

*ОРИГИНАЛЬНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ*

© Коллектив авторов, 2016  
УДК 615.015

**МОЖНО ЛИ ОЦЕНИВАТЬ ПРИНАДЛЕЖНОСТЬ ЛЕКАРСТВЕННЫХ ВЕЩЕСТВ  
К СУБСТРАТАМ ГЛИКОПРОТЕИНА-P НА САМКАХ КРОЛИКОВ  
ПОРОДЫ ШИНШИЛЛА**

М.В. ГАЦАНОГА, И.В. ЧЕРНЫХ, А.В. ЩУЛЬКИН, Е.Н. ЯКУШЕВА, Н.М. ПОПОВА

Рязанский государственный медицинский университет им. акад. И.П. Павлова,  
ул. Высоковольтная, 9, 390026, г. Рязань, Российская Федерация

В статье описана методика анализа веществ на принадлежность к субстратам гликопротеина-P (Pgp) на самках кроликов породы Шиншилла, которая заключалась в оценке фармакокинетики маркерного субстрата белка-транспортера (фексофенадина) до и после введения его индуктора (рифампицин, 20 мг/кг массы два раза в день) и ингибитора (верапамил, 20 мг/кг три раза в сутки). Показано, что введение верапамила вызывает накопление фексофенадина в организме кроликов, а рифампицин – существенно не влияет на фармакокинетику препарата, что не позволяет использовать для разработанного метода анализа. Таким образом, определение принадлежности веществ к субстратам Pgp целесообразно проводить на самках.

*Ключевые слова:* гликопротеин-P, кролики-самки породы Шиншилла, фексофенадин, рифампицин, верапамил, фармакокинетика, субстрат.

**THE METHOD OF ASSESSMENT OF DRUGS BELONGING TO THE SUBSTRATES  
OF P-GLYCOPROTEIN ON FEMALE RABBITS**

M.V. GATSANOVA, I.V. CHERNYKH, A.V. SHCHULKIN, E.N. YAKUSHEVA, N.M. POPOVA

Ryazan state medical university named after academician I.P. Pavlov, Visocovoltnaya str., 9,  
390026, Ryazan, Russian Federation

The article describes the method of analysis of drugs belonging to the substrates of transporter P-glycoprotein (Pgp) on female Chinchilla rabbits which consisted in assessment of pharmacokinetics of a transporter-protein marker substrate (fexofenadine) before and after the introduction of its inductor (rifampicin 20 mg/kg of weight twice a day) and inhibitor (verapamil, 20 mg/kg three times a day). It is shown that verapamil administration cause fexofenadine accumulation in the rabbits and rifampicin – did not significantly affect the drug pharmacokinetics, what doesn't allow to use for the developed analysis method. Thus, the definition of drugs belonging to the substrates of Pgp is advantageously carried out on male Chinchilla rabbits.

*Keywords:* P-glycoprotein, female Chinchilla rabbits, fexofenadine, rifampicin, verapamil, pharmacokinetics, substrate.

Гликопротеин-Р (Pgp) представляет собой мембранный белок-транспортер с широким спектром субстратов, среди которых – большое число лекарственных средств. Его активность может изменяться под действием факторов как внешней, так и внутренней среды, что способно привести к изменению фармакокинетики лекарственных веществ-его субстратов [1, 2]. Разработка универсальной методики анализа принадлежности лекарственных веществ к субстратам данного белка-транспортера позволит прогнозировать фармакокинетические взаимодействия между ними и препаратами-модуляторами активности транспортера (Pgp).

Разработанная нами методика основана на сравнении параметров фармакокинетики предполагаемого субстрата до и после 14-дневного перорального введения индуктора (рифампицина) и ингибитора (верапамила) данного белка-транспортера. Замедленное всасывание и ускоренная экскреция тестируемого вещества из организма на фоне введения индуктора Pgp и обратная динамика – на фоне введения ингибитора свидетельствует о его принадлежности к субстратам транспортера. В предварительном исследовании нами продемонстрирована адекватность данной методики на кроликах-самцах породы Шиншилла при использовании в качестве маркерного субстрата гистаминолитика III поколения – фексофенадина [3, 4, 5].

Однако в связи с выявленными нами гендерными различиями функционирования Pgp [4] целью данной работы явилась апробация методики анализа принадлежности лекарственных веществ к числу субстратов Pgp на кроликах-самцах породы Шиншилла.

#### **Материалы и методы**

Работа выполнена на 12 половозрелых кроликах-самцах породы Шиншилла массой 3800–4500 г. Все манипуляции с животными проводились в соответствии с правилами лабораторной практики (Приложение к приказу Министерства здравоохранения и социального развития Российской Федерации от 23 августа 2010 г.

708н). Животным однократно внутривенно вводили фексофенадин (таблетки покрытые оболочкой Телфаст, 180 мг, Aventis Pharma, Италия) в дозе 67,5 мг/кг массы тела с последующим забором кровив девяти временных точках (1, 2, 3, 4, 5, 6, 8, 12 и 24 ч после введения) из ушной вены и ее центрифугированием при 3000 об/мин в течение 10 мин. для получения плазмы. В плазме крови определяли концентрацию фексофенадина методом ВЭЖХ [5].

Исследование проводили на высокоэффективном жидкостном хроматографе «Стайер» (Россия) с УФ-спектрофотометрическим детектором UVV 104, петлевым краном-дозатором РЕЕК с петлей для ввода пробы объемом 100 мкл, аналитическим ручным инжектором для ввода пробы модели 7725i фирмы Rheodyne (США) при длине волны 220 нм. Использовалась обращено-фазовая колонка с C18-эндкэппированием: Ultrasphere 4,6\*250 мм (зерниность 5 мкм) (BeckmanCoulter, США) с термостатированием при 45°C. Ввод проб в петлю хроматографа производили с помощью шприца «Microsyringes» (Германия).

Определение концентрации фексофенадина в плазме выполняли методом абсолютной калибровки по высоте пика. Калибровочные растворы готовили путем добавления к интактной плазме крови кроликов рассчитанного объема раствора стандарта фексофенадина гидрохлорида с концентрацией 10 мкг/мл.

Экстрагирование фексофенадина из плазмы крови кроликов проводили следующим образом: к 1,5 мл плазмы добавляли 375 мкл 2 н. кислоты хлористоводородной, перемешивали на приборе «Vortex», а затем добавляли по 2 мл дихлорметана, этилацетата и диэтилового эфира и помещали на 10 мин на встряхиватель для пробирок. После центрифугирования в течение 10 мин. при 3000 об/мин органический слой переносили в колбы для упаривания и удаляли растворитель с помощью роторно-вакуумного испарителя. Сухой остаток растворяли в 300 мкл подвижной фазы, 100 мкл наносили на колонку хроматографа.

Элюирование выполняли подвижной фазой следующего состава: 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 составляло 12,31 мин.

Калибровочная зависимость сигнала детектора от концентрации фексофенадина была определена в диапазоне концентраций 100-1000 нг/мл по 6 точкам, для каждой точки было выполнено по 5 измерений.

В последующем животных делили на две серии: первая (n = 6) получала индуктор Pgp – рифампицин [6] (капсулы Рифампицин, 150 мг, РУП «Белмедпрепараты», Республика Беларусь) в дозе 20 мг/кг дважды в день [7] в течение 14 дней, вторая серия (n = 6) получала ингибитор транспортера – верапамил [8] (таблетки, покрытые оболочкой, 80 мг, Валента Фармацевтика ОАО, Россия) в дозе 20 мг/кг 3 раза в день аналогичным курсом с однократным введением также за 1 час до введения фексофенадина. Затем животным обеих серий снова вводили фексофенадин и анализировали его фармакокинетику. Эксперимент выполнялся «слепым методом». Введение препаратов, забор крови и ВЭЖХ-анализ выполняли разные исследователи после специальной маркировки препаратов и проб крови для выполнения условий «ослепления».

Фармакокинетические параметры рассчитывали, используя модельно-независимый метод, с использованием программы «Kinetica 5.0».

Для статистической обработки данных применяли офисный пакет «Microsoft Office XP» и программу Statistica 7.0. Характер распределения данных оценивали по критерию Шапиро-Уилка. Наличие статистически достоверных межгрупповых различий определяли по критерию Стьюдента повторных измерений при нормальном распределении показателей, или критерий Вилкоксона – для показателей, распределение которых отличалось от нормального. Результаты считали достоверными при уровне значимости меньше 0,05.

#### Результаты и их обсуждение

Полученные результаты представлены в таблицах 1 и 2.

Курсовое введение кроликам индуктора Pgp – рифампицинане приводило к ожидаемым изменениям фармакокинетики маркерного субстрата транспортера – фексофенадина: максимальная концентрация ( $C_{max}$ ), площадь под фармакокинетической кривой «концентрация-время» ( $AUC_{0-t}$ ,  $AUC_{0-\infty}$ ) и другие параметры фармакокинетики маркерного субстрата (время достижения максимальной концентрации ( $T_{max}$ ), общий клиренс (Cl) статистически значимо не изменялись ( $p > 0,05$ ). Имелась лишь незначительная тенденция к снижению среднего времени удерживания (MRT) фексофенадина на 40,2% ( $p = 0,098$ ).

Таблица 1

#### Фармакокинетические параметры фексофенадина до и после введения рифампицина

Фармакокинетические параметры	Интактные кролики (n=6)	На фоне введения рифампицина (n=6)	p
$C_{max}$ , нг/мл	273,68±80,21	260,45±146,97	0,866
$AUC_{0-t}$ , нг*ч/мл	2795,39±1242,62	2394,76±1718,74	0,609
$AUC_{0-\infty}$ , нг*ч/мл	3382,19±1516,61	2601,49±1796,80	0,421
$T_{max}$ , ч	5,5 (1,0; 10,0)	4,5 (3,5; 6,0)	0,674
MRT, ч	11,44±3,37	6,84±4,76	0,098
Cl, л/ч	23,64±11,51	47,61±44,75	0,276

*Примечание:* данные представлены в форме среднего арифметического и стандартного отклонения среднего арифметического ( $M \pm SD$ ) в случае их нормального распределения и медианы, нижнего и верхнего квартилей (Med, Iq, uq) – в случае распределения отличного от нормального.

**Фармакокинетические параметры фексофенадина  
до и после введения верапамила**

Фармакокинетические параметры	Интактные кролики (n=6)	На фоне введения верапамила (n=6)	p
$C_{\max}$ , нг/мл	190,27 (146,77; 209,79)	243,82 (205,61; 326,69)	0,075
$AUC_{0-t}$ , нг*ч/мл	1894,92±595,78	3742,15±1643,59	0,033
$AUC_{0-\infty}$ , нг*ч/мл	2519,48 (2254,36; 3133,39)	5139,81 (3229,94; 40973,46)	0,046
$T_{\max}$ , ч	5,5 (4,75; 7,0)	5,5 (4,25; 10,0)	0,854
MRT, ч	14,77 (11,44; 21,69)	19,98 (9,92; 133,50)	0,345
Cl, л/ч	26,41±7,41	14,53±14,11	0,092

*Примечание:* данные представлены в форме среднего арифметического и стандартного отклонения среднего арифметического ( $M \pm SD$ ) в случае их нормального распределения и медианы, нижнего и верхнего квартилей (Med, Iq, uq) – в случае их распределения отличным от нормального способом.

На фоне курсового введения верапамила наблюдалось достоверное повышение площади под фармакокинетической кривой концентрация-время ( $AUC_{0-t}$ ) на 94,5% ( $p = 0,033$ ), и площади под фармакокинетической кривой концентрация-время ( $AUC_{0-\infty}$ ) – на 104,0% ( $p = 0,046$ ).

По рекомендации FDA все новые лекарственные препараты в США подвергаются тестированию на принадлежность к субстратам и ингибиторам Pgp. Согласно данным рекомендациям исследования проводятся на культурах клеток, и лишь при положительных результатах *in vitro* (выявление принадлежности вещества к субстрату или ингибитору) препарат подвергается анализу *in vivo*.

На наш взгляд, при оценке принадлежности лекарственных веществ к субстратам Pgp в любом случае необходимо проводить доклиническое исследование *in vivo*, так как в этом случае будет учтена возможность косвенного влияния препарата на функционирование транспортера (изменение гормонального фона человека или метаболических процессов). В качестве биологической модели в подобных исследованиях мы использовали кроликов по ряду причин: высокое сходство аминокислотной последовательности транспортера кролика и человека [9], во многом аналогичный спектр модуляторов активности и лигандов у кролика и человека [10], а также возможность неоднократного забора

крови для построения фармакокинетической кривой и использование одного и того же животного в качестве контроля и опыта (связанные выборки животных).

Продемонстрированная в данной работе незначительная динамика параметров фармакокинетики фексофенадина после курсового введения рифампицина свидетельствует о более низкой чувствительности Pgp самок кроликов породы Шиншилла к регуляторным воздействиям, в частности к индукции. В связи с этим предпочтительно анализировать принадлежность лекарственных средств к субстратам Pgp на самцах, что было продемонстрировано нами ранее [3, 4].

#### Выводы

1. Курсовое введение кроликам-самкам породы Шиншилла рифампицина не приводит к изменению фармакокинетических параметров маркерного субстрата Pgp – фексофенадина.

2. Курсовое введение кроликам-самкам породы Шиншилла верапамила приводит к возрастанию  $AUC_{0-t}$  и  $AUC_{0-\infty}$  фексофенадина.

3. Анализ принадлежности лекарственных веществ к субстратам Pgp предпочтительно проводить на самцах кроликов породы Шиншилла.

#### Литература

1. Кулес В.Г., Грачев С.В., Сычев Д.А., Раменская Г.В. Метаболизм лекарственных средств. Научные основы пер-

- сонализованной медицины: руководство для врачей. М.: ГЭОТАР-Медиа. 2008. 304 с.
2. Якушева Е.Н., Черных И.В., Щулькин А.В., Гацанога М.В. Методика определения принадлежности лекарственных средств к числу субстратов гликопротеина-Р // Российский медико-биологический вестник имени академика И.П. Павлова. 2015. №3. С.49-53.
  3. Якушева Е.Н., Щулькин А.В., Черных И.В. Оценка принадлежности мексидола к субстратам, ингибиторам или индукторам гликопротеина-Р // Экспериментальная и клиническая фармакология. 2015. Т. 78, № 5. С. 19-23.
  4. Якушева Е.Н., Черных И.В., Щулькин А.В., Котлярова А.А., Никифоров А.А. Половые различия функциональной активности и экспрессии гликопротеина-Р у кроликов // Российский физиологический журнал им. И.М. Сеченова. 2014. Т. 100, №8. С. 944-952.
  5. Якушева Е.Н., Щулькин А.В., Черных И.В., Титов Д.С. Функциональная активность гликопротеина-Р при экспериментальных манипуляциях // Российский медико-биологический вестник имени академика И.П. Павлова. 2014. № 2. С. 74-77.
  6. Kim S.W., Hasanuzzaman M., Cho M., Neo Y.R., Ryu M.J., Ha N.Y., Park H.J., Park H.Y., Shin J.G. Casein Kinase 2 (CK2)-mediated Phosphorylation of Hsp90 $\beta$  as a Novel Mechanism of Rifampin-induced MDR1 Expression // J. Biol. Chem. 2015. Vol. 290, №27. P. 17029-17040. doi: 10.1074/jbc.M114.624106.
  7. Yin L.Y., Lazzarini L., Li F., Stevens C.M., Calhoun J.H. Comparative evaluation of tetracycline and vancomycin, with and without rifampicin, in the treatment of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* experimental osteomyelitis in a rabbit model // J. Antimicrob. Chemother. 2005. Vol. 55, №6. P. 995-1002.
  8. Garrigos M., Mir L.M., Orłowski S. Competitive and Non-Competitive Inhibition of the Multidrug-Resistance-Associated P-glycoprotein ATPase // Eur. J. Biochem. 1997. Vol. 244, №2. P. 664-673.
  9. Ballent M., Wilkens M.R., Mate L., Muscher A.S., Virkel G., Sallovitz J., Schroder B., Lanusse C., Lifschitz A. P-glycoprotein in sheep liver and small intestine: gene expression and transport efflux activity // J. Vet. Pharmacol. Ther. 2013. Vol. 36, №6. P. 576-582. doi:10.1111/jvp.12040.
  10. Moore L.B., Maglich J.M., McKee D.D., Wisely B., Willson T.M., Kliewer S.A., Lambert M.H., Moore J.T. Pregnane X receptor (PXR), constitutive androstane receptor (CAR), and benzoate X receptor (BXR) define three pharmacologically distinct classes of nuclear receptors // Molecular endocrinology. 2002. Vol. 16, №5. P. 977-986.
- ### References
1. Kukes VG, Grachev SV, Sychev DA, Ramenskaja GV. *Metabolizm lekarstvennyh sredstv. Nauchnye osnovy personalizovannoj mediciny: rukovodstvo dlja vrachej [Drugs metabolism. Scientific basis for personalized medicine: a guide for physicians]*. М.: GJEOTAR-Media. 2008. 304 p. (in Russian)
  2. Yakusheva EN, Chernykh IV, Shchulkin AV, Gatsanoga MV. Metodika opredelenija prinadlezhnosti lekarstvennyh sredstv k chislu substratov glikoproteina-P [Method of determining the affiliation of drugs to P-glycoprotein substrates]. *Rossijskij mediko-biologicheskij vestnik imeni akademika I.P. Pavlova [I.P. Pavlov Russian Medical Biological Herald]*. 2015; 3: 49-53. (in Russian)
  3. Yakusheva EN, Shchulkin AV, Chernykh IV. Ocenka prinadlezhnosti meksidola k substratam, ingibitoram ili induktoram glikoproteina-P [Assessment of mexidol belonging to substrates, inhibitors or inducers of P-glycoprotein]. *Jekspierimental'naja i klinicheskaja farmakologija [Experimental and clinical pharmacology]*. 2015; 78 (5): 19-23. (in Russian)
  4. Yakusheva EN, Chernykh IV, Shchulkin AV, Kotljarova AA, Nikiforov A.A. Polovye razlichija funkcional'noj aktivnosti i

- jekspressii glikoproteina-P u krolikov [Sex differences in functional activity and expression of P-glycoprotein in rabbits]. *Rossijskij fiziologicheskij zhurnal im. I.M. Sechenova [Neuroscience and Behavioral Physiology – Sechenov Physiology Journal]*. 2014; 100 (8): 944-952. (in Russian)
5. Yakusheva EN, Shhulkin AV, Chernykh IV, Titov D.S. Funkcional'naja aktivnost' glikoproteina-P pri jeksperimental'nyh manipuljacijah [Functional activity of P-glycoprotein at experimental manipulations]. *Rossijskij mediko-biologicheskij vestnik imeni akademika I.P. Pavlova [I.P. Pavlov Russian Medical Biological Herald]*. 2014; 2: 74-77. (in Russian)
  6. Kim SW, Hasanuzzaman M, Cho M, Heo YR, Ryu MJ, Ha NY, Park HJ, Park HY, Shin JG. Casein Kinase 2 (CK2)-mediated Phosphorylation of Hsp90 $\beta$  as a Novel Mechanism of Rifampin-induced MDR1 Expression. *J Biol Chem*. 2015; 290 (27): 17029-17040. doi: 10.1074/jbc.M114.624106.
  7. Yin LY, Lazzarini L, Li F, Stevens CM, Calhoun JH. Comparative evaluation of tige cycline and vancomycin, with and without rifampicin, in the treatment of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* experimental osteomyelitis in a rabbit model. *J Antimicrob Chemother*. 2005; 55 (6): 995-1002.
  8. Garrigos M, Mir LM, Orłowski S. Competitive and Non-Competitive Inhibition of the Multidrug-Resistance-Associated P-glycoprotein ATPase. *Eur J Biochem*. 1997; 244 (2): 664-673.
  9. Ballent M, Wilkens MR, Mate L, Muscher AS, Virkel G, Sallovitz J, Schroder B, Lannusse C, Lifschitz A. P-glycoprotein in sheep liver and small intestine: gene expression and transport efflux activity. *J Vet Pharmacol Ther*. 2013; 36 (6): 576-582. doi:10.1111/jvp.12040
  10. Moore LB, Maglich JM, McKee DD, Wisely B, Willson TM, Kliewer SA, Lambert MH, Moore JT. Pregnane X receptor (PXR), constitutive androstane receptor (CAR), and benzoate X receptor (BXR) define three pharmacologically distinct classes of nuclear receptors. *Molecular endocrinology*. 2002; 16 (5): 977-986.

---

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ

Гацанова Мария Валериевна.  
Тел.: 8(952)1250104.  
E-mail: mvgatsanoga90@mail.ru

Черных Иван Владимирович.  
Тел.: 8(953)7403306.  
E-mail: ivchernykh88@mail.ru

Щулькин Алексей Владимирович.  
Тел.: 8(920)9520024.  
E-mail: alekseyshulkin@rambler.ru (автор, ответственный за переписку)

Якушева Елена Николаевна.  
Тел.: 8-903-834-46-88, 8 (4912) 46-08-60 (раб.).  
E-mail: e.yakusheva@rzgmu.ru

Попова Наталья Михайловна.  
Тел.: 8-920-633-57-17.  
E-mail: p34-66@yandex.ru