговатого мозга — на 177,8% ($p<0,05$), а через 1,5 ч превышал только концентрацию в гомогенате мозжечка — на 243,9% ($p<0,05$). В остальных контрольных точках исследования достоверных различий между уровнем мексидола в гомогенатах разных отделов головного мозга получено не было.

При изучении соотношения концентрации мексидола в гомогенатах исследуемых отделов головного мозга крыс и его содержания в плазме крови были получены следующие результаты: наблюдалась прямая пропорциональная связь между концентрацией мексидола в плазме крови и его содержанием в гомогенатах коры больших полушарий ($r=0,3744$, $p=0,024$), мозжечка ($r=0,4182$, $p=0,011$), таламуса ($r=0,8222$, $p=0,000$) и продолговатого мозга ($r=0,3442$, $p=0,04$). Эти данные отражены на **рис. 1**.

При изучении распределения мексидола в митохондриальной и цитоплазматической фракциях коры больших полушарий крыс было установлено, что максимальное его содержание в митохондриальной фракции опреде-

Динамика концентрации мексидола (нг/мл) в плазме крови и в гомогенатах разных отделов головного мозга крыс после его однократного внутрижелудочного введения в дозе 200 мг/кг массы тела

Исследуемый образец	Время после введения препарата, ч					
	0,5	1	1,5	2	3	4
Плазма крови	2926,4 (1105,4; 4278,5)	1822,3±1268,7	1635,4±1268,7	966,3±636,1	429,4 (302,4; 746,7)	154,1 (109,3; 260,6)
Кора	431,7 (295,9; 893,5)	637,2±448,6	564,8±422,6	560,3±546,6	160,0 (149,2; 187,2)	37,8 (24,2; 62,2)
Мозжечок	380,3 (335,5; 1142,7)	184,5±164,3*	164,2±70,6*	501,1±326,0	151,7 (105,9; 235,1)	15,3 (0,0; 39,5)
Таламус	311,8 (76,0; 1001,4)	274,9±293,1*	299,9±266,5#	159,4±117,3	4,1 (0,0; 43,8)	39,8 (0,0; 268,9)
Продолговатый мозг	205,5 (116,5; 226,6)	229,4±62,0*	230,5±43,8#	178,6±46,5	131,3 (120,8; 141,9)	112,3 (0,0; 120,8)

Примечание. * — $p<0,05$ — достоверные различия с концентрацией мексидола в гомогенате коры больших полушарий головного мозга; # — $p=0,08$ — различия с концентрацией мексидола в гомогенате коры больших полушарий головного мозга.



Рис. 1. **Зависимость концентрации мексидола в гомогенатах разных отделов головного мозга от его концентрации в плазме крови.**

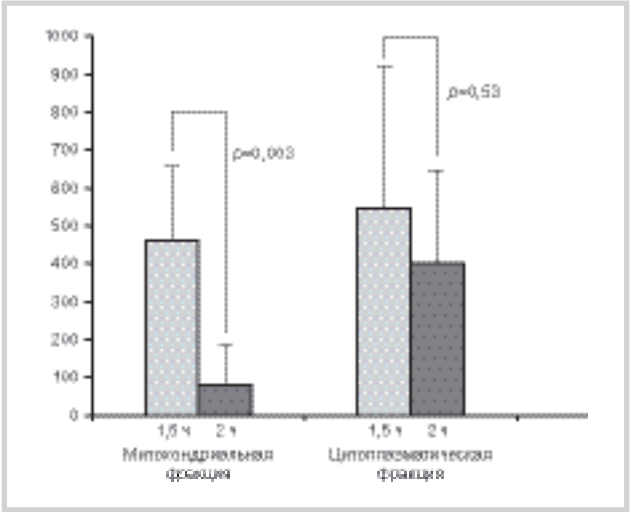

Рис. 2. **Концентрация мексидола (ось ординат, нг/мл) в митохондриальной и цитоплазматической фракциях коры больших полушарий (*M±SD*) через 1,5 и 2 ч (ось абсцисс) после введения.**

лялось через 1,5 ч после введения препарата и достоверно на 406,7% ($p=0,003$) превышало его уровень, наблюдаемый через 2 ч после введения **(рис. 2)**. Аналогичные изменения были выявлены и при изучении цитоплазматической фракции. Достоверных различий между концентрацией мексидола в цитоплазматической фракции коры больших полушарий через 1,5 и 2 ч после введения препарата получено не было ($p=0,53$).

Обсуждение

В настоящем исследовании установлено, что мексидол проникает через ГЭБ в разные структуры головного мозга крыс, что может объяснить все его основные фармакологические эффекты — нейропротекторный, антигипоксический, антиоксидантный, анксиолитический и ноотропный [1, 4, 5]. При этом максимальная концентрация в гомогенатах мозжечка и таламуса обнаруживалась уже через 30 мин после введения препарата, а в гомогенатах коры больших полушарий и продолговатого мозга — через 1 ч. При проведении перерасчета полученных концентраций мексидола в гомогенатах исследуемых отделов головного мозга крыс из нг/мл в мМ установлено, что они примерно соответствуют концентрациям, в которых препарат проявляет антиоксидантную активность в опытах *in vitro*, например, содержание мексидола 600 нг/мл соответствует уровню 0,047 мМ [7].

При изучении корреляции между концентрацией мексидола в гомогенатах разных отделов головного мозга крыс и его содержанием в плазме крови была выявлена достоверная прямо пропорциональная зависимость. Это свидетельствует о том, что проникновение мексидола в головной мозг через ГЭБ, скорее всего, носит характер простой диффузии.

В эксперименте максимальная корреляционная связь ($r=0,8222$, $p=0,000$) между концентрацией мексидола в таламусе и в плазме крови и более быстрое время ее достижения по сравнению с другими отделами головного мозга

(уже через 30 мин после введения препарата), вероятно, связаны с тем, что в пробу таламуса попадала и гипоталамо-гипофизарная область, где ГЭБ имеет высокую проницаемость [8], и мексидол может проникать в головной мозг за более короткое время.

Концентрация мексидола в гомогенате коры больших полушарий через 1 ч после введения превышала его содержание в гомогенатах мозжечка, таламуса и продолговатого мозга, а через 1,5 ч — в гомогенате мозжечка. Данные различия, скорее всего, связаны с тем, что для приготовления гомогената коры больших полушарий использовалась только кора — серое вещество, представленное преимущественно нейронами и нейроглией, способными накапливать мексидол. Для приготовления гомогенатов таламуса, мозжечка и продолговатого мозга брались образцы головного мозга, содержащие также значительное количество белого вещества, представленного нервными волокнами, не накапливающими мексидол.

В ходе выполнения работы было показано, что мексидол способен проникать внутрь митохондрий, которые являются основной мишенью его фармакологического воздействия. Пик концентрации в митохондриях наблюдали через 1,5 ч и после этого его содержание резко снижалось. Видимо, после проникновения внутрь митохондрий мексидол быстро гидролизуется на составные компоненты — 2-этил-6-метил-3-гидроксипиридин и янтарную кислоту. Первый метаболит начинает связывать свободные радикалы, образующиеся в процессе переноса электронов по дыхательной цепи митохондрий, а второй включается в цикл трикарбоновых кислот [1, 4, 5].

Обобщая представленные данные, можно сделать следующие выводы: мексидол проникает через ГЭБ в ткань головного мозга, накапливаясь преимущественно в коре больших полушарий, и он способен проникать внутрь нервных клеток, обнаруживаясь в митохондриальной и цитоплазматической фракциях.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Андреева Н.Н.* Экспериментальные и клинические аспекты применения мексидола при гипоксии (обзор). Мед. альманах 2009; 4 (9): 193—197.
2. *Марышева В.В.* Антигипоксанты аминотиолового ряда. Обзоры по клинической фармакологической лекарственной терапии. 2007; 5 (1): 17—27.
3. *Лукьянова Л.Д., Романова В.Е., Чернобаева Г.Н., Лукиных Н.В., Смирнов Л.Д.* Особенности антигипоксического действия мексидола, связанные с его специфическим влиянием на энергетический обмен. Химико-фармацевтический журнал. 1990; 24 (8): 9—11.
4. *Воронина Т.А.* Антиоксидант мексидол. Основные нейропсихотропные эффекты и механизм действия. Психофармакология, биология, наркология. 2001; 1: 2—12.
5. *Воронина Т.А.* Мексидол: спектр фармакологических эффектов. Журнал неврологии и психиатрии им. С.С. Корсакова. 2012; 12: 86—90.
6. *Середенин С.Б., Кравцова О.Ю., Сариев А.К., Жердев В.П., Колыванов Г.Б., Воронина Т.А.* Биотрансформация мексидола у мышей инбредных линий C57BL/6 и BALB/C. Экспериментальная клиническая фармакология. 2005; 68 (2): 40—43.
7. *Щулькин А.В.* Влияние мексидола на развитие «феномена эксайтотоксичности» нейронов *in vitro*. Журнал неврологии и психиатрии им. С.С. Корсакова. 2012; 112 (2): 35—39.
8. *Fenstermacher J., Kaye T., Ann N.Y.* Drug «diffusion» within the brain. Acad. Sci. 1988; 531: 29—39.