НЕЙРОХИМИЯ, 2019, том 36, № 1, с. 84–88

МЕТОДЫ

УДК 615.357.015.45

МЕТОД АНАЛИЗА ФУНКЦИОНАЛЬНОЙ АКТИВНОСТИ ГЛИКОПРОТЕИНА-Р В ГЕМАТОЭНЦЕФАЛИЧЕСКОМ БАРЬЕРЕ

© 2019 г. И. В. Черных[1], А. В. Щулькин[1, *], П. Ю. Мыльников[1], М. В. Гацанога[1], Н. М. Попова[1], Е. Н. Якушева[1]

[1]*Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования "Рязанский государственный медицинский университет им. акад. И.П. Павлова" Министерства здравоохранения Российской Федерации, Рязань, Россия*

Поступила в редакцию 29.01.2018 г.
После доработки 09.04.2018 г.
Принята к публикации 20.04.2018 г.

В статье описан способ тестирования функциональной активности белка-транспортера гликопротеина-Р (Pgp) в гематоэнцефалическом барьере на крысах Вистар. Данный способ основан на исследовании фармакокинетики маркерного субстрата Pgp – фексофенадина после его однократного внутривенного введения в дозе 10 мг/кг. Количественное определение фексофенадина в плазме крови и гомогенате коры головного мозга крыс проводилось методом высокоэффективной жидкостной хроматографии с ультрафиолетовым детектированием. Для оценки проницаемости гематоэнцефалического барьера и активности Pgp, предлагается рассчитывать площадь под кривой концентрация фексофенадина в коре больших полушарий головного мозга–время ($AUC_{0\text{-}t(мозг)}$), отражающую общее количество фексофенадина, попавшее в мозг. Адекватность разработанного метода была подтверждена при введении крысам фексофенадина на фоне применения индуктора и ингибитора белка-транспортера.

Ключевые слова: гликопротеин-Р, фексофенадин, гематоэнцефалический барьер, фармакокинетика, верапамил, рифампицин, мексидол

DOI: 10.1134/S1027813319010060

Гематоэнцефалический барьер (ГЭБ) – физиологический барьер, защищающий центральную нервную систему от проникновения широкого спектра ксено- и эндобиотиков из системного кровотока. Одним из переносчиков, локализующихся в ГЭБ и препятствующих проникновению в мозг различных веществ, является гликопротеин-Р (Pgp, ABCB1-белок) [1]. Pgp – это АТФ-зависимый белок-транспортер, экспрессирующийся также в опухолевых клетках, гепатоцитах, энтероцитах кишечника, эпителии почечных канальцев, и выводящий вещества-субстраты из клеток в биологические жидкости (желчь, мочу, кровь) и просвет кишечника.

Данный белок-транспортер обладает широкой субстратной специфичностью: к числу его субстратов относятся дигоксин, дабигатрана этексилат, фексофенадин, домперидон и другие лекарственные вещества [1–3]. С повышением активности Pgp в ГЭБ связывают развитие лекарственно-резистентной эпилепсии, неэффективность фармакотерапии острого нарушения мозгового кровообращения и болезни Альцгеймера [4, 5].

Для разработки подходов к ингибированию Pgp с целью повышения эффективности фармакотерапии указанных заболеваний необходим адекватный метод оценки функционирования данного белка-транспортера локально в ГЭБ, что и послужило задачей настоящего исследования.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Оценку функциональной активности Pgp проводили путем определения фармакокинетики его маркерного субстрата – фексофенадина. Маркерный субстрат – это вещество экзогенного или эндогенного происхождения, фармакокинетика которого зависит в большей степени от функционирования данного белка-транспортера, т.е. он не подвергается биотрансформации и не является субстратом других белков-транспортеров.

Известно, что ряд лекарственных препаратов может модулировать активность Pgp. Так, введение индуктора белка-транспортера совместно с его субстратом приводит к снижению всасывания субстрата, уменьшению его проникновения через

* Адресат для корреспонденции: 390026 Россия, Рязань, ул. Высоковольтная, д. 9, тел.: 8-4912-460859, e-mail: alekseyshulkin@rambler.ru.

ГЭБ и ускорению выведения почками и печенью, а применение ингибитора Pgp – к обратному изменению фармакокинетики субстрата. Поэтому для подтверждения адекватности разработанного метода мы вводили животным фексофенадин совместно с индуктором (рифампицин) и ингибитором (верапамил и мексидол) Pgp.

Работа выполнена на 120 крысах-самцах вистар массой 200–350 г в соответствии с правилами лабораторной практики (приказ МЗ РФ № 199н от 1 апреля 2016 г.).

Животных рандомизировали на 4 группы. Первой группе (контроль, $n = 30$) в хвостовую вену вводили фексофенадин ("Аллегра", "Sanofi", Франция) в дозе 10 мг/кг [6].

Второй группе животных ($n = 30$) в течение 14 дней вводили индуктор Pgp – рифампицин ("Белмедпрепараты", Республика Беларусь) per os в дозе 20 мг/кг два раза в день, а затем на 15-й день в/в вводили фексофенадин в дозе 10 мг/кг.

Третьей группе животных ($n = 30$) за 30 мин до введения фексофенадина (10 мг/кг) внутривенно вводили ингибитор Pgp – верапамил ("Биосинтез", Россия) в дозе 1.65 мг/кг [7].

Четвертой группе крыс ($n = 30$) за 30 мин до введения фексофенадина (10 мг/кг) внутривенно вводили ингибитор Pgp – мексидол ("Фармасофт", Россия) в дозе 50 мг/кг [8].

Крыс выводили из эксперимента под золетиловым наркозом ("Virbac Sante Animale", Франция, 30 мг/кг внутрибрюшинно [9]) через 5, 10, 15, 30, 45 и 60 мин после введения фексофенадина. Для анализа у них забирали кровь в объеме 4 мл из брюшной аорты в гепаринизированные пробирки, а также кору больших полушарий головного мозга. Кровь центрифугировали при 3000 об/мин 10 мин для получения плазмы. Образцы тканей и плазмы замораживали при –29°С до последующего анализа.

Первоначально для оценки активности Pgp в ГЭБ предполагалось вводить фексофенадин per os, однако его фармакокинетика оказалась вариабельной, поэтому в дальнейшем мы остановились на внутривенном введении субстрата, при котором его биодоступность составляет 100%.

В связи с отсутствием лекарственной формы фексофенадина для парентерального введения производилась экстракция лекарственного вещества из таблеток "Аллегра", "Sanofi", Франция (180 мг) следующим образом. Одна таблетка измельчалась и суспендировалась в 20 мл ацетонитрила ("Acros Organics", Бельгия) категории "Для ВЭЖХ", после чего взбалтывалась на приборе Shaker в течение 15 мин с последующим центрифугированием 15 мин при 3500 об./мин. Надосадочный слой упаривали на роторно-вакуумном испарителе, и сухой остаток растворяли в 10 мл воды для инъекций. Для исследования полученный раствор вводили в хвостовую вену крыс в объеме 2 мл/кг [10]. Концентрацию фексофенадина в полученном растворе определяли методом ВЭЖХ.

Для экстракции фексофенадина из плазмы крови к 1.5 мл плазмы прибавляли 4 мл ацетонитрила ("Acros Organics", Бельгия) категории "Для ВЭЖХ", встряхивали на приборе Vortex в течение 15 мин и центрифугировали 15 мин при 3500 об./мин.

Экстракцию фексофенадина из ткани коры больших полушарий головного мозга крыс выполняли следующим образом. Образцы мозга массой 500 мг гомогенизировали в 500 мкл воды деионизированной в течение 1 мин, после чего экстрагировали фексофенадин 4 мл ацетонитрила ("Acros Organics", Бельгия) путем встряхивания на приборе Vortex в течение 15 мин с последующим центрифугированием 15 мин при 3500 об./мин.

Количественное определение фексофенадина в плазме крови крыс и в гомогенате головного мозга производили методом ВЭЖХ с колонкой Phenomenex Synergi 4u Polar-RP 80A (250 × 4.6) с зернением 4 мкм и термостатированием при 35°С на хроматографической системе "Stayer" с УФ-спектрофотометрическим детектированием при длине волны 220 нм. Состав подвижной фазы: 128 мл ацетонитрила ("Acros Organics", Бельгия, "Для ВЭЖХ"), 267.4 мл воды деионизированной, 7.0 мл триэтиламина ("Acros Organics", Бельгия, "Для ВЭЖХ"), 4.66 мл кислоты уксусной ледяной ("Химмед", Россия), pH 6.0. Скорость потока – 1 мл/мин. Время удерживания фексофенадина составило 14.91 ± 0.25 мин. Коэффициенты экстракции фексофенадина из плазмы крови крыс и гомогената коры головного мозга составили 83.57% и 81.25% соответственно. Пределы количественного определения и предел обнаружения фексофенадина в гомогенате мозга и плазме крови составили 43.70 и 35.27 нг/г и 14.49 и 11.68 нг/мл соответственно.

Суммарное количество фексофенадина, попавшее в системный кровоток и в кору больших полушарий, оценивали по площади под кривой "концентрация фексофенадина (в крови или ткани коры больших полушарий головного мозга)–время" ($AUC_{0\text{-}t(плазма)}$ или $AUC_{0\text{-}t(мозг)}$), которые рассчитывали по методу трапеции [11].

Статистическая обработка результатов проводилась с использованием программы "Statsoft Statistica 7.0 (США)".

Характер распределения полученных данных определяли по критерию Шапиро–Уилка. Учитывая, что распределение большинства данных было отличным от нормального, межгрупповые различия оценивали по критерию Крускала–Уоллиса, попарные сравнения выполняли с помощью критерия Манна–Уитни с поправкой Бонферрони. В табл. 1 и рисунках данные представ-

Таблица 1. Концентрация фексофенадина в гомогенате коры больших полушарий головного мозга крыс, после его внутривенного введения в дозе 10 мг/кг массы (медиана, верхний и нижний квартили)

Группы эксперимента	Сроки эксперимента					
	5 мин	10 мин	15 мин	30 мин	45 мин	60 мин
Контроль, нг/г	264.00 (198.98; 471.35)	288.27 (202.98; 754.8)	344.77 (245.99; 432.36)	301.68 (120.85; 638.02)	242.91 (201.78; 385.01)	172.16 (147.5; 192.28)
Рифампицин, нг/г	333.17 (256.99; 387.42)	262.19 (151.02; 694.45)	174.04 (82.49; 220.53)*	61.63 (46.71; 170.43)*	91.84 (65.66; 387.68)	97.27 (64.83; 153.55)
Верапамил, нг/г	441.67 (260.84; 549.71)	270 (224.22; 423.6)	377.62 (253.6; 1540.65)	294.52 (227.09; 318.33)	89.66 (79.11; 274.1)	195.28 (55.68; 238.61)
Мексидол, нг/г	799.3 (299.5; 1627.3)	849.4 (617.9; 928.9)	908.9 (264.5; 1236.4)	356.6 (201.9; 647.1)	508.7 (320.4; 1839.7) *p = 0.07	280.9 (146.9; 524.9)

Примечание: * $p < 0.05$ – статистически значимые различия с показателями животных группы контроля, данные представлены в виде медианы (верхнего и нижнего квартилей).

лены в виде медианы, нижнего и верхнего квартилей.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

При изучении фармакокинетики фексофенадина после его внутривенного введения крысам вистар были получены следующие результаты.

Концентрация фексофенадина в плазме крови крыс через 5 мин после его внутривенного введения в дозе 10 мг/кг массы (контроль) составила 16.6 мкг/мл, затем постепенно снижалась и достигала значения 1.0 мкг/мл к 60 мин исследования. Введение рифампицина, верапамила и мексидола существенно не влияло на концентрации фексофенадина в плазме крови крыс и площадь под фармакокинетической кривой концентрация–время ($AUC_{0\text{-}t(плазма)}$). Данные показатели статистически значимо не отличались от значений контрольных животных (рис. 1, 2).

Концентрация фексофенадина в коре больших полушарий головного мозга крыс через 5 мин после его внутривенного введения в дозе 10 мг/кг массы составила 264.0 нг/г, достигала через 15 мин своего максимума – 344.8 нг/г и постепенно снижалась к 60 мин исследования до 172.2 нг/г (табл. 1).

Применение рифампицина приводило к снижению концентрации фексофенадина в коре головного мозга крыс через 15 мин на 49.5% ($p < 0.05$), через 30 мин на 79.6% ($p < 0.05$) по сравнению с показателями контрольных животных. Введение верапамила не оказало существенного влияния на концентрацию фексофенадина в коре больших полушарий головного мозга, а мексидол повышал концентрацию фексофенадина в коре больших полушарий через 45 мин после введения последнего на 109.4% ($p = 0.07$) по сравнению с показа-

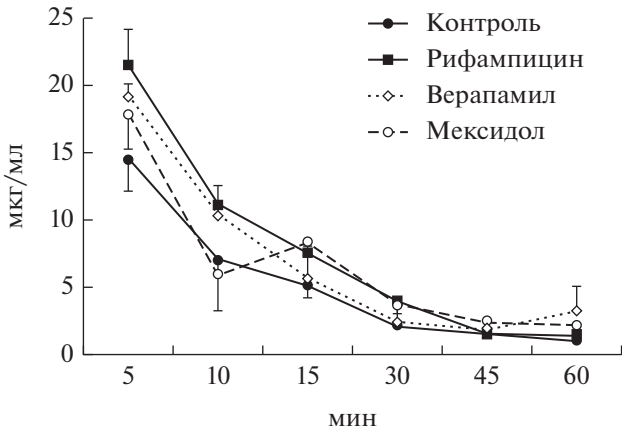

Рис. 1. Динамика концентраций фексофенадина в плазме крови крыс после его внутривенного введения в дозе 10 мг/кг массы (концентрации представлены в виде средних арифметических ± стандартная ошибка среднего).

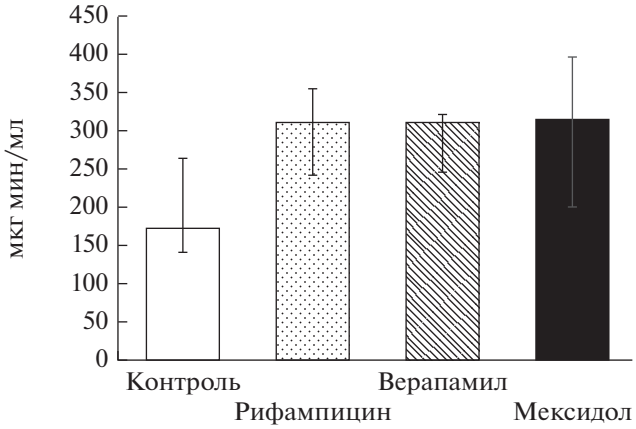

Рис. 2. Площадь под кривой "концентрация фексофенадина в плазме крови–время" ($AUC_{0\text{-}t\text{-}плазма}$) после внутривенного введения фексофенадина в дозе 10 мг/кг массы (медиана, верхний и нижний квартили). Примечание: * $p < 0.05$ – статистически значимые различия с показателями животных группы контроля.

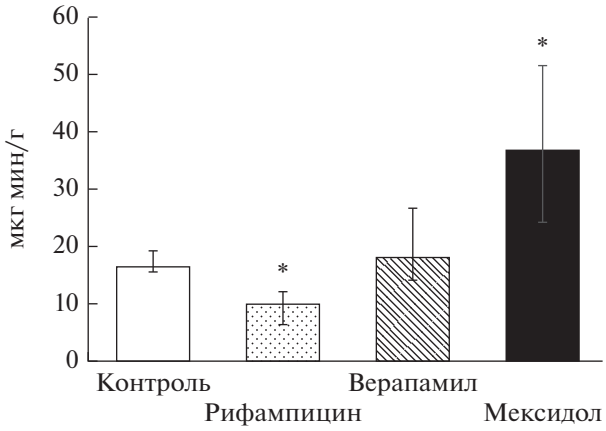

Рис. 3. Площадь под кривой "концентрация фексофенадина в ткани коры больших полушарий головного мозга–время" ($AUC_{0\text{-}t\text{-}мозг}$) после внутривенного введения фексофенадина в дозе 10 мг/кг массы (медиана, верхний и нижний квартили). Примечание: * $p < 0.05$ – статистически значимые различия с показателями животных группы контроля.

телями крыс, которым вводили только фексофенадин (табл. 1).

Дополнительно была рассчитана площадь под кривой концентрация фексофенадина в коре больших полушарий–время ($AUC_{0\text{-}t(мозг)}$), которая характеризует общее количество фексофенадина, попавшее в кору. Установлено, что введение рифампицина приводило к снижению $AUC_{0\text{-}t(мозг)}$ фексофенадина на 39.6% ($p < 0.05$), а применение мексидола увеличивало данный показатель на 125.0% ($p < 0.05$) (рис. 3).

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

В ходе настоящей работы разрабатывался и тестировался метод оценки функциональной активности Pgp в ГЭБ. В качестве маркерного субстрата Pgp был использован фексофенадин, поскольку именно данный белок-транспортер препятствует его проникновению в мозг, выводя обратно в кровь [13].

В качестве индуктора Pgp был применен рифампицин, повышающий экспрессию данного белка-транспортера, действуя опосредовано через прегнан-Х-рецептор [14]. Поскольку для индукции экспрессии требуется время, рифампицин вводили в течение 14 дней.

Для ингибирования активности Pgp использовали внутривенное введение верапамила, который является классическим прямым ингибитором белка-транспортера в опытах *in vitro* [15], т.е. непосредственно связывается с ним и снижает активность. Однако в ходе нашего исследования при введении верапамила фармакокинетика фексофенадина не изменилась ни в плазме крови, ни в головном мозге.

Мы предположили, что причиной отсутствия изменений является способность верапамила снижать артериальное давление, что приводит к ухудшению перфузии органов, в том числе головного мозга. После измерения артериального давления на фоне введения верапамила у крыс непрямым методом было установлено, что применение блокатора кальциевых каналов вызывает снижение систолического АД с 149.5 ± 7.4 до 94.8 ± 8.7 мм рт. ст.

Поэтому мы использовали другой прямой ингибитор Pgp – мексидол [16], который не влияет на артериальное давление и не имеет других нежелательных системных эффектов.

Введение рифампицина и мексидола не оказало влияния на концентрацию фексофенадина в плазме крови, а также на площадь под фармакокинетической кривой концентрация–время ($AUC_{0\text{-}t(плазма)}$). Это может быть связано с тем, что Pgp препятствует всасыванию фексофенадина при его пероральном применении и прохождению препарата через ГЭБ, и не влияет на его выведение [17]. Таким образом, при внутривенном введении фексофенадина модуляция активности Pgp (индукция и ингибирование) не привела к изменению фармакокинетики изучаемого субстрата.

Применение индуктора Pgp – рифампицина приводило к снижению концентрации фексофенадина в мозге через 15 и 30 мин, а также $AUC_{0\text{-}t(мозг)}$ по сравнению с показателями контрольных животных, что свидетельствует о том, что фексофенадин в меньшей степени проникает через ГЭБ.

Применение мексидола перед введением фексофенадина приводило к повышению концентрации фексофенадина в коре больших полушарий через 45 мин (на уровне тенденции, $p = 0.07$) после введения последнего и увеличению $AUC_{0\text{-}t(мозг)}$ фексофенадина по сравнению с данными контрольных животных, что свидетельствует о повышении проникновения препарата через ГЭБ. При этом стоит отметить, что если бы определялись только концентрации фексофенадина в коре больших полушарий в разные временные точки, то можно было бы сделать вывод о несущественном влиянии мексидола на активность Pgp в ГЭБ. Поэтому целесообразно рассчитывать именно $AUC_{0\text{-}t(мозг)}$, отражающую общее количество фексофенадина, попавшее в головной мозг.

Таким образом, изменение проницаемости ГЭБ для маркерного субстрата Pgp фексофенадина на фоне введения рифампицина и мексидола подтверждает адекватность предложенного нами метода анализа функциональной активности Pgp в ГЭБ.

ВЫВОДЫ

Разработан способ тестирования функциональной активности гликопротеина-Р в гемато-

энцефалическом барьере на крысах вистар по фармакокинетике его маркерного субстрата фексофенадина, основанный на:

1) внутривенном введении животным фексофенадина в дозе 10 мг/кг;

2) экстракции фексофенадина из плазмы крови и коры головного мозга крыс с применением в качестве экстрагента ацетонитрила;

3) количественном определении фексофенадина в плазме крови и в гомогенате головного мозга методом ВЭЖХ по оригинальной методике с расчетом площадей под кривой "концентрация фексофенадина (в крови или ткани коры больших полушарий головного мозга)–время" ($AUC_{0\text{-}t(плазма)}$ или $AUC_{0\text{-}t(мозг)}$).

БЛАГОДАРНОСТИ

Работа поддержана грантом РФФИ № 16-44-620292 р_а.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Якушева Е.Н., Щулькин А.В., Попова Н.М., Черных И.В., Титов Д.С.* // Обзоры по клин. фармакол. и лекарств. терапии. 2011. № 3. С. 142–148.
2. *Schlachetzki F., Pardridge W.M.* // Neuroreport. 2003. V. 14. № 16. P. 2041–2046.
3. *Robertson S.J., Mokgokong R., Kania K.D., Guedj A.S., Hladky S.B., Barrand M.A.* // Cell Mol. Neurobiol. 2011. V. 31. № 7. P. 1103–1111.
4. *Ma A., Wang C., Chen Y., Yuan W.* // Drug Des. Devel. Ther. 2013. V. 7. P. 1447–1454.
5. *Mohamed L.A., Keller J.N., Kaddoumi A.* // Biochim. Biophys. Acta. 2016. V. 1862. № 4. P. 778–787.
6. *Jaisue S., Gerber J.P., Davey A.K.* // Xenobiotica. 2010. V. 40. № 11. P. 743–750.
7. *Fang W., Peng L., Geng X., Shang E., Yang Q., Sha L., Li Y.* // Neurochem. Internat. 2013. V. 62. P. 23–30.
8. *Новиков В.Е., Крюкова Н.О., Новиков А.С.* // Экспер. и клин. фармакол. 2010. Т. 73. № 5. С. 15–18.
9. *Ивашев М.Н., Арльт А.В., Савенко И.А., Сергиенко А.В., Зацепина Е.Е., Лысенко Т.А., Куянцева А.М., Саркисян К.Х.* // Научные ведомости Белгородского государственного университета. 2012. Т. 123. № 4. С. 168–171.
10. Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств. // Под ред. Миронова А.Н. М.: Гриф и К, 2012. 944 с.
11. *Каркищенко Н.Н., Хоронько В.В., Сергеева С.А., Каркищенко В.Н.* // Ростов-на-Дону: Феникс, 2001. 384 с.
12. *Kerns E.H., Di L.* Drug-like Properties: Concepts, Structure Design and Methods: from ADME to Toxicity Optimizati. Academic Press, 2016. 560 p.
13. *Zhao R., Kalvass J.C., Yanni S.B., Bridges A.S., Pollack G.M.* // Drug Metab. Dispos. 2009. V. 37. № 3. P. 529–535.
14. *Карпова С.И., Тюрина Н.Г.* // Проблемы гематологии и переливания крови. 1997. № 1. С. 37–46.
15. *Carrigos M., Mir L.M., Orlowski S.* // Eur. J. Biochem. 1997. V. 244. № 2. P. 664–673.
16. *Якушева Е.Н., Щулькин А.В., Черных И.В.* // Экспер. и клин. фармакол. 2015. Т. 78. № 5. С. 19–23.
17. *Tahara H., Kusuhara H., Fuse E., Sugiyama Y.* // Drug Metab. and Dispos. 2005. V. 33. № 7. P. 963–968.

Method of Analysis of Functional Activity of P-Glycoprotein in the Blood-Brain Barrier

I. V. Chernykh[a], A. V. Shchul'kin[a], P. Yu. Myl'nikov[a], M. V. Gatsanoga[a], N. M. Popova[a], and E. N. Yakusheva[a]

[a] *Pavlov Ryazan State Medical University, Ministry of Health, Ryazan, Russia*

The article describes a method for testing the functional activity of the transporter protein P-glycoprotein (Pgp) in the blood-brain barrier in Wistar rats. This method is based on the study of the pharmacokinetics of fexofenadine, a marker substrate of Pgp, after its single intravenous administration at a dose of 10 mg/kg. Quantitative determination of fexofenadine in rat blood plasma and homogenate of the rat cerebral cortex was performed by high performance liquid chromatography with ultraviolet detection. To assess the permeability of the blood-brain barrier and Pgp activity, we proposed to calculate the area under the curve of fexofenadine concentration in the cerebral cortex-time ($AUC_{0-t(brain)}$), which reflects the total amount of fexofenadine in the brain. The adequacy of the developed method was confirmed when fexofenadine was administered to rats in the presence of inducer and inhibitor of the transporter protein.

Keywords: glycoprotein-P, fexofenadine, blood-brain barrier, pharmacokinetics, verapamil, rifampicin, mexidol