

ДИНАМИКА РАСПРЕДЕЛЕНИЯ НИЗКОМОЛЕКУЛЯРНЫХ ВЕЩЕСТВ ЦЕРЕБРАЛА В ТКАНЯХ КРЫС ПРИ ИНТРАНАЗАЛЬНОМ ВВЕДЕНИИ

А. Н. Макаренко, И. Г. Васильева, Е. С. Галанта, С. В. Кириченко, Е. В. Григорьева¹

Гомогенная низкомолекулярная фракция готовой лекарственной формы — церебрал с молекулярной массой 350 – 500 Д, способствующая выживанию крыс после воспроизведения геморрагического инсульта, была помечена радиоактивным тритием. Исследовали распределение и накопление меченого препарата в ткани обонятельного тракта, обонятельной луковицы, участка повреждения в неокоре, гиппокампе, гипоталамусе, среднем мозге, мосте, продолговатом мозге, мозжечке, печени и крови животных через 20 и 120 мин после интраназального введения интактным, ложноперированным крысам и животным с экспериментальным геморрагическим инсультом. Установлено, что через 20 мин меченый препарат накапливается во всех исследованных структурах головного мозга, печени и крови крыс. Через 120 мин уровень накопления метки пропорционально увеличивается. Оперативное вмешательство (ложноперированные животные и животные с геморрагическим инсультом) приводит к повышенному, по сравнению с интактными животными, накоплению меченого препарата. Характер накопления метки в обонятельном тракте и обонятельной луковице при интраназальном введении доказывает транспортировку лекарства по этим структурам в ЦНС.

Ключевые слова: интраназальное введение, экспериментальный геморрагический инсульт, церебрал, низкомолекулярная фракция, распределение и накопление

ВВЕДЕНИЕ

Применение значительного количества средств, способных эффективно влиять на метаболизм в центральной нервной системе, ограничено гематоэнцефалическим барьером. Интраназальный путь введения позволяет это преодолеть. Установлено, что пептиды после интраназального введения влияют на различные функции мозга. Это продемонстрировано для вазопрессина, инсулина, адренкортикотропин/меланцит стимулирующего гормона [10]. Количество абсорбированного лекарственного средства соответствует введенной дозе [16]. Фармакологическое действие объясняется и возможностью аксонального транспорта веществ по обонятельному тракту [8], взаимодействием с нервными рецепторами в области верхних хоан, диффузией по межклеточному пространству к рецепторам [9, 11, 14]. Проникновение лекарственных средств в мозг при интраназальном пути введения доказано экспериментально. Показано, что после интраназального введения смеси меченых пептидов 15 % радиоактивности определяется в ткани мозга, а 85 % — в печени и других тканях экспериментальных животных [6].

Ранее нами было показано, что церебрал повышает процент выживания экспериментальных животных при моделировании геморрагического инсульта (ГИ). Введенный интраназально экспериментальным животным церебрал стимулирует экспрессию мРНК ФРН [3, 15]. При этом было показано, что интраназальное

введение церебрала более эффективно влияет на экспрессию мРНК ФРН, чем при внутрибрюшинном пути введения трофинотропина.

Целью настоящего исследования было получение гомогенной низкомолекулярной фракции церебрала² и выяснение особенностей распределения и накопления меченой радиоактивным газообразным тритием (³H) церебрала в ткани головного мозга экспериментальных животных при интраназальном его введении.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

В экспериментах использованы самцы белых крыс массой 200 – 250 г, которые были разделены на 6 экспериментальных групп. Контроль, ложноперированные животные и животные с геморрагическим инсультом через 20 и 120 мин после введения (³H) церебрала. Всего в эксперименте использовано 28 животных.

Хирургические процедуры и декапитацию животных осуществляли под эфирным наркозом (стадия наркоза III₂₋₃).

Моделирование геморрагического субнеокортикального инсульта проводилось с использованием стереотаксиса по разработанной нами методике, включающей следующие основные этапы: 1) в фронтопариетальной части головы животного в области обоих полушариях был сделан надрез кожи 5 мм; 2) просверлено отверстие длиной 3 мм и диаметром 0,5 мм; 3) в

¹ Лаборатория патологической физиологии (зав. — Ю. Н. Макаренко) Института фармакологии и токсикологии АМН Украины, Украина, Киев, 03022, ул. Э. Потьме, 14.

² Аминокислотный состав препарата приведен в статье А. Н. Макаренко, Ю. Н. Королева, С. В. Касьянова — Сравнительное исследование аминокислотного состава отдельных субстанций, а также препаратов “церебрал”, “постронг” и “адемент” — новой разрабатываемой группы нейротропных средств, Архив психиатрии, № 3 (18), с. 138 – 143, 1998 г.

это отверстие в область *capsula interna dextra et sinistra* была погружена игла с мандреном для разрушения структур мозга; 4) в ткань мозга введено 100 мкл свежей аутокрови [2]. Процедуру завершили наложением шва. У ложноперитонизированных животных процедура исключала введение в структуры мозга иглы с мандреном и аутокрови. Препаративное разделение компонентов, входящих в состав готовой лекарственной формы церебрала [1, 4] проводили с использованием хроматографа Миллихром (Россия) и обращеннофазовой хроматографии на колонке (10 × 50 мм) с сорбентом Lichrosorb C18 (ША). 10 мкм в подвижной фазе: 0,1 % трифторуксусная кислота — ацетонитрил. Элюат детектировали при длине волны 215 нм. Активную фракцию церебрала (церебрал-АФ) подвергали рехроматографиям до получения гомогенного продукта пептидной природы с молекулярной массой 350 – 500 Д. Церебрал-АФ выделяли по тестированию ее влияния на выживание экспериментальных животных после моделирования ГИ.

Для получения церебрала меченого газообразным тритием 1 мг церебрала инкубировали с 10 Сi газообразного трития (содержание изотопа 97 %) в течение 7 дней при давлении 700 мм рт. ст. После обмена меченый тритий удаляли растворением в смеси вода/метанол с последующей дистилляцией под вакуумом. Процедуру повторяли 2 раза. После чего получали (³H) церебрал с удельной радиоактивностью 0,8 мСi/мг.

Раствор церебрала с удельной активностью 0,8 мСi/мл вводили интраназально в объеме 100 мкл в каждую ноздрю.

Образцы ткани головного мозга крысы печени и крови исследовались через 20 и 120 мин после введения.

Для определения радиоактивности исследуемых тканей животных декапитировали, мозг извлекали, выделяли структуры: обонятельную луковицу (ОЛ), обонятельный тракт (ОТ), участок повреждения в неокоре (размером 5 × 2 мм), гиппокамп, гипоталамус, средний мозг, мост, продолговатый мозг, мозжечок, отделяли фрагмент печени массой 100 мг. Все образцы тканей гомогенизировали в физиологическом растворе 1:5 (в/о); центрифугировали при 5000 об/мин, 100 мкл надосадочной жидкости вносили в сцинтиллятор ЖС 107 (Россия); 100 мкл образца крови помещали в ЖС 107 без обработки. Радиоактивность образцов определяли на сцинтилляционном счетчике “Бета” (Россия).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

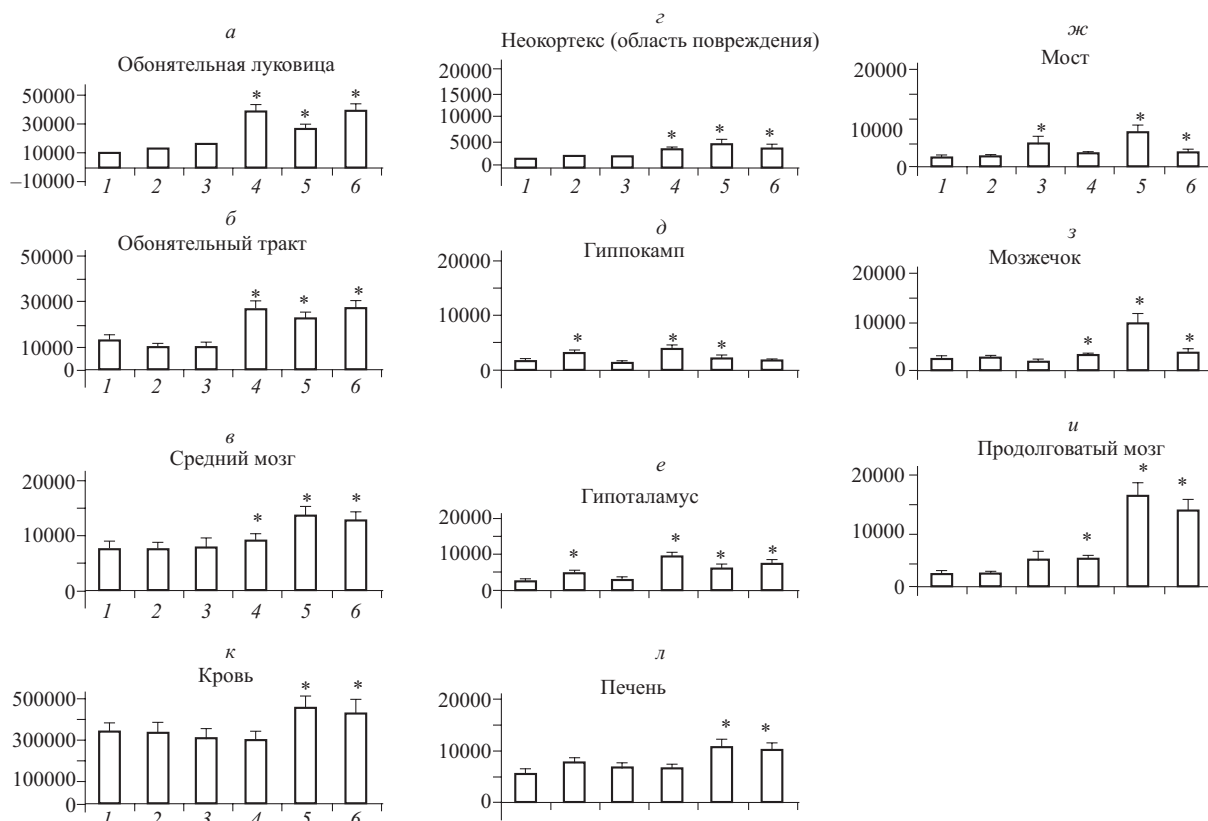
Применение метода обращеннофазовой хроматографии с применением высокоэффективного сорбента Lichrosorb C18 для разделения церебрала позволило в ходе 4 хроматографий получить гомогенную (95 %) активную фракцию церебрала, представляющую собой смесь ди-, три- и тетрапептидов с молекулярной массой 350 – 500 Д. Анализ 7 фракций, полученных на промежуточных этапах разделения свидетельствует о

присутствии в исходном препарате сахарозы ($\approx 0,5\%$), отделение которой достигалось в ходе первой и второй хроматографии, и 6 фракций пептидной природы. Одна из них, фракция N2 способствующая выживанию крыс после ГИ, была принята как активная и использована для изучения накопления церебрала тканями мозга, печени и крови при интраназальном введении.

Исследование содержания (³H) церебрала показало, что уже через 20 мин (рисунок) меченый препарат распределяется и накапливается во всех исследованных структурах головного мозга [ОЛ, ОТ, гипоталамус, гиппокамп, в неокортексе (область повреждения), в среднем мозге, продолговатом мозге и мосте]. Значительное количество меченого препарата накапливается в крови и печени крыс (рисунок, а, б). Сравнительное изучение уровней радиоактивности исследованных образцов указывает на продвижение веществ препарата по обонятельному тракту. Так, на 100 мг ткани в обонятельном тракте и обонятельной луковице (рисунок, а, б) приходится ≈ 10000 имп/мин, тогда как в печени — 5400 имп/мин. Высокий уровень радиоактивности в ткани среднего мозга свидетельствует о последующем поступлении препарата в клеточные образования этой структуры мозга (рисунок, в). В остальных же отделах головного мозга интактных животных уровень радиоактивности близок к 2000 имп/мин, что указывает на отсроченное и равномерное распределение препарата по всему головному мозгу.

Через 120 мин уровень радиоактивности в головном мозге крыс возрастает значительно (в 1,5 – 4 раза). Такое резкое увеличение уровня радиоактивности в структурах в условиях его постоянного уровня в крови также свидетельствует о тропизме накопления низкомолекулярных пептидных веществ препарата в нервной ткани. Характерно, что у животных с экспериментальным ГИ радиоактивный препарат накапливается в клеточных образованиях мозга в больших количествах. Такая закономерность прослеживается в среднем мозге, неокортексе, продолговатом мозге, мосте, мозжечке и в крови. Однако в образце обонятельного тракта и в обонятельной луковице уровень радиоактивности после моделирования не отличается от такового у интактных животных. В тканях гиппокампа и гипоталамуса у ложноперитонизированных и животных с ГИ уровень понижен. Повышение уровня радиоактивности в структурах мозга после ГИ и у ложноперитонизированных животных, связано по-видимому и с особенностями регуляции проницаемости сосудов и гематоэнцефалического барьера и дополнительным поступлением препарата в нервную ткань из крови.

Известно, что при доставке пептидных регуляторов в ЦНС интраназальный путь введения является единственным позволяющим осуществить ее, минуя гематоэнцефалический барьер [12]. Установлены некото-



Накопление (^3H) cerebrala в ткани головного мозга, печени и в крови при геморрагическом инсульте.

Животные через 20 и 120 мин после введения (^3H) cerebrala: 1, 3 — интактные животные; 2, 4 — ложнооперированные; 5, 6 — с геморрагическим инсультом. * — $p < 0,05$ (Mann-Whitney, Ut). По осям ординат — имп/мин на 100 мг ткани.

рые механизмы, обеспечивающие специфический транспорт веществ по обонятельному тракту, доказано, что одним из лигандов может быть GSH [18]. В составе комплекса с GSH компонент захватывается первичными нейронами ОТ, транспортируется по ОТ и попадает в ОЛ. Полученные нами данные о накоплении (^3H) cerebrala коррелируют с результатами, полученными по накоплению дофамина [7]. Исследования показывают [5], что при интраназальном пути введения пептида MEN 10627 достигается 100 % биодоступность лекарства, что обеспечивает возможность снижения дозировок и позволяет использовать этот путь введения пептидов как альтернативный инъекционным способам введения.

После ГИ определенный вклад в уровень радиоактивности в мозговых структурах вносит проникновение (^3H) cerebrala через кровеносные сосуды, когда изменяется их проницаемость [17, 19]. В результате дополнительного поступления (^3H) cerebrala через кровеносные сосуды мозга при ГИ, в структурах мозга наблюдается повышение уровня накопления (^3H) cerebrala, а в гиппокампе и в гипоталамусе снижение.

ВЫВОД

Показано, что молекулы (^3H) cerebrala транспортируются по обонятельному тракту и накапливаются в

структурах головного мозга, что подтверждает возможность и целесообразность использования этого пути доставки лекарства (помимо парентеральных путей) в ЦНС минуя гематоэнцефалический барьер.

ЛИТЕРАТУРА

1. Ю. Н. Королёв, А. Н. Макаренко, *Патент РФ № 2151605 от 27.06.2000, Изобретения. Полезные модели*, Москва (2000), № 18 (1), с. 301.
2. Н. О. Косицын, С. В. Карпенко, А. Н. Макаренко, В. А. Мишина, *Патент РФ № 17675118 от 08.06.1992*.
3. О. М. Макаренко, И. Г. Васильева, Н. Г. Чопик, *Трансплантология*, 3(3), 18 – 22 (2002).
4. О. М. Макаренко, С. В. Карпенко, *Патент РФ № 1839727 от 10.08.1993, Изобретения*, Москва, № 11 (10.08.1993), с. 116.
5. Annalisa Lippi, Marco Criscuoli, Marco Guelfi, et al., *Drug Metab. Dispos.*, 26(11), 1077 – 1081 (1998).
6. M. Dahlin, U. Bergman, B. Jansson, et al., *Pharm. Res.*, 17, 737 – 742 (2000).
7. M. Dahlin, B. Jansson, and E. Bjork, *Eur. J. Pharm. Sci.*, 14(1), 75 – 80 (2001).
8. S. Diamond, F. Freitag, S. B. Phillips, et al., *Cephalalgia*, 20, 597 – 602 (2000).
9. E. F. Domino, S. Minoshima, S. K. Guthrie, et al., *Neuroscience*, 101, 277 – 282 (2000).
10. H. L. Fehm, B. Perras, R. Smolnik, et al., *Eur. J. Pharmacol.*, 405, 43 – 54 (2000).
11. L. Fishbein, P. O'Brien, A. Hutson, et al., *J. Investig. Med.*, 48, 435 – 440 (2000).

12. D. Lawrence, *Lancet.*, **359**, 1674 – 1681 (2002).
13. X. F. Liu, J. R. Fawcett, and R. G., *Neurosci Lett.*, **308**(3), 91 – 94 (2001).
14. C. J. Lloyd, T. Alredy, and J. C. Lowry, *Br. J. Oral Maxillofac. Surg.*, **38**, 593 – 595 (2000).
15. A. N. Makarenko, I. G. Vasilyeva, *Molecular mechanism of NGF synthesis and secretion in acute haemorrhage stroke. Proc. Of the Neurochemistry. Joint Meeting of the ISN and ASN, Buenos-Aires* (August 36 – 31, 2001), 207, 14.2.18.
16. H. W. Nielsen, E. Bechgaard, B. Twile, et al., *Int. J. Pharm.*, **204**, 35 – 41, (2000).
17. E. Stolz, T. Gerriets, S. S. Babacan, et al., *Stroke*, **33**(2), 479 – 485 (2002).
18. J. Tallkvist, E. Persson, J. Henriksson, and H. Tjalve, *Toxicol. Sci.*, **67**(1), 108 – 113 (2002).
19. D. M. Wootton, *Annu. Rev. Biomed. Eng.*, **1**, 299 – 329 (1999).

Поступила 01.06.02

THE DYNAMICS OF DISTRIBUTION OF THE LOW-MOLECULAR-WEIGHT COMPOUNDS OF CEREBRAL IN RAT TISSUES UPON INTRANASAL ADMINISTRATION

A. N. Makarenko, I. G. Vasil'eva, E. S. Galanta, S. V. Kirichenko, and E. V. Grigor'eva

Department of Pathophysiology, Institute of Pharmacology and Toxicology, Academy of Medical Sciences of Ukraine, 03022 Kiev, Ukraine

A homogeneous low-molecular-weight fraction (MW, 350 – 500 Da) separated from a ready-to-use commercial form of the new neurotropic drug cerebral (for amino acid composition see *Arkh. Psikh.* 3(18), 138 – 143 (1998)) increases the survival of experimental rats upon experimental hemorrhagic stroke (HS). The distribution and accumulation of tritium-labeled preparation was studied in various tissues (tractus olfactorius, bulbus olfactorius, damaged neocortex region, hippocampus, hypothalamus, midbrain, pons, medulla oblongata, cerebrum, liver) and in the blood of intact, sham-operated (SO), and HS rats 20 and 120 min after intranasal administration. A significant amount of the labeled drug is accumulated for 20 min in all structures of the brain, liver, and blood. After 120 min, the level of accumulated drug proportionally increases. The amount of labeled preparation accumulated in SO and HS rats is greater than that in intact rats. The character of cerebral accumulation in tractus olfactorius and bulbus olfactorius upon intranasal administration is indicative of the effective drug transport to CNS via these pathways. Therefore, the intranasal administration can offer a promising means of clinical treatment of HS patients.