

© Коллектив авторов, 2015
УДК 615.252.349.015.4

ВЛИЯНИЕ ГЛИКВИДОНА НА ФУНКЦИОНАЛЬНУЮ АКТИВНОСТЬ АВСВ1 БЕЛКА IN VIVO

Д.С. Титов, А.А. Никифоров, С.К. Правкин

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

В исследовании *in vivo* на кроликах изучено влияние гликвидона на функциональную активность белка-транспортера гликопротеина-Р (Р-гр, АВСВ1 белок). Активность Р-гр оценивали по фармакокинетике его маркерного субстрата – фексофенадина после однократного внутривенного введения. Применение гликвидона в дозе 10 мг/кг массы тела в течение 14 дней приводило к повышению максимальной концентрации фексофенадина, периода его 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 к снижению общего клиренса и коэффициента абсорбции, что свидетельствует об ингибировании функциональной активности белка-транспортера на уровне целостного организма.

Ключевые слова: гликвидон, гликопротеин-Р, АВСВ1 белок.

Гликопротеин-Р (Р-гр, АВСВ1 белок) – один из наиболее клинически значимых лекарственных транспортеров. АВСВ1 белок осуществляет транспортировку широкого спектра соединений против градиента концентрации, принимая участие в процессах всасывания, распределения и выделения, что определяется его локализацией в соответствующих органах и тканях [5, 14, 18]. Однако функциональная активность Р-гр лабильна и способна модулироваться, в том числе лекарственными препаратами. Изменение функциональной активности транспортера за счет индукции или ингибирования, может вызвать лекарственные взаимодействия, сопровождающиеся изменением фармакокинетики, главного и/или побочных действий препарата [4, 6, 7, 9]. Для целей оптимизации терапии, повышения ее эффективности и безопасности, путем предотвращения нежелательных лекарственных реакций, необходимо изучение

фармакологической регуляции гликопротеина-Р. Актуальность данной проблемы встает особенно остро для пациентов с заболеваниями, приводящими к полипрагмазии, такими, как сахарный диабет 2-го типа с присущим ему патологическим комплексом и рядом осложнений, включающим не только гипергликемию, но и ожирение, гипертонию, диабетическую ретинопатию, нефропатию и другие нарушения, требующие медикаментозной коррекции. Кроме того, часто фармакотерапия самого сахарного диабета 2-го типа носит комбинированный характер, а в отношении ряда гипогликемических препаратов было установлено, что они являются субстратами Р-гр: росиглитазон [17], метформин [10, 17] и др., при этом они могут быть использованы совместно с производными сульфонилмочевины [1]. Представителем последних является гликвидон – производное сульфонилмочевины II поколения, обладающий панкреати-

ческим и внепанкреатическим эффектами. Гликовидон метаболизируется в печени, главным образом, гидроксиглированием и деметилированием, с образованием неактивных метаболитов, он не оказывает ингибирующего или индуцирующего действия на изоферменты системы цитохрома P450 [3]. Однако на сегодняшний день отсутствуют данные о характере влияния гликовидона на гликопротеин-P.

Материалы и методы

В качестве экспериментальной модели использовали кроликов, которые являются адекватной трансляционной моделью для изучения гликопротеина-P. Эксперимент выполнен на 16 половозрелых кроликах-самцах породы Шиншилла, средней массой 3500-4500 г. Гликовидон (Препарат Глюренорм 30 мг; производитель: Boehringer Ingelheim, Греция) вводили животным в течение 14 дней внутривенно в дозе 10 мг/кг массы тела [11]. Функциональную активность P-gr определяли по анализу динамики плазменной концентрации фексофенадина, рекомендованного маркерного субстрата ABCB1 белка [13]. Фексофенадин (Препарат Телфаст 180 мг; производитель: Aventis Pharma, Италия) вводился однократно внутривенно через зонд в дозе 67,5 мг/кг массы тела животного до и после 14 дневного введения гликовидона. 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 внутривенного введения фексофенадина, центрифугировали 10 минут при 3000 об/мин, плазму хранили при -28°C до анализа.

Содержание фексофенадина в плазме крови определяли методом ВЭЖХ на хроматографе «Стайер» (Россия) с ультрафиолетовым детектором и обращенно-фазовой колонке «Wescman Coulter» 4,6*250 мм, зернением 5 мкм. Экстракцию и хроматографирование маркерного субстрата осуществляли по методу Раменской Г.В. в собственной модификации [8]. Анализ выполняли при длине волны 220 нм и скорости подвижной фазы 1 мл/мин.

Элюирование выполняли подвижной фазой следующего состава (на 200

мл): 133,7 мл бидистиллированной воды, содержащей 2,33 мл ледяной уксусной кислоты и 0,936 мл триэтиламина, доведенной триэтиламином до pH=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 IBM SPSS Statistics 20. Характер распределения данных оценивали по критерию Шапиро-Уилка. Для исследования статистической значимости показателей, имеющих нормальное распределение, использовали парный критерий Стьюдента. Для оценки статистической значимости показателей, распределение которых отличалось от нормального, использовали критерий Уилкоксона. 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).

Фармакокинетические параметры фексофенадина рассчитывали при помощи программы «Kinetic 5.0». 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 (данные представлены в таблице 2).

Результаты и их обсуждение

При введении гликовидона в дозе 10 мг/кг массы курсом 14 дней по сравнению с исходными значениями выявлены следующие изменения фармакокинетики маркерного субстрата P-gr – фексофенадина: достоверное увеличение медиан значений

С_{max} на ↑772,7% (p<0,05), медиан значений T_{1/2} на ↑1913,49% (p<0,05), средних значений AUC_{0-t} на ↑2548,22% (p<0,01), медиан значений AUC_{0-∞} на ↑7000,7% (p<0,05), медиан значений MRT на ↑1226,27% (p<0,05), снижение средних значений Cl на ↓98,94% (p<0,05), медиан значений С_{max}/AUC_{0-t} на ↓92,5 (p<0,01), и средних значений С_{max}/AUC_{0-∞} на ↓73,08% (p<0,05). Указанные изменения

свидетельствуют об увеличении концентрации фексофенадина в крови за счет увеличения абсорбции и замедления выведения маркерного субстрата. В соответствии с рекомендациями FDA ингибитором Р-гр признаются вещества увеличивающие AUC фексофенадина более чем на 25% [12], что может служить доказательством ингибирующего влияния гликвидона на функциональную активность Р-гр.

Таблица 1

Фармакокинетические параметры фексофенадина

Изучаемые параметры	Исходные значения (n=8)	Значения после 14 дней введения гликвидона (n=8)
Максимальная концентрация (С _{max} , нг/мл)	206,8 (130,47; 249,87)	1804,77 (1544,09; 1981,07)*
Время достижения максимальной концентрации (Т _{max} , ч)	3 (3; 4)	5,5 (3; 6)
Период полувыведения (T _{1/2} , ч)	2,15 (1,76; 6,05)	43,29 (20,73; 57,42)*
Площадь под фармакокинетической кривой (0-t) (AUC _{0-t} , (нг/мл)×ч)	959,57±543,04	25411,53±6837,36**
Площадь под фармакокинетической кривой (0-∞) (AUC _{0-∞} , (нг/мл)×ч)	1102,13 (470,22; 1515,3)	78258,85 (47982,8; 146118,5)*
Общий клиренс (Cl, л/ч)	96,64±59,68	1,02±0,74*
Коэффициент абсорбции (С _{max} /AUC _{0-t} , л/ч)	0,2 (0,14; 0,35)	0,015 (0,01; 0,04)**
Коэффициент абсорбции (С _{max} /AUC _{0-∞} , л/ч)	0,26±0,11	0,07±0,02*
Время удерживания (MRT, ч)	4,91 (4,44; 9,94)	65,12 (32,35; 86,25)*

*- уровень значимости <0,05 (p<0,05) по сравнению с исходными значениями,

** - уровень значимости <0,01 (p<0,01) по сравнению с исходными значениями

Ряд эндогенных соединений способны выступать в роли регуляторов Р-гр [2, 6, 15, 16], в том числе уровень которых под воздействием гликвидона способен изменяться, а именно инсулин и глюкоза. В связи с этим у интактных животных и после 14 дней введения гликвидона изучали уровни инсулина натощак, на 10 и на 45 минут после глюкозной нагрузки (3 г/кг), а также уровень глюкозы до, через 10 и 90 минут после глюкозной нагрузки. Рассчитывали гликемический и инсулиногенный индексы (табл. 2).

Изученные показатели представлены в таблице 2. При введении гликвидона в дозе 10 мг/кг массы курсом 14 дней выявлены

следующие изменения по сравнению с исходными значениями в уровнях инсулина, глюкозы и связанных с ними индексов: достоверное увеличение медиан значений инсулиногенного индекса на ↑151,76% (p<0,05), снижение средних значений глюкозы натощак на ↓17,4% (p<0,05) и средних значений гликемического индекса на ↓50,24% (p<0,05), изменения остальных показателей статистически не значимы. При этом согласно современным представлениям глюкоза способна выступать в качестве ингибитора гликопротеина-Р. Инсулин же является одним из основных регуляторов уровня глюкозы в крови, и оказывает индуцирующее влияние на АВСВ1 белок [2, 6, 15, 16].

Таблица 2

Изменения уровня инсулина и глюкозы

Исследуемые параметры	Исходные значения (n=8)	Значения после 14 дней введения гликвидона (n=8)
Глюкоза натощак ммоль/л	5,69±0,95	4,7±1,36*
Инсулин натощак мкЕД/мл	2,83 (1,92; 4,77)	4,68 (3,7; 5,06)
Гликемический индекс (отношение содержания глюкозы в крови натощак к инсулину в крови натощак)	2,07±1,09	1,03±0,21*
Инсулиногенный индекс (отношение прироста инсулина в крови к приросту глюкозы в крови на 10 мин после глюкозной нагрузки)	0,85 (0,55;1,05)	2,14 (1,04; 4,15) *
Инсулин 45 мин мкЕД/мл	14,54 (10,1; 19,19)	5,51 (3,05; 17,56)
Глюкоза 90 мин ммоль/л	9,11±4,16	8,88±4,43

*- уровень значимости <0,05 (p<0,05) по сравнению с исходными значениями

Таким образом, после 14 дней введения гликвидона, наблюдавшиеся увеличение уровня инсулина и снижение уровня глюкозы крови, согласно литературным данным, должны были привести к индукции белка-транспортера гликопротеина-R. Однако, фармакокинетические показатели маркерного субстрата – фексофенадина на 14 сутки введения гликвидона свидетельствуют об ингибировании ABCB1 белка. Следовательно, снижение функциональной активности R-гр в нашем исследовании связано с противодиабетическим препаратом, производным сульфонилмочевины II поколения – гликвидоном.

Выводы

Внутрижелудочное введение кроликам гликвидона в дозе 10 мг/кг массы тела в течение 14 дней вызывает ингибирование функциональной активности гликопротеина-R, определяемой по фармакокинетике маркерного субстрата – фексофенадина.

Литература

1. Алгоритм специализированной медицинской помощи больным сахарным диабетом / под ред. И.И. Дедова, Г.А. Мельниченко. – М., 2013. – Вып. 6. – 120 с.
2. Влияние тироксина на функциональную активность гликопротеина-R в эксперименте / А.С. Бирюкова [и др.] // Российский медико-биологический вестник им. акад. И.П. Павлова. – 2011. – №4. – С. 49-53.
3. Заявка 2015147617 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-R гликвидоном / Е.Н. Якушева, Д. С. Титов; Ряз. гос. мед. ун-т им. акад. И.П. Павлова. – заявл. 5.11.2015; № 073317.

4. Титов Д.С. Влияние ингибитора ДПП-4-вилдаглитина на функциональную активность гликопротеина-R in vivo / Д.С. Титов, Л.В. Никифорова // Российский медико-биологический вестник им. акад. И.П. Павлова. – 2015. – №3. – С. 54-60.
5. Якушева Е.Н. Характеристика гликопротеина-R 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.
6. Якушева Е.Н. Дозозависимое влияние тироксина на функциональную активность гликопротеина-R в эксперименте / Е.Н. Якушева, А.В. Щулькин, А.С. Бирюкова // Биомедицина. – 2012. – №2. – С. 53-60.
7. Якушева Е.Н. Влияние финастерида на функциональную активность гликопротеина-R в эксперименте / Е.Н. Якушева, И.В. Черных // Российский медико-биологический вестник им. акад. И.П. Павлова а. – 2012. – №4. – С. 46-50.
8. Якушева Е.Н. Влияние экспериментальной подострой гипобарической гипоксической гипоксии на функциональную активность гликопротеина-R

- / Е.Н. Якушева, И.В. Черных // Российский медико-биологический вестник им. акад. И.П. Павлова. – 2013. – №1. – С. 60-64.
9. Якушева Е.Н. Оценка принадлежности мексидола к субстратам, ингибиторам или индукторам гликопротеина-P / Е.Н. Якушева, А.В. Шулькин, И.В. Черных // Эксперим. и клинич. фармакология. – 2015. – №3. – С. 79-83.
10. Changes in metformin pharmacokinetics after intravenous and oral administration to rats with short-term and long-term diabetes induced by streptozotocin / Y.H. Choi [et al.] // Journal of pharmaceutical sciences. – 2008. – Vol. 97, №12. – P. 5363-5375.
11. Effect of gliquidone on insulin binding to rabbit erythrocytes / M. de Gasparo [et al.] // The Journal of endocrinology. – 1983. – Vol. 97, №1. – P. 97-103.
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.
13. Guideline on the investigation of bioequivalence / European Medicines Agency. – 2010. – 60 p.
14. Hennessy M. A primer on the mechanics of P-glycoprotein the multidrug transporter / M. Hennessy, J.P. Spiers // Pharmacological research. – 2010. – Vol. 55, №1. – P. 1-15.
15. Hyperglycemia induced down-regulation of renal P-glycoprotein expression / S.Y. Yeh [et al.] // European journal of pharmacology. – 2012. – Vol. 690, № 1-3. – P. 42-50.
16. 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.
17. Role of human placental apical membrane transporters in the efflux of glyburide, rosiglitazone, and metformin / S.J. Hemauer [et al.] // American journal of obstetrics and gynecology. – 2010. – Vol. 202, №4. – P. 383.e1-387.e7.
18. 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 GLIQUIDONE ON THE ABCB1 PROTEIN FUNCTIONAL ACTIVITY IN VIVO

D.S. Titov, A.A. Nikiforov, S.K. Pravkin

In the in vivo study in rabbits the effect of gliquidone at 10 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 pharmacokinetics of its marker substrate – fexofenadine after a single intragastric administration. Applying gliquidone 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 and rate of absorption, indicating that the inhibition of the functional activity of the protein transporter at the level of the whole organism.

Keywords: gliquidone, P-glycoprotein, ABCB1 protein.

Титов Д.С. – аспирант кафедры фармакологии с курсом фармации ФДПО ГБОУ ВПО РязГМУ Минздрава России, г. Рязань.
E-mail: i3762@yandex.ru

Никифоров А.А. – к.м.н., доц., зав. центральной научно-исследовательской лабораторией ГБОУ ВПО РязГМУ Минздрава России, г. Рязань.
E-mail: laris-nikiforova@yandex.ru

Правкин С.К. – к.м.н., ст. преп. кафедры фармакологии с курсом фармации ФДПО ГБОУ ВПО РязГМУ Минздрава России, г. Рязань.
E-mail: farm_nauka_2015@mail.ru