

© Коллектив авторов, 2015
УДК: 615.014.4

МЕТОДИКА ОПРЕДЕЛЕНИЯ ПРИНАДЛЕЖНОСТИ ЛЕКАРСТВЕННЫХ СРЕДСТВ К ЧИСЛУ СУБСТРАТОВ ГЛИКОПРОТЕИНА-Р

Е.Н. Якушева, И.В. Черных, А.В. Шулькин, М.В. Гацанога

Рязанский государственный медицинский университет
им. акад. И.П. Павлова, г. Рязань

В статье представлена оригинальная методика определения принадлежности лекарственных средств к числу субстратов белка-транспортера гликопротеина-Р (Pgp). Данная методика основана на сравнении фармакокинетических параметров тестируемого субстрата до и после курсового введения индуктора (рифампицина) и ингибитора (верапамила) данного белка-транспортера. Если содержание тестируемого вещества в организме после введения индуктора Pgp снижается, а после введения ингибитора – увеличивается, то вещество является субстратом Pgp. Для апробации разработанной методики слепым методом изучена фармакокинетика фексофенадина – известного маркерного субстрата Pgp в дозе 67,5 мг/кг массы, до и после курсового 14-дневного введения рифампицина (в дозе 40 мг/кг массы два раза в день) и верапамила (в суточной дозе 20 мг/кг три раза в сутки).

Выявлено, что на фоне курсового введения верапамила наблюдалось достоверное повышение максимальной концентрации фексофенадина, площади под фармакокинетической кривой концентрация-время, периода полувыведения, а также снижение времени достижения максимальной концентрации. Напротив, курсовое введение рифампицина приводило к снижению площади под фармакокинетической кривой концентрация-время и увеличению общего клиренса, что подтверждает адекватность предлагаемой методики.

Ключевые слова: гликопротеин-Р, фексофенадин, рифампицин, верапамил, фармакокинетика, субстрат гликопротеина-Р, методика.

В фармакокинетике лекарственных веществ (ЛВ) кроме ферментных систем, участвующих в их биотрансформации, большая роль принадлежит транспортным белкам, обеспечивающим выведение ЛВ из организма или препятствующим их всасыванию и проникновению через тканевые барьеры. Наиболее изученным транспортером является гликопротеин-Р (Pgp) – мембранный белок, удаляющий из клеток во внеклеточное пространство или просвет органов широкий спектр эндогенных и экзогенных субстратов, среди которых – большое число лекарственных веществ с различной химической структурой и механизмом действия [9]. Pgp локализован преимущественно на апикальной мем-

бране клеток слизистой оболочки тонкого кишечника, гепатоцитов, эпителиоцитов проксимальных канальцев нефронов почек и эндотелиоцитов гистогематических барьеров. В связи с особенностями локализации от функциональной активности Pgp в значительной степени зависит фармакокинетика лекарственных веществ, являющихся его субстратами, и, следовательно, эффективность и безопасность фармакотерапии. Функционирование белка-транспортера может быть как индуцировано, так и ингибировано под действием различных факторов внешней и внутренней среды [3], в том числе и при приеме ряда лекарственных средств [4]. При этом высокая активность транспортера ведет к

неэффективности фармакотерапии веществом-субстратом, а низкая активность – к его относительной передозировке.

В связи с вышеизложенным целью работы явилась разработка методики анализа принадлежности лекарственных средств к числу субстратов Pgp.

Материалы и методы

Работа выполнена на 12 половозрелых кроликах-самцах породы Шиншилла массой 3500 – 4300 г. Работа с животными проводилась в соответствии с правилами лабораторной практики (Приложение к приказу Министерства здравоохранения и социального развития Российской Федерации от 23 августа 2010 года 708н). Животным вводили фексофенадин (таблетки покрытые оболочкой Телфаст, 180 мг, Aventis Pharma, Италия) однократно внутривенно в дозе 67,5 мг/кг массы [1], затем забирали у них кровь из ушной краевой вены в объеме 5 мл в гепаринизированные пробирки, после чего центрифугировали при 3000 об/мин в течение 10 мин для получения плазмы. В плазме крови определяли концентрацию фексофенадина методом ВЭЖХ на хроматографической системе «Stayer» по методике, описанной ранее [2]. Затем животные были разделены на две серии: первая серия (n=6) получала рифампицин (капсулы Рифампицин, 150 мг, РУП «Белмедпрепараты», Республика Беларусь) в дозе 40 мг/кг дважды в день [7] в течение 14 дней, вторая серия (n=6) получала верапамил (таблетки, покрытые обо-

лочкой, 80 мг, Валента Фармацевтика ОАО, Россия) в дозе 20 мг/кг в сутки в три приема [1] аналогичным курсом. Затем животным двух серий снова вводили фексофенадин и анализировали его фармакокинетику. Эксперимент выполнен «слепым» методом. Введение препаратов (рифампицина и верапамила), забор крови и определение концентрации фексофенадина методом ВЭЖХ выполняли разные исследователи после специальной маркировки препаратов и проб крови для выполнения условий «ослепления».

Фармакокинетические параметры рассчитывали, используя модельно-независимый метод, с применением программы «Kinetic 5.0».

Для статистической обработки данных применяли офисный пакет «Microsoft Office XP» и программу Statistica 7.0. При статистической обработке результатов характер распределения данных оценивали по критерию Шапиро-Уилка. Наличие статистически достоверных межгрупповых различий определяли по критерию Ньюмена-Кейлса после проведения дисперсионного анализа повторных измерений (тест ANOVA – для показателей, имеющих нормальное распределение, критерий Фридмана – для показателей, распределение которых отличалось от нормального). Результаты считали достоверными при уровне значимости меньше 0,05.

Результаты и их обсуждение

Полученные результаты представлены в таблицах 1 и 2.

Таблица 1

Основные фармакокинетические параметры фексофенадина до и после введения верапамила

Фармакокинетические параметры	Интактные кролики (n=6)	После введения верапамила (n=6)	p
C_{max} , нг/мл	673,43±370,67	1012,27±252,67	0,014
AUC_{0-t} , нг*ч/мл	5256,65±4024,58	8064,62±2145,95	0,031
$AUC_{0-\infty}$, нг*ч/мл	6216,16±5611,39	11104,14±3353,63	0,011
T_{max} , ч	5,5 (2,5; 6,0)	2,0 (1,75; 2,5)	0,042
$T_{1/2}$, ч	6,4±2,5	13,75±5,65	0,024
MRT, ч	9,72 (8,2; 12,48)	18,4 (13,0; 22,7)	0,116
Cl, л/ч	54,42±44,83	17,47±5,05	0,075
Объем распределения, л	527,51±456,7	305,05±104,63	0,307

Примечание: данные представлены в виде среднего арифметического и стандартного отклонения среднего арифметического (M±SD) в случае их нормального распределения и медианы, нижнего и верхнего квартилей (Med, Iq, uq) – в случае распределения отличного от нормального.

На фоне курсового введения верапамила наблюдалось достоверное повышение максимальной концентрации (C_{max}) фексофенадина на 50,3% ($p = 0,014$), площади под фармакокинетической кривой концентрация-время (AUC_{0-t}) на 53,4% ($p = 0,031$), периода полувыведения ($T_{1/2}$) на 114,8% ($p=0,024$), а также сниже-

ние времени достижения максимальной концентрации (T_{max}) на 63,6% ($p = 0,042$).

Напротив, курсовое введение кроликам рифампицина приводило к снижению площади под фармакокинетической кривой концентрация-время (AUC_{0-t}) фексофенадина на 61,2% ($p = 0,042$) и увеличению общего клиренса (Cl) на 130,2% ($p = 0,038$).

Таблица 2

Основные фармакокинетические параметры фексофенадина до и после введения рифампицина

Фармакокинетические параметры	Интактные кролики (n=6)	После введения рифампицина (n=6)	p
C_{max} , нг/мл	909,89±449,42	506,12±459,05	0,155
AUC_{0-t} , нг*ч/мл	5276,73±2955,84	2049,60±957,59	0,042
$AUC_{0-\infty}$, нг*ч/мл	5958,31±3236,25	2308,89±914,97	0,035
T_{max} , ч	4,0 (2,5; 5,25)	3,0 (2,0; 3,75)	0,357
$T_{1/2}$, ч	7,51±5,52	4,90±2,29	0,342
MRT, ч	10,47±4,07	9,35±3,53	0,650
Cl, л/ч	41,49±26,42	95,5±57,32	0,038
Объем распределения, л	367,71±150,83	861,62±468,77	0,074

Примечание: данные представлены в виде среднего арифметического и стандартного отклонения среднего арифметического ($M \pm SD$) в случае их нормального распределения и медианы, нижнего и верхнего квартилей (Med, Iq, Uq) – в случае их распределения отличного от нормального.

Фексофенадин – это гистаминолитик III поколения, который не метаболизируется в организме, а его всасывание в кишечнике, распределение и элиминация напрямую зависят от функционирования Pgp. Поэтому данный лекарственный препарат может служить маркерным субстратом, отражающим функциональную активность данного белка-транспортера [1, 8].

Верапамил в ряде исследований продемонстрировал свою способность ингибировать функциональную активность Pgp, предположительно, связываясь с его молекулой и нарушая ее контакт с субстратами транспортера [1, 5].

Рифампицин повышает функциональную активность Pgp путем активации транскрипционного фактора PXR, который связывается с промотором гена, кодирующего данный транспортер, и повышает его экспрессию [6].

Выявление зависимости фармакокинетики лекарственного вещества от Pgp позволяет корректировать его дозу с учетом индивидуальной функциональной

активности транспортера. Подобную тактику уже рекомендуют американские организации FDA (Food and Drug Administration), U.S. Department of Health and Human Services, Center for Drug Evaluation and Research.

Продemonстрированная в данной работе динамика параметров фармакокинетики фексофенадина, который был выбран в качестве эталонного субстрата Pgp, после курсового введения рифампицина и верапамила доказывает пригодность использования указанных индуктора и ингибитора активности транспортера, курсов их введения и доз для тестирования лекарственных средств на принадлежность к субстратам Pgp.

Выводы

1. Введение кроликам породы шиншилла верапамила в суточной дозе 20 мг/кг массы три раза в сутки в течение 14 дней вызывает снижение функциональной активности гликопротеина-P, что позволяет использовать препарат в качестве ингибитора для оценки принадлеж-

ности лекарственных средств к числу субстратов гликопротеина-Р.

2. Введение кроликам породы шиншилла рифампицина в дозе 40 мг/кг массы два раза в день в течение 14 дней вызывает повышение функциональной активности гликопротеина-Р, что позволяет использовать препарат в качестве индуктора для оценки принадлежности лекарственных средств к числу субстратов гликопротеина-Р.

3. Разработанная методика оценки принадлежности лекарственных средств к числу субстратов гликопротеина-Р основана на сравнении фармакокинетических параметров тестируемого субстрата до и после курсового введения индуктора и ингибитора данного белка-транспортера.

Литература

1. Колхир С.В. Клиническое значение изучения активности транспортера лекарственных средств гликопротеина-Р для оптимизации фармакотерапии: автореф. дис. ... канд. мед.наук: 14.03.06 / С.В. Колхир; ГОУ ВПО ММА им. И.М. Сеченова. – М., 2007. – 21 с.
2. Функциональная активность и экспрессия гликопротеина-Р при экспериментальных манипуляциях / Е.Н. Якушева [и др.] Российский медико-биологический вестник им. акад. И.П. Павлова. – 2014. – №2. – С. 75-78.
3. Якушева Е.Н. Влияние экспериментальной подострой гипобарической гипоксической гипоксии на функциональную активность гликопротеина-Р / Е.Н. Якушева, И.В. Черных // Российский медико-биологический вестник им. акад. И.П. Павлова. – 2013. – №1. – С. 60-64.
4. Binkhathlan Z. P-glycoprotein Inhibition as a Therapeutic Approach for Overcoming Multidrug Resistance in Cancer: Current Status and Future Perspectives / Z. Binkhathlan, A. Lavasanifar // *Curr. Cancer Drug Targets.* – 2013. – Vol. 13, №3. – P. 326-346.
5. Carrigos M. Competitive and Non-Competitive Inhibition of the Multidrug-Resistance-Associated P-glycoprotein ATPase / M. Carrigos, L.M. Mir, S. Orłowski // *Eur. J. Biochem.* – 1997. – Vol. 244, №2. – P. 664-673.
6. Casein Kinase 2 (CK2)-mediated Phosphorylation of Hsp90 β as a Novel Mechanism of Rifampin-induced MDR1 Expression / S.W. Kim [et al.] // *J. Biol. Chem.* – 2015. – Vol. 290, №27. – P. 17029-17040.
7. Comparative evaluation of tigecycline and vancomycin, with and without rifampicin, in the treatment of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* experimental osteomyelitis in a rabbit model / L.Y. Yin [et al.] // *J. Antimicrob. Chemother.* – 2005. – Vol. 55, №6. – P. 995-1002.
8. Design of Fexofenadine Prodrugs Based on Tissue-Specific Esterase Activity and Their Dissimilar Recognition by P-Glycoprotein / K. Ohura [et al.] // *J. Pharm. Sci.* – 2015. – Vol. 104, №9. – P. 3076-3083.
9. Montanari F. Prediction of drug-ABC-transporter interaction – Recent advances and future challenges / F. Montanari, G.F. Ecker // *Adv. Drug. Deliv. Rev.* – 2015. – Vol. 86. – P. 17-26.

METHODS OF IDENTIFICATION OF DRUGS AS P-GLYCOPROTEIN SUBSTRATES

E.N. Yakusheva, I.V. Chernykh, A.V. Shulkin, M.V. Gatsanoga

The article presents an original method for determining belonging of drugs to the substrates of the transport protein P-glycoprotein (Pgp). This method is based on a comparison of the pharmacokinetic parameters of the test substrate before and after a course of administration of the inducer (rifampicin) and inhibitor (verapamil) of the transport protein. If the content of test substance in organism is reduced after Pgp inducer administration, and increased after the inhibitor administration, we conclude that this substance is Pgp substrate. For approbation of developed technique we examined by blind method the pharmacokinetics of fexofenadine – known Pgp substrate at a dose of 67,5 mg/kg, before and after the 14-days administration of rifampicin (40 mg/kg twice daily) and verapamil (a daily dose of 20 mg/kg three times a day).

It was revealed that after a course administration of verapamil maximum concentration of fexofenadine, its area under the concentration-time curve and half-life were significantly increased, as well as the time of maximum concentration was decreased. In contrast, rifampicin course administration resulted in a decrease in the area under the curve concentration-time and an increase in total clearance of marker substrate of Pgp, which proves the adequacy of methods.

Keywords: P-glycoprotein, fexofenadine, rifampicin, verapamil, pharmacokinetics, P-glycoprotein substrate, methods.

Якушева Е.Н. – д.м.н., проф., зав. кафедрой фармакологии с курсом фармации ФДПО ГБОУ ВПО РязГМУ Минздрава России.
E-mail: e.yakusheva@rzgmu.ru

Черных И.В. – к.б.н., ассист. кафедры общей химии с курсом биоорганической и органической химии ГБОУ ВПО РязГМУ Минздрава России.
E-mail: Ivchernykh88@mail.ru

Шулькин А.В. – к.м.н., ассист. кафедры фармакологии с курсом фармации ФДПО ГБОУ ВПО РязГМУ Минздрава России.
E-mail: alekseyshulkin@rambler.ru

Гацаного М.В. – очный аспирант кафедры фармакологии с курсом фармации ФДПО ГБОУ ВПО РязГМУ Минздрава России.
E-mail: Ivchernykh88@mail.ru