

ОРИГИНАЛЬНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

© Якушева Е.Н., Титов Д.С., 2017
УДК 615.252.349.015.4
DOI:10.23888/НМЖ20172208-224

ВЛИЯНИЕ ГЛИКВИДОНА НА ЭКСПРЕССИЮ ГЛИКОПРОТЕИНА-P НА ФОНЕ НОРМЫ И НА ФОНЕ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОГО АЛЛОКСАН-ИНДУЦИРОВАННОГО САХАРНОГО ДИАБЕТА 2-ГО ТИПА

Е.Н. ЯКУШЕВА, Д.С. ТИТОВ

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

В последнее время все большее значение в фармакокинетике лекарственных веществ придается белкам-транспортерам, наиболее клинически значимым из которых является гликопротеин-P (P-gr, ABCB1 белок, MDR1), что определяется его широкой субстратной специфичностью и локализацией в организме.

В исследовании *in vivo* на кроликах непрямым иммуногистохимическим методом изучено влияние гликвидона на экспрессию P-gr в тканях тощей кишки, печени, почек и гематоэнцефалическом барьере на фоне нормы и экспериментального аллоксан-индуцированного СД 2-го типа. Введение гликвидона интактным животным в дозе 10 мг/кг массы не приводило к изменениям экспрессии P-gr в указанных тканях, однако сопровождалось снижением уровня тощачевой глюкозы крови – эндогенного ингибитора ABCB1 белка. Описанные результаты сохранялись и на 5-й день отмены препарата. После 14-дневной фармакотерапии гликвидоном в дозе 10 мг/кг массы аллоксан-индуцированного СД 2-го типа наблюдалось восстановление сниженной на фоне патологии экспрессии ABCB1 белка в тканях тощей кишки, печени и почек до уровня исходных значений, при этом наблюдалась нормализация углеводного обмена. На 5-й день отмены терапии вновь имело место ингибирование экспрессии P-gr в тканях тощей кишки и печени. Вероятно, что наблюдаемое снижение экспрессии гликопротеина-P на фоне СД 2-го типа было связано с увеличением уровня глюкозы и снижением концентрации инсулина – эндогенного индуктора белка-транспортера. На фоне терапии гликвидоном наблюдалась нормализация углеводного обмена и как следствие восстановление сниженной на фоне патологии экспрессии ABCB1 белка. На 5-й день отмены препарата вновь наблюдался рост уровня глюкозы крови и снижение концентрации инсулина, в результате вновь наблюдалось снижение уровня экспрессии P-gr в тканях тощей кишки и печени, а также тенденция к снижению в почках.

Ключевые слова: гликопротеин-P, гликвидон, сахарный диабет 2-го типа.

По данным Всемирной Организации Здравоохранения (ВОЗ) и Международной Диабетической Федерации (IDF) 387

млн человек во всем мире больны диабетом. На СД 2-го типа приходится 90% всех случаев диабета в мире. Если

учесть 175 млн не диагностированных, по данным IDF, случаев СД, становится ясно, что огромное количество людей не подозревает о том, что диабет у них прогрессирует в сторону развития поздних осложнений, одним из которых является диабетическая нефропатия (ДН). ДН обнаруживается у 25% больных СД 2-го типа, прогрессирует до конечной стадии у значительной части пациентов и ограничивает возможности фармакотерапии самого диабета. Согласно последним клиническим рекомендациям единственным производным сульфонилмочевины, который может быть использован до 4-й стадии хронической болезни почек (ХБП) (СКФ 29-15 мл/мин/1,73 м², тяжелое снижение СКФ), включительно, без корректировки дозы является гликвидон [1-4].

СД 2-го типа с присущим ему патологическим комплексом приводит к полипрагмазии, в условиях которой возрастает риск нежелательных лекарственно-опосредованных взаимодействий, в том числе и фармакокинетических, для которых все большее значение придается белкам-транспортерам, наиболее клинически значимый из которых – гликопротеин-P. В роли регуляторов последнего способны выступать как экзогенные соединения – лекарственные препараты, так и эндогенные, в том числе инсулин (эндогенный индуктор P-gr) и глюкоза (эндогенный ингибитор P-gr), уровень которых на фоне нормы и на фоне СД 2-го типа существенным образом отличается [5].

Цель исследования

Изучение влияния гликвидона на экспрессию гликопротеина-P в тканях тощей кишки, печени, почек и коры больших полушарий головного мозга на фоне нормы и на фоне СД 2-го типа.

Материалы и методы

Исследование было выполнено на 96 половозрелых кроликах-самцах породы Шиншилла, средней массой 3500-4500 г. Животные имели необходимые ветеринарные свидетельства и содержались в стандартных условиях вивария ФГБОУ ВО РязГМУ Минздрава России. Работу

с лабораторными животными проводили в соответствии с правилами лабораторной практики (прил. к приказу Минздрава РФ № 708н от 23.08. 2010 г.).

Согласно задачам эксперимента, кролики были разделены на 6 групп.

Животные 2-й и 4-й групп были разделены на две подгруппы. В 1-й группе (n=8) изучали уровень экспрессии в тканях тощей кишки, печени, почек и коры больших полушарий головного мозга на фоне нормы. Выбор тканей обусловлен их ролью в процессах абсорбции, элиминации и распределения лекарственных веществ, а также преимущественной локализацией P-gr. Во 2-й группе (n=16) изучали влияние гликвидона (10 мг/кг) на экспрессию ABCB1 белка в указанных тканях после 14-дневного введения препарата (1-ая подгруппа n=8) и на 5-й день его отмены (2-ая подгруппа n=8). В 3-й группе (n=16) моделировали СД 2-го типа и изучали экспрессию P-gr в указанных тканях на фоне патологии (n=8). В 4-й группе предварительно моделировали СД 2-го типа (n=32) и изучали влияние гликвидона (10 мг/кг) на экспрессию белка-транспортера после 14-дневной терапии СД 2-го типа гликвидоном (n=8) и на 5-й день его отмены (n=8). В 5-й группе (n=8) изучали уровни инсулина и глюкозы в динамике у интактных кроликов, после 14-дневного введения гликвидона и на 5-й день его отмены. В 6-й группе (n=16) изучали уровни инсулина и глюкозы у интактных кроликов, на фоне СД 2-го типа, после 14-дневной терапии гликвидоном и на 5-й день его отмены.

СД 2-го типа моделировали однократной внутривенной инъекцией свежеприготовленного раствора аллоксанамонгидрата («Sigma») в цитратном буфере (pH=4,0) в дозе 80 мг/кг массы. Концентрации инсулина определяли натощак, на 10 и 45 минутах, глюкозы натощак на 10, 90 минутах (120 минут для серий с патологией) после пероральной глюкозной нагрузки (3 г/кг). Рассчитывали гликемический (отношение содержания базальной глюкозы к базальному инсулину в

крови) и инсулиногенный индексы (отношение прироста инсулина в крови к приросту глюкозы в крови на 10 минуту после пероральной глюкозной нагрузки) (табл.1, 3). СД 2-го типа подтверждали через 30 дней по уровню глюкозы натощак не более 13,89 ммоль/л на фоне сохраненной секреции базального инсулина, концентрации постпрандиальной глюкозы отличной от базальной, сниженному инсулиногенному индексу и уровню инсулина на 45 минуту после глюкозной нагрузки [5, 6].

Содержание глюкозы (ммоль/л) определяли глюкозооксидазным методом при помощи наборов «Human» (Германия), инсулин (мкЕД/мл) – радиоиммунным методом с использованием набора «Immunotech» (Чехия) в сыворотке венозной крови – в центральной научно-исследовательской лаборатории (ЦНИЛ) РязГМУ. В качестве экспресс-метода определения уровня глюкозы в цельной крови использовали электрохимический глюкометр One Touch Ultra Easy [7].

Экспрессию P-gp определяли *in vivo* непрямым иммуногистохимическим методом в ЦНИЛ РязГМУ. Для этого кроликов выводили из эксперимента методом воздушной эмболии.

Гистологический материал подвергали стандартной обработке: производили обезвоживание в растворах этилового спирта возрастающей концентрации, просветляли ксилолом, с последующим заключением в парафин. Перед реакцией иммуноного окрашивания производили демаскировку антигенов тканей посредством нагревания на водяной бане в 10 мМ цитратном буфере (pH=6,0), блокировали эндогенную пероксидазу 3%-ным раствором пероксида водорода. Затем инкубировали срезы с первичными антителами к P-gp (ABCb1 antibody – middleregion, 100 мкл (Aviva Systems Biology ARP51326_P050, США)) в разведении 1:50 по стандартной методике. Для иммуноного окрашивания использовали полимерную систему детекции с пероксидазной меткой («Leica Microsystems»,

Германия). Ядра клеток докрашивали гематоксилином.

Микропрепарат фотографировали с помощью цифровой камеры Canon Power Shot G5 при увеличении в 400 раз. В каждом гистологическом препарате оценивали 10 репрезентативных участков (10 фотографий). В дальнейшем изображения анализировали с помощью программы для анализа и обработки цифровых изображений «Image J» и специально разработанного для количественного иммуногистохимического анализа плагина «IHC Profiler». Уровень экспрессии определяли в «+», по интенсивности и площади окраски («+++» – высокая, «++» – умеренная, «+» – слабая, 0 – отсутствие экспрессии). Интенсивность окраски «диаминобензидина» оценивали количественно в диапазоне от 0 (черное) до 255 (белое).

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 изменений уровней инсулина, глюкозы и связанных с ними индексов, в случае нормального распределения данных, проверку нулевой гипотезы в сериях, состоящих более чем из двух зависимых групп, выполняли дисперсионным анализом (ANOVA) повторных измерений. Для оценки показателей, распределение которых отличалось от нормального, применяли критерий Фридмана. В качестве методов множественных сравнений использовали параметрический и непараметрический варианты критерия Ньюмена-Кейлса, соответственно.

Проверку статистической значимости для параметрических данных в серии, состоящей из двух зависимых групп, проводили парным критерием Стьюдента. Для оценки показателей, распределение которых отличалось от нормального применяли 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).

Изучение статистической значимости изменений экспрессии P-gr проводили непараметрическими методами. Для проверки нулевой гипотезы использовали критерий Крускала-Уоллиса, в качестве метода множественного сравнения применяли непараметрический вариант критерия Ньюмена-Кейлса.

Для описания данных использовали моду (Mode) и размах вариации (Range (R)), а также медиану (Median) и верхний и нижний квартили (Iq; uq).

Результаты и их обсуждение

При введении гликвидона в дозе 10 мг/кг массы 14-дневным курсом выявлено статистически достоверное снижение средних значений глюкозы натошак после 14 дней введения на 17,4% ($p < 0,05$), сохраняющиеся сниженными на 20,74% ($p < 0,05$) и на 5-й день отмены препарата (табл. 1). В условиях снижения уровня эндогенного ингибитора P-gr – глюкозы, предполагалось, что будет наблюдаться индукция P-gr. Однако указанного явления не происходило. Экспрессия P-gr в тканях тощей кишки, печени, почек и гематоэнцефалическом барьере головного мозга после 14-дневного введения гликвидона интактным кроликам и на 5-й день его отмены оставалась без изменений (табл. 2, 5).

Таблица 1

Изменения уровней инсулина и глюкозы после введения гликвидона (10 мг/кг) на фоне нормы (Mean±SD или Media (Iq; uq))

Исследуемые параметры	Исходные значения (n=8)	14 дней введения гликвидона (n=8)	5-й день отмены гликвидона (n=8)
Глюкоза натошак, ммоль/л	5,69 ± 0,95	4,70 ± 1,36 ¹	4,51 ± 1,15 ¹
Инсулин натошак, мкЕД/мл	2,83 (1,92; 4,77)	4,68 (3,7; 5,06)	4,28 (3,63; 6,51)
Гликемический индекс	2,07 ± 1,09	1,03 ± 0,21	1,00 ± 0,47
Инсулиногенный индекс	0,66 (0,33; 1,53)	4,18 (1,16; 16,37)	1,15 (0,23; 2,17)
Инсулин 45 мин, мкЕД/мл	14,54 (10,10; 19,19) ^c	5,51 (3,05; 17,56)	9,71 (7,56; 11,56) ^c
Глюкоза 90 мин, ммоль/л	9,11 ± 4,16 ^a	8,88 ± 4,43 ^a	6,78 ± 1,83 ^a

Примечание:^a - уровень значимости $< 0,05$ ($p < 0,05$) по сравнению со значениями базальной глюкозы в соответствующем периоде (исходные значения, 14 дней введения гликвидона, 5 день отмены);

^c - уровень значимости $< 0,05$ ($p < 0,05$) по сравнению со значениями базального инсулина в соответствующем периоде (исходные значения, 14 дней введения гликвидона, 5 день отмены);

¹ - уровень значимости $< 0,05$ ($p < 0,05$) по сравнению с исходными значениями

Таблица 2

Экспрессия в «+» гликопротеина-P в тканях кроликов после введения гликвидона (10 мг/кг) на фоне нормы (Mode (R)/Media (Iq; uq))

Орган	Контроль (интактные кролики) (n=8)	14 дней введения гликвидона (n=8)	5-й день отмены гликвидона (n=8)
Тошная кишка	2(1)/2 (2;2)	2(0)/2 (2;2)	2(0)/2 (2;2)
Печень	2(1)/2 (2;2)	2(1)/2 (2;2)	2(0)/2 (2;2)
Почка	1 (0)/1 (1;1)	1 (0)/1 (1;1)	1 (0)/1 (1;1)
Мозг	2(1)/2 (2;2)	2(0)/2 (2;2)	2(1)/2 (2;2)

Примечание: статистически достоверных изменений не обнаружено.

На фоне СД 2-го типа (табл. 3) наблюдалось статистически достоверное снижение уровня инсулина на 45 минуту после глюкозной нагрузки на 47,5% ($p < 0,05$) по сравнению с исходными значениями. На фоне 14-дневного введения гликвидона животным с СД 2-го типа наблюдалось статистически достоверное увеличение уровня инсулина на 142,82% ($p < 0,05$) на 45 минуту после глюкозной нагрузки по сравнению со значениями на фоне СД 2-го типа и его восстановление до уровня исходных значений. На 5-й день отмены гликвидона имела место тенденция к снижению ($p > 0,05$) уровня инсулина. Также наблюдалось статистически достоверное увеличение уровня глюкозы натощак на фоне СД 2-го типа на 29,07% ($p < 0,05$) и на 5-й день отмены препарата на 30,67% ($p < 0,05$) по сравнению с исходными значениями, соответственно. После 14-дневного введения гликвидона на фоне СД 2-го типа уровень тощачевой глюкозы нормализовался (\downarrow на 19,26% ($p < 0,05$) по сравнению со значениями на фоне СД 2-го типа). На фоне СД 2-го типа наблюда-

лось статистически достоверное увеличение уровня глюкозы на 90 минуту на 142,64% ($p < 0,05$) и на 120 минуту на 153,91% ($p < 0,05$) после глюкозной нагрузки по сравнению с исходными значениями. Зафиксирована нормализация уровня глюкозы после 14-дневного введения гликвидона на фоне СД 2-го типа (на 90 минуту после глюкозной нагрузки \downarrow на 54,49% ($p < 0,05$), на 120 минуту \downarrow на 58,39% ($p < 0,05$) по сравнению со значениями на фоне СД 2-го типа). На 5-й день отмены препарата наблюдался рост концентрации глюкозы на 90 минуту на 131,94% ($p < 0,05$) по сравнению с исходными значениями, на 120 минуту после глюкозной нагрузки на 100,43% ($p < 0,05$) по сравнению с исходными значениями и на 89,71% ($p < 0,05$) по сравнению со значениями на фоне 14-дневной терапии гликвидоном. Выявлено статистически достоверное снижение ($p < 0,05$) инсулиногенного индекса на фоне СД 2-го типа и на 5-й день отмены гликвидона, показатель восстанавливался только после 14 дней введения препарата на фоне СД 2-го типа.

Таблица 3

Изменения уровней инсулина и глюкозы после терапии СД 2-го типа гликвидоном (10 мг/кг) (Mean \pm SD или Media (Iq; uq))

Исследуемые параметры	Исходные значения (n=8)	Значения на фоне СД 2-го типа (n=8)	14 дней введения гликвидона на фоне СД 2-го типа (n=8)	5 день отмены гликвидона на фоне СД 2-го типа (n=8)
Глюкоза натощак, ммоль/л	6,88 (5,52; 7,68)	8,88 (7,77; 9,86) ¹	7,17 (6,91; 7,85) ²	8,99 (7,80; 9,67) ¹
Инсулин натощак, мкЕД/мл	6,58 (4,83; 7,36)	5,55 (5,08; 6,31)	6,2 (5,03; 7,45)	5,67 (4,92; 5,98)
Гликемический индекс	1,1235 \pm 0,382	1,5391 \pm 0,391	1,2275 \pm 0,3729	1,5983 \pm 0,335
Инсулиногенный индекс	0,6841 (0,3923; 2,6016)	0,0215 (-0,0904; 0,0438) ¹	0,3319 (0,151; 0,6017)	-0,0163 (-0,0676; 0,255) ¹
Инсулин 45 мин, мкЕД/мл	16,59 (13,05; 28,10) ^c	8,71 (6,70; 10,03) ¹	21,15 (16,02; 25,38) ^{c,2}	10,02 (8,67; 20,46) ^c
Глюкоза 90 мин, ммоль/л	7,20 (5,87; 8,22) ^{a,b}	17,47 (16,08; 18,49) ^{a,1}	7,95 (7,36; 8,92) ^{a,b,2}	16,70 (15,02; 18,58) ^{a,1}
Глюкоза 120 мин, ммоль/л	6,90 (5,46; 7,62)	17,52 (16,38; 18,84) ^{a,1}	7,29 (6,94; 8,05) ²	13,83 (12,13; 18,31) ^{a,1,2,3}

Примечание:

^a - уровень значимости $< 0,05$ ($p < 0,05$) по сравнению со значениями базальной глюкозы в соответствующем периоде (исходные значения, СД 2-го типа, 14 дней введения гликвидона на фоне СД 2-го типа, 5 день отмены);

^b - уровень значимости $<0,05$ ($p<0,05$) по сравнению со значениями глюкозы на 120 минуту после глюкозной нагрузки в соответствующем периоде (исходные значения, СД 2-го типа, 14 дней введения гликвидона на фоне СД 2-го типа, 5 день отмены);

^c - уровень значимости $<0,05$ ($p<0,05$) по сравнению со значениями базального инсулина в соответствующем периоде (исходные значения, СД 2-го типа, 14 дней введения гликвидона на фоне СД 2-го типа, 5 день отмены);

¹ - уровень значимости $<0,05$ ($p<0,05$) по сравнению с исходными значениями;

² - уровень значимости $<0,05$ ($p<0,05$) по сравнению со значениями на фоне СД 2-го типа;

³ - уровень значимости $<0,05$ ($p<0,05$) по сравнению со значениями после 14 дней введения гликвидона кроликам на фоне СД 2-го типа

14-дневная терапия СД 2-го типа гликвидоном приводила к увеличению ($p<0,05$) экспрессии Р-гр в тканях тощей кишки, печени и почек и ее восстановлению до уровня исходных значений в группе контроля. На 5-й день отмены препарата вновь наблюдалось снижение ($p<0,05$) экспрессии Р-гр в тканях тощей кишки и печени. Несмотря на тенденцию к снижению экспрессии АВСВ1 белка в

почках, его уровень в указанном органе на 5-й день отмены гликвидона статистически значимо не изменился ($p>0,05$). В гематоэнцефалическом барьере головного мозга достоверные изменения экспрессии Р-гр в изучаемые сроки не наблюдались (табл. 4, 5). Полученные изменения экспрессии АВСВ1 белка, видимо, связаны с изменениями уровней его эндогенных регуляторов – инсулина и глюкозы.

Таблица 4

Экспрессия в «+» гликопротеина-Р в тканях кроликов после введения гликвидона (10 мг/кг) на фоне аллоксан-индуцированного СД 2-го типа (Mode (R)/Media (Iq; uq))

Орган	Контроль (n=8)	СД 2-го типа (n=8)	14 дней введения гликвидона на фоне СД 2-го типа (n=8)	5-й день отмены гликвидона на фоне СД 2-го типа (n=8)
Тощая кишка	2(1)/ 2 (2;2)	0(1)/ 0 (0;1) ¹	2 (1)/ 2 (2;2) ²	1 (1) 1 (0; 1) ^{1, 3}
Печень	2(1)/ 2 (2;2)	1(1)/ 1 (1;1) ¹	2 (1)/ 2 (2;2) ²	1(1)/ 1 (1;1) ^{1, 3}
Почка	1 (0)/ 1 (1;1)	0 (1)/ 0 (0;0,5) ¹	1 (1) 1(0;1)	0 (1) 0 (0;1)
Мозг	2(1)/ 2 (2;2)	2(0)/ 2 (2;2)	2(0)/ 2 (2;2)	2(0)/ 2 (2;2)

Примечание:



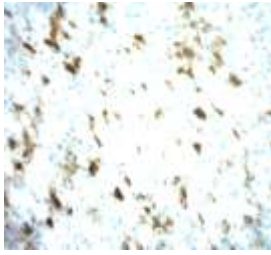


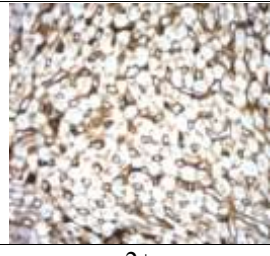


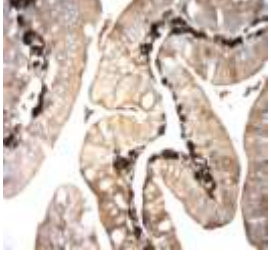







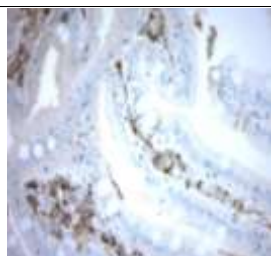

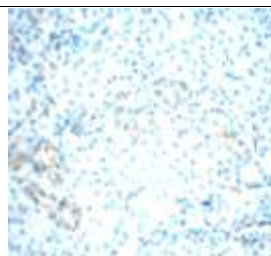

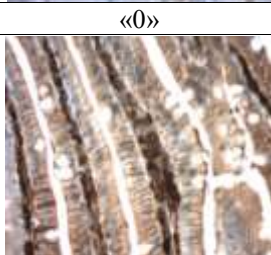
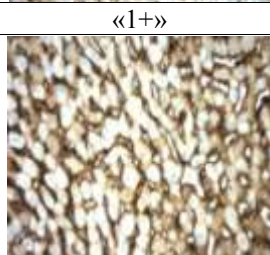
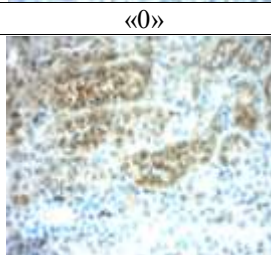
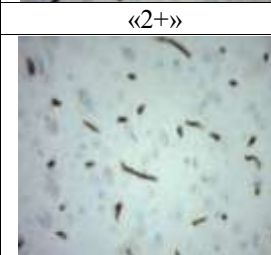
¹ - уровень значимости $<0,05$ ($p<0,05$) по сравнению с исходными значениями;

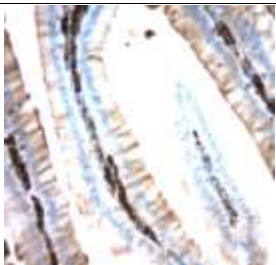


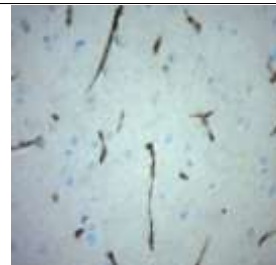
² - уровень значимости $<0,05$ ($p<0,05$) по сравнению со значениями на фоне СД 2-го типа;

³ - уровень значимости $<0,05$ ($p<0,05$) по сравнению со значениями после 14 дней введения гликвидона кроликам на фоне СД 2-го типа

Таблица 5

Иммуногистохимическая картина экспрессии гликопротеина-Р (×400 раз)

№	Тощая кишка	Печень	Почка	Головной мозг
1	 «0»	 «0»	 «0»	 «0»
2	 «2+»	 «2+»	 «1+»	 «2+»
3	 «2+»	 «2+»	 «1+»	 «2+»
4	 «2+»	 «2+»	 «1+»	 «2+»
5	 «0»	 «1+»	 «0»	 «2+»
6	 «2+»	 «2+»	 «1+»	 «2+»

	«2+»	«2+»	«1+»	«2+»
7				
	«1+»	«1+»	«0»	«2+»

Примечание:

- 1 – Без первичных антител в тканях интактных кроликов;
- 2 – С первичными антителами (группа контроля) в тканях интактных кроликов;
- 3 – 14-дневное введение гликвидона на фоне нормы;
- 4 – 5-й день отмены гликвидона на фоне нормы;
- 5 – аллоксан-индуцированный СД 2-го типа;
- 6 – 14-дневная терапия гликвидоном на фоне аллоксан-индуцированного СД 2-го типа;
- 7 – 5-й день отмены гликвидона на фоне аллоксан-индуцированного СД 2-го типа

Выводы

Таким образом, внутрижелудочное введение интактным кроликам гликвидона в дозе 10 мг/кг массы тела в течение 14 дней не вызывает достоверных изменений экспрессии Р-гр в тканях тощей кишки, печени, почек и гематоэнцефалическом барьере головного мозга, несмотря на снижение уровня тощачковой глюкозы крови – эндогенного ингибитора ABCB1 белка. На фоне аллоксан-индуцированного СД 2-го типа наблюдается снижение экспрессии Р-гр в тканях тощей кишки печени и почек, при этом 14-дневная фар-

макотерапия СД 2-го типа гликвидоном в дозе 10 мг/кг массы способствует ее восстановлению на фоне нормализации уровней эндогенных регуляторов белка-транспортера. На 5-й день отмены гликвидона вновь наблюдается ингибирование экспрессии Р-гр в тканях тощей кишки и печени, сопровождающееся увеличением уровней базальной и постпрандиальной глюкозы крови, а также снижением инсулиногенного индекса. Экспрессия Р-гр в тканях коры больших полушарий головного мозга на протяжении всего исследования оставалась без изменений.

Конфликт интересов отсутствует.

Литература

1. Абдуллоев Д.А., Набиев М.Х., Билолов М.К., Бегаков У.М. Предотвращение ампутации у больных с осложнёнными формами синдрома диабетической стопы // Наука молодых (Eruditio Juvenium). 2015. №4. С. 50-55
2. Виноградов А.А., Андреева И.В., Авад Али Риядх. Влияние алкилселено-нафтиридина на развитие диабетической кардиомиопатии при стрептозотоциновом сахарном диабете // Наука молодых (Eruditio Juvenium). 2015. №4. С. 33-39.
3. Дедов И.И., Мельниченко Г.А. Алгоритм специализированной медицинской помощи больным сахарным диабетом. М., 2015. Вып. 7. 112 с.
4. Дедов И.И., Мельниченко Г.А. Эндокринология: национальное руководство. Краткое издание. М.: ГЭОТАР-Медиа, 2013. 752 с.
5. Якушева Е.Н., Титов Д.С., Никифоров А.А. Влияние комбинации вилдаглиптина и гликвидона на функциональную активность и экспрессию гликопротеина-Р на фоне нормы и при экспериментальном аллоксан-индуцированном сахар-

ном диабете 2-го типа // Российский медико-биологический вестник имени академика И.П. Павлова. 2016. Т. 24, №3. С. 53-66, doi:10.17816/PAVLOVJ2016353-66.

6. Shukla R., Anand K., Prabhu K.M., Murthy P.S. Hypoglycaemic effect of the water extract of *Ficus bengalensis* in alloxan re-

covered, mildly diabetic and severely diabetic rabbits // International Journal of Diabetes in Developing Countries. 1994. Vol. 14. P. 78-81.

7. Тиц Н. Энциклопедия клинических лабораторных тестов. М.: Лабинформ, 1997. Т. 6. 948 с.

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ

Якушева Е.Н. – д.м.н., профессор, зав. кафедрой фармакологии с курсом фармации ФДПО, Рязанский государственный медицинский университет им. акад. И.П. Павлова, г. Рязань, Российская Федерация.
E-mail: e.yakusheva@rzgmu.ru

Титов Дмитрий Сергеевич – ассистент кафедры фармакологии с курсом фармации ФДПО, Рязанский государственный медицинский университет им. акад. И.П. Павлова, г. Рязань, Российская Федерация.
E-mail: i3762@yandex.ru (автор, ответственный за переписку)

ОРИГИНАЛЬНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

© Yakusheva E.N., Titov D.S., 2017

УДК 615.252.349.015.4

DOI:10.23888/HMJ20172208-224

GLIQUIDONE INFLUENCE ON THE P-GLYCOPROTEIN EXPRESSION ON THE BACKGROUND OF NORM AND EXPERIMENTAL ALLOXAN-INDUCED DIABETES MELLITUS TYPE 2

E.N. YAKUSHEVA, D.S. TITOV

Ryazan State Medical University, Vysokovoltnaya str., 9, 390026, Ryazan, Russian Federation

In recent years in the pharmacokinetics of drugs more and more importance is attached to proteins-transporters, most clinically significant of which is the P-glycoprotein (P-gp, ABCB1 protein, MDR1), due to its broad substrate specificity and localization in the body.

In in vivo study at intact rabbits and rabbits with experimental alloxan-induced diabetes mellitus (DM) type 2 the effect of gliquidone on P-gp expression in jejunum, liver, kidney and blood-brain barrier was investigated by indirect immunohistochemistry method. Gliquidone administration (10 mg/kg) did not lead to changes of P-gp expression at intact rabbits, however, was accompanied by a decrease in the level of fasting blood glucose – endogenous inhibitor of the ABCB1 protein. These results were maintained on the 5th day of drug withdrawal. 14-days gliquidone therapy (10 mg/kg) of alloxan-induced diabetes type 2 showed restoring expression of ABCB1 protein in jejunum, liver and kidney reduced on the pathology background to the level of intact rabbits, while there was normalization of carbohydrate metabolism. On the 5th day of gliquidone withdrawal inhibition of P-gp expression was occurred again in jejunum and liver. It is likely that the observed decrease in the P-gp expression on a background of diabetes type 2 was associated with an increase glucose levels in blood and decrease insulin concentration – endogenous inducer of transporter protein. In the therapy by gliquidone normalization of carbohydrate metabolism and as a consequence restoring of declined on the background of the pathology ABCB1 protein expression were observed. On the 5th day of gliquidone withdrawal increase in blood glucose level and decrease insulin concentration were observed. In the result reduction of the level of P-gp expression in the tissues of jejunum and liver, and a tendency to decrease in the kidneys were observed again.

Keywords: P-glycoprotein, gliquidone, diabetes 2 type.

According to the data of the World Health Organization (WHO) and International Diabetes Federation (IDF), 387 mln individuals world wide have diabetes mellitus (DM). Type II DM makes 90% of all cases of DM in the world. Taking into account 175 mln of undiagnosed cases of DM (according

to IDF) it becomes clear that an enormous amount of individuals do not suspect that diabetes in them progresses to development of late complications, diabetic nephropathy (DN) being one of them. DN is identified in 25% of patients with type II DM, it progresses to the final stage in a significant

part of patients and restricts potentials of pharmacotherapy of diabetes as such. According to recent clinical recommendations, the only derivative of sulfonylurea that can be used until the 4th stage of chronic kidney disease (GFR 29-15 ml/min/1,73 m² which is a severe reduction in GFR) inclusive without correction of dose, is gliquidone (1-4).

Type II DM with its inherent pathological complex leads to polypragmasy with a high risk of undesired drug-mediated interactions including pharmacokinetic ones in which increasing significance is assigned to transporter proteins with the glycoprotein-P being the most clinically important. The latter can be regulated both by exogenous compounds – medical drugs, and endogenous ones including insulin (endogenous inductor of P-gp) and glucose (endogenous inhibitor of P-gp) whose levels significantly differs in norm and in type II DM [5].

In view of the above, the aim of the given research work is to study the effect of gliquidone on expression of glycoprotein-P in tissues of the jejunum, liver, kidneys and cerebral cortices in norm and in type II DM.

Materials and methods

The research was conducted on 96 sexually mature male chinchilla rabbits with the average mass 3500-4500 g. The animals had the necessary veterinary certificates and were kept in standard conditions of the vivarium of FSBEI HE RyazSMU of Health Ministry of Russia. The animals were handled in accordance with the rules of laboratory practice (Suppl. to Order of Ministry of Health and Social Development of RF №708Н of 23.08.2010 g.).

According to the objectives of the experiment, the rabbits were divided into 6 groups. Animals of the 2nd and 4th groups were divided into two subgroups. In the 1st group (n=8) the level of expression was studied in tissues of the jejunum, liver, kidneys and cerebral cortices in norm. Selection of tissues is determined by their role in absorption, elimination and distribution of medical drugs, and also by the primary localization of P-gp. In the 2nd group (n=16) the effect of gliquidone (10 mg/kg) on expression of

ABCB1 protein in the mentioned tissues was studied after introduction of the drug within 14 days (1st subgroup n=8) and on the 5th day of its cancellation (2nd subgroup n=8). In the 3^d group (n=16) type II DM was modelled, and expression of P-gp in the mentioned tissues was studied with the underlying pathology (n=8). In the 4th group type-II DM was preliminarily modelled (n=32), and the effect of gliquidone (10 mg/kg) on expression of the transporter protein was studied after 14-day treatment of type II DM with gliquidone (n=8) and on the 5th day of its cancellation (n=8). In the 5th group (n=8) insulin and glucose levels were studied in dynamics in intact rabbits, after 14-days introduction of gliquidone and on the 5th day of its cancellation. In the 6th group (n=16) insulin and glucose levels were studied in intact rabbits, with the underlying type II DM, after 14-days treatment with gliquidone and on the 5th day of its cancellation.

Type II DM was modelled by one-time intravenous injection of fresh-made alloxan-monohydrate solution («Sigma») in citrate buffer (pH=4,0) in the dose 80 mg/kg of mass. Insulin concentrations were determined in fasting condition, on the 10th and 45th minute; glucose concentrations were determined in fasting condition, on the 10th, 90th minute (on the 120th minute for series with pathology) after oral glucose load (3 g/kg). Glycemic index (ratio of basal glucose to basal insulin level in blood) and insulino-genic index (ratio of buildup of insulin to buildup of glucose in blood on the 10th minute after peroral glucose load) were calculated (tabl. 1, 3). Type II DM was confirmed in 30 days by the fasting glucose level not more than 13,89 mmol/l with preserved secretion of basal insulin, by concentration of postprandial glucose different from concentration of basal glucose, by decreased insulino-genic index and by insulin level on the 45th minute after glucose load [5, 6].

The level of glucose (mmol/l) was determined in venous blood serum by glucosidase method using «Human» kits (Germany), and the level of insulin (μUnit/ml) – using radioimmunoassay method with «Immu-

notech» kit (Czech Republic) in the central research laboratory (CRL) of RyazSMU. As an express-method for determination of blood glucose level in the whole blood electrochemical glucometer One Touch Ultra Easy was used [7].

Expression of P-gp was determined in vivo by indirect immunohistochemical method in CRL of RyazSMU. For this, the rabbits were withdrawn from the experiment by method of air embolism.

Histological material was subject to standard processing: dehydration in ethyl alcohol solution of increasing concentration, decoloration with xyloland subsequent incorporation into paraffin. Before reaction of immunostaining, tissue antigenretrieval was conducted by heating in water-bath in 10 mM citrate buffer (pH=6,0) with blocking endogenous peroxidase with 3% hydrogen peroxide solution. After that sections with primary antibodies to P-gp ((ABC B1 antibody – middle region, 100 µl (Aviva Systems Biology ARP51326_P050, USA)) were incubated in 1:50 dilution by standard methods. For immunostaining polymer detection system with peroxidase label («Leica Microsystems», Germany) was used. Cell nuclei were counterstained with hematoxylin.

Photos of the micropreparation were taken by Canon Power Shot G5 digital camera with 400x magnification. In each histological preparation 10 representative areas were evaluated (10 photos). Images were further analyzed using «Image J» program for analysis and processing of digital images, and «IHC Profiler» plugin specially designed for quantitative immunohistochemical analysis. The level of expression was determined by «+» depending on the intensity and the area of staining («+++» – high expression, «++» – moderate expression, «+» – weak expression, 0 – absence of expression). Intensity of «diaminobenzidine» staining was evaluated quantitatively in the range from 0 (black) to 255 (white).

The obtained experimental data were subject to mathematico-statistical processing using office software package «Microsoft Office XP», and Statistica 8.0 and IBM SPSS

Statistics 20 programs. Distribution of data was evaluated by Shapiro-Wilk statistics.

To evaluate statistical significance of changes in the levels of insulin, glucose and related indices (in case of normal distribution of data) the null hypothesis in series consisting of more than two dependent groups was checked by repeated measures analysis of variance (ANOVA). To evaluate parameters with other than normal distribution, Friedman's criterion was used. As methods of multiple comparisons, parametric and non-parametric variants of Newman-Keuls tests were used.

Statistical significance of parametric data in a series consisting of two dependent groups was tested by paired Student test. For evaluation of parameters with other than normal distribution Wilcoxon criterion was used.

For data with normal distribution the arithmetic mean (Mean) and standard deviation (SD) were calculated. For data with other than normal distribution, median (Median), upper and lower quartiles (uq; lq) were calculated.

Statistical significance of changes in P-gp expression was studied by non-parametric methods. For check of the null hypothesis Kruskal-Wallis test was used, and as a method of multiple comparison non-parametric variant of Newman-Keuls test was used.

For description of data mode (Mode) and range (R) of variation, and also median (Median), upper quartiles and lower (uq; lq) were used.

Results and Discussion

In introduction of gliquidone in the dose 10 mg/kg of mass within 14 days a statistically reliable reduction in the average fasting glucose level by 17,4% ($p < 0,05$) after 14-days introduction was noted and remained reduced by 20,74% ($p < 0,05$) even on the 5th day after cancellation of the drug (tabl. 1). In conditions of reduced level of endogenous inhibitor of P-gp – glucose, induction of P-gp was expected. However, this did not occur. Expression of P-gp in tissues of the jejunum, liver and of hematoencephalic barrier of the brain after 14-days introduction of gliquidone to intact rabbits and on the 5th day after its cancellation remained unchanged (tabl. 2, 5).

Table 1

Changes in Insulin and Glucose Levels after Introduction of Gliquidone (10 mg/kg) in Norm (Mean±SD or Media (lq; uq))

Parameter	Initial values (n=8)	14 days of introduction of gliquidone (n=8)	5 th day of cancellation of gliquidone (n=8)
Fasting glucose level, mmol/l	5,69 ± 0,95	4,70 ± 1,36 ¹	4,51 ± 1,15 ¹
Fasting insulin level, μUnit/ml	2,83 (1,92; 4,77)	4,68 (3,7; 5,06)	4,28 (3,63; 6,51)
Glycemic index	2,07 ± 1,09	1,03 ± 0,21	1,00 ± 0,47
Insulinogenic index	0,66 (0,33;1,53)	4,18 (1,16; 16,37)	1,15 (0,23; 2,17)
Insulin 45 th min, μUnit/ml	14,54 (10,10; 19,19) ^c	5,51 (3,05; 17,56)	9,71 (7,56; 11,56) ^c
Glucose 90 th min, mmol/l	9,11 ± 4,16 ^a	8,88 ± 4,43 ^a	6,78 ± 1,83 ^a

Note:

^a - level of significance <0,05 (p<0,05) compared with the basal glucose values in the respective period (initial values, 14 days of gliquidone introduction, 5th day of cancellation);

^c - level of significance <0,05 (p<0,05) compared with the basal insulin values in the respective period (initial values, 14 days of gliquidone introduction, 5th day of cancellation);

¹ - level of significance <0,05 (p<0,05) compared with the initial values.

Table 2

Expression of Glycoprotein-P in Rabbits' Tissues after Introduction of Gliquidone (10 mg/kg) in Norm (Mode (R)/Media (lq; uq))

Organ	Control (intact rabbits) (n=8)	14 days of gliquidone introduction (n=8)	5 day of gliquidone cancellation (n=8)
Jejunum	2(1)/2 (2;2)	2(0)/2 (2;2)	2(0)/2 (2;2)
Liver	2(1)/2 (2;2)	2(1)/2 (2;2)	2(0)/2 (2;2)
Kidney	1 (0)/1 (1;1)	1 (0)/1 (1;1)	1 (0)/1 (1;1)
Brain	2(1)/2 (2;2)	2(0)/2 (2;2)	2(1)/2 (2;2)

Note: no statistically significant changes were found.

In type II DM (tabl. 3) there was noted a statistically reliable reduction in insulin level by 47,5% (p<0,05) on the 45th minute after glucose load compared with the initial values. With 14-day introduction of gliquidone into animals with type II DM a statistically reliable increase in insulin level by 142,82% (p<0,05) on the 45th minute after glucose load compared with type II DM, and its recovery to the initial level were observed. On the 5th day after cancellation of gliquidone a tendency to decrease in insulin level (p<0,05) was noted. There was also noted a statistically reliable increase in fasting glucose level by 29,07% in type II DM and by 30,67% (p<0,05) on the 5th day after cancellation of the drug compared with the initial values, respectively. After 14-days of introduction of gliquidone with the

underlying type II DM the fasting glucose level normalized ((↓ by 19,26% (p<0,05) compared with the values in type II DM)). With the underlying type II DM a statistically reliable increase in blood glucose level by 142,64% (p<0,05) on the 90th minute and by 153,91% (p<0,05) on the 120th minute after glucose load compared with the initial values was noted. Normalization of glucose level after 14-day introduction of gliquidone with the underlying type II DM ((↓ by 54,49% (p<0,05) on the 90th minute after glucose load and ↓ by 58,39% (p<0,05) on the 120th minute compared with the values in type II DM)) was recorded. On the 5th day of cancellation of the drug glucose concentration increased by 131,94% (p<0,05) on the 90th minute compared with the initial values, by 100,43%

($p < 0,05$) on the 120th minute after glucose load compared the initial values and by 89,71% ($p < 0,05$) compared with the values in 14-day therapy with gliquidone. A statistically reliable reduction ($p < 0,05$) in insulinogenic

index was revealed in type II DM and on the 5th day after cancellation of gliquidone, with the recovery of the index only after 14 days of introduction of the drug in type II DM.

Table 3

Changes in Insulin and Glucose Levels after Therapy of Type II DM with Gliquidone (10 mg/kg) (Mean±SD or Media (lq; uq))

Parameter	Initial values (n=8)	Values in type II DM (n=8)	Introduction of gliquidone within 14 days in type II DM (n=8)	5 th day of cancellation of gliquidone in type II DM (n=8)
Fasting glucose, mmol/l	6,88 (5,52; 7,68)	8,88 (7,77; 9,86) ¹	7,17 (6,91; 7,85) ²	8,99 (7,80; 9,67) ¹
Fasting insulin, μUnit/ml	6,58 (4,83; 7,36)	5,55 (5,08; 6,31)	6,2 (5,03; 7,45)	5,67 (4,92; 5,98)
Glycemic index	1,1235 ±0,382	1,5391 ±0,391	1,2275 ±0,3729	1,5983 ±0,335
Insulinogenic index	0,6841 (0,3923; 2,6016)	0,0215 (-0,0904; 0,0438) ¹	0,3319 (0,151; 0,6017)	-0,0163 (-0,0676; 0,255) ¹
Insulin 45 th min, μUnit/ml	16,59 (13,05; 28,10) ^c	8,71 (6,70; 10,03) ¹	21,15 (16,02; 25,38) ^{c,2}	10,02 (8,67; 20,46) ^c
Glucose 90 th min, mmol/l	7,20 (5,87; 8,22) ^{a,b}	17,47 (16,08; 18,49) ^{a,1}	7,95 (7,36; 8,92) ^{a,b,2}	16,70 (15,02; 18,58) ^{a,1}
Glucose 120 th min, mmol/l	6,90 (5,46; 7,62)	17,52 (16,38; 18,84) ^{a,1}	7,29 (6,94; 8,05) ²	13,83 (12,13; 18,31) ^{a,1,2,3}

Note:

^a - level of significance $< 0,05$ ($p < 0,05$) compared with the basal glucose values in the respective period (initial values, type II DM, 14 days of gliquidone introduction in type II DM, 5th day of cancellation);

^b - level of significance $< 0,05$ ($p < 0,05$) compared with glucose values on the 120th minute after glucose load in the respective period (initial values, type II DM, 14 days of gliquidone introduction in type II DM, 5th day of cancellation);

^c - level of significance $< 0,05$ ($p < 0,05$) compared with the basal insulin values in the respective period (initial values, type II DM, 14 days of gliquidone introduction with type II DM, 5th day of cancellation);

¹ - level of significance $< 0,05$ ($p < 0,05$) compared with the initial values;

² - level of significance $< 0,05$ ($p < 0,05$) compared with the values in type II DM;

³ - level of significance $< 0,05$ ($p < 0,05$) compared with the values after 14-day introduction of gliquidone to rabbits with type II DM.

14-Day therapy of type II DM with gliquidone lead to increase ($p < 0,05$) in expression of P-gp in tissues of the jejunum, liver and kidney with its recovery to the initial values of the control group. On the 5th day of cancellation of the drug reduction ($p < 0,05$) in the expression of P-gp in tissues of the jejunum and kidney was noted again. Despite the tendency to reduction in expression of ABCB1 protein in kidney, its level in

this organ did not show any statistically significant changes ($p < 0,05$) on the 5th day after cancellation of the drug. In the hematoencephalic barrier in the brain no reliable changes in expression of P-gp were noted in the period of observation (tabl. 4, 5). The obtained changes in expression of ABCB1 protein are probably associated with changes in the levels of its endogenous regulators – insulin and glucose.

Table 4

Expression of Glycoprotein-P in «+» in Rabbits' Tissues after Introduction of Gliquidone (10mg/kg) in Alloxan-Induced Type II DM (Mode (R)/Media (lq; uq))

Organ	Control (n=8)	Type II DM (n=8)	Introduction of gliquidone within 14 days in type II DM (n=8)	5 th day of cancellation of gliquidone in type II DM (n=8)
Jejunum	2(1)/ 2 (2;2)	0(1)/ 0 (0;1) ¹	2 (1)/ 2 (2;2) ²	1 (1) 1 (0; 1) ^{1, 3}
Liver	2(1)/ 2 (2;2)	1(1)/ 1 (1;1) ¹	2 (1)/ 2 (2;2) ²	1(1)/ 1 (1;1) ^{1, 3}
Kidney	1 (0)/ 1 (1;1)	0 (1)/ 0 (0;0,5) ¹	1 (1) 1(0;1)	0 (1) 0 (0;1)
Brain	2(1)/ 2 (2;2)	2(0)/ 2 (2;2)	2(0)/ 2 (2;2)	2(0)/ 2 (2;2)

Note:



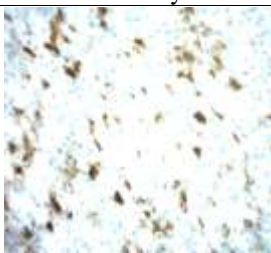


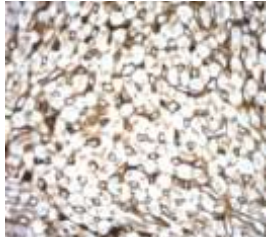


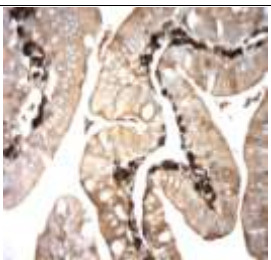

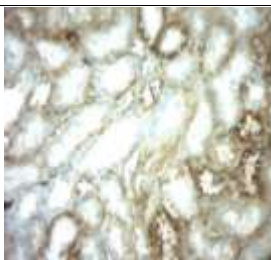

¹ –level of significance <0.05 (p<0.05) compared with the initial values;







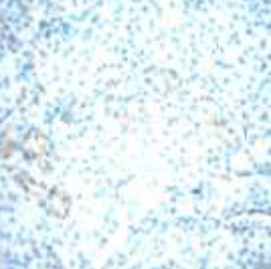

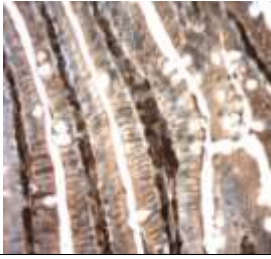

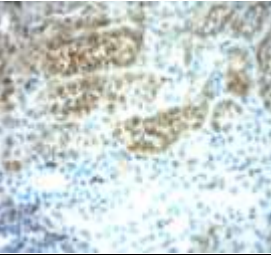

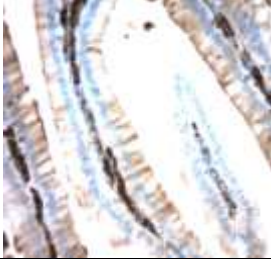



² –level of significance <0.05 (p<0.05) compared with the values in type II DM;

³ –level of significance <0.05 (p<0.05) compared with the values after 14-day introduction of gliquidone into rabbits with type II DM.

Table 5

Imunohistochemical Picture of Expression of Glycoprotein P (400x magnification)

№	Jejunum	Liver	Kidney	Brain
1				
	«0»	«0»	«0»	«0»
2				
	«2+»	«2+»	«1+»	«2+»
3				
	«2+»	«2+»	«1+»	«2+»

4	 «2+»	 «2+»	 «1+»	 «2+»
5	 «0»	 «1+»	 «0»	 «2+»
6	 «2+»	 «2+»	 «1+»	 «2+»
7	 «1+»	 «1+»	 «0»	 «2+»

Note:

- 1 – without primary antibodies in tissues of intact rabbits;
- 2 – with primary antibodies (control group) in tissues of intact rabbits;
- 3 – 14-day introduction of gliquidone in norm;
- 4 – 5th day after cancellation of gliquidone in norm;
- 5 – alloxan-induced type II DM;
- 6 – 14-day therapy with gliquidone in alloxan-induced type II DM;
- 7 – 5th day after cancellation of gliquidone in alloxan-induced type II DM.

Conclusions

Thus, intragastric introduction of gliquidone into intact rabbits in the dose 10 mg/kg of body mass within 14 days causes no reliable changes in expression of P-gp in tissues of the jejunum, liver, kidneys and in hematoencephalic barrier of the brain despite reduction in the fasting level of glucose –

endogenous inhibitor of ABCB1 protein. With the underlying alloxan-induced type II DM reduction in expression of P-gp in tissues of the jejunum and kidneys was observed; here, 14-day pharmacotherapy of type II DM with gliquidone in the dose 10 mg/kg of mass promotes recovery of expression with the underlying normalization of the

levels of endogenous regulators of the transporter protein. On the 5th day of cancellation of gliquidone inhibition of expression of P-gp in the jejunal and hepatic tissues was observed again accompanied by increase in the

levels of basal and postprandial blood glucose, and also by reduction in the insulinogenic index. Expression of P-gp in tissues of cerebral cortices remained unchanged during the whole period of research.

No conflict of interest.

References

1. Abdulloev DA, Nabiev MH, Bilolov MK, Begakov UM. Predotvrachshenie amputacii u bol'nyh s oslozhnjonnymi formami sindroma diabeticheskoy stopy [Complex treatment of the complicated forms of diabetic foot syndrome]. *Nauka molodyh (Eruditio Juvenium)* [Science of the young (Eruditio Juvenium)]. 2015; (3) 4: 50-55. (in Russian)
2. Vinogradov AA, Andreeva IV, Avad Ali Rijadh. Vlijanie alkilselenonaftiridina na razvitie diabeticheskoy kardiomiopatii pri streptozotocinovom saharnom diabete [The influence of alkylselenonaftiridin on the development of diabetic cardiomyopathy in streptozotocin diabetes mellitus]. *Nauka molodyh (Eruditio Juvenium)* [Science of the young (Eruditio Juvenium)]. 2015; (3) 4: 33-39. (in Russian)
3. Dedov II, Melnichenko GA. *Algoritm specializirovannoj medicinskoj pomoshhi bol'nym saharnym diabetom* [Algorithm for specialized medical assistance to patients with diabetes mellitus]. M., 2015. Vol. 7. 112 p. (in Russian)
4. Dedov II, Melnichenko GA. *Endokrinologija: nacional'noe rukovodstvo. Kratkoe izdanie* [Endocrinology: national guidelines. Brief Edition]. M.: GEOTAR-Media; 2013. 752 p. (in Russian)
5. Yakusheva EN. Vlijanie kombinacii vildagliptina i glikvidona na funkcional'nuju aktivnost' i ekspressiju glikoproteina-P na fone normy i pri eksperimental'nom alloksan-inducirovannom saharnom diabete 2-go tipa. [Influence of vildagliptin and gliquidone combination on P-glycoprotein functional activity and expression against the background norm and in experimental alloxan-induced type 2 diabetes mellitus]. *Rossijskij mediko-biologicheskij vestnik imeni akademika I.P. Pavlova* [I.P. Pavlov Russian Medical Biological Herald]. 2016; (24) 3: 53-66. doi: 10.17816/PAVLOVJ2016353-66. (in Russian)
6. Shukla R, Anand K, Prabhu KM, Murthy PS. Hypoglycaemic effect of the water extract of *Ficus bengalensis* in alloxan recovered, mildly diabetic and severely diabetic rabbits. *International Journal of Diabetes in Developing Countries*. 1994; (14): 78-81.
7. Tic N. *Enciklopedija klinicheskikh laboratornyh testov* [Encyclopedia of clinical laboratory tests]. Moscow: Labinform; 1997. T. 6. 948 p. (in Russian)

INFORMATION ABOUT THE AUTHORS

Yakusheva E.N. – MD, Professor, head the department of pharmacology with a course of pharmacy, Ryazan State Medical University, Ryazan, Russian Federation.
E-mail: e.yakusheva@rzgmu.ru

Dmitry Sergeevich Titov – assistant of the department of pharmacology with a course of pharmacy, Ryazan State Medical University, Ryazan, Russian Federation.
E-mail: i3762@yandex.ru (author responsible for correspondence)