

ФУНКЦИОНИРОВАНИЕ ГЛИКОПРОТЕИНА-P ПРИ ХИРУРГИЧЕСКОМ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОМ ГИПОТИРЕОЗЕ

Щулькин А.В., Якушева Е.Н., Черных И.В., Титов Д.С., Попова Н.М., Никифоров А.А.

Рязанский государственный медицинский университет им. акад. И.П. Павлова, г. Рязань, e-mail: p34-66@yandex.ru

В исследовании на кроликах породы шиншилла изучено функционирование гликопротеина-P (Pgp) при хирургическом экспериментальном гипотиреозе, моделируемом субтотальной резекцией щитовидной железы с оставлением паращитовидных желез. Функциональную активность Pgp определяли по фармакокинетике его маркерного субстрата – фексофенадина. Концентрацию фексофенадина в плазме крови кроликов определяли методом высокоэффективной жидкостной хроматографии. Уровни тиреоидных гормонов в сыворотке крови оценивали радиоиммунным методом. Установлено, что при хирургическом гипотиреозе максимальная концентрация фексофенадина (C_{max}) и площадь под фармакокинетической кривой концентрация время (AUC_{0-t}) увеличивались, общий клиренс (Cl) снижался. Выявлены корреляционные зависимости между уровнем ТТГ и C_{max} , AUC_{0-t} и Cl, концентрацией Т4 и C_{max}/AUC_{0-t} . Изменения параметров фармакокинетики фексофенадина свидетельствует о снижении функциональной активности Pgp при хирургическом экспериментальном гипотиреозе.

Ключевые слова: гликопротеин-P, ABCB1 белок, функциональная активность, фексофенадин, субтотальный хирургический гипотиреоз.

FUNCTIONING OF P-GLYCOPROTEIN ON SURGICAL EXPERIMENTAL HYPOTHYROIDISM

Shchulkin A.V., Yakusheva E.N., Chernykh I.V., Titov D.S., Popova N.M., Nikiforov A.A.

Ryazan State Medical University, Ryazan, e-mail: p34-66@yandex.ru

On Chinchilla rabbits was studied the functional activity of P-glycoprotein (Pgp) in chinchilla rabbits with surgical experimental hypothyroidism modelled by subtotal resection of the thyroid gland. Parathyroid glands were not resected. The functional activity of Pgp was determined by the pharmacokinetics of its marker substrate – fexofenadine. Concentration of fexofenadine in plasma was determined by method of highly effective liquid chromatography (HPLC). Serum blood levels of thyroid hormones (general T4, general T3, TTH) was investigated by radioimmune method. It was stated that the maximal concentration of fexofenadine (C_{max}), the area under pharmacokinetic concentration-time curve (AUC_{0-t}) increased, total clearance (Cl) decreased in experimental hypothyroidism. The correlation analysis revealed the significant relationship between the concentration of TTH and C_{max} , AUC_{0-t} and Cl, the level of T4 and C_{max}/AUC_{0-t} . The dynamic of fexofenadine pharmacokinetic parameters show a decrease in the functional activity of Pgp on surgical experimental hypothyroidism.

Keywords: P-glycoprotein, ABCB1, functional activity, fexofenadine, subtotal surgical hypothyroidism.

Гликопротеин-P (Pgp) – АТФ-зависимый мембранный белок-транспортер (ABCB1), обеспечивающий экскрецию липофильных эндогенных и экзогенных веществ из клетки. Локализуясь в эпителиоцитах кишечника, клетках печени, почек и эндотелиоцитах гистогематических барьеров, он играет важную роль в процессах всасывания, распределения и выведения лекарственных веществ, являющихся его субстратами [5].

Гормоны щитовидной железы оказывают множество эффектов на рост, развитие организма и обменные процессы. В исследованиях *in vitro* показано, что трийодтиронин (Т3) и тетраодтиронин (Т4) стимулируют экспрессию Pgp [3]. На кроликах породы шиншилла

выявлено, что тироксин дозозависимо повышает функциональную активность данного белка-транспортера на уровне целостного организма [2].

Целью настоящего исследования стала оценка функциональной активности Pgp при хирургическом экспериментальном гипотиреозе.

Материалы и методы исследования

Работа выполнена на 13 половозрелых кроликах-самках породы шиншилла, массой 3500–4300 г, находящихся в фазе диэструса, полученных из питомника ООО «Касимов-Миакро» и имеющих необходимые ветеринарные свидетельства. Экспериментальные исследования проводили в соответствии с правилами лабораторной практики (Приложение к приказу Министерства здравоохранения и социального развития Российской Федерации от 23 августа 2010 года 708н).

1-ю группу животных составили кролики, у которых оценивали функционирование Pgp после «ложной операции» (n=5); 2-ю группу – кролики, у которых определяли функциональную активность Pgp на фоне хирургического экспериментального гипотиреоза (n=8). «Ложная» операция заключалась во вскрытии кожных покровов и подкожной жировой клетчатки в проекции щитовидной железы с последующим послойным ушиванием раны. Хирургический экспериментальный гипотиреоз моделировали посредством субтотальной резекции щитовидной железы с оставлением паращитовидных желез. Оперативные вмешательства выполняли в условиях операционной после наркотизации животных введением рометара (ксилазина гидрохлорида) в дозе 4,0-6,0 мг/кг массы внутримышечно (в/м) с последующим (через 20 минут) в/м введением золетила-50 в дозе 5-10 мг/кг массы [1].

За 7 дней до операции, на 7-е, 14-е (животные 1-й и 2-й групп), 21-е и 28-е сутки после операции (животные 2-й группы) определяли функциональную активность Pgp по анализу фармакокинетики фексофенадина – маркерного субстрата данного белка-транспортера после его однократного перорального введения в дозе 30 мг/кг массы («Телфаст», SanofiAventis, Франция) [2] с последующим забором крови из краевой вены уха через 1; 2; 3; 4; 5; 6; 12 и 24 часа в гепаринизированные пробирки в объеме 5 мл.

Фексофенадин не подвергается метаболизму, и его фармакокинетика зависит исключительно от функционирования Pgp. Поэтому высокие концентрации фексофенадина в плазме крови кроликов и его медленное выведение свидетельствуют о низкой функциональной активности Pgp, и наоборот. Плазменные концентрации фексофенадина определяли методом ВЭЖХ на хроматографе Beckman Coulter (США) с УФ-детектированием по оригинальной методике [2]. В ходе исследования оценивали следующие фармакокинетические параметры фексофенадина: C_{max} – максимальная концентрация (нг/мл); AUC_{0-t} – площадь под кривой «концентрация - время» от нуля до времени

последнего забора крови ($\text{нг}\cdot\text{ч}/\text{мл}$); Cl – общий клиренс ($\text{мл}/\text{мин}$); $\text{C}_{\text{max}}/\text{AUC}_{0-t}$ – коэффициент абсорбции.

У животных 2-й группы в указанные сроки также определяли уровни тиреоидных гормонов (ТТГ, общий Т3, общий Т4) в сыворотке крови радиоиммунным методом с использованием стандартных тест-систем производства IMMUNOTECH (Чехия) и дальнейшей оценкой результатов на анализаторе «Иммунотест» (Россия) в ЦНИЛ РязГМУ.

Полученные результаты обрабатывали с помощью программ StatSoft Statistica 7.0 и «Биостат». Характер распределения данных оценивали по критерию Шапиро-Уилка. Для сравнения показателей, имеющих нормальное распределение, использовали тест ANOVA повторных измерений, а при распределении признаков, отличном от нормального, – критерий Фридмана. Различия между сериями определяли по критерию Ньюмена-Кейсла. Для анализа корреляции между гормональным статусом кроликов и фармакокинетическими параметрами фексофенадина использовали коэффициент корреляции Спирмена. Данные в таблицах представлены в виде 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 отличного от нормального распределения.

Результаты исследования и их обсуждение

Выполнение ложной операции не оказало влияния на фармакокинетические параметры маркерного субстрата Pgp - фексофенадина – на 7-е и 14-е сутки после оперативного вмешательства, что свидетельствует о сохранении функциональной активности белка-транспортера на исходном уровне (табл. 1).

Таблица 1

Основные фармакокинетические параметры фексофенадина после выполнения «ложной операции» ($n=5$)

Изучаемые параметры	Исходные значения	7-е сутки после «ложной операции»	14-е сутки после «ложной операции»
C_{max} , $\text{нг}/\text{мл}$	172,0 (95,7; 356,9)	139,3 (138,1; 173,4)	253,0 (164,7; 256,2)
AUC_{0-t} , ($\text{нг}/\text{мл}$) $\times\text{ч}$	746,4 (360,7; 1302,4)	1141,4 (627,7; 1224,9)	1750,7 (1634,6; 1793,3)
Cl , $\text{л}/\text{ч}$	396,7 \pm 408,9	294,8 \pm 211,4	102,4 \pm 61,6
$\text{C}_{\text{max}}/\text{AUC}_{0-t}$, $1/\text{ч}$	0,21 \pm 0,11	0,20 \pm 0,10	0,08 \pm 0,05

* - $p<0,05$ – достоверные различия по сравнению с показателями интактных животных (исходные значения).

Субтотальная резекция щитовидной железы приводила к развитию экспериментального гипотиреоза, о чем свидетельствуют изменения гормонального статуса кроликов (табл. 2). Концентрация ТТГ достоверно ($p<0,05$) повышалась на 7-е сутки эксперимента на 21,1%, на 14-е сутки – на 14,7%, на 21-е сутки – на 16,8%, на 28-е сутки – на 12,0%. Уровень Т3 снижался на 7-е и 14-е сутки послеоперационного периода на 45,4% ($p<0,05$) и 28,0% ($p<0,05$) соответственно, а в остальные сроки достоверно от исходных показателей не отличался. Содержание Т4 достоверно ($p<0,05$) уменьшалось на 7-е сутки на 45,6%, на 14-е сутки – на 26,1%, на 21-е сутки – на 21,7%, а на 28-е сутки – на 20,8%. Нормализация Т3 к 21-му дню исследования свидетельствует о регенерации щитовидной железы и восстановлении уровня, в первую очередь, наиболее активного гормона.

В таблице 2 представлены изменения фармакокинетики фексофенадина на фоне хирургического гипотиреоза. На 7-е сутки эксперимента C_{max} фексофенадина увеличивалась на 121,7% ($p<0,05$), AUC_{0-t} – на 231,3% ($p<0,05$), Cl уменьшался на 66,9% ($p<0,05$) по сравнению с исходными значениями. На 14-е сутки экспериментальной патологии C_{max} фексофенадина увеличивалась на 99,4% ($p<0,05$), AUC_{0-t} – на 218,9% ($p<0,05$), Cl уменьшался на 66,5% ($p<0,05$). На 21-е сутки исследования C_{max} фексофенадина превышала исходные показатели на 137,8% ($p<0,05$), AUC_{0-t} – на 308,6% ($p<0,05$), Cl был снижен на 75,0% ($p<0,05$). На 28-е сутки патологии C_{max} фексофенадина оставалась повышенной на 189,5% ($p<0,05$), AUC_{0-t} – на 247,6% ($p<0,05$) по сравнению со значениями интактных кроликов, Cl снижался на 66,7% ($p<0,05$). На протяжении всего исследования отношение C_{max}/AUC_{0-t} – показатель, характеризующий всасывание фексофенадина в кишечнике – достоверно по сравнению с показателями интактных животных не изменялось ($p>0,05$).

Таблица 2

Основные фармакокинетические параметры фексофенадина и гормональный статус кроликов на фоне хирургического экспериментального гипотиреоза (n=8)

Изучаемые параметры	Исходные значения	Сутки после субтотальной резекции щитовидной железы			
		7-е сутки	14-е сутки	21-е сутки	28-е сутки
C_{max} , нг/мл	119,6 (94,2; 175,3)	265,1 (153,7; 404,5)*	238,5 (187,7; 412,5)*	284,4 (200,1; 467,0)*	346,3 (175,2; 486,2)*
AUC_{0-t} , (нг/мл)×ч	829,9 (459,1; 1270,2)	2749,7 (1707,3; 4020,3)*	2647,3 (1426,0; 3297,4)*	3391,2 (2127,5; 4763,3)*	2884,6 (1535,9; 5347,6)*
Cl , л/ч	72,0 (36,8; 128,8)	23,8 (12,9; 40,7)*	24,1 (14,4; 52,8)*	18,0 (11,7; 36,4)*	24,0 (8,9; 42,9)*
C_{max}/AUC_{0-t} , 1/ч	0,14 (0,12; 0,22)	0,09 (0,09; 0,12)	0,12 (0,07; 0,20)	0,09 (0,08; 0,12)	0,12 (0,08; 0,14)

ТТГ, мМЕ/л	0,95±0,145	1,15±0,09*	1,09±0,064*	1,11±0,045*	1,08±0,04*
Общий Т3, нмоль/л.	9,52±1,174	5,20±1,574*	6,85±1,818*	8,48±1,219	8,18±1,440
Общий Т4, нмоль/л	13,99±2,497	7,61±3,039*	10,34±2,352*	10,96±1,735*	11,08±1,612*

* - $p < 0,05$ – достоверные различия по сравнению с показателями интактных животных (исходные значения).

При проведении корреляционного анализа были выявлены достоверные зависимости между концентрацией ТТГ и C_{max} ($R=0,39$, $p=0,012$), ТТГ и AUC_{0-t} ($R=0,525$, $p=0,0005$), ТТГ и Cl ($R=-0,46$, $p=0,003$), уровнем Т4 и C_{max}/AUC_{0-t} , ($R=0,38$, $p=0,016$).

Динамика параметров фармакокинетики фексофенадина – маркерного субстрата Pgp - указывает на более высокое содержание препарата в плазме крови у животных на фоне хирургического экспериментального гипотиреоза, что, в свою очередь, характеризует уменьшение функциональной активности белка-транспортера на организменном уровне. При проведении «ложной операции» функциональная активность Pgp оставалась на исходном уровне, что является подтверждением того, что изменение функционирования белка-транспортера связано именно с резекцией щитовидной железы.

Молекулярные механизмы изменения функционирования Pgp в настоящее время активно изучаются. Ведущую роль в данном процессе играет уровень экспрессии гена MDR1, кодирующего данный белок-транспортер.

Его повышенная экспрессия в нормальных и трансформированных клетках инициируется сигналами от большого количества стимулов, которые сходятся на общей области промотора гена MDR1, называемой «MDR1 enhanceosome» [4].

Тиреоидные гормоны могут повышать экспрессию Pgp, непосредственно взаимодействуя с промотором гена MDR1 или опосредованно, через прегнан-Х-рецептор [3]. Большинство эффектов гормонов щитовидной железы реализуется в результате их взаимодействия со специфическими ядерными рецепторами, которые всегда связаны с участками ДНК – «тиреоидчувствительными элементами» (thyroid response elements). В отсутствие гормонов соответствующие рецепторы ингибируют экспрессию генов, в присутствии тиреоидных гормонов блок снимается [6].

Выявленная в исследовании корреляционная зависимость между содержанием ТТГ - C_{max} , AUC_{0-t} и Cl при отсутствии достоверных связей с концентрациями Т3 и Т4 свидетельствует о том, что функционирование Pgp при хирургическом гипотиреозе зависит не столько от уровня тиреоидных гормонов, сколько от факта их дефицита, показателем которого является в первую очередь концентрация ТТГ.

Выводы

Таким образом, в настоящем исследовании установлено, что при хирургическом экспериментальном гипотиреозе у кроликов происходит снижение функциональной активности гликопротеина-P на уровне целостного организма, определяемой по фармакокинетике его маркерного субстрата – фексофенадина.

Список литературы

1. Разина А.В., Фролова А.И., Сергеев М.А. Оптимизация метода общей анестезии на кроликах // Актуал. вопросы ветер. биол. - 2010. - Т. 1, № 5. - С. 32-35.
2. Якушева Е.Н., Щулькин А.В., Бирюкова А.С. Дозозависимое влияние тироксина на функциональную активность гликопротеина-P в эксперименте // Биомедицина. - 2012. - № 2. - С. 53-60.
3. Mitin T. et al. Levothyroxine up-regulates P-glycoprotein independent of the pregnane X receptor // Drug Metab. Dispos. - 2004. - Vol. 32, № 8. - P. 779-782.
4. Scotto K.W., Johnson R.A. Transcription of MDR. A Therapeutic Target // Mol. Intervent. - 2001. - Vol. 1. - P. 117-125.
5. Sharom F.J. The P-glycoprotein multidrug transporter // Essays Biochem. - 2011. - Vol. 50, № 1. - P. 161–178.
6. Viguerie N., Langin D. Effect of thyroid hormone on gene expression // Curr. Opin. Clin. Nutr. Metab. Care. - 2003. - Vol. 6, № 4. - P. 377–381.

Рецензенты:

Ших Е.В., д.м.н., профессор, директор Института профессионального образования ГБОУ ВПО «Первый МГМУ им. И.М. Сеченова» Минздрава России, г. Москва;

Покровский М.В., д.м.н., профессор, заведующий кафедрой фармакологии ФГАОУ ВПО «Белгородский государственный национальный исследовательский университет» Министерства образования и науки Российской Федерации, г. Белгород.