

ОРИГИНАЛЬНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

© Коллектив авторов, 2011
УДК 616.62-003.7-056.4

**ВЛИЯНИЕ ТИРОКСИНА НА ФУНКЦИОНАЛЬНУЮ АКТИВНОСТЬ
ГЛИКОПРОТЕИНА-P В ЭКСПЕРИМЕНТЕ**

Е.Н. Якушева, А.С. Бирюкова, А.В. Шулькин, Л.В. Никифорова

ГБОУ ВПО «Рязанский государственный медицинский университет имени академика И.П. Павлова» Министерства здравоохранения и социального развития РФ, г. Рязань

В исследовании на кроликах изучено влияние L-тироксина на активность белка-транспортера гликопротеина-P (Pgp). Активность Pgp изучали по фармакокинетике его маркерного субстрата фексофенадина. Установлено, что введение L-тироксина в течение 14 дней приводит к дозозависимому повышению активности Pgp.

Ключевые слова: гликопротеин P, MDR1, L-тироксин, гипертиреоз, фексофенадин

Гликопротеин-P (Pgp) – белок-транспортер, обеспечивающий выведение липофильных ксенобиотиков и ряда биобиотиков из клеток и как следствие защиту организма от действия лекарственных и токсических веществ [1].

В эксперименте и клинике исследовано большое количество препаратов как естественного, так и синтетического происхождения, которые оказывают влияние на функциональную активность Pgp, причем как индуцирующее, так и ингибирующее. Подобное воздействие на белок-транспортер приводит в конечном счете к значительным нарушениям фармакокинетики лекарственных веществ и, как следствие, к изменению их фармакологической активности [1].

Влияние тиреоидных гормонов на функциональную активность Pgp остается недостаточно изученным.

Цель настоящего исследования – изучить влияние L-тироксина на функциональную активность Pgp у кроликов породы шиншилла.

Материалы и методы

Работа выполнена на 12 половозрелых кроликах породы шиншилла, средней массой 3500±100 г. В исследование включали самок, которые находились в состоянии течки. L-тироксин (Berlin-Chemi Me-

parini) вводили подкожно в течение 14 дней: 6 самкам – в дозе 25 мкг/кг массы (серия низкая доза тироксина) и 6 самкам – в дозе 100 мкг/кг массы (серия высокая доза тироксина). За сутки до начала эксперимента, через 14 дней введения L-тироксина и на 5 день отмены препарата у животных определяли активность Pgp и уровень ТТГ, Т3 и Т4 в сыворотке крови.

Активность белка-транспортера оценивали по концентрации в плазме крови его маркерного субстрата – фексофенадина (Sapofli Aventis). Фексофенадин вводили животным перорально с помощью металлического зонда в дозе 30 мг/кг массы. Через 1, 2, 3, 4, 5, 6, 8, 12 и 24 часа от момента введения препарата из ушной вены кроликов забирали кровь в объеме 5 мл. Для получения плазмы пробы центрифугировали при 3000 об/мин в течение 10 минут и хранили до анализа при температуре -29°C. Содержание фексофенадина в плазме крови определяли методом ВЭЖХ на хроматографе «Beckman Coulter» с ультрафиолетовым детектором и колонке «Beckman Coulter» 4,6*250 мм, зернением 5 мкм. Экстракцию и хроматографирование маркерного субстрата осуществляли по методу Раменской Г.В. с соавт. [2] в собственной модификации. Анализ выполняли при длине волны 225 нм и скорости подвижной фазы 1 мл/мин. Использовали подвижную фазу следующего

состава: 133,7 мл бидистиллированной воды, содержащей 2,33 мл ледяной уксусной кислоты (ХИММЕД) и 0,936 мл триэтиламина (Chem-Lab), доведенной ортофосфорной кислотой до pH 4 и 64 мл ацетонитрила (Chem-Lab). Осуществляли жидкостную экстракцию фексофенадина из плазмы крови. В качестве экстрагентов использовали дихлорметан (ACROS ORGANICS), этилацетат (ACROS ORGANICS) и диэтиловый эфир (ХИММЕД). Коэффициент экстракции составил 53%.

Количественное определение фексофенадина выполняли по методу абсолютной калибровки, с использованием стандарта фексофенадина (Strasbourg cedex). Представлено уравнение калибровочной зависимости для определения фексофенадина в плазме крови: $y = ax + b = -0,0001 + 9,4089 \cdot 10^{-6} \cdot x$, где y – высота пика фексофенадина в единицах экстинкции, x – содержание фексофенадина в стандартном растворе в нг/мл. Коэффициент регрессии r для данной калибровочной зависимости равнялся 0,9958.

Примененный метод хроматографического анализа обладал следующими характеристиками: время удерживания – 13,7 мин; предел обнаружения фексофенадина в плазме крови 90 нг/мл; точность – 4,2%.

Вычисление концентрации фексофенадина осуществляли с помощью программы Gold. Фармакокинетические параметры (максимальную концентрацию – C_{max} , площадь под фармакокинетической кривой концентрация-время $AUC_{0-\infty}$, общий клиренс, объем распределения) рассчитывали модельно-независимым методом с использованием программы Kinetica 5.0. Отношение $C_{max}/AUC_{0-\infty}$ рассчитывали самостоятельно.

Уровень гормонов определяли радиоиммунным методом с применением стандартных тест-систем производства IMMUNOTECH (Чехия) и дальнейшей обработкой результатов на анализаторе «Иммунотест» (Москва) в ЦНИЛ РязГМУ.

Полученные данные обрабатывали статистически с помощью программ Statsoft Statistica 6.1. Характер распределения данных определяли по критерию Шапиро-

Уилка. Для исследования статистической значимости показателей, имеющих нормальное распределение, внутри каждой серии использовали тест ANOVA повторных измерений, межгрупповые различия определяли по критерию Ньюмена-Кейсла. Для каждого показателя рассчитывали среднее арифметическое значение и ошибку среднего ($M \pm m$).

Результаты и их обсуждение

Введение как низкой дозы (25 мкг/кг массы) так и высокой дозы L-тироксина (100 мкг/кг массы) приводило к развитию выраженного гипертиреоза, что проявлялось повышением уровней T4 на 249,5% ($p < 0,05$) и 245,1% ($p < 0,05$), T3 на 496,1% ($p < 0,05$) и 450,0% ($p < 0,05$) и снижением содержания ТТГ в сыворотке крови на 36,9% ($p < 0,05$) и 19,4% ($p < 0,05$) соответственно по сравнению с исходными значениями (табл. 2).

Более выраженные изменения показателей у животных, получавших низкую дозу L-тироксина, связаны с исходно более низкими показателями уровней T4, T3 и более высоким уровнем ТТГ в данной серии опыта (табл. 2). На 5 день отмены низкой дозы L-тироксина происходила нормализация гормонального статуса лабораторных животных ($p > 0,05$). В отличие от данных этой серии на 5 день отмены высокой дозы L-тироксина содержание T3 оставалось повышенным на 133,3% ($p < 0,05$), концентрация T4 снижалась на 39,9% ($p < 0,05$), уровень ТТГ соответствовал норме.

При изучении фармакокинетики фексофенадина – маркерного субстрата Pgp на фоне введения тироксина, получены результаты, которые представлены в таблице 1.

Применение кроликам L-тироксина в дозе 25 мкг/кг в течение 14 дней вызывало снижение C_{max} (ключевого показателя оценки функциональной активности Pgp) на 39,4% ($p < 0,05$) по сравнению с исходным значением. Остальные фармакокинетические параметры имели лишь тенденцию к изменению: $AUC_{0-\infty}$ – к уменьшению, а общий клиренс, объем распределе-

ния и отношение $C_{\max}/AUC_{0-\infty}$ – к увеличению. На 5 день отмены L-тироксина изучаемые параметры достоверно от исходных значений не отличались.

При введении L-тироксина в дозе 100 мкг/кг массы в течение 14 дней наблюдалась схожая динамика показателей, но выраженная в большей степени. C_{\max} снизилась на 54,9% ($p < 0,05$), $AUC_{0-\infty}$ – на 63,7% ($p < 0,05$), общий клиренс увеличился на 183,3% ($p < 0,05$). Объем распределения и отношение $C_{\max}/AUC_{0-\infty}$ имели тенденцию к увеличению ($p > 0,05$). На 5 день отмены высокой дозы L-тироксина C_{\max} оставалась сниженной на 16,8% ($p < 0,05$), остальные изучаемые фармакокинетические параметры достоверно от исходных значений не отличались ($p > 0,05$).

Снижение C_{\max} и $AUC_{0-\infty}$ фексофенадина, более выраженное при введении высокой дозы L-тироксина, свидетельствует о повышении активности белка-транспортера Pgp. В тоже время увеличение общего клиренса (характеризующего выведение лекарственных веществ из организма) и отсутствия изменений в отношении $C_{\max}/AUC_{0-\infty}$ (характеризующего всасывание лекарственных веществ) можно рассматривать как косвенное свидетельство селективного повышения активности Pgp под действием L-тироксина в печени и почках – органах ответственных за выведение фексофенадина (80% препарата активно секретируется Pgp в желчь и 20% в мочу). Данная гипотеза согласуется с результатами полученными ранее в эксперименте на крысах с гипертиреозом, в котором установлено, что экспрессия Pgp существенно повышалась в печени и почках, умеренно в тощей и подвздошной кишке [7]. Более выраженные изменения фармакокинетики фексофенадина при введении L-тироксина в дозе 100 мкг/кг массы по сравнению с дозой 25 мкг/кг являются следствием дозозависимой индукции Pgp.

Молекулярные механизмы индукции и ингибирования Pgp в настоящий момент активно изучаются. Описано повышение экспрессии гена MDR1, кодирующего Pgp, под действием ЦОГ-2 [8], фактора индуцируемого гипоксией [4], за счет активации

ядерного прегнан-Х-рецептора [5]. Предполагается, что индукция Pgp может быть опосредована через фактор некроза опухоли альфа [3]. Активация Pgp под влиянием тироксина может быть связана со стимуляцией ядерных рецепторов и индукцией экспрессии Pgp, которая опосредована увеличением транскрипции мРНК гена *mdr1*, что обнаружено в ткани почек у крыс [9].

На культуре клеток с повышенной экспрессией MDR1 обнаружено, что T3 выводится из клеток Pgp [6]. Аналогичные данные получены для Pgp в гематоэнцефалическом барьере. Показано, что белок – транспортер регулирует проникновение T4 в спинно-мозговую жидкость [10]. Таким образом, тиреоидные гормоны являются субстратами и тканеспецифичными индукторами Pgp, а дисфункция щитовидной железы способна существенно изменять фармакокинетику лекарственных веществ.

Выводы

1. Введение кроликам L-тироксина подкожно в дозах 25 и 100 мкг/кг массы в течение 14 дней приводит к развитию экспериментального гипертиреоза, который сопровождается повышением уровней T3 и T4 и снижением уровня ТТГ в сыворотке крови.

2. L-тироксин, назначаемый кроликам в течение 14 дней, вызывает повышение активности гликопротеина-P, определяемой по фармакокинетике его маркерного субстрата фексофенадина, что подтверждается снижением C_{\max} (дозы 25 и 100 мкг/кг), а также уменьшением $AUC_{0-\infty}$ и увеличением общего клиренса (доза 100 мкг/кг).

3. L-тироксин является дозозависимым индуктором гликопротеина-P.

Литература

1. Метаболизм лекарственных средств. Научные основы персонализационной медицины: руководство для врачей / В.Г. Кукес [и др.]. – М.: ГЭОТАР-МЕДиа, 2008. – 304 с.
2. Раменская Г.В. Разработка методики количественного определения маркера активности Р-гликопротеина фексофенадина в плазме крови /

Таблица 1

Основные фармакокинетические параметры фексофенадина при введении тироксина ($M \pm m$)

Серии эксперимента	Изучаемые параметры				
	C_{max} , нг/мл	$AUC_{0-\infty}$, нг/ч×мл	Общий клиренс, л/ч	Объем распределения, л	C_{max} / AUC_{0-t}
Доза тироксина 25 мкг/кг					
Исходные значения	385,9±54,7	6886,9±1351,5	16,1±4,0	344,3±52,3	0,072±0,021
Тироксин 14 дней	234,0±22,4*, **	3795,7±767,7	30,1±6,5	446,1±49,2	0,077±0,017
5 день отмены	320,1±24,1	4841,6±1011,8	22,2±3,6	360,3±25,1	0,081±0,016
Доза тироксина 100 мкг/кг					
Исходные значения	399,8±14,2	5336,4±717,3	18,6±2,6	329,9±47,5	0,084±0,0135
Тироксин 14 дней	180,3±9,8*, **	1937,1±666,3*, **	52,7±14,4*, **	445,9±72,9	0,144±0,04
5 день отмены	332,4±14,3*	4881,5±763,0	21,3±3,7	372,5±20,8	0,076±0,01

* – $p < 0,05$ – достоверные различия со значениями у интактных животных (исходные значения),

** – $p < 0,05$ – достоверные различия со значениями на 5 день отмены препарата.

Таблица 2

Гормональный статус кроликов при введении тироксина ($M \pm m$)

Серии эксперимента	Изучаемые параметры		
	ТТГ, мМЕ/л	Т3, нмоль/л	Т4, нмоль/л
Доза тироксина 25 мкг/кг			
Исходные значения	0,73±0,03	1,3±0,1	39,8±0,6
Тироксин 14 дней	0,46±0,02*, **	7,8±0,3*, **	139,1±13,0*, **
5 день отмены	0,70±0,03	1,1±0,03	60,7±7,5
Доза тироксина 100 мкг/кг			
Исходные значения	0,62±0,02	1,8±0,09	70,0±4,3
Тироксин 14 дней	0,50±0,03*	9,9±0,5*, **	241,6±12,9*, **
5 день отмены	0,59±0,03	4,2±0,6*	42,1±1,8 *

* – $p < 0,05$ – достоверные различия со значениями у интактных животных,

** – $p < 0,05$ – достоверные различия со значениями на 5 день отмены препарата.

- Г.В. Раменская, Е.А. Скуридина, Л.М. Красных // Хим.-фармац. журн. – 2006. – Т. 40, №12. – С. 47-50.
3. Bauer B. Tumor necrosis factor alpha and endothelin-1 increase P-glycoprotein expression and transport activity at the blood-brain barrier / B. Bauer, A.M. Hartz, D.S. Miller // Mol. Pharmacol. – 2007. – Vol. 71. – P. 667-675.
 4. Digoxin and ouabain induce P-glycoprotein by activating calmodulin kinase II and hypoxia-inducible factor-1alpha in human colon cancer cells / C. Riganti [et al.] // Toxicol. Appl. Pharmacol. – 2009. – Vol. 240, №3. – P. 385-392.
 5. Geick A. Nuclear receptor response elements mediate induction of intestinal MDR1 by rifampin / A. Geick, M. Eichelbaum, O. Burk // J. Biol. Chem. – 2001. – Vol. 276. – P. 14581-14587.
 6. Mitchell A. Thyroid hormone export from cells: contribution of P-glycoprotein / A. Mitchell, M. Tom, R. Mortimer // Endocrinol. – 2005. – Vol. 185, № 1. – P. 93-98.
 7. Modulation of P-glycoprotein expression in hyperthyroid rat tissues / N. Nishio [et al.] // Journal of endocrinology. – 2005. – Vol. 185. – P. 93-98.
 8. Patel V.A. Regulation of MDR-1 (P-glycoprotein) by cyclooxygenase-2 / V.A. Patel, M.J. Dunn, A. Sorokin // J. Biol. Chem. – 2002. – Vol. 277. – P. 38915-38920.
 9. The molecular biology of thyroid hormone action / R.C.J. Reibeiro [et al.] // Ann NY Acad Sci. – 1995. – Vol. 758. – P. 366-389.
 10. Thyroxine (T4) transfer from CSF to choroid plexus and ventricular brain regions in rabbit: contributory role of P-glycoprotein and organic anion transporting polypeptides / N. Kassem [et al.] // Brain Res. – 2007. – Vol. 1181. – P. 44-50.

INFLUENCE OF THE THYROXINE ON THE FUNCTIONAL ACTIVITY OF THE P-GLYCOPROTEIN IN THE EXPERIMENT

E.N. Yakusheva, A.S. Byryukova, A.V. Shchulkin, L.V. Nikiforova

In the research on the rabbits influence of a L-thyroxine on the activity of the protein- transporter P-glycoprotein (Pgp) was studied. Activity of the Pgp was investigated on the pharmacokinetics of its marker substrate fexofenadine. It was established that introduction of a L-thyroxine within 14 days lead to dose-dependent rising of Pgp activity.

Key words: *P-glycoprotein, MDR1, L-thyroxine, hyperthyroidism, fexofenadine.*

Елена Николаевна Якушева – доктор медицинских наук, доцент, заведующая кафедрой фармакологии с курсом фармакотерапии ФПДО.