

ФАРМАКОКИНЕТИКА

БИОТРАНСФОРМАЦИЯ МЕКСИДОЛА У МЫШЕЙ ИНБРЕДНЫХ ЛИНИЙ C57BL/6 И BALB/C

С. Б. Середенин, О. Ю. Кравцова, А. К. Сариев, В. П. Жердев,
Г. Б. Колыванов, Т. А. Воронина¹

Исследованы процессы фармакокинетики и биотрансформации мексидола у мышей линий C57BL/6 и BALB/C. В плазме крови животных зарегистрированы дезалкилированные метаболиты, в моче — глюкуроноконъюгированные производные препарата. Показано, что глюкуроноконъюгация мексидола интенсивнее протекает у мышей C57BL/6 по сравнению с BALB/C.

Ключевые слова: биотрансформация, глюкуроноконъюгация, инбредные животные, мексидол, фармакокинетика

ВВЕДЕНИЕ

Мексидол — лекарственное средство широкого спектра действия, лечебные свойства которого основаны на антиоксидантном эффекте [1–3]. Ранее установлено, что у людей определяются только конъюгированные метаболиты препарата, у крыс и кроликов наряду с конъюгатами встречаются дезалкилированные продукты превращения [5, 9]. Инбредные линии C57BL/6 и BALB/C характеризуются различиями по I фазе биотрансформации [4, 6]. Данные животные неодинаково реагируют на мексидол [7, 8]. Поэтому представляет интерес изучить фармакокинетику и метаболизм мексидола у мышей инбредных линий C57BL/6 и BALB/C и беспородных мышей.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Опыты проводили на 130 мышках-самцах инбредных линий C57BL/6, 130 BALB/C и 46 белых беспородных мышках-самцах массой 18–22 г (питомник “Столбовая” РАМН). Мексидол вводили в желудок с помощью металлического зонда в дозе 100 мг/кг. При исследовании зависимости процесса экскреции препарата и его глюкуроноконъюгированного метаболита от дозы мексидол вводили из расчета: 200, 400 и 800 мг/кг. Для экстракции мексидола и метаболитов из плазмы крови и мочи к опытным пробам плазмы, полученным центрифугированием крови при 8000 об/мин в течение 15 мин, и мочи добавляли 3-кратный объем 1 М боратного буфера (рН 9,0). Экстракцию проводили дважды 6-кратным объемом этилацетата в течение 15 мин на электрическом встряхива-

теле. Экстракты объединяли и упаривали на водяной бане при 77° С. Сухой остаток растворяли в 0,3–0,8 мл дистиллированной воды; 200 мкл полученного раствора вводили в петлю инжектора хроматографа. Глюкуроноконъюгированные фракции мексидола определяли в моче после ее предварительной инкубации с добавлением фермента β-глюкуронидазы. Концентрацию препарата в плазме крови определяли через 1; 2,5; 5; 10; 15; 20; 30; 45; 60 и 90 мин; в моче — через 24 ч после введения мексидола методом высокоэффективной жидкостной хроматографии.

Хроматографический анализ содержания мексидола в моче проводили на компьютеризированной системе Perkin Elmer (США), оснащенной изократической помпой — PE-250, УФ-детектором с переменной длиной волны — PE-290. Условия хроматографирования: стационарная фаза — колонка “Luna” (Phenomenex) с обращеннофазным сорбентом C18(2) (4,6 × 250 мм; 5 мкм); подвижная фаза — метанол : цитратно-фосфатный буфер (рН 5,0) (1:12); скорость подвижной фазы — 1,5 мл/мин; детектирование — 296 нм; объем петли хроматографа — 200 мкл. Хроматографировали при комнатной температуре (22–23 °С). В этих условиях время удерживания мексидола составило 10,5 мин.

Концентрации препарата в плазме крови определяли на компьютеризированной системе Beckman (США), оснащенной изократической помпой — Beckman System Gold 116, УФ-детектором с переменной длиной волны — Beckman System Gold 166. Условия хроматографирования: стационарная фаза — колонка “Luna” (Phenomenex) с обращеннофазным сорбентом C18(2) (4,6 × 250 мм; 5 мкм); подвижная фаза — метанол: цитратно-фосфатный буфер (рН 5,0) (1,5:5); скорость подвижной фазы — 1 мл/мин; детектирование — 296 нм; объем петли хроматографа — 200 мкл. Хроматографировали при комнатной температуре

¹ Лаборатории фармакогенетики (руководитель — акад. РАМН С. Б. Середенин), фармакокинетики (руководитель — проф. В. П. Жердев), психофармакологии (руководитель — проф. Т. А. Воронина) ГУ НИИ фармакологии им. В. В. Закусова РАМН, Москва, 125315, ул. Балтийская, 8.

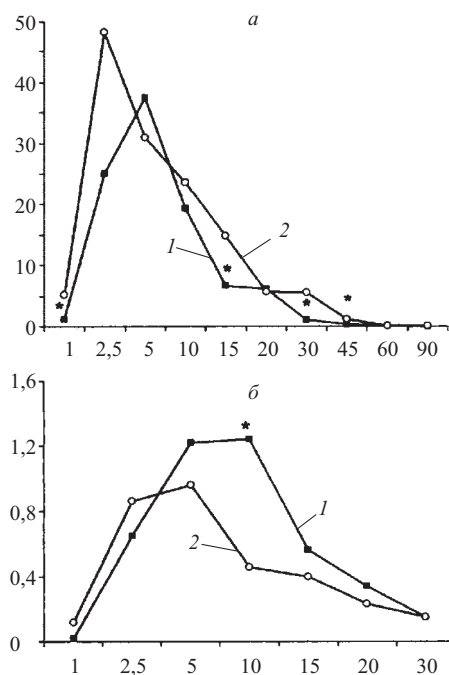


Рис. 1. Кривые “концентрация — время” мексидола (*a*) и его дезалкилированного метаболита (*б*) после однократного интрагастрального введения (100 мг/кг) у мышей инбредных линий ($n = 8$).

По оси абсцисс — время, мин; по оси ординат — концентрация мексидола (*a*) и его метаболита (*б*) (в мкг/мл). 1 — мыши линии C57BL/6, 2 — мыши линии BALB/C. * — $p < 0,05$ между инбредными линиями.

(22 – 23 °C). В этих условиях время удерживания мексидола составило 5,6 мин.

Количественную оценку вещества в обоих случаях проводили по данным прямой калибровки с использованием площадей хроматографических пиков мексидола. Основные фармакокинетические параметры рассчитаны модельно-независимым методом с использованием пакета программ “M-IND”.

Полученные экспериментальные данные были подвергнуты математической статистической обработке с помощью программы Statistica v 6.0. Достоверность

Таблица 1. Фармакокинетические параметры мексидола у мышей инбредных линий

Параметр	C57BL/6	BALB/C
T_{\max} , мин	5	2,5
C_{\max} , мкг/мл	37,44	48,99
$Cl_{\text{per os}}$, л/мин/кг	0,26	0,18
K_{el} , мин ⁻¹	0,09	0,07
$T_{1/2el}$, мин	8,04	9,64
MRT, мин	10,35	13,52
V_d , л/кг	2,98	2,53
$AUC_{0 \rightarrow \infty}$, мкг/мл · мин	389,51	548,86
$C_{\max}/AUC_{0 \rightarrow \infty}$, мин ⁻¹	0,1	0,09
$AUC_{0 \rightarrow \infty} \text{ м}/AUC_{0 \rightarrow \infty}$	0,05	0,03

Примечание. Здесь и в табл. 2 $AUC_{0 \rightarrow \infty} \text{ м}$ — площадь под кривой “концентрация — время” метаболита.

различий сравниваемых фармакокинетических параметров оценивали по t -критерию Стьюдента для независимых выборок.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Проведенные исследования системной фармакокинетики показали, что препарат в дозе 100 мг/кг определяется в плазме крови инбредных мышей на протяжении 1,5 ч (рис. 1, *a*). Из материалов основных фармакокинетических параметров мексидола, представленных в табл. 1, можно отметить, что вещество всасывается из желудочно-кишечного тракта очень быстро, о чем свидетельствует параметр $C_{\max}/AUC_{0 \rightarrow \infty}$, составляющий у мышей линий C57BL/6 и BALB/C 0,1 и 0,09 мин⁻¹ соответственно. Однако максимальные концентрации мексидола достигаются быстрее у BALB/C (через 2,5 мин) по сравнению с C57BL/6 (через 5 мин) и составляют соответственно 48,19 и 37,44 мкг/мл. При сравнении периодов полувыведения препарата ($T_{1/2el}$), можно отметить, что вещество быстрее выводится из плазмы крови мышей линии C57BL/6. Дополнительным подтверждением более интенсивной элиминации мексидола из плазмы крови мышей C57BL/6 являются также низкая величина среднего времени удерживания лекарственного вещества в организме (MRT = 10,35 мин) и высокий клиренс ($Cl_{\text{per os}} = 0,26$ л/мин/кг) в сравнении с аналогичными фармакокинетическими параметрами, рассчитанными для мышей BALB/C. Низкая величина площади под фармакокинетической кривой ($AUC_{0 \rightarrow \infty} = 389,51$ мкг/мл · мин) у мышей C57BL/6 свидетельствует о высокой интенсивности процессов биотрансформации в их организме по сравнению со скоростью метаболизма у мышей BALB/C ($AUC_{0 \rightarrow \infty} = 548,86$ мкг/мл · мин).

При хроматографическом анализе также выявлен дезалкилированный метаболит мексидола. Концентрационные профили метаболита в плазме мышей инбредных линий представлены на рис. 1, *б*, рассчитанные параметры фармакокинетики приведены в табл. 2. Установлено, что содержание метаболита выше в плазме крови мышей C57BL/6 ($C_{\max} = 1,24$ мкг/мл), чем у мышей BALB/C ($C_{\max} = 0,96$ мкг/мл). Этот факт также подтверждает и более высокая величина $AUC_{0 \rightarrow \infty} \text{ м}/AUC_{0 \rightarrow \infty}$ (0,05) у мышей C57BL/6 по

Таблица 2. Фармакокинетические параметры дезалкилированного метаболита мексидола у мышей инбредных линий

Параметр	C57BL/6	BALB/C
T_{\max} , мин	10	5
C_{\max} , мкг/мл	1,24	0,96
K_{el} , мин ⁻¹	0,1	0,07
$T_{1/2el}$, мин	6,77	9,71
MRT, мин	13,15	15,19
$AUC_{0 \rightarrow \infty} \text{ м}$, мкг/мл · мин	19,54	14,1

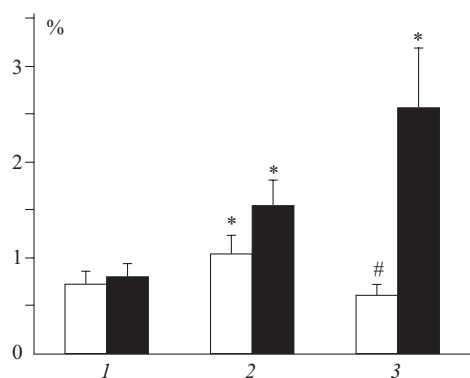


Рис. 2. Экскреция неизмененного мексидола и его глюкуроноконъюгата у мышей инбредных линий и беспородных мышей после однократного интрагастрального введения ($n = 26$, $M \pm SEM$).

По оси абсцисс: 1 — мыши линии BALB/C, 2 — мыши линии C57BL/6, 3 — беспородные мыши. По оси ординат — процент от введенной дозы (100 мг/кг) мексидола. Светлые столбики — неизмененный препарат, темные — глюкуроноконъюгат мексидола. * — $p < 0,05$ по сравнению с BALB/C, # — $p < 0,05$ по сравнению с C57BL/6.

сравнению с таковой у BALB/C (0,03). Параметр $AUC_{0 \rightarrow \infty} m/AUC_{0 \rightarrow \infty}$ характеризует степень превращения фармакологического средства в метаболит и косвенно отражает скорость метаболизма, т.е. последняя несколько выше у мышей C57BL/6.

В результате исследования экскреционной кинетики мексидола выявлено, что препарат выводится из организма мышей, как в неизменной форме, так и в виде глюкуронового конъюгата. Получены данные, характеризующие процесс глюкуроноконъюгации мексидола у исследуемых животных. Между инбредными линиями обнаружены достоверные различия в экскреции как неизмененного препарата ($p \leq 0,05$), так и его глюкуроноконъюгированной формы ($p \leq 0,05$): мексидол и его метаболит активно выводится у мышей линии C57BL/6, в моче которых обнаружено 0,03 мг неизмененного мексидола и 0,04 мг глюкуроноконъюгата, что составляет 1,51 и 2,02 % от введенной дозы соответственно, в то время как у BALB/C зарегистрировано 0,018 мг неизмененного мексидола и 0,02 мг глюкуроноконъюгата; 0,9 и 0,98 % соответственно (рис. 2). При усредненной оценке оказалось, что среди трех исследуемых групп наиболее интенсивно процесс глюкуроноконъюгации мексидола протекает у беспородных мышей, у которых в моче обнаружено 0,14 мг глюкуроноконъюгата, или 4,2 %. Однако внутри группы беспородных животных можно выделить 2 подгруппы с разной способностью метаболизировать препарат, а именно “медленных” (0,03 мг глюкуроноконъюгата, что составляет 1,47 %) и “быстрых” (0,27 мг глюкуроноконъюгата — 7,32 %) метаболиторов, что свидетельствует о генетической неоднородности по процессу глюкуронирования популяции беспородных животных.

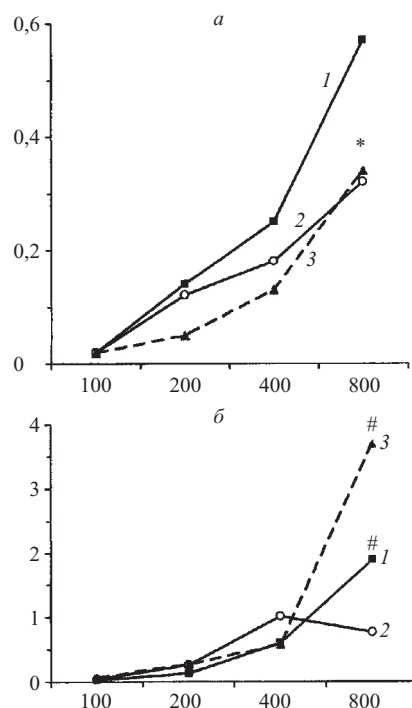


Рис. 3. Экскреция неизмененного мексидола (а) и его глюкуроноконъюгата (б) в зависимости от дозы интрагастрально введенного препарата у мышей инбредных линий и беспородных мышей ($n = 6$).

По оси абсцисс — доза, мг/кг; по оси ординат — количество мексидола (а) и его глюкуроноконъюгата (б), мг. 1 — мыши линии BALB/C, 2 — мыши линии C57BL/6, 3 — беспородные мыши. * — $p < 0,05$ по сравнению с BALB/C, # — $p < 0,05$ по сравнению с C57BL/6.

Дальнейшие исследования заключались в изучении процесса экскреции неизмененного мексидола и его метаболита в зависимости от дозы препарата (рис. 3). Эти исследования позволили опосредованно оценить эффект насыщения фермента уридиндифосфоглюкурозилтрансферазы (UDPGT; E.C.2.4.1.17), опосредующего конъюгацию мексидола с глюкуроновой кислотой. Так, у мышей линии C57BL/6 насыщение фермента UDPGT достигается при применении мексидола в диапазоне доз от 400 до 800 мг/кг, об этом свидетельствует снижающееся ($p \leq 0,05$) в этих пределах содержание конъюгированной фракции препарата в моче животных (рис. 3, б). Следовательно, интрагастральное введение мексидола в дозах, превышающих 800 мг/кг может привести к проявлению токсического действия препарата у животных этой линии и даже их гибели.

В целом, можно заключить, что метаболизм мексидола интенсивнее протекает у мышей C57BL/6 по сравнению с BALB/C, причем в основном за счет реакции II фазы — глюкуроновой конъюгации. Так, если содержание дезалкилированного метаболита в плазме крови мышей обеих инбредных линий практически одинаково, то глюкуроноконъюгата в моче в 2 раза больше у мышей C57BL/6 по сравнению с BALB/C.

Таким образом, при исследовании мексидола, важным путем метаболизма которого является конъюгация с глюкуроновой кислотой, показано, что мыши инбредных линий C57BL/6 и BALB/C обладают разными фенотипами глюкуронирования. Интенсивнее этот процесс протекает у мышей C57BL/6.

Обращает внимание тот факт, что у мышей BALB/C с большей интенсивностью происходит процесс окисления I фазы [4, 6], тогда как, судя по полученным данным, противоположные различия обнаружены по реакции II фазы.

Не исключено, что выявленные закономерности биотрансформации мексидола в организме мышей изученных инбредных линий вносят вклад в межлинейные различия фармакологического действия препарата, установленные в предыдущих работах [7, 8].

ВЫВОД

Установлены межлинейные различия в процессе конъюгации мексидола с глюкуроновой кислотой: у мышей C57BL/6 эта реакция протекает интенсивнее, чем у BALB/C.

ЛИТЕРАТУРА

1. Т. А. Воронина, *Психофармакол. и биол. наркология*, № 1, 2 – 12 (2001).
2. К. М. Дюмаев, Т. А. Воронина, Л. Д. Смирнов, *Антиоксиданты в профилактике и терапии патологий ЦНС*, Изд. Инст-та биомед. химии РАМН, Москва (1995).
3. Г. Г. Незнамов, Е. С. Телешова, Т. П. Сафарова и др., *Материалы международного симпозиума "Биоантиоксидант"*, Тюмень (1997), сс. 85 – 87.
4. И. В. Рыбина, Л. Б. Пирогова, С. Б. Середенин, *Экспериментальная и клиническая фармакокинетика*, Москва (1988), сс. 39 – 48.
5. А. К. Сариев, И. А. Давыдова, Г. Г. Незнамов и др., *Экспер. и клин. фармакол.*, **64**(3), 17 – 21 (2001).
6. С. Б. Середенин, В. Г. Зиньковский, Н. Я. Головенко, И. В. Рыбина, *Хим.-фарм. ж.*, **15**(9), 23 – 26 (1981).
7. С. Б. Середенин, Т. А. Воронина, Г. Г. Незнамов и др., *Вестн. РАМН*, № 11, 3 – 9 (1998).
8. S. B. Seredenin and Y. A. Blednov, *Biological basis of individual sensitivity to psychotropic drug*, Edinburgh (1995), pp. 25 – 38.
9. V. P. Zherdev, A. K. Sariev, and T. A. Voronina, *Ann. Ist. Super. Sanita, Italia*, **24**(3), 467 – 473 (1988).

Поступила 16.11.04

BIOTRANSFORMATION OF MEXIDOL IN INBRED BALB/C AND C57BL/6 MICE

S. B. Seredenin, O. Yu. Kravtsova, A. K. Sariev, V. P. Zherdev, G. B. Kolyvanov, and T. A. Voronina

Laboratory of Psychopharmacology, Institute of Pharmacology, Russian Academy of Medical Sciences, Baltiiskaya ul. 8, Moscow, 125315 Russia

The pharmacokinetics and biotransformation of mexidol was studied in BALB/C and C57BL/6 mice. The blood plasma contains dealkylated metabolites, and the urine contains glucuroconjugated derivatives of the drug. The process of glucuroconjugation more intensively proceeds in C57BL/6 mice than in BALB/C mice.