

© Титов Д.С., Никифорова Л.В., 2015
УДК 615.252.349.015.4

ВЛИЯНИЕ ИНГИБИТОРА ДПП-4 – ВИЛДАГЛИПТИНА НА ФУНКЦИОНАЛЬНУЮ АКТИВНОСТЬ ГЛИКОПРОТЕИНА-P IN VIVO

Д.С. Титов, Л.В. Никифорова

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

В исследовании *in vivo* на кроликах изучено влияние вилдаглиптина на функциональную активность белка-транспортера гликопротеина-P (P-gr, ABCB1 белок). Активность P-gr оценивали по фармакокинетике его маркерного субстрата – фексофенадина после однократного внутривенного введения. Применение вилдаглиптина в дозе 5 мг/кг массы тела в течение 14 дней приводило к повышению максимальной концентрации фексофенадина, его периода полувыведения, площади под фармакокинетической кривой концентрация – время от нуля до последней точки забора крови, площади под фармакокинетической кривой концентрация – время от нуля до бесконечности, а также времени удерживания маркерного субстрата и снижению общего клиренса, коэффициента абсорбции и объема распределения, что свидетельствует об ингибировании функциональной активности белка-транспортера на уровне целостного организма.

Ключевые слова: гликопротеин-P, ABCB1 белок, вилдаглиптин.

В последнее время все большее значение в фармакокинетике лекарственных веществ придается белкам-транспортерам [15], наиболее клинически значимым из которых является – гликопротеин-P (P-gr, ABCB1 белок, MDR1), что определяется его широкой субстратной специфичностью и локализацией в организме. P-gr осуществляет транспортировку липофильных соединений против градиента концентрации за счет энергии гидролиза АТФ. ABCB1 белок участвует в процессах всасывания, распределения и выделения широкого спектра лекарственных веществ [9, 21]. Многие лекарственные препараты способны модулировать функциональную активность транспортера, что может привести к клинически значимым лекарственным взаимодействиям, поскольку около 50% существующих препаратов являются субстратами или ингибиторами гликопротеина-P [15], причем этот список постоянно пополняется [11, 13].

Последнее десятилетие стало эпохой создания новых групп лекарственных препаратов, в том числе противодиабетических [8]. Данный факт имеет огромное значение так как, по мнению ведущих международных медицинских организаций, сахарный диабет (СД) является настоящей эпидемией современности, 387 миллионов человек во всем мире страдают от этого заболевания, а его глобальная распространенность составляет 8,3%. При этом на диабет 2-го типа приходится 90% всех случаев СД в мире. Предполагается, что к 2035 году количество людей с СД возрастет на 55%, а 17,0% людей будут иметь диабет или преддиабетическое состояние к 2030 году, что делает СД одной из самых важных и сложных проблем со здоровьем в будущем [4, 19].

Инновационные препараты, действие которых основано на продлении активности инкретинов за счет блокады фермента дипептидилпептидазы-4 (ингибиторы ДПП-4, называемые также глип-

тинами) уже активно применяют в клинической практике. Рекомендации ААСЕ (Американской ассоциации клинических эндокринологов) включают инкретиновую терапию на всех стадиях лечения пациентов с СД 2-го типа. А ингибиторы ДПП-4 поставлены в ряд препаратов первого выбора при начале медикаментозной терапии СД. При этом одним из основных недостатков данного класса препаратов является недостаточный опыт их использования [1, 8], очевидно, что указанный недостаток менее характерен для первого представителя ингибиторов ДПП-4 – вилдаглиптина. Он имеет высокую степень безопасности, хорошо переносится, обладает глюкозозависимым действием и лишен серьезных побочных эффектов [2]. Однако в изученной литературе не обнаружено данных о влиянии вилдаглиптина на функциональную активность гликопротеина-Р, при использовании в качестве маркерного субстрата фексофенадина.

Материалы и методы

В качестве тест-системы использовали кроликов, которые являются адекватной трансляционной моделью для изучения гликопротеина-Р [3]. Эксперимент выполнен на 21 половозрелом кроликсамце породы Шиншилла, средней массой 3500-4500 г. Животные имели необходимые ветеринарные свидетельства и содержались в стандартных условиях вивария ГБОУ ВПО РязГМУ Минздрава России. 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 две группы. В 1-ой группе (n = 12) изучалась функциональная активность гликопротеина-Р на 14 сутки введения вилдаглиптина и на 5 сутки отмены препарата на уровне целостного организма; во 2-ой группе (n = 9) в те же сроки введения и отмены вилдаглиптина изучались изменения уровня инсулина и глюкозы.

Вилдаглиптин (Препарат Галвус 50 мг) вводили животным в течение 14 дней

внутрижелудочно в дозе 5 мг/кг массы тела [5]. Функциональную активность Р-гр определяли по анализу динамики плазменной концентрации фексофенадина, маркерного субстрата данного белка-транспортера. Фексофенадин был выбран в качестве специфического субстрата Р-гр, с низкой биодоступностью при пероральном введении, более чувствительного к снижению функциональной активности Р-гр в кишечнике, чем пероральный дигоксин [18], который также является одним из маркерных субстратов АВСВ1 белка. Фексофенадин (Препарат Телфаст 180 мг) вводили однократно внутрижелудочно через зонд в дозе 67,5 мг/кг массы тела животного до и после 14 дневного введения вилдаглиптина [12]. Пробы крови отбирали в объеме 3-5 мл из краевой вены уха кролика в гепаринизированные пробирки через 1, 2, 3, 4, 5, 6, 8, 12 и 24 часа после однократного внутрижелудочного введения фексофенадина, центрифугировали 10 минут при 3000 об/мин, плазму хранили при -28°C до анализа [3].

Содержание фексофенадина в плазме крови определяли методом ВЭЖХ на хроматографе «Стайер» (Россия) с ультрафиолетовым детектором и обращенно-фазовой колонке «Beckman Coulter» 4,6*250 мм, зернением 5 мкм. Экстракцию и хроматографирование маркерного субстрата осуществляли по модифицированному методу Г.В. Раменской. Анализ выполняли при длине волны 220 нм и скорости подвижной фазы 1 мл/мин [10].

Элюирование проводили подвижной фазой следующего состава (из расчета на 200 мл): 133,7 мл бидистиллированной воды, содержащей 2,33 мл ледяной уксусной кислоты и 0,936 мл триэтиламина, доведенной триэтиламином до рН=4,3 и 64 мл ацетонитрила. Время удерживания пика фексофенадина составило 12,31 мин.

В качестве экстрагентов для жидкостной экстракции фексофенадина использовали дихлорметан, этилацетат и диэтиловый эфир. Коэффициент экстракции фексофенадина из плазмы крови составил 64%.

Полученные экспериментальные данные были подвергнуты математико-

статистической обработке с использованием офисного пакета «Microsoft Office XP» и программ Statistica 8.0. и IBMSPSS Statistics 20. Характер распределения данных оценивали по критерию Шапиро-Уилка. Для исследования статистической значимости показателей, имеющих нормальное распределение, использовали тест ANOVA повторных измерений. Для оценки статистической значимости показателей, распределение которых отличалось от нормального, использовали критерий Фридмана. Наличие достоверных различий определяли по параметрическому и не параметрическому критерию Ньюмена-Кейлса, соответственно. Для данных, имеющих нормальное распределение, рассчитыва-

ли среднее арифметическое значение (Mean) и стандартное отклонение (SD). Для данных имеющих распределение отличное от нормального, рассчитывали медиану (Median), верхний и нижний квартили (Iq; uq).

Фармакокинетические параметры фексофенадина рассчитывали при помощи программы «Kinetica 5.0». Изучаемые показатели фармакокинетики и полученные данные представлены в таблице 1.

Уровень инсулина (мкЕД/мл) определяли радиоиммунным методом, концентрацию глюкозы (ммоль/л) – глюкозоксидазным методом в центральной научно-исследовательской лаборатории РязГМУ. Рассчитывали гликемический и инсулиногенный индексы (табл. 2).

Таблица 1

Фармакокинетические параметры фексофенадина

Изучаемые параметры	Исходные значения (n=12)	Значения после 14 дней введения видаглиптина (n=12)	Значения на 5 день отмены видаглиптина (n=12)
Максимальная концентрация (C _{max} , нг/мл)	191,47 (123,32; 231,05)	583,02* (550,98; 741,39)	650,19* (428,47; 1264,84)
Время достижения максимальной концентрации (T _{max} , ч)	4,5 (3;6)	1,5 (1; 4)	3,5 (1;4)
Период полувыведения (T _{1/2} , ч)	4,43 (2,44; 8,3)	58,58* (19,96; 113,04)	36,13* (9,11; 145,47)
Площадь под фармакокинетической кривой (0-t) (AUC _{0-t} , (нг/мл)×ч)	1211,34 (806,44; 1763,17)	4264,25* (3701,02; 5312,01)	5114,56* (3444,46; 6589,96)
Площадь под фармакокинетической кривой (0-∞) (AUC _{0-∞} , (нг/мл)×ч)	1464,93 (964,93; 2262,69)	12255,85* (6733,49; 29211,7)	15663,6* (6315,88; 40014,1)
Общий клиренс (Cl, л/ч)	202,87±97,42	25,65±19,53*	26,02±22,92*
Объем распределения (V _d , л)	2151,34 (1674,58; 2952,32)	1237,29 (734,68; 1939,97)	956,47* (760,48; 1456,58)
Коэффициент абсорбции (C _{max} /AUC _{0-∞} , 1/ч)	0,13 (0,09; 0,15)	0,04* (0,02; 0,08)	0,06 (0,03; 0,1)
Время удерживания (MRT, ч)	11,4 (8,11; 17,51)	75,6* (33,19; 159,21)	35,91* (24,57; 198,22)

*- уровень значимости <0,05 (p<0,05) по сравнению с исходными значениями. Достоверных отличий между значениями полученными после 14-ти дней введения видаглиптина и на 5-ый день его отмены не получено.

Коэффициент абсорбции рассчитывался как отношение C_{max}/AUC_{0-∞} т.к. AUC_{0-t}< 80% AUC_{0-∞} [6, 18].

Таблица 2

Изменения уровня инсулина и глюкозы

Исследуемые параметры	Исходные значения (n=9)	Значения после 14 дней введения вилдаглиптина (n=9)	Значения на 5 день отмены вилдаглиптина (n=9)
Глюкоза натощак ммоль/л	7,32 (6,22; 8,39)	6,44 (5,99; 6,64)	6,19 (5,64; 6,28)
Инсулин натощак мкЕД/мл	6,88 (6,11; 14,61)	7,24 (5,4; 10,48)	5,54 (4,48; 8,23)
Гликемический индекс (отношение содержания глюкозы в крови натощак к инсулину в крови натощак)	1,16±0,65	0,89±0,41	1,06±0,39
Инсулиногенный индекс (отношение прироста инсулина в крови к приросту глюкозы в крови на 10 мин после глюкозной нагрузки)	2,67 (1,42; 3,37)	7,49 (1,75; 13,18)	2,64 (0,97; 2,76)
Инсулин 45 мин мкЕД/мл	9,31 (6,7; 12,41)	14,21 (9,31; 18,66)	9,8 (6,83; 12,77)
Глюкоза 90 мин ммоль/л	8,68±2,51	7,87±0,99	7,19±2,2

Результаты и их обсуждение

При введении вилдаглиптина в дозе 5 мг/кг массы курсом 14 дней по сравнению с исходными значениями выявлены следующие изменения фармакокинетики маркерного субстрата Р-гр – фексофенадина (табл. 1): достоверное увеличение медиан значений C_{max} после 14 дней введения на 204,5% ($p < 0,05$) и на 5-й день отмены на 239,58% ($p < 0,05$), медиан значений $T_{1/2}$ после 14 дней введения на 1222,35% ($p < 0,05$) и на 5-й день отмены на 715,57% ($p < 0,05$), медиан значений AUC_{0-t} после 14 дней введения на 252,03% ($p < 0,05$) и на 5-й день отмены на 322,22% ($p < 0,05$), медиан значений $AUC_{0-\infty}$ после 14 дней введения на 736,62% ($p < 0,05$) и на 5-й день отмены на 969,24% ($p < 0,05$), медиан значений MRT после 14 дней введения на 563,16% ($p < 0,05$) и на 5-й день отмены на 215% ($p < 0,05$), снижение средних значений Cl после 14 дней введения на 87,36% ($p < 0,05$) и на 5-й день отмены на 87,17% ($p < 0,05$), медиан значений V_d после 14 дней введения на 42,49% ($p > 0,05$) и на 5-й день отмены на 55,54% ($p < 0,05$), медиан значений $C_{max}/AUC_{0-\infty}$ после 14 дней введения на 69,23% ($p < 0,05$) и на 5-й день отмены на 53,85% ($p > 0,05$). Указанные изменения свидетельствуют об увеличе-

нии концентрации фексофенадина в крови за счет увеличения абсорбции и замедления выведения маркерного субстрата. В соответствии с рекомендациями Food and Drug Administration (FDA) ингибитором Р-гр признаются вещества увеличивающие AUC фексофенадина более чем на 25%, что может служить доказательством ингибирующего влияния вилдаглиптина на функциональную активность Р-гр [17].

Ряд эндогенных соединений способны выступать в роли регуляторов Р-гр [3, 10], в том числе уровень которых связан с фармакологическим эффектом глиптинов и изменяется под воздействием ингибиторов ДПП-4, а именно инсулин и глюкоза. В совокупности имеющиеся данные позволяют предположить, что глюкоза способна выступать в роли одного из таких регуляторов в качестве ингибитора гликопротеина-Р. Инсулин же является одним из основных регуляторов уровня глюкозы в крови, и по современным представлениям очевидно оказывает индуцирующее влияние на АВСВ1 белок [16, 20]. В связи с этим, у интактных животных после 14 дней введения вилдаглиптина и на 5-й день его отмены изучали уровни инсулина натощак и на 45 минут после глюкозной нагрузки (3 г/кг), а также уровень глюкозы до и через 90 минут

после глюкозной нагрузки. Рассчитывали гликемический и инсулиногенный индексы (табл. 2) (указанные сроки были выбраны в связи с тем, что в данные промежутки времени наблюдаются максимальные отклонения от нормы уровня инсулина, глюкозы и инсулиногенного индекса при введении вилдаглиптина) [7, 14].

Изученные показатели представлены в таблице 2. Достоверных различий в уровнях глюкозы и инсулина натощак, показателях гликемического и инсулиногенного индекса до и после 14 дней введения вилдаглиптина, а также на 5-й день его отмены не обнаружено. Таким образом изменения функциональной активности Р-гр в нашем исследовании не могут быть связаны с уровнем глюкозы и/или инсулина.

После 14 дней введения изучаемого глиптина наблюдалась тенденция к снижению уровня глюкозы натощак, гликемического индекса и уровня глюкозы на 90 минуту после глюкозной нагрузки и к повышению уровня инсулина натощак, инсулиногенного индекса, а также уровня инсулина на 45 минуту после глюкозной нагрузки. При этом на 5-й день отмены вилдаглиптина на фоне продолжающегося снижения тощачковой глюкозы и глюкозы на 90 минуту после глюкозной нагрузки появилась тенденция к снижению инсулина натощак (по сравнению со значениями полученными после 14 дней введения вилдаглиптина) на фоне тренда к восстановлению до исходных значений гликемического, инсулиногенного индексов, а также инсулина на 45 минуту после глюкозной нагрузки. При этом несмотря на то, что статистически значимые отличия фармакокинетических показателей маркерного субстрата – фексофенадина на 5-е сутки, по сравнению со значениями после 14 дней введения вилдаглиптина не наблюдались, прослеживается тенденция в сторону возврата к исходным значениям таких фармакокинетических показателей фексофенадина, как $T_{1/2}$, MRT и Cl , а достоверные отличия между коэффициентом абсорбции, наблюдающиеся на 14-й день введения изучаемого ингибитора

ДПП-4 по сравнению с исходными значениями, на 5-й день его введения по сравнению с исходными значениями были полностью нивелированы. Тем не менее на 5-й день введения вилдаглиптина прослеживается тенденция к продолжению роста таких, важных с точки зрения оценки функциональной активности, белка-транспортера –Р-гр, фармакокинетических показателей как C_{max} , AUC_{0-t} и $AUC_{0-\infty}$ [6, 17, 18], а также к уменьшению V_d . В совокупности представленные данные подтверждают тот факт, что снижение функциональной активности Р-гр в данном исследовании главным образом связано с введением ингибитора ДПП-4-вилдаглиптина.

Выводы

Внутрижелудочное введение кроликам вилдаглиптина в дозе 5мг/кг массы тела в течение 14 дней вызывает ингибирование функциональной активности гликопротеина-Р, определяемой по фармакокинетике маркерного субстрата – фексофенадина, сохраняющееся на 5-й день отмены препарата.

Литература

1. Алгоритм специализированной медицинской помощи больным сахарным диабетом / под ред. И.И. Дедова, Г.А. Мельниченко. – М., 2013. – Вып. 6. – 120 с.
2. Виллхауэр Э. Вилдаглиптин: первый инновационный ингибитор ДПП-4 / Э. Виллхауэр // Сахарный диабет. – 2010. – №3. – С. 118-120.
3. Влияние тироксина на функциональную активность гликопротеина-Р в эксперименте / А.С. Бирюкова [и др.] // Российский медико-биологический вестник им. акад. И.П. Павлова. – 2011. – №4. – С. 49-53.
4. Всемирная организация здравоохранения. – Электр. ресурс. – Режим доступа: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs312/ru/>. – 7.07.2015
5. Заявка 2015125946 Рос. Федерация, МПК⁷ А 61 К 31/132 А 61 К 31/133, А 61 К 31/137 А 61 К 31/145 А 61 К 31/166 А 61 К 31/40. Способ моделирования состояния ингибирования

- функциональной активности гликопротеина-Р ингибитором дипептидилпептидазы 4 / Е.Н. Якушева, Д.С. Титов; Рязанский гос. мед. ун-т им. акад. И.П. Павлова. – Заявл.29.06.2015 Входящий № 040315.
6. Оценка биоэквивалентности лекарственных средств: методические указания / И.Б. Бондарева [и др.]. – М., 2008. – 32 с.
 7. Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств / редкол.: А.Н. Миронов [и др.]. – М.: Гриф и К, 2012. – Ч. 1. – 944 с.
 8. Эндокринология: нац. рук-в. / под ред. И.И. Дедова, Г.А. Мельниченко. – М.: ГЭОТАР-Медиа, 2013. – 752 с.
 9. Якушева Е.Н. Характеристика гликопротеина-Р как белка-транспортера лекарственных веществ / Е.Н. Якушева, И.В. Черных, А.С. Бирюкова // Российский медико-биологический вестник им. акад. И.П. Павлова. – 2011. – №3. – С. 142-148.
 10. Якушева Е.Н. Дозозависимое влияние тироксина на функциональную активность гликопротеина-Р в эксперименте / Е.Н. Якушева, А.В. Шулькин, А.С. Бирюкова // Биомедицина. – 2012. – №2. – С. 53-60.
 11. Якушева Е.Н. Влияние финастерида на функциональную активность гликопротеина-Р в эксперименте / Е.Н. Якушева, И.В. Черных // Российский медико-биологический вестник им. акад. И.П. Павлова. – 2012. – №4. – С. 46-50.
 12. 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.
 13. Якушева Е.Н. Оценка принадлежности мексидола к субстратам, ингибиторам или индукторам гликопротеина-Р / Е.Н. Якушева, А.В. Шулькин, И.В. Черных // Эксперим. и клинич. фармакология. – 2015. – №3. – С. 79-83.
 14. Acute and chronic effect soft he incretinenhancervildagliptinininsulinresistantrats / B.F. Burkey[et al.] // JPharmacol ExpTher. – 2005. – Vol. 315, №2. – P. 688-695.
 15. Ayrton A. Role of transport proteins in drug discovery and development: a pharmaceutical perspective / A. Ayrton, P. Morgan // Xenobiotica. – 2008. – Vol. 38, № 7-8. – P. 676-708.
 16. Coinduction of glucose-regulated proteins and doxorubicin resistance in Chinese hamster cells / J. Shen [et al.] // Proc Natl Acad Sci USA. – 1987. – Vol. 84, №10. – P. 3278-3782.
 17. 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.
 18. Guideline on the investigation of bioequivalence / European Medicines Agency. – 2010. – 60 p.
 19. International Diabetes Federation. – Электр. ресурс. – Режим доступа: <http://www.idf.org>. – 7.07.2015
 20. Insulin therapy restores impaired function and expression of P-glycoprotein in blood-brain barrier of experimental diabetes / H. Liu [et al.] // Biochem Pharmacol. – 2008. – Vol. 75, №8. – P. 1649-1658.
 21. Zhou S.F. Structure, function and regulation of P-glycoprotein and its clinical relevance in drug disposition / S.F. Zhou // Xenobiotica. – 2008. – Vol. 38, №7-8. – P. 802-832.

**EFFECT OF AN INHIBITOR OF DPP-4-VILDAGLIPTIN
FOR THE FUNCTIONAL ACTIVITY OF P-GLYCOPROTEIN IN VIVO**

D.S. Titov, L.V. Nikiforova

In the in vivo study in rabbits the effect of vildagliptin at 5 mg / kg body weight of the functional activity of the protein transporter P-glycoprotein (P-gp, ABCB1 protein) was studied. P-gp activity was evaluated by its pharmacokinetics marker substrate – fexofenadine after a single intragastric administration. Applying vildagliptin for 14 days led to an increase in the maximum concentration of fexofenadine, its half-life, area under the concentration-time curve from zero to the last point of drawing blood, area under the concentration-time curve from zero to infinity, and the retention time of marker substrate and reduce the overall clearance rate of absorption and distribution volume, indicating that the inhibition of the functional activity of the protein transporter at the level of the whole organism.

Keywords: P-glycoprotein, ABCB1 protein, vildagliptin.

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

E-mail: i3762@yandex.ru

Никифорова Л.В. – ст. науч. сотрудник центральной научно-исследовательской лаборатории ГБОУ ВПО РязГМУ Минздрава России, г. Рязань.

E-mail: laris-nikiforova@yandex.ru