

**ОРИГИНАЛЬНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ**

© Коллектив авторов, 2016  
УДК 615.252.349.015.4

**ВЛИЯНИЕ КОМБИНАЦИИ ВИЛДАГЛИПТИНА И ГЛИКВИДОНА  
НА ФУНКЦИОНАЛЬНУЮ АКТИВНОСТЬ И ЭКСПРЕССИЮ ГЛИКОПРОТЕИНА-P  
НА ФОНЕ НОРМЫ И ПРИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОМ  
АЛЛОКСАН-ИНДУЦИРОВАННОМ САХАРНОМ ДИАБЕТЕ 2-ГО ТИПА**

*Е.Н. Якушева, Д.С. Титов, А.А. Никифоров*

Рязанский государственный медицинский университет  
им. акад. И.П. Павлова, ул. Высоковольтная, 9,  
390026, г. Рязань, Российская Федерация

В исследовании *in vivo* на кроликах изучено влияние комбинации вилдаглиптина и гликвидона на фоне нормы и экспериментального аллоксан-индуцированного сахарного диабета (СД) 2-го типа на функциональную активность гликопротеина-P (P-gp, ABCB1 белок) и его экспрессию в тканях тощей кишки, печени, почек и гематоэнцефалическом барьере. Введение комбинации вилдаглиптина в дозе 5 мг/кг и гликвидона в дозе 10 мг/кг массы тела на фоне нормы в течение 14 дней не приводило к изменениям со стороны гликопротеина-P. На 5-й день отмены указанной комбинации наблюдалось ингибирование функциональной активности белка-транспортера, без изменения его экспрессии. При комбинированной терапии вилдаглиптином и гликвидоном аллоксан-индуцированного СД 2-го типа наблюдалось полное восстановление, сниженных на фоне патологии, функциональной активности и экспрессии гликопротеина-P. На 5-й день отмены терапии вновь имело место ингибирование функциональной активности белка-транспортера и снижение его экспрессии.

*Ключевые слова:* гликопротеин-P, сахарный диабет 2-го типа, вилдаглиптин, гликвидон.

---

**INFLUENCE OF VILDAGLIPTIN AND GLIQUIDONE COMBINATION  
ON P-GLYCOPROTEIN FUNCTIONAL ACTIVITY AND EXPRESSION  
ON THE BACKGROUND OF NORM AND IN EXPERIMENTAL  
ALLOXAN-INDUCED DIABETES MELLITUS TYPE 2**

*E.N. Yakusheva, D.S. Titov, A.A. Nikiforov*

Ryazan State Medical University named after academician I.P. Pavlov,  
Vysokovoltnaya str., 9, 390026, Ryazan, Russian Federation

In the *in vivo* study on rabbits investigated the effect of the vildagliptin and gliquidone combination on the background of norm and experimental alloxan-induced diabetes mellitus (DM) type 2 on the P-glycoprotein (P-gp, ABCB1 protein) functional activity and its expression in the tissues of the jejunum, liver, kidney and the blood-brain barrier. Introduction of combination of vildagliptin at a dose of 5 mg/kg and gliquidone 10 mg/kg body weight on the background of norm for 14 days did not result in P-glycoprotein

**changes. On the 5-day of the cancellation of this combination observed inhibition of transporter protein functional activity without altering its expression. In the combination therapy of vildagliptin and gliquidone alloxan-induced diabetes type 2 showed complete recovery of P-glycoprotein functional activity and expression reduced on the pathology background. On the 5-day of treatment withdrawal again occurred inhibition of functional activity of the transporter protein and a decrease in its expression.**

**Keywords:** *P-glycoprotein, diabetes mellitus type 2, vildagliptin, gliquidone.*

По мнению Международной Диабетической Федерации, сахарный диабет (СД) является настоящей эпидемией современного общества, 387 миллионов человек во всем мире страдают от этого заболевания, а его глобальная распространенность составляет 8,3%. Предполагается, что к 2035 г. количество людей с СД в мире возрастет на 55%. При этом на СД 2-го типа приходится 90% всех случаев СД в мире. СД 2-го типа с присущим ему патологическим комплексом и осложнениями приводит к полипрагмазии, в условиях которой возрастает риск нежелательных лекарственно-опосредованных взаимодействий, в том числе и фармакокинетических, для которых все большее значение придается белкам-транспортерам, наиболее клинически значимым из которых является – гликопротеин-P (P-gr, ABCB1 белок). Значение ABCB1 белка определяется его широкой субстратной специфичностью и локализацией в организме. Перечень субстратов P-gr чрезвычайно разнообразен и представлен эндогенными и экзогенными соединениями, более 50% существующих лекарственных препаратов являются его субстратами или ингибиторами. P-gr принимает участие в процессах всасывания, распределения и выделения из организма широкого спектра соединений. Однако, транспортная активность P-gr чрезвычайно лабильна, а в роли модуляторов ABCB1 белка способны выступать и эндогенные и экзогенные вещества [1, 2, 3]. Учитывая сложность патофизиологии СД 2-го типа, фармакотерапия которого часто носит комбинированный характер, одной из рациональных комбинаций является сочетание ингибиторов дипептидилпептида-

зы-4 (ДПП-4) – вилдаглиптина и производных сульфонилмочевины – гликвидона. Данная комбинация обладает наибольшим потенциалом для терапии СД 2-го типа сопровождающегося хронической болезнью почек (ХБП) [4]. Принимая во внимание значение P-gr для судьбы лекарственных препаратов в организме, рассмотрение аспекта влияния указанной комбинации на белок-транспортер необходимо для мотивированной и комплексной оценки рисков нежелательных лекарственных реакций в клинической практике.

#### **Материалы и методы**

Эксперимент выполнен на 48 половозрелых кроликах-самцах породы Шиншилла, средней массой 3500-4500 г. Животные содержались в стандартных условиях вивария ГБОУ ВПО РязГМУ Минздрава России и имели ветеринарные свидетельства. Работу с животными осуществляли в соответствии с правилами лабораторной практики (прил. к приказу Минздравсоцразвития РФ № 708н от 23.08. 2010).

Согласно задачам эксперимента, кролики были разделены на 4 группы. В 1-ой группе (n=8) изучалась экспрессия P-gr у интактных кроликов в тканях тощей кишки, печени, почек и коре больших полушарий головного мозга. Во 2-ой группе (n=8) изучалась экспрессия ABCB1 белка в указанных тканях на фоне экспериментального аллоксан-индуцированного СД 2-го типа. В 3-й (n=16) и 4-ой (n=16) группах изучалось влияние комбинации вилдаглиптина и гликвидона на функциональную активность и экспрессию P-gr в норме и на фоне аллоксан-индуцированного СД 2-го типа, соответственно. При этом, животные 3-й и 4-ой групп, были разделены на две

подгруппы. В первых подгруппах изучались изменения уровней инсулина, глюкозы, функциональная активность P-gr по фармакокинетике фексофенадина, а также экспрессия ABCB1 белка на 5-й день отмены лекарственных препаратов. Во вторых группах изучалась экспрессия P-gr после 14-дневного введения препаратов на фоне нормы и на фоне патологии.

Сахарный диабет 2-го типа моделировали однократной внутривенной инъекцией свежеприготовленного раствора аллоксана моногидрата («Sigma») в цитратном буфере (рН=4,0) в дозе 80 мг/кг массы [5, 6]. Концентрации инсулина (мкЕД/мл) натощак, на 10 и 45 минуту и глюкозы (ммоль/л) натощак на 10 и 90 минуту после пероральной глюкозной нагрузки (3г/кг) в сыворотке крови определяли радиоиммунным и глюкоксидазным методами, соответственно в ЦНИЛ РязГМУ. Рассчитывали гликемический (отношение содержания базальной глюкозы к базальному инсулину в крови) и инсулиногенный индексы (отношение прироста инсулина в крови к приросту глюкозы в крови на 10 мин после пероральной глюкозной нагрузки) (данные представлены в таблице 2) [5, 7]. СД 2-го типа подтверждали по уровню глюкозы натощак не более 13,89 ммоль/л на фоне сохраненной секреции базального инсулина, концентрации постпрандиальной глюкозы отличной от базальной, сниженному инсулиногенному индексу и уровню инсулина на 45 минуту после глюкозной нагрузки.

Вилдаглиптин («Галвус» 50 мг; Новартис Фарма АГ, Швейцария) и Гликвидон («Глюренорм» 30 мг; Берингер Ингельхайм, Германия) вводили животным в течение 14 дней внутривентально в дозе 5 мг/кг и 10 мг/кг массы тела, соответственно [8, 9]. Функциональную активность белка-транспортера определяли *in vivo* методом ВЭЖХ по анализу динамики плазменной концентрации маркерного субстрата P-gr – фексофенадина («Телфаст» 180 мг; Aventis Pharma, Италия), который вводили в дозе 67,5 мг/кг массы тела животного [3, 10] однократно интактным кроли-

кам и животным на фоне аллоксан-индуцированного СД 2-го типа (в серии с патологией), до и после 14-дневного введения комбинации вилдаглиптина и гликвидона и на 5-й день ее отмены.

Экспрессию гликопротеина-P изучали *in vivo* непрямым иммуногистохимическим методом в ЦНИЛ РязГМУ. Кроликов выводили из эксперимента методом воздушной эмболии, образцы тощей кишки, печени, почек и коры больших полушарий головного мозга, фиксировали в 10%-ном растворе нейтрального формалина. Выбор тканей обусловлен их ролью в фармакокинетике и преимущественной локализацией P-gr.

Гистологический материал был подвергнут стандартной обработке. Инкубацию срезов тканей проводили с первичными антителами к P-gr (ABCB1 antibody – middle region (Aviva Systems Biology ARP51326\_P050, США) в разведении 1:50 по стандартной методике. Для иммунного окрашивания использовали полимерную систему детекции с пероксидазной меткой («Leica Microsystems», Германия). Ядра клеток были докрашены гематоксилином.

Микропрепарат фотографировали с помощью цифровой камеры Canon Power Shot G5 при увеличении в 400 раз. В каждом гистологическом препарате оценивали 10 репрезентативных участков. Уровень экспрессии определяли в «+», по интенсивности и площади окраски («+++» – высокая, «++» – умеренная, «+» – слабая, 0 – отсутствие экспрессии) с помощью программы для анализа и обработки цифровых изображений «ImageJ» и специально разработанного для целей количественного иммуногистохимического анализа плагина «IHC Profiler» [11].

Полученные экспериментальные данные обрабатывали с использованием офисного пакета «Microsoft Office XP» и программ Statistica 8.0. и IBM SPSS Statistics 20. Характер распределения данных оценивали по критерию Шапиро-Уилка (за исключением  $T_{max}$  и экспрессии в «+»).

Проверку нулевой гипотезы для исследования статистической значимости

изменений фармакокинетических показателей, уровня инсулина, глюкозы и связанных с ними индексов выполняли дисперсионным анализом (ANOVA) повторных измерений. В случае отличия распределения от нормального использовали критерия Фридмана (для  $T_{\max}$  характер распределения не определяли, указанный фармакокинетический параметр рассчитывали при помощи критерия Фридмана). В качестве методов множественных сравнений использовали параметрический и не параметрический варианты критерия Ньюмена-Кейлса, соответственно. Для параметрических данных рассчитывали среднее арифметическое значение (Mean) и стандартное отклонение (SD). Для данных имеющих распределение отличное от нормального, рассчитывали медиану (Median), верхний и нижний квартили (lq; uq).

Для фармакокинетических параметров (за исключением  $T_{\max}$ ) дополнительно проводили проверку справедливости нулевой гипотезы с помощью ANOVA повторных измерений, с использованием в качестве метода множественного сравнения параметрического варианта критерия Ньюмена-Кейлса, после предварительного логарифмирования данных, исходя из представления об их лог-нормальном распределении.

Полученные результаты представлены в виде среднего геометрического (Geom. mean) и его 95% доверительного интервала (95% CI).

Рассчитывали двухсторонний 90% доверительный интервал отношения средних геометрических, изучаемых фармакокинетических параметров интактных животных, на фоне аллоксан-индуцированного СД 2-го типа (в серии с патологией), после 14-дневного введения изучаемых препаратов и на 5-й день их отмены. В соответствии с рекомендациями FDA по изучению гликопротеина-P, клинически достоверными признавались различия между фармакокинетическими параметрами двухсторонний 90% доверительный интервал отношения средних геометрических которых полностью находился за

пределами диапазона 80%-125% (0,8-1,25) (т.е. -20%+25%) или когда, как минимум, отношение средних геометрических не попадало в указанный диапазон и границы доверительного интервала отношения средних не пересекали или не совпадали со средним диапазона 80%-125% (0,8-1,25) -100% (1,0) [12]. Изменения фармакокинетических параметров фексофенадина демонстрирующие статистическую и клиническую значимость признавались достоверными.

Изучение статистической значимости изменений экспрессии гликопротеина-P проводили непараметрическими методами. Для проверки нулевой гипотезы использовали критерий Крускала-Уоллиса, в качестве метода множественного сравнения применяли не параметрический вариант критерия Ньюмена-Кейлса.

Для описания данных использовали моду (Mode) и размах вариации (Range (R)), а также медиану (Median) и верхний и нижний квартили (lq; uq).

#### **Результаты и их обсуждение**

При введении комбинации вилдаглиптина в дозе 5 мг/кг и гликвидона в дозе 10 мг/кг массы на фоне нормы фармакокинетические параметры фексофенадина на 14-й день введения достоверно не изменялись по сравнению с исходными данными, однако в периоде отмены выявлены достоверные увеличения значений  $T_{1/2}$ , AUC<sub>0-t</sub>, AUC<sub>0-∞</sub> и MRT, а также снижение CI фексофенадина, как по сравнению с исходными значениями, так и значениями на фоне 14-дневного введения указанной комбинации, свидетельствующие об ингибировании функциональной активности P-gr (табл. 1).

Экспрессии P-gr после 14 дней введения комбинации на фоне нормы и на 5-й день ее отмены оставалась без изменений (табл. 6).

После 14 дней введения комбинации вилдаглиптина и гликвидона интактным животным достоверно изменялись уровни базальных инсулина и глюкозы, постпрандиальной глюкозы и гликемический индекс. На 5-й день отмены комбинации

изменения в уровнях инсулина, глюкозы и связанных с ними индексов по сравнению

с исходными значениями не были зафиксированы (табл. 2).

Таблица 1

**Фармакокинетические параметры фексофенадина у интактных кроликов, на фоне 14-дневного введения комбинации вилдаглиптина и гликвидона и на 5-й день отмены препаратов (Mean±SD или Media (Iq; uq)/Geom. Mean (95% CI))**

Изучаемые параметры	Исходные значения (n = 8)	Значения после 14 дней введения комбинации вилдаглиптина и гликвидона (n = 8)	Значения на 5-е сутки отмены комбинации вилдаглиптина и гликвидона (n = 8)
↑↓отношения Geom. Mean в % и 90% CI отношения			
C <sub>max</sub> , нг/мл	180,56 (167,67; 210,69)/ 199,2 (158,52; 250,3)	222,48 (180,49; 256,16)/ 211,41 (159,87; 279,57)	177,94 (168,7; 218,15)/ 198,05 (152,31; 257,54)
14/исх; 5/исх		↑6,13 (↓20,17; ↑41,1)	↓0,57 (↓11,18; ↑11,3)
5 отм/14			↓6,32 (↓33,16; ↑31,31)
T <sub>max</sub> , ч	4 (2; 4)	2 (1; 3)	2 (1; 5,5)
T <sub>1/2</sub> , ч	11,45 (9,35; 13,71)/ 12,04 (8,76; 16,56)	15,67 (9,75; 21,66)/ 14,88 (10,06; 22,02)	38,61 (21,66; 71,9) <sup>1</sup> / 42,12 (23,46; 75,62) <sup>1,2</sup>
14/исх; 5/исх		↑23,63 (↓7,22; ↑64,73)	↑249,85 (↑123,76; ↑446,98) <sup>3</sup>
5 отм/14			↑182,98% (↑55,33%; ↑415,55%) <sup>4</sup>
AUC <sub>0-t</sub> , (нг/мл)×ч	1878,43±619,51/ 1794,34 (1371,78; 2347,5)	2000,34± 623,28/ 1915,45 (1467,78; 2499,67)	2744,6± 550,28 <sup>1,2</sup> / 2695,33 (2270,74; 3199,32) <sup>1,2</sup>
14/исх; 5/исх		↑6,75 (↓14,11; ↑32,68)	↑50,21 (↑22,88; ↑83,63) <sup>3</sup>
5 отм/14			↑40,71 (↑5,39; ↑87,88) <sup>4</sup>
AUC <sub>0-∞</sub> , (нг/мл)×ч	2260,04 (1865,23;2978,97)/ 2502,41 (1722,54; 3635,34)	2792,99 (2048,99; 4019,1)/ 2846,97 (1957,53; 4140,54)	6729,18 (5067,59; 15767,75) <sup>1,2</sup> / 8939,9 (4836,9; 16523,34) <sup>1,2</sup>
14/исх; 5/исх		↑13,77 (↓12,81; ↑48,44)	↑257,25(↑109; ↑510,67) <sup>3</sup>
5 отм/14			↑214 (↑59,21; ↑519,33) <sup>4</sup>
Cl, л/ч	103,33±38,3/ 95,78 (66,14; 138,71)	92,54±39,84/ 84,19 (55,92; 126,74)	32,38±18,23 <sup>1,2</sup> / 26,81 (14,7; 48,88) <sup>1,2</sup>
14/исх; 5/исх		↑12,11 (↓32,64; ↑14,68)	↓72,01 (↓83,63; ↓52,15) <sup>3</sup>
5 отм/14			↓68,16 (↓83,86; ↓37,19) <sup>4</sup>
Vd, л	1833,27±618,25/ 1719,57 (1214,3; 2434,08)	1868,58±592,16/ 1789,22 (1338,24; 2368,16)	1708,21±458,88/ 1645,71 (1274,27; 2125,42)
14/исх; 5/исх		↑3,53 (↓20,34; ↑34,55)	↓4,3 (↓15,71; ↑8,66)
5 отм/14			↓7,56 (↓28,16; ↑18,95)
MRT, ч	17,54 (14,33; 19,72)/ 18,05 (13,18; 24,72)	18,98 (15,39; 29,62)/ 21,14 (15,18; 29,46)	57,78 (35,38; 105,57) <sup>1</sup> / 61,38 (33,79; 111,49) <sup>1,2</sup>
14/исх; 5/исх		↑17,12 (↓10,21; ↑52,78)	↑240 (↑119,34; ↑427,06) <sup>3</sup>
5 отм/14			↑190,29 (↑62,8; ↑417,63) <sup>4</sup>

Примечание: надстрочными цифрами в таблицах 1 и 2 обозначены:

<sup>1</sup> – уровень значимости <0,05 (p<0,05) по сравнению с исходными значениями;

<sup>2</sup> – уровень значимости <0,05 (p<0,05) по сравнению со значениями после 14-ти дней введения комбинации вилдаглиптина и гликвидона;

<sup>3</sup> – двухсторонний 90% доверительный интервал отношения средних геометрических к средним геометрическим исходных значений, не укладывающийся в пределы диапазона 80%-125% (0,8-1,25) (14/исх; 5 отм/исх);

<sup>4</sup> – двухсторонний 90% доверительный интервал отношения средних геометрических к средним геометрическим значений после 14-ти дней введения комбинации вилдаглиптина и гликвидона, не укладывающийся в пределы диапазона 80%-125% (0,8-1,25) (5 отм/14)

Таблица 2

**Изменения уровней инсулина и глюкозы после введения комбинации вилдаглиптина (В) и гликвидона (Г) интактным кроликам (Mean±SD или Media (Iq; uq))**

Изучаемые параметры	Исходные значения (n = 8)	14 дней введения комбинации В и Г (n = 8)	5-й день отмены комбинации В и Г (n = 8)
Глюкоза натощак, ммоль/л	5,53±0,48	4,06±1,26 <sup>1</sup>	5,04±0,42 <sup>2</sup>
Инсулин натощак, мкЕД/мл	5,88±2,42	11,36±5,81 <sup>1</sup>	8,67±3,58
Гликемический индекс	1,07±0,37	0,45±0,21 <sup>1</sup>	0,66±0,24 <sup>2</sup>
Инсулиногенный индекс	2,21±2,43	2,8±11,93	1,73±1,92
Инсулин 45 мин, мкЕД/мл	9,09±3,52	12,97±9	11,61±5,95
Глюкоза 90 мин, ммоль/л	7,02±1,7	6,21±1,71 <sup>1</sup>	6,8±2,06 <sup>2</sup>

Таким образом, 14-дневное введение интактным кроликам комбинации вилдаглиптина в дозе 5 мг/кг и гликвидона в дозе 10 мг/кг массы тела, сопровождающееся увеличением концентрации базального инсулина (эндогенного индуктора Р-гр) и снижением уровня базальной и постпрандиальной глюкозы (эндогенного ингибитора Р-гр) [10], а также гликемического индекса, не приводит к изменениям функциональной активности Р-гр и его экспрессии в тканях тощей кишки, печени, почек и гематоэнцефалическом барьере. На 5-й день отмены комбинации препаратов наблюдается ингибирование транспортной функции Р-гр без изменения его экспрессии в изученных тканях на фоне нормализации концентраций инсулина,

глюкозы крови и гликемического индекса по сравнению с исходными значениями.

Комбинированная терапия аллоксан-индуцированного СД 2-го вилдаглиптином и гликвидоном приводила к нормализации всех изменившихся при патологии фармакокинетических параметров фексофенадина: *Stax*, AUC0-t, AUC0-∞, *Cl* и *Vd* до уровня исходных значений, что свидетельствует о восстановлении сниженной на фоне патологии функциональной активности Р-гр. На 5-й день отмены комбинации указанные параметры вновь достоверно отличались от исходных значений, а *Stax*, AUC0-t и *Vd* и от значений на фоне 14-дневного введения комбинации, демонстрируя ингибирование функциональной активности Р-гр (табл. 3).

Таблица 3

**Фармакокинетические параметры фексофенадина у кроликов на фоне комбинированной терапии вилдаглиптином и гликвидоном аллоксан-индуцированного сахарного диабета 2-го типа (Mean±SD или Media (Iq; uq)/Geom. Mean (95% CI (ДИ)))**

Изучаемые параметры	Исходные значения (n = 8)	Значения на фоне СД 2-го типа (n = 8)	Значения после 14 дней введения комбинации вилдаглиптина и гликвидона на фоне СД 2-го типа (n=8)	Значения на 5 день отмены комбинации вилдаглиптина и гликвидона на фоне СД 2-го типа (n=8)
↑↓ отношения Геом. Mean в % и 90% CI отношения				
<i>Stax</i> , нг/мл	178,61±28,54/ 176,5 (153,4; 203,07)	299,04±122,72 <sup>1</sup> / 278,82 (199,6; 389,46) <sup>1,4</sup>	176,64±50,85 <sup>2</sup> / 169,22 (128,68; 222,54) <sup>2</sup>	282,28±89,48 <sup>1,3</sup> / 270,99 (210,63; 348,63) <sup>1,3</sup>
диаб/исх; 14/исх; 5 отм/исх		↑57,98 (↑29,1; ↑93,3) <sup>4</sup>	↓4,12 (↓24,89; ↑22,39)	↑53,54 (↑21,81; ↑93,52) <sup>4</sup>
14/диаб; 5 отм/диаб			↓39,31 (↓56,5; ↓15,32) <sup>5</sup>	↓2,81 (↓27,47; ↑30,22)

14/5 отг				↑60,13 (↑17,63; ↑118) <sup>6</sup>
Tmax, ч	2 (1; 3)	2 (1;5,5)	2,5 (1,5; 3,5)	4 (2; 4)
T½, ч	13,72 (12,22; 15,82)/ 14 (11,66; 16,85)	22,02 (15,29; 52,51)/ 32,16 (12,17; 85)	18,3 (12,19; 23,51)/ 18,2 (11,54; 28,6)	22 (19,94; 26,59)/ 22,8 (18,35; 28,33)
диаб/исх; 14/исх; 5 отг/исх				↑62,64 (↑24,79; ↑111,98) <sup>4</sup>
14/диаб; 5 отг/диаб			↓43,49 (↓76,05; ↑33,31)	↓29,11 (↓66,95; ↑52,05)
14/5 отг				↑25,45 (↓18,5; ↑93,15)
AUC0-t, нг/мл × ч	1750,36±419,76/ 1705,98 (1390,68; 2092,76)	3432,1±923,89 <sup>1</sup> / 3311,46 (2588,36; 4236,56) <sup>1</sup>	2006,07±702,25 <sup>2</sup> / 1890,05 (1376,01; 2596,11) <sup>2</sup>	2947,82±238,89 <sup>1,3</sup> / 2939,42 (2747,73; 3144,48) <sup>1,3</sup>
диаб/исх; 14/исх; 5 отг/исх		↑94,11 (↑77,64; ↑112,1) <sup>4</sup>	↑10,79 (↓13; ↑41,08)	↑72,3 (↑45,46; ↑104,09) <sup>4</sup>
14/диаб; 5 отг/диаб			↓42,92 (↓53,1; ↓30,54) <sup>5</sup>	↓11,24 (↓27,58; ↑8,8)
14/5 отг				↑55,52 (↑19,19; ↑102,92) <sup>6</sup>
AUC0-∞, нг/мл × ч	2516,92 (2046,8; 2934,5)/ 2511,42 (1876,68; 3360,84)	6276,77 (4876,38; 10939,8) <sup>1</sup> / 8807,3 (3837,41; 20213,78) <sup>1</sup>	4005,73 (2285,76; 5010,53)/ 3290,42 (2060,22; 5255,2) <sup>2</sup>	5713,36 (5181,24; 6561,15) <sup>1</sup> / 5836,89 (5190,36; 6563,94) <sup>1</sup>
диаб/исх; 14/исх; 5 отг/исх		↑250,69 (↑72,23; ↑614) <sup>4</sup>	↑31,02 (↓12,98; ↑97,26)	↑132,41 (↑76,26; ↑206,45) <sup>4</sup>
14/диаб; 5 отг/диаб			↓62,64 (↓80,76; ↓27,48) <sup>5</sup>	↓33,73 (↓66; ↑29,17)
14/5 отг				↑77,39 (↑13,54; ↑177,15) <sup>6</sup>
Cl, л/ч	98,3±32,24/ 94,05 (72,32; 122,29)	35,54±20,63 <sup>1</sup> / 26,58 (11,32; 62,42) <sup>1</sup>	82,88±55,74/ 71,32 (45,13; 112,7) <sup>2</sup>	40,6±6,78 <sup>1</sup> / 34,73 (34,73; 46,38) <sup>1</sup>
диаб/исх; 14/исх; 5 отг/исх		↓71,74 (↓86,1; ↓42,64) <sup>4</sup>	↓24,17 (↓49,53; ↑13,94)	↓57,33 (↓67,37; ↓44,2) <sup>4</sup>
14/диаб; 5 отг/диаб			↑168,3 (↑38; ↑421,68) <sup>5</sup>	↑50,99 (↓22,63; ↑194,68)
14/5 отг				↓43,72 (↓64,06; ↓11,88) <sup>6</sup>
Vd, л	1812,11 (1753,23; 2075,49)/ 1940,68 (1648,86; 2284,14)	1279,62 (836,3; 1790,31) <sup>1</sup> / 1181,55 (790,18; 1766,74) <sup>1</sup>	1831,17 (1494,47; 2603,07)/ 1881,26 (1360,29; 2601,75) <sup>2</sup>	1413 (1265,58; 1488,87) <sup>1</sup> / 1345,88 (1182,76; 1531,5) <sup>1,3</sup>
диаб/исх; 14/исх; 5 отг/исх		↓39,19 (↓52,34; ↓22,2) <sup>4</sup>	↓3,06 (↓20,84; ↑18,71)	↓30,65 (↓40,74; ↓18,85) <sup>4</sup>
14/диаб; 5 отг/диаб			↑59,22 (↑12,1; ↑126,16) <sup>5</sup>	↑13,91 (↓18,04; ↑58,3)
14/5 отг				↓28,46 (↓42,89; ↓10,4) <sup>6</sup>
MRT, ч	20,24 (18,19; 23,22)/ 20,77 (17,34; 24,87)	31,6 (21,91; 74,97)/ 44,38 (16,12; 122,19)	27,23 (17,1; 34,65)/ 26,37 (16,76; 41,51)	32,54 (29,42; 38,78)/ 33,53 (27,09; 41,5)
диаб/исх; 14/исх; 5 отг/исх		↑113,7 (↓11,4; ↑415,5)	27↑ (↓14,15; ↑87,87)	↑61,46 (↑24,41; ↑109,54) <sup>4</sup>
14/диаб; 5 отг/диаб			↓40,57 (↓75,5; ↑44,12)	↓24,45 (↓66,05; ↑68,11)
14/5 отг				↑27,13 (↓16,74; ↑94,13)

Примечание: надстрочными цифрами в таблицах 3,4,5 обозначены:

<sup>1</sup> – уровень значимости <0,05 (p<0,05) по сравнению с исходными значениями;

<sup>2</sup> – уровень значимости <0,05 (p<0,05) по сравнению со значениями на фоне СД 2-го типа;

<sup>3</sup> – уровень значимости <0,05 (p<0,05) по сравнению со значениями после 14 дней введения комбинации вилдаглиптина и гликвидона на фоне СД 2-го типа;

<sup>4</sup> – двухсторонний 90% доверительный интервал отношения средних геометрических к средним геометрическим исходных значений, не укладывающийся в пределы диапазона 80%-125% (0,8-1,25) (диаб/исх; 14/исх; 5 отм/исх);

<sup>5</sup> – двухсторонний 90% доверительный интервал отношения средних геометрических к средним геометрическим значений на фоне СД 2-го типа, не укладывающийся в пределы диапазона 80%-125% (0,8-1,25) (14/диаб; 5 отм/диаб);

<sup>6</sup> – двухсторонний 90% доверительный интервал отношения средних геометрических к средним геометрическим значений после 14-дневного введения комбинации вилдаглиптина и гликвидона на фоне СД 2-го типа, не укладывающийся в пределы диапазона 80%-125% (0,8-1,25) (14/5 отм)






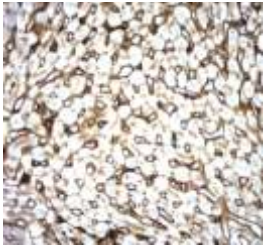


На фоне комбинированной терапии наблюдалось полное восстановление экспрессии Р-гр в тканях тощей кишки, печени и почек до уровня исходных значений. Экспрессия белка-транспортера в ге-

матоэнцефалическом барьере в изучаемые сроки оставалась без изменений. На 5-й день отмены терапии вновь имело место снижение экспрессии Р-гр в ткани тощей кишки (табл. 4, рис. 1).

Таблица 4

**Экспрессия в «+» гликопротеина-Р в тканях на фоне комбинированной терапии вилдаглиптином (В) и гликвидоном (Г) аллоксан-индуцированного сахарного диабета 2-го типа (Mode (R)/Media (Iq; iq))**

Орган	Контроль (n=8)	СД 2-го типа (n=8)	14 дней введения комбинации В и Г на фоне СД 2-го типа (n=8)	5-й день отмены комбинации В и Г на фоне СД 2-го типа (n=8)
Тощая кишка	2 (1)/2 (2;2)	0 (1)/0 (0;1) <sup>1</sup>	2 (1)/2 (2;2) <sup>2</sup>	1 (1)/1 (0;5; 1) <sup>1,3</sup>
Печень	2 (1)/2 (2;2)	1(1)/1 (1;1) <sup>1</sup>	2 (0)/2 (2;2) <sup>2</sup>	1(1)/1 (1;2)
Почка	1 (0)/1 (1;1)	0 (1)/0 (0;0,5) <sup>1</sup>	1 (1)/ 1(1;1) <sup>2</sup>	0 (1)/ 0 (0;1)
Мозг	2 (1)/2 (2;2)	2 (0)/2 (2;2)	2 (1)/2 (2;2)	2 (0)/ 2 (2;2)

№	Тощая кишка	Печень	Почка	Головной мозг
1	 «0»	 «0»	 «0»	 «0»
2				



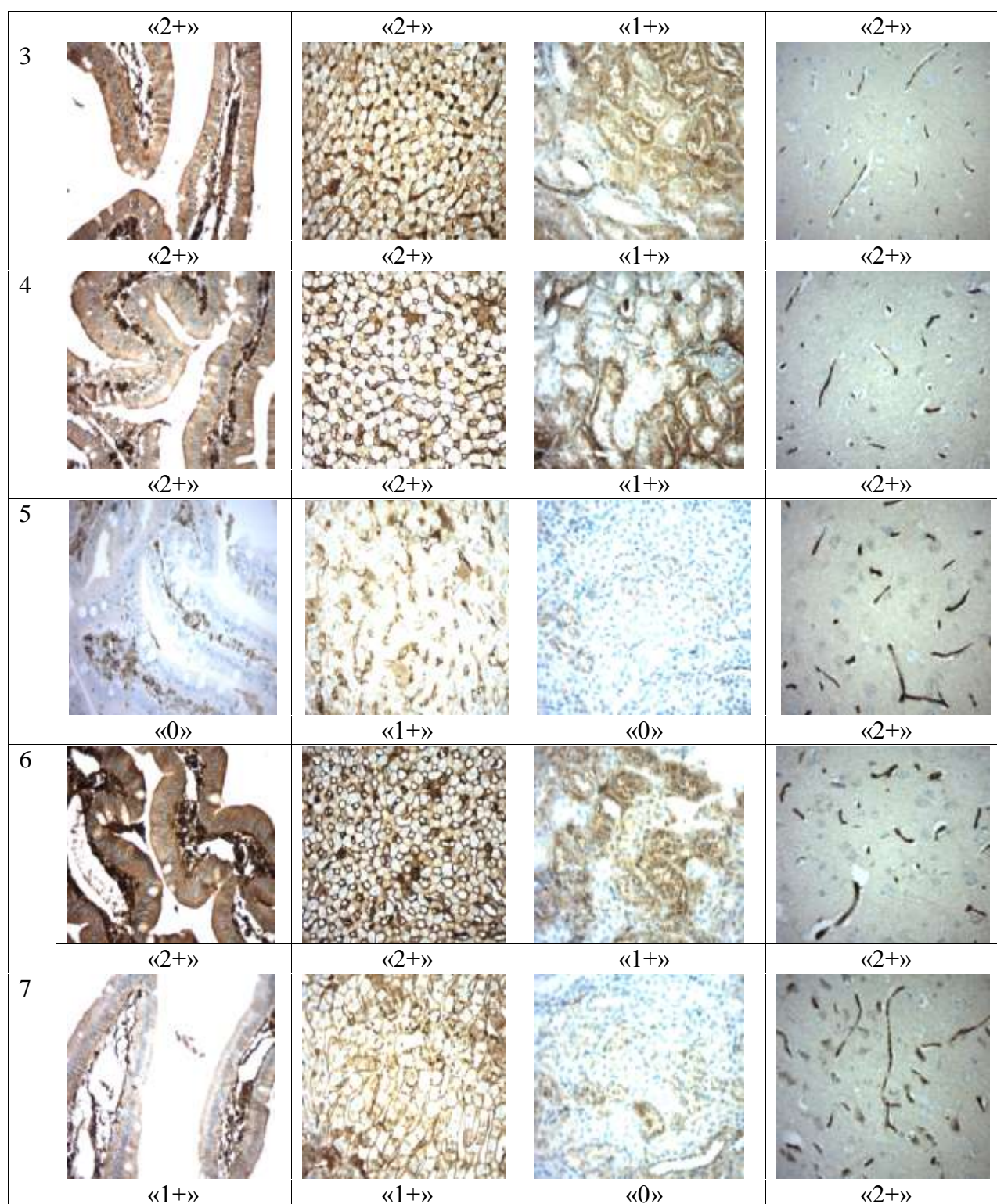


Рис. 1. Иммуногистохимическая картина экспрессии гликопротеина-Р (×400 раз):  
 1 – Без первичных антител в тканях intactных кроликов; 2 – С первичными антителами (группа контроля) в тканях intactных кроликов; 3 – 14-дневное введения комбинации вилдаглиптина и гликвидона на фоне нормы; 4 – 5-й день отмены комбинации вилдаглиптина и гликвидона на фоне нормы;  
 5 – аллоксан-индуцированный сахарный диабет 2-го типа; 6 – 14-дневная терапия комбинацией вилдаглиптина и гликвидона на фоне аллоксан-индуцированного сахарного диабета 2-го типа;  
 7 – 5-й день отмены терапии комбинацией вилдаглиптина и гликвидона на фоне аллоксан-индуцированного сахарного диабета 2-го типа

Полученные изменения функциональной активности и экспрессии P-gr сопровождались восстановлением на фоне терапии, уровня инсулина сыворотки крови на 45 минуту после пероральной глюкозной нагрузки и инсулиногенного индекса, а также нормализацией concentra-

ции постпрандиальной глюкозы. На 5-й день отмены комбинации наблюдалось снижение уровня инсулина и рост концентрации глюкозы, а также уменьшение инсулиногенного индекса по сравнению со значениями у интактных животных (табл. 5).

Таблица 5

**Изменения уровня инсулина и глюкозы на фоне комбинированной терапии вилдаглиптином (В) и гликвидоном (Г) аллоксан-индуцированного сахарного диабета 2-го типа (Mean±SD или Media (Iq; uq))**

Исследуемые параметры	Исходные значения (n=8)	Значения на фоне СД 2-го типа (n = 8)	14 дней введения комбинации В и Г на фоне СД 2-го типа (n=8)	5 день отмены комбинации В и Г на фоне СД 2-го типа (n=8)
Глюкоза натощак ммоль/л	6,9±1,81	7,28±1,84	6,94±1,43	6,08±0,75
Инсулин натощак мкЕД/мл	5,95±1,7	4,38±1,52	5,47±1,36	3,98±1,69
Гликемический индекс	1,0667 (0,9702; 1,4147)	1,5477 (1,2546; 2,2297)	1,2364 (0,9667; 1,669)	1,7515 (1,0639; 2,603)
Инсулиногенный индекс	4,4556 (1,4409; 14,5278)	0,012 (0,1708; 1,3985) <sup>1</sup>	2,6712 (0,2156; 12,7373)	0,4711 (0,0049; 1,7355) <sup>1</sup>
Инсулин 45 мин мкЕД/мл	16,17±8,2	4,88±2,05 <sup>1</sup>	14,82±7,1 <sup>2</sup>	5,84±3,66 <sup>1,3</sup>
Глюкоза 90 мин ммоль/л	6,43±1,12	13,75±4,3 <sup>1</sup>	7±1,35 <sup>2</sup>	11,88±3,99 <sup>1,3</sup>

Учитывая характер изменений экспрессии и/или функциональной активности P-gr при введении комбинации вилдаглиптина и гликвидона на фоне нормы и при аллоксан-индуцированном СД 2-го типа, особенности фармакокинетики и фармакодинамики указанных препаратов, а также взаимосвязь со стороны показателей инсулина и глюкозы можно предположить, что наиболее вероятная причина установленных явлений – изменение в уровне эндогенных регуляторов белка-транспортера, биологическая активность и/или уровень которых на фоне нормы и на фоне СД 2-го типа были не одинаковы. Таким образом, снижение функциональной активности P-gr при введении комбинации вилдаглиптина и гликвидона интактным кроликам может быть следствием увеличения уровня инкретиновых гормонов глюкогоноподобного полипептида-1 (ГПП-1) и гастро-ингибирующего поли-

пептида (ГИП), называемого также глюкозо-зависимым инсулиноотропным полипептидом, в результате – ингибирования вилдаглиптом фермента ДПП-4. Уникальность гипогликемического действия инкретинов заключается в его физиологичности, инсулиноотропный эффект ГПП-1 и ГИПа проявляется лишь на фоне гипергликемии. При этом, изменения со стороны концентраций инсулина (эндогенного индуктора P-gr) и глюкозы (эндогенного ингибитора P-gr) после 14-дневного введения вилдаглиптина и гликвидона интактным кроликам очевидно нивелировали влияние инкретинов на белок-транспортер. Гликвидон имеющий конечный T<sub>1/2</sub> около 8 часов, с диапазоном 5,7-9,4 ч, должен был полностью покинуть организм животного за 5 конечных T<sub>1/2</sub>, что подтверждается нормализацией уровней инсулина и глюкозы, а также гликемического индекса на 5-й день от-

мены комбинации, статистически достоверно не изменяющихся при введении одного вилдаглиптина [10]. Вилдаглиптин, выступающий в качестве ингибирующего субстрата, ковалентно связывается с двумя субсайтами ДПП-4: S1 (S 630, Y547, Y631) и S2 (N710, E205, E206, S209, H126) и формирует устойчивый комплекс, подвергающийся медленной диссоциации, что обеспечивает стойкое дозозависимое блокирование фермента [13] и большую продолжительность действия вилдаглиптина, несмотря на его короткий T<sub>1/2</sub> (2-3 часа). Таким образом, на 5-й день отмены комбинации вилдаглиптина и гликвидона уровень инкретинов, очевидно, уже недостаточен для проявления гипогликемического действия на фоне аллоксан-индуцированного СД 2-го типа, но все еще повышен. Ингибирование функциональной активности P-gr при отсутствии патологии, вероятно, связано с увеличением инкретинового пула, не задействованного в снижении концентрации глюкозы в крови на фоне нормогликемии. Следствием этого могла стать интенсификация участия ГПП-1 и ГИП в регуляции процессов за пределами поджелудочной железы т.к. инкретиновые рецепторы обнаружены в кишечнике, почках и ряде других органов [14], а сами гормоны способны выступать в качестве местных регуляторов транспортных процессов в желудочно-кишечном тракте [15]. Тот факт, что P-gr обладает широкой субстратной специфичностью, а его субстратами являются, в том числе, углеводы и аминокислоты – стимуляторы секреции инкретинов, повышает вероятность взаимосвязи указанного белка-транспортера с ГПП-1 и ГИП. Учитывая системность обстоятельств, при которых секретируются инкретины (прием пищи) очевидно, что регуляция транспортной функции ABCB1 белка должна осуществляться без изменения его экспрессии, за счет модуляции функциональной активности, чтобы иметь возможность восстановиться в кратчайшие сроки.

Ингибирование функциональной ак-

тивности P-gr, на фоне аллоксан-индуцированного СД 2-го типа, сопровождающееся снижением его экспрессии в тканях тощей кишки, печени и почек, вероятно, стало следствием снижения уровня эндогенного индуктора инсулина и увеличением концентрации эндогенного ингибитора глюкозы, в результате нарушения углеводного обмена. Комбинированная терапия вилдаглиптином и гликвидоном приводила к нормализации уровней инсулина и глюкозы в крови и как следствие восстанавливала функциональную активность и экспрессию P-gr, сниженные на фоне патологии. При этом, предположительно, основное действие инкретинов было направлено на нормализацию углеводного обмена, таким образом, основная доля инкретинового пула была задействована в реализации его эффекта на уровне поджелудочной железы, исключая тем самым инкретины из регуляции внепанкреатических процессов.

#### **Выводы**

1. Внутривенное введение интактным кроликам комбинации вилдаглиптина в дозе 5 мг/кг и гликвидона в дозе 10 мг/кг массы тела в течение 14 дней не вызывает изменений функциональной активности гликопротеина-P и его экспрессии в тканях тощей кишки, печени, почек и гематоэнцефалическом барьере, однако, на 5-й день отмены указанной комбинации наблюдается ингибирование функциональной активности гликопротеина-P без изменения его экспрессии.

2. 14-дневная комбинированная терапия кроликов с аллоксан-индуцированным СД 2-го типа вилдаглиптином в дозе 5 мг/кг и гликвидоном в дозе 10 мг/кг массы тела приводит к нормализации сниженных на фоне патологии функциональной активности гликопротеина-P и его экспрессии в тканях тощей кишки, печени и почек. На 5-й день отмены комбинации вновь наблюдается ингибирование функциональной активности белка-транспортера и его экспрессии в ткани тощей кишки.

*Конфликт интересов отсутствует.*

### Литература

1. Якушева Е.Н., Черных И.В., Щулькин А.В., Котлярова А.А., Никифоров А.А. Половые различия функциональной активности и экспрессии гликопротеина-Р у кроликов // Российский физиологический журнал им. И.М. Сеченова. 2014. Т. 100, №8. С. 944-952.
2. Якушева Е.Н., Черных И.В., Щулькин А.В., Попова Н.М. Гликопротеин-Р: структура, физиологическая роль и молекулярные механизмы модуляции функциональной активности // Успехи физиологических наук. 2014. Т. 45, № 4. С. 89-98.
3. Якушева Е.Н., Щулькин А.В., Черных И.В., Титов Д.С. Функциональная активность гликопротеина-Р при экспериментальных манипуляциях // Российский медико-биологический вестник имени академика И.П. Павлова. 2014. № 2. С. 74-77.
4. Дедов И.И., Мельниченко Г.А., ред. Клинические рекомендации. Алгоритм специализированной медицинской помощи больным сахарным диабетом М., 2015. Вып. 7. 112 с. doi: 10.14341/DM20151S1-112
5. Миронов А.Н., ред. Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств. Часть первая. М.: Гриф и К, 2012. 944 с.
6. Shukla R., Anand K., Prabhu K.M., Murthy P.S. Hypoglycaemic effect of the water extract of *Ficus bengalensis* in alloxan recovered, mildly diabetic and severely diabetic rabbits // International Journal of Diabetes in Developing Countries. 1994. Vol. 14. P. 78-81.
7. Burkey B.F., Li X., Bolognese L., Balkan B., Mone M., Russell M. et al. Acute and chronic effects of the incretin enhancer vildagliptin in insulin-resistant rats // Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics. 2005. Vol. 315, №2. P. 688-695. doi:10.1124/jpet.105.087064
8. Хабриев Р.У., ред. Руководство по экспериментальному (доклиническому) изучению новых фармакологических веществ. М.: Медицина, 2005. 832 с.
9. de Gasparo M., Hostetter G., Desaulles P.A. Effect of gliquidone on insulin binding to rabbit erythrocytes // Journal of Endocrinology. 1983. Vol. 97, № 1. P. 97-103.
10. Титов Д.С., Никифорова Л.В. Влияние ингибитора ДПП-4 – вилдаглиптина на функциональную активность гликопротеина-Р in vivo // Российский медико-биологический вестник имени академика И.П. Павлова. 2015. №. 3. С. 54-60.
11. Varghese F., Bukhari A.B., Malhotra R., De A. IHC Profiler: an open source plugin for the quantitative evaluation and automated scoring of immunohistochemistry images of human tissue samples // PloS one. 2014. Vol. 9, №. 5. e96801 p. doi: 10.1371/journal.pone.0096801
12. Guidance for Industry Drug Interaction Studies – Study Design, Data Analysis, Implications for Dosing, and Labeling Recommendations / U.S. Department of Health and Human Services Food and Drug Administration Center for Drug Evaluation and Research (CDER). 2012. 75 p. Available at: <http://www.fda.gov/downloads/drugs/guidancecomplianceregulatoryinformation/guidances/ucm292362.pdf>
13. Ceriello A., Sportiello L., Rafaniello C., Rossi F. DPP-4 inhibitors: pharmacological differences and their clinical implications // Expert opinion on drug safety. 2014. Vol. 13, №1. P. 57-68. doi: 10.1517/14740338.2014.944862
14. Usdin T.B., Mezey E., Button D.C., Brownstein M.J., Bonner T.I. Gastric inhibitory polypeptide receptor, a member of the secretin-vasoactive intestinal peptide receptor family, is widely distributed in peripheral organs and the brain // Endocrinology. 1993. Vol. 133, №6. P. 2861-2870. doi: 10.1210/endo.133.6.8243312

15. Cheeseman C.I., Tsang R. The effect of GIP and glucagon-like peptides on intestinal basolateral membrane hexose transport // *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology*. 1996. Vol. 271, №3. P. G477-G482.

### References

1. Yakusheva EN, Chernyh IV, Shchul'kin AV, Kotlyarova AA, Nikiforov AA. Polovye razlichiya funktsional'noj aktivnosti i ehkspressii glikoproteina-P u krolikov [Sex differences of P-glycoprotein functional activity and expression in rabbits]. *Rossijskij fiziologicheskij zhurnal im. I.M. Sechenova [Russian journal of physiology (formerly I. M. Sechenov physiological journal)]*. 2014; 100 (8): 944-952. (in Russian)
2. Yakusheva EN, Chernyh IV, Shchul'kin AV, Popova NM. Glikoprotein-R: struktura, fiziologicheskaya rol' i molekulyarnye mekhanizmy modulyacii funktsional'noj aktivnosti [P-Glycoprotein: Structure, Physiological Role and Molecular Mechanisms of Modulation Functional Activity]. *Uspekhi fiziologicheskikh nauk [Successes in Physiological Sciences]*. 2014; 45 (4): 89-98. (in Russian)
3. Yakusheva EN, Chernyh IV, Shchul'kin AV, Titov DS. Funktsional'naya aktivnost' glikoproteina-P pri ehksperimental'nyh manipulyaciyah [Functional activity of P-glycoprotein during experimental manipulations]. *Rossijskij mediko-biologicheskij vestnik imeni akademika I.P. Pavlova [I.P. Pavlov Russian Medical Biological Herald]*. 2014; 2: 74-77. (in Russian)
4. Dedov II, Mel'nichenko GA. *Klinicheskie rekomendacii. Algoritm specializirovannoj medicinskoj pomoshchi bol'nym saharnym diabetom [Clinical guidelines. Algorithms of Specialized Medical Care for Diabetes Mellitus Patients]*. Moscow; 2015. 112 p. (in Russian)
5. Mironov AN. *Rukovodstvo po provedeniyu doklinicheskikh issledovanij lekarstvennykh sredstv. Chast' pervaya [Guidelines for conducting pre-clinical trials of medicinal products. Part I]*. Moscow: Grif and K; 2012. 944 p. (in Russian)
6. Shukla R, Anand K, Prabhu KM, Murthy PS. Hypoglycaemic effect of the water extract of *Ficus bengalensis* in alloxan recovered, mildly diabetic and severely diabetic rabbits. *International Journal of Diabetes in Developing Countries*. 1994; 14: 78-81.
7. Burkey BF, Li X, Bolognese L, Balkan B, Mone M, Russell M et al. Acute and chronic effects of the incretin enhancer vildagliptin in insulin-resistant rats. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*. 2005; 315 (2): 688-695.
8. Habriev RU. *Rukovodstvo po ehksperimental'nomu (doklinicheskomu) izucheniyu novykh farmakologicheskikh veshchestv [Manual on experimental (pre-clinical) study of new pharmacological substances]*. Moscow: Medicine; 2005. 832 p. (in Russian)
9. de Gasparo M, Hostetter G, Desaulles PA. Effect of gliquidone on insulin binding to rabbit erythrocytes. *Journal of Endocrinology*. 1983; 97 (1): 97-103.
10. Titov DS, Nikiforova LV. Vliyanie inhibitora DPP-4 – vildagliptina na funktsional'nuyu aktivnost' glikoproteina-P in vivo [Effect of an inhibitor of DPP-4-vildagliptin for the functional activity of P-glycoprotein in vivo]. *Rossijskij mediko-biologicheskij vestnik imeni akademika I.P. Pavlova [I.P. Pavlov Russian Medical Biological Herald]*. 2015; 3: 54-60. (in Russian)
11. Varghese F, Bukhari AB, Malhotra R, De A. IHC Profiler: an open source plugin for the quantitative evaluation and automated scoring of immunohistochemistry images of human tissue samples. *PloS one*. 2014; 9 (5). e96801 p.
12. FDA. 2012. Available at: [http://www.fda.gov/downloads/drugs/guidance compliance regulatory information/guidances/ucm292362.pdf](http://www.fda.gov/downloads/drugs/guidance%20compliance%20regulatory%20information/guidances/ucm292362.pdf)

13. Ceriello A, Sportiello L, Rafaniello C, Rossi F. DPP-4 inhibitors: pharmacological differences and their clinical implications. *Expert opinion on drug safety*. 2014; 13 (1): 57-68.
14. Usdin TB, Mezey E, Button DC, Brownstein MJ, Bonner TI. Gastric inhibitory polypeptide receptor, a member of the secretin-vasoactive intestinal peptide receptor family, is widely distributed in peripheral organs and the brain. *Endocrinology*. 1993; 133 (6): 2861-2870.
15. Cheeseman CI, Tsang R. The effect of GIP and glucagon-like peptides on intestinal basolateral membrane hexose transport. *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology*. 1996; 271 (3): G477-G482.

---

Якушева Е.Н. – д.м.н., профессор, зав. кафедрой фармакологии с курсом фармации ФДПО ФГБОУ ВО РязГМУ Минздрава России. г. Рязань.

E-mail: e.yakusheva@rzgmu.ru

Титов Д.С. – аспирант кафедры фармакологии с курсом фармации ФДПО ФГБОУ ВО РязГМУ Минздрава России, г. Рязань.

E-mail: 1ФГБОУ ВО РязГМУ Минздрава России. г. Рязань.