

© Якушева Е.Н., Черных И.В., 2013
УДК 616-001.8:616-008.9

ВЛИЯНИЕ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ ПОДОСТРОЙ ГИПОБАРИЧЕСКОЙ ГИПОКСИЧЕСКОЙ ГИПОКСИИ НА ФУНКЦИОНАЛЬНУЮ АКТИВНОСТЬ ГЛИКОПРОТЕИНА-Р

Е.Н. Якушева, И.В. Черных

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

В исследовании на кроликах изучено влияние экспериментальной подострой гипобарической гипоксической гипоксии на функциональную активность АТФ-зависимого белка-транспортера гликопротеина-Р (Pgp). Активность Pgp оценивали по фармакокинетике его маркерного субстрата фексофенадина. Установлено, что подострое 4-часовое гипоксическое воздействие приводит к индукции активности Pgp.

Ключевые слова: гликопротеин-Р, MDR1, гипоксия, подострая гипобарическая гипоксическая гипоксия, фексофенадин, транспортеры, фармакокинетика.

Современная фармакотерапия часто характеризуется полипрагмазией, что связано с увеличением доли пожилого населения и, как следствие, с ростом полиморбидности. Возможность лекарственных взаимодействий при полипрагмазии в клинике часто недооценивается, что влечет за собой возникновение нежелательных явлений, таких как развитие побочного действия лекарственных средств или неэффективность фармакотерапии.

Pgp – это эффлюксный транспортер, контролирующий фармакокинетику различных соединений в физиологических и патологических условиях [9]. Белок осуществляет экстрацеллюлярный перенос липофильных экзогенных и эндогенных веществ через клеточные мембраны вне зависимости от их концентрационного градиента, что требует затраты энергии в форме АТФ. В связи с конститутивной экспрессией в тканях, широкой субстратной специфичностью, активным участием в кишечной секреции, почечной и желчной экскреции многих экзогенных соединений, формированием защитных свойств гистогематических барьеров Pgp играет важную роль в защите организма от потенциально

токсичных ксенобиотиков, их метаболитов, а также от эндогенных веществ [7].

Гипоксия – это типовой патологический процесс, осложняющий различные заболевания, определяющий в значительной степени тяжесть течения патологии и ее исход. Вне зависимости от провоцирующих факторов результирующим метаболическим сдвигом при гипоксии является недостаточность окислительно-восстановительных процессов и энергообеспечения тканей. Гипоксия сопровождает сердечно-сосудистые заболевания (сердечная недостаточность, гипертоническая болезнь), нарушения дыхательной функции (бронхиальная астма, хроническая обструктивная болезнь легких, пневмония) и другие расстройства, что особенно актуально для людей пожилого возраста. Состояние именно этой группы населения наиболее часто характеризуется полиморбидностью, а, значит, и необходимостью назначать несколько лекарственных средств одновременно. Это, в свою очередь, повышает вероятность возникновения нежелательных лекарственных взаимодействий, связанных с нарушением функций белков-транспортеров.

В экспериментах на крысах установлено, что гипоксическое воздействие приводит к тканеспецифичному повышению экспрессии Pgp в сердце [5], к возрастанию уровня иРНК гена *mdr1b*, а также уровня самого транспортера [3]. В опытах на культурах клеток после воздействия умеренной гипоксии показано повышение активности Pgp, выявленное по ингибированию верапамилом эффлюкса дигоксина и родамина [4].

Однако при анализе научной литературы нами не было обнаружено информации об изучении функциональной активности Pgp при гипоксии в условиях целостного организма методом оценки фармакокинетики маркерных субстратов белка-транспортера.

Цель настоящего исследования – изучить влияние подострой гипобарической гипоксической гипоксии на функциональную активность Pgp.

Материалы и методы

Работа выполнена на 6 половозрелых кроликах-самцах породы Шиншилла, массой 3500–4300 г. Исследование влияния подострой гипобарической гипоксической гипоксии на функциональную активность Pgp проводили по анализу динамики плазменной концентрации фексофенадина – маркерного субстрата белка-транспортера.

Моделирование подострой гипобарической гипоксической гипоксии осуществляли в барокамере с приточно-вытяжной вентиляцией при разряжении воздуха, эквивалентном подъему животных "на высоту" 6000 м. Гипоксическому воздействию кроликов подвергали в течение 4 ч [6], "подъем" и "спуск" производили со скоростью 15 м/с.

За 4 суток до и сразу после гипоксического воздействия животным вводили фексофенадин (Телфаст, Aventis Pharma, Италия) внутрижудочно через зонд в дозе 67,5 мг/кг массы тела [1]. Пробы крови отбирали из краевой вены уха кролика в объеме 5 – 7 мл в гепаринизированные пробирки через 1, 2, 3, 4, 5, 6, 8, 12 и 24 часа после однократного введения фексофенадина, центрифугировали 10 минут при 3000 об/мин, плазму хранили при -29°C до анализа [1].

Содержание фексофенадина в плазме крови определяли методом ВЭЖХ на

хроматографе «Стайер» (Россия) с ультрафиолетовым детектором и обращенно-фазовой колонкой «Beckman Coulter» 4,6*250 мм, зернением 5 мкм. Экстракцию и хроматографирование маркерного субстрата осуществляли по собственной методике, за основу которой был взят метод Раменской Г.В. с соавт. [2]. Анализ выполняли при длине волны 220 нм и скорости подвижной фазы 1 мл/мин. В качестве экстрагентов для жидкостной экстракции фексофенадина применяли дихлорметан (ACROS ORGANICS), этилацетат (ACROS ORGANICS) и диэтиловый эфир (ХИМ-МЕД). Коэффициент экстракции фексофенадина из плазмы крови составлял 64 %.

Количественное определение фексофенадина проводили методом абсолютной калибровки по высоте пика. Калибровочная зависимость сигнала детектора от концентрации фексофенадина в диапазоне от 100 до 1000 нг/мл являлась линейной с коэффициентом корреляции 0,9974. Методика характеризовалась пределом обнаружения 50 нг/мл.

Определяли следующие фармакокинетические параметры: максимальная концентрация – C_{max} (нг/мл), время достижения максимальной концентрации – T_{max} (ч), период полувыведения $T_{1/2}$ (ч), площадь под фармакокинетической кривой "концентрация-время" от нуля до бесконечности и от нуля до последнего забора крови $AUC_{0-\infty}$, AUC_{0-t} (нг/мл)×ч, общий клиренс – Cl (л/ч), коэффициент абсорбции – C_{max}/AUC_{0-t} (1/ч) среднее время удерживания – MRT (ч), константа элиминации – K_{el} (1/ч).

Фармакокинетические параметры рассчитывали модельно-независимым методом с использованием программы Kinetica 5.0. Отношение C_{max}/AUC_{0-t} вычисляли самостоятельно. Экспериментальные данные были подвергнуты математико-статистической обработке с использованием офисного пакета «Microsoft Office XP» и программы Statistica 8.0. Характер распределения данных определяли по критерию Шапиро-Уилка. Наличие статистически достоверных межгрупповых различий определяли по t -критерию Стьюдента для связанных выборок в случае нормального распределения данных и по критерию Вилкоксона в случаях, когда

распределение данных отличалось от нормального. Полученные результаты представлены в виде среднего арифметического значения и стандартной ошибки среднего результата в случае нормального распределения данных или в виде медианы, верхнего и нижнего квартиля, если распределение данных отличалось от нормального.

Результаты и их обсуждение

Воздействие на кроликов подострой гипобарической гипоксической гипоксии, соответствующей «подъему на высоту» 6000 м в течение 4 ч., приводило к достоверному изменению фармакокинетики маркерного субстрата Pgp – фексофенадина. Полученные результаты представлены в таблице 1.

Таблица 1

Фармакокинетические параметры фексофенадина до и после гипоксического воздействия ($M \pm m$ – при нормальном распределении данных; медиана, нижний и верхний квартиль – при распределении данных, отличном от нормального)

Исследуемые параметры	Исходные значения n=6	Значения после гипоксического воздействия n=6
C_{max} , нг/мл	898,59±89,31	409,21±60,23*
T_{max} , ч	4,17±0,7	4,17±0,91
$T_{1/2}$, ч	9,49±1,13	6,32±1,17
AUC_{0-t} , (нг/мл)×ч	5628,98 (5392,28; 5817,93)	4227,25* (2647,26; 4557,88)
$AUC_{0-\infty}$, (нг/мл)×ч	7201,085 (6255,07; 7853,63)	4507,58* (2845,76; 4932,24)
Cl, л/ч	31,055±3,084	62,29±9,38*
C_{max}/AUC_{0-t} , 1/ч	0,15±0,018	0,11±0,011
MRT, ч	14,39±1,72	11,11±1,54*
K_{el} , 1/ч	0,078±0,0099	0,13±0,02

* – достоверные различия по сравнению с исходными данными ($p < 0,05$)

Гипоксическое воздействие вызвало достоверное ($p < 0,05$) снижение медиан значений AUC_{0-t} на 24,90%, $AUC_{0-\infty}$ на 37,40%, средних значений MRT на 22,79% и C_{max} на 54,46% по сравнению с исходными данными. Изменение средних значений $T_{1/2}$ и C_{max}/AUC_{0-t} не было статистически достоверным, однако наблюдалась тенденция к снижению показателей на 33,40% ($p = 0,056$) и на 26,67% ($p = 0,088$), соответственно. Выявлено достоверное повышение среднего значения Cl на 100,58% ($p < 0,05$) и тенденция к повышению среднего значения K_{el} на 66,67% ($p = 0,067$). T_{max} фексофенадина у кроликов до и после гипоксического воздействия не менялось ($p > 0,05$).

В проведенном исследовании изучено воздействие гипоксии на функциональную активность Pgp. Достоверное снижение значений C_{max} , $AUC_{0-\infty}$, AUC_{0-t} , MRT, а также повышение значения Cl фексофенадина может служить доказательством индуци-

рующего влияния подострой гипобарической гипоксической гипоксии в течение 4 часов на функциональную активность Pgp.

По данным научной литературы гипоксическое воздействие способно изменить степень экспрессии и функциональную активность Pgp. Ранее было установлено, что двухнедельное воздействие на крыс интермиттирующей дыхательной гипоксии приводило к повышению степени экспрессии транспортера Pgp в сердце, к увеличению количества иРНК гена *mdr1a* в печени и сердце, а также иРНК гена *mdr1b* в сердце [5]. По другим данным 48-часовое воздействие на крыс гипоксических условий (8% O_2) вызывало статистически значимое возрастание уровня иРНК гена *mdr1b*, а также уровня самого транспортера. Уровень иРНК *mdr1a* не претерпел изменений [3]. В опытах на культурах клеток после воздействия умеренной гипоксии в течение 48 и 24 часов наблюдалось повышение активности Pgp, выявленное по

изменению степени ингибирования верапамилом эфлюкса дигоксина (культура эпителиальных клеток Т84) и родамина 123 (культура эндотелиальных клеток Сасо2) [4]. По данным эксперимента на культурах эпителиальных и эндотелиальных клеток, подвергавшихся гипоксическому воздействию (инкубирование при парциальном давлении кислорода 20 мм рт. ст., углекислого газа – 35 мм рт. ст.), наблюдалось зависимое от продолжительности воздействия увеличение содержания мРНК гена MDR1 (в 2,2 и 7,1 раз по сравнению с контролем после 6 и 18 часов гипоксии, соответственно) и возрастание количества самого транспортера (максимальный уровень наблюдался после 48 часов гипоксического воздействия; дальнейшего возрастания уровня протеина после увеличения продолжительности гипоксии до 72 и 96 часов не наблюдалось) [4].

Существенную роль в процессе активации экспрессии гена MDR1 в условиях гипоксии отводится фактору, индуцируемому гипоксией (Hypoxia Inducible Factor – HIF-1) [4]. Данный фактор ответствен за транскрипционный ответ организма на гипоксию, включающий изменение выработки эритропоэтина, некоторых транспортеров глюкозы, ферментов гликолиза и цикла Кребса, метаболическую адаптацию, изменение сосудистого тонуса и неангиогенеза [8].

Полученные нами данные дополняют представления о влиянии гипоксии на функциональную активность Pgp, т.к. установлено, что индукция функциональной активности белка-транспортера в условиях гипоксии достоверно изменяет у кроликов фармакокинетику маркерного субстрата Pgp – фексофенадина. Таким образом, фармакотерапия заболеваний, сопровождающихся гипоксией, должна проводиться с учетом возможного изменения фармакокинетики лекарственных веществ-субстратов Pgp в результате индуцирующего влияния гипоксии на данный белок-транспортер.

Выводы

Воздействие на кроликов подострой гипобарической гипоксической гипоксии, соответствующей «подъему на высоту» 6000

м в течение 4 часов, приводит к индукции функциональной активности Pgp, определяемой по фармакокинетике его маркерного субстрата – фексофенадина, что подтверждается достоверным снижением C_{max} , AUC_{0-t} , $AUC_{0-\infty}$, MRT и повышением Cl.

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. Раменская Г.В. Разработка методики количественного определения маркера активности P-гликопротеина фексофенадина в плазме крови / Г.В. Раменская, Е.А. Скуридина, Л.М. Красных // Хим.-фармац. журн. – 2006. – Т. 40, №12. – С. 47-50.
3. Animal models of acute moderate hypoxia are associated with a down-regulation of CYP1A1, 1A2, 2B4, 2C5, and 2C16 and up-regulation of CYP3A6 and P-glycoprotein in liver / C. Fradette [et al.] // Drug Metab. Dispos. – 2007. – Vol. 35, №5. – P. 765-771.
4. Hypoxia-inducible Factor-1-dependent Regulation of the Multidrug Resistance / M. Katrina [et al.] // Gene Cancer Res. – 2002. – Vol. 62, №12. – P. 3387-3394.
5. Influence of intermittent hypoxia on myocardial and hepatic P-glycoprotein expression in a rodent model / J.M. Dopp [et al.] // Pharmacotherapy. – 2009. – Vol. 29, №4. – P. 365-372.
6. Pavlov A.D. RNA synthesis in rabbit and rat kidney under experimental changes in erythropoiesis / A.D. Pavlov, E.F. Morshchakova, N.M. Kalacheva // Haematologia (Budap). – 1978-1979. – Vol. 12, №1-4. – P. 149-158.
7. Tanigawara Y. Role of P-glycoprotein in drug disposition / T. Tanigawara // Ther. Drug. Monit. – 2000. – Vol. 22, №1. – P. 137-140.
8. The hypoxia-inducible transcription factor pathway regulates oxygen sensing in the simplest animal, *Trichoplax adhaerens* / C. Loenarz [et al.] // EMBO Rep. – 2011. – Vol. 12, №1. – P. 63-70.

9. The structure and functions of P-glycoprotein / Y. Li [et al.] // *Curr. Med. Chem.* – 2010. – Vol. 17, №8. – P. 786-800.

**THE INFLUENCE OF EXPERIMENTAL SUBACUTE HYPOBARIC HYPOXIA
ON P-GLYCOPROTEIN FUNCTIONAL ACTIVITY**

E.N. Yakusheva, I.V. Chernykh

In a study on rabbits the effect of the experimental subacute hypobaric hypoxic hypoxia on the functional activity of ATP-dependent protein transporter P-glycoprotein (Pgp) was studied. Pgp activity was assessed by pharmacokinetic of it's marker substrate fexofenadine. It was found that 4-hour hypoxic action leads to Pgp induction.

Key words: *glycoprotein-P, MDRI, hypoxia, subacute hypobaric hypoxic hypoxia, fexofenadine, transporters, pharmacokinetics.*

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

Черных Иван Владимирович
E-mail: ivchernykh88@mail.ru.