

© Коллектив авторов, 2014
УДК 615.033

ФУНКЦИОНАЛЬНАЯ АКТИВНОСТЬ ГЛИКОПРОТЕИНА-Р ПРИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫХ МАНИПУЛЯЦИЯХ

Е.Н. Якушева, А.В. Шулькин, И.В. Черных, Д.С. Титов

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

В исследовании на кроликах изучена функциональная активность гликопротеина-Р на уровне целостного организма при экспериментальных манипуляциях – проведении «ложной» операции и введении дистиллированной воды. Активность гликопротеина-Р оценивали по анализу фармакокинетики его маркерного субстрата – фексофенадина. Установлено, что исследуемые манипуляции существенно не влияют на функционирование гликопротеина-Р в исследуемые сроки.

Ключевые слова: гликопротеин-Р, «ложная» операция, фексофенадин.

Гликопротеин-Р (Pgp) – это мембранный белок-транспортёр, который за счет гидролиза АТФ выбрасывает во внеклеточное пространство широкий спектр химически разнородных субстратов, в том числе большое число лекарственных средств и эндогенных веществ (биобиотиков) [5]. Функциональная активность Pgp может значительно варьировать в зависимости от генетических особенностей, приема некоторых лекарственных веществ, а также гормонального фона [2]. При этом повышенная активность Pgp может привести к неэффективности фармакотерапии в связи со снижением абсорбции лекарственного средства в желудочно-кишечном тракте и интенсификацией его экскреции почками или печенью. С другой стороны, угнетение его функционирования может служить причиной относительной передозировки веществом-субстратом Pgp [2].

Поэтому для прогнозирования развития нежелательных межлекарственных взаимодействий опосредованных Pgp целесообразно исследование влияния новых и уже широко используемых лекарственных препаратов на активность данного белка-транспортёра, а также изучение его

функционирования при экспериментальных патологических состояниях.

Поскольку введение лекарственных препаратов и проведение хирургических вмешательств, которые часто используются для моделирования экспериментальных патологических состояний, могут самостоятельно оказать влияние на функционирование Pgp, для объективизации проводимых исследований актуально исследование влияния данных экспериментальных манипуляций на его активность.

Цель исследования – изучить функциональную активность Pgp при экспериментальных манипуляциях, используемых в качестве контроля – проведении «ложной» операции и введении дистиллированной воды.

Материалы и методы

Работа выполнена на 13 половозрелых кроликах-самцах породы Шиншилла, массой 3500-4300 г. Все животные были разделены на 2 группы: 1-я группа – исследование функциональной активности Pgp на 7-й и 14-й дни после проведения «ложной» операции (n=5); 2-я группа – изучение функциональной активности Pgp после курсового 14-дневного введения дистиллированной воды в дозе 5 мл/кролик (n=8).

Функциональную активность Pgr оценивали по фармакокинетике его маркерного субстрата – фексофенадина. Для этого кроликам внутривенно вводили фексофенадин в дозе 67,5 мг/кг массы [1] с последующим анализом его фармакокинетики. Пробы крови отбирали в объеме 5 мл из краевой вены уха кролика в гепаринизированные пробирки через 1, 2, 3, 4, 5, 6, 12 и 24 часа после введения препарата, центрифугировали 10 минут при 3000 об/мин, полученную плазму хранили при -29°C до анализа. Содержание фексофенадина в плазме крови определяли методом ВЭЖХ на хроматографе «Стайер» (Россия) с ультрафиолетовым детектором и обращено-фазовой колонке «Beckman Coulter» 4,6*250 мм, зернением 5 мкм. Экстракцию и хроматографирование осуществляли по методу Раменской Г.В. с соавт. в собственной модификации [4]. Анализ выполняли при длине волны 220 нм и скорости подвижной фазы 1 мл/мин. Фармакокинетические параметры рассчитывали моделью-независимым методом с использованием программы Kinetica 5.0.

«Ложную операцию» проводили после наркотизации животных с помощью внутримышечного введения препарата рометар (ксилазина гидрохлорид) в дозе 4,0-6,0 мг/кг массы с последующим (через 20 минут) внутримышечным введением препарата золетил-50 в дозе 5-10 мг/кг массы [3]. Для премедикации использовали подкожное введение 0,1% раствора атропина в дозе 0,01 мл/кг.

Животным сбрасывали шерсть в области шеи и передней брюшной стенки, вскрывали кожу, подкожно-жировую клетчатку, мышечный слой, выделяли щитовидную железу и яичники. После чего операционные поля послойно ушивали.

Для выведения из состояния наркоза животным однократно внутримышечно вводили 10% раствор сульфокамфокаина в дозе 0,1 мл/кг массы. В течение 5 суток после операции проводили обезболивание внутримышечным введением 50% раствора метамизола натрия (анальгин) в суточной дозе 500 мг/кролик/сутки. Для профилактики инфекционных осложне-

ний животным внутримышечно вводили ампициллин в дозе 30 мг/кг массы через день в течение 6 дней.

Полученные экспериментальные данные были подвергнуты математико-статистической обработке с использованием офисного пакета «Microsoft Office XP» и программы Statistica 8.0. Характер распределения данных оценивали по критерию Шапиро-Уилка. Наличие достоверных различий в 1 группе животных 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), во 2 группе – с помощью критерия Стьюдента повторных измерений (при нормальном распределении данных) или критерия Вилкоксона (при распределении данных отличным от нормального). Для данных, имеющих нормальное распределение, рассчитывали среднее арифметическое значение (Mean) и стандартное отклонение (SD). Для данных, имеющих распределение отличное от нормального, рассчитывали медиану (Median), верхний и нижний квартили (Iq; uq).

Результаты и их обсуждение

В проведенном исследовании изучено влияние экспериментальных манипуляций – проведения «ложной» операции и курсового введения дистиллированной воды, которые широко используются в качестве контроля, на функциональную активность Pgr.

Сравнение фармакокинетики фексофенадина – маркерного субстрата Pgr до «ложной» операции, а также на 7-й и 14-й сутки послеоперационного периода показало отсутствие статистически значимых различий между изучаемыми группами, что служит доказательством сохранения функциональной активности белка-транспортёра на исходном уровне (табл. 1). Полученные результаты свидетельствуют о возможности использования хирургических вмешательств для моделирования экспериментальных патологических состояний при изучении особенностей функционирования Pgr.

Таблица 1

Основные фармакокинетические параметры фексофенадина после «ложной операции»

Изучаемые параметры	Исходные значения n=5	Значения на 7-й день после «ложной операции» n=5	Значения на 14-й день после «ложной операции» n=5
C_{max} , нг/мл	172,0 (95,7; 356,9)	139,3 (138,1; 173,4)	253,0 (164,7; 256,2)
T_{max} , ч	3,0 (2,0; 3,0)	3,0 (2,0; 5,0)	3,0 (3,0; 5,0)
$T_{1/2}$, ч	3,8±2,3	5,9±4,8	16,7±15,2
AUC_{0-t} , (нг/мл)×ч	746,4 (360,7; 1302,4)	1141,4 (627,7; 1224,9)	1750,7 (1634,6; 1793,3)
$AUC_{0-\infty}$, (нг/мл)×ч	939,1 (543,4; 1341,1)	1201,2 (665,9; 1530,5)	2817,7 (1676,5; 3190,9)
Cl, л/ч	396,7±408,9	294,8±211,4	102,4±61,6
C_{max}/AUC_{0-t} , 1/ч	0,21±0,11	0,20±0,10	0,08±0,05
MRT, ч	7,3±2,2	10,4±5,8	25,3±21,1

14-дневное внутрижелудочное введение кроликам дистиллированной воды не приводило к статистически достоверному изменению значений основных параметров фармакокинетики фексофенадина – маркерного субстрата Pgr, что свидетельствует об отсутствии влияния

примененной манипуляции на функциональную активность данного белка-транспортера (табл. 2). Установленные данные позволяют использовать курсовое введение животным лекарственных средств для оценки их влияния на функциональную активность Pgr.

Таблица 2

Основные фармакокинетические параметры фексофенадина после 14-дневного введения дистиллированной воды

Изучаемые параметры	Исходные значения, n=8	Значения после 14 дней введения дистиллированной воды n=8
C_{max} , нг/мл	325,6±190,2	368,5±299,7
T_{max} , ч	4,0 (3,0; 5,0)	2,5 (1,5; 3,5)
$T_{1/2}$, ч	12,4±13,3	4,6±3,8
AUC_{0-t} , (нг/мл)×ч	2545,6±1110,99	1644,6±1590,9
$AUC_{0-\infty}$, (нг/мл)×ч	3725,3±2177,5	1899,6±1954,4
Cl, л/ч	85,6±52,6	263,1±196,0
C_{max}/AUC_{0-t} , 1/ч	0,11±0,06	0,25±0,13
MRT, ч	19,7±18,3	8,9±4,3

Обращает на себя внимание выраженный разброс персональных значений фармакокинетических параметров фексофенадина в обеих группах эксперимента, что свидетельствует об индивидуальных особенностях функционирования Pgr. Однако данный факт не уменьшает значимости полученных результатов в связи с применением для анализа статистических критериев для связанных выборок.

Выводы

1. «Ложная» операция не приводит к изменению функциональной активности Pgr, определяемой по фармакокине-

тике его маркерного субстрата – фексофенадина.

2. 14-дневное внутрижелудочное введение кроликам дистиллированной воды не вызывает изменения функционирования Pgr.

Литература

1. Колхир С.В. Клиническое значение изучения активности транспортера лекарственных средств гликопротеина-P для оптимизации фармакотерапии: дис. канд. мед. наук / С.В. Колхир; ГОУ ВПО ММА им. И.М. Сеченова. – М., 2007. – 21 с.

2. Метаболизм лекарственных средств. Научные основы персонализированной медицины: руководство для врачей / В.Г. Кукес [и др.]. – М.: ГЭОТАР-Медиа, 2008. – 304 с.
3. Разина А.В. Оптимизация метода общей анестезии на кроликах / А.В. Разина, А.И. Фролова, М.А. Сергеев // *Акт. вопр. ветеринарии и биол.* – 2010. – №1. – С. 32-35.
4. Якушева Е.Н. Влияние финастерида на функциональную активность гликопротеина-Р в эксперименте / Е.Н. Якушева, И.В. Черных // *Рос. медико-биол. вестн. им. акад. И.П. Павлова.* – 2012. – №4. – С. 46-50.
5. The structure and functions of P-glycoprotein / Y. Li [et al.] // *Curr. Med. Chem.* – 2010. – Vol. 17, №8. – P. 786-800.

Работа поддержана грантом РФФИ № 14-04-97522 p_центр_a

FUNCTIONAL ACTIVITY OF P-GLYCOPROTEIN DURING EXPERIMENTAL MANIPULATIONS

E.N. Yakusheva, A.V. Shulkin, I.V. Chernykh, D.S. Titov

In a study on rabbits the effect of experimental manipulations (false surgery and distilled water administration) on functional P-glycoprotein activity was studied. P-glycoprotein activity was assessed by pharmacokinetic analysis of its marker substrate – fexofenadine. Found that manipulations applied do not lead to modulation of Pgp activity at all stages of the research period.

Keywords: *P-glycoprotein, false surgery, fexofenadine.*

Якушева Е.Н.- д-р. мед. наук, доц., зав. кафедрой фармакологии с курсом фармации ФДПО ГБОУ ВПО РязГМУ Минздрава России. E-mail: e.yakusheva@rzgmu.ru

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

Черных И.В. асс. кафедры общей химии с курсом биоорганической и органической химии ГБОУ ВПО РязГМУ Минздрава России. E-mail: Ivchernykh88@mail.ru

Титов Д.С. очный аспирант кафедры фармакологии с курсом фармации ФДПО ГБОУ ВПО РязГМУ Минздрава России. E-mail: I3762@yandex.ru