

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ
СТАТЬИ

ФУНКЦИОНАЛЬНАЯ АКТИВНОСТЬ ГЛИКОПРОТЕИНА-Р
В ГЕМАТОЭНЦЕФАЛИЧЕСКОМ БАРЬЕРЕ НА ФОНЕ
ИШЕМИИ–РЕПЕРФУЗИИ ГОЛОВНОГО МОЗГА

© 2019 г. И. В. Черных^{1, *}, А. В. Шулькин¹, Е. Н. Якушева¹, А. С. Есенина¹,
М. М. Градинарь¹, П. Ю. Мыльников¹, М. В. Гацанова¹

¹Рязанский государственный медицинский университет им. академика И.П. Павлова,
Рязань, Россия

*E-mail: ivchernykh88@mail.ru

Поступила в редакцию 28.01.2019 г.

После доработки 18.03.2019 г.

Принята к публикации 31.03.2019 г.

На 70 крысах-самцах линии Вистар изучена активность белка-транспортера гликопротеина-Р (Pgp) и его относительное количество в гематоэнцефалическом барьере (ГЭБ) коры лобной доли больших полушарий головного мозга при окклюзии–реперфузии средней мозговой артерии. Окклюзию выполняли эндоваскулярно на протяжении 30 мин. Активность Pgp в ГЭБ оценивали косвенно по концентрации его маркерного субстрата – фексофенадина в коре больших полушарий головного мозга крыс после его внутривенного введения в дозе 10 мг/кг через 24 ч после реперфузии. Образцы ткани коры больших полушарий головного мозга и плазмы крови забирали через 5, 10, 15, 30, 45 и 60 мин после введения фексофенадина. Концентрацию фексофенадина в тканях определяли методом высокоэффективной жидкостной хроматографии. Относительное количество транспортера оценивали методом иммуногистохимии. Установлено, что окклюзия–реперфузия средней мозговой артерии приводила к увеличению проницаемости ГЭБ для фексофенадина, о чем свидетельствует повышение площади под кривой “концентрация фексофенадина в коре головного мозга–время” и отношения площади под кривой “концентрация фексофенадина в коре головного мозга–время” к площади под кривой “концентрация фексофенадина в плазме крови–время” в 3.2 и 2.5 раза соответственно по сравнению с показателями ложнооперированных животных. Иммуногистохимическая оценка относительного количества Pgp в ГЭБ после окклюзии–реперфузии средней мозговой артерии показала, что количество транспортера возрастает в 1.9 раза по сравнению с крысами, которые подвергались “ложной” операции. Таким образом, несмотря на повышение количества Pgp в ГЭБ на фоне окклюзии–реперфузии средней мозговой артерии, его проницаемость для фексофенадина возрастает, что, вероятно связано с нарушением структуры барьера на фоне дефицита кислорода.

Ключевые слова: гликопротеин-Р, гематоэнцефалический барьер, окклюзия–реперфузия средней мозговой артерии

DOI: 10.1134/S0869813919050133

Гликопротеин-Р (Pgp, ABCB1-белок) – эффлюксный мембранный белковый транспортер, осуществляющий выброс различных по химической структуре эндогенных и экзогенных веществ из клеток во внеклеточное пространство [1]. Локализуясь в гематоэнцефалическом барьере (ГЭБ), он препятствует проникновению

его субстратов в головной мозг. Многие вещества с установленной нейропротективной активностью *in vitro* – флавоноиды [2], ривастигмин [3], берберин [4] – не применяются в качестве таковых в связи с тем, что в терапевтической дозе не достигают достаточной концентрации в головном мозге за счет их эффлюкса посредством Pgp, а при повышении дозы оказывают выраженные системные побочные эффекты.

Кроме того, широкий спектр препаратов и факторов способен изменять активность Pgp, а соответственно и проницаемость ГЭБ [5, 6].

Например, повышение экспрессии и активности белка-транспортера при остром нарушении мозгового кровообращения может быть одним из факторов, обуславливающих низкую активность нейропротекторов-субстратов Pgp при данной патологии.

Целью настоящего исследования явилась оценка функциональной активности и относительного количества Pgp в ГЭБ на фоне окклюзии–реперфузии средней мозговой артерии (СМА).

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Исследование выполнено на 70 половозрелых крысах-самцах линии Вистар массой 220–260 г в соответствии с правилами лабораторной практики (Приказ Министерства здравоохранения РФ от 1 апреля 2016 г. № 199н “Об утверждении Правил надлежащей лабораторной практики”).

Животные были разделены на 2 серии: в первой ($n = 60$) оценивали функциональную активность Pgp в ГЭБ на фоне ишемии–реперфузии СМА, во второй ($n = 10$) – относительное количество белка-транспортера в ГЭБ.

Первая серия, в свою очередь, была разделена на 2 группы. Первая – контроль, представлена животными, которым выполняли “ложную” операцию – вскрытие кожи и мягких тканей шеи без окклюзии СМА с последующим ушиванием раны. Вторая группа включала животных, подвергнутых окклюзии СМА в течение 30 мин с последующей реперфузией. Через 24 ч после манипуляций у животных обеих групп оценивали функциональную активность Pgp в ГЭБ.

Вторая серия животных также делилась на 2 группы: на первой ($n = 5$) анализировалось относительное количество Pgp в ГЭБ на фоне “ложной” операции, на второй ($n = 5$) – на фоне окклюзии–реперфузии СМА.

Окклюзию–реперфузию СМА моделировали под золотильным наркозом: внутривенное введение золотила (“Virbac”, Франция) в дозе 30 мг/кг [7]) путем 30-минутной эндovasкулярной окклюзии сосуда полипропиленовой нитью диаметром 0.150–0.199 мм совместно с перманентной перевязкой общей и наружной сонных артерий с последующей реканализацией [8].

Оценку проницаемости ГЭБ проводили по анализу фармакокинетики маркерного субстрата Pgp фексофенадина – гистаминолитика 3-го поколения, который незначительно проникает в головной мозг из-за активного эффлюкса транспортером. Повышение содержания фексофенадина в головном мозге происходит при увеличении проницаемости ГЭБ, что косвенно свидетельствует об угнетении функциональной активности Pgp, т.к. фексофенадин не метаболизируется в организме, а его проникновение в мозг контролируется преимущественно данным белком-транспортером [9].

Через 24 ч после ложной операции (первая группа) или после реканализации СМА (вторая группа) животным внутривенно вводили фексофенадин в дозе 10 мг/кг с последующим забором крови в объеме 4 мл из брюшной аорты и ткани коры больших полушарий головного мозга через 5, 10, 15, 30, 45 и 60 мин (на

каждую временную точку приходилось по 5 крыс) для определения содержания маркерного субстрата Pgr.

Количественное определение фексофенадина в плазме крови и гомогенате головного мозга крыс производилось методом высокоэффективной жидкостной хроматографии с колонкой Phenomenex Synergi 4u Polar-RP 80A (250 × 4.6) с зернением 4 мкм и термостатированием при 45°C на хроматографической системе “Stayer” (“Аквилон”, Россия) с УФ-спектрофотометрическим детектированием при длине волны 220 нм. Состав подвижной фазы: ацетонитрил (128 мл), вода деионизированная (267.4 мл), триэтиламин (7.0 мл), кислота уксусная ледяная (6.3 мл), pH 6.15. Осаждение белка при пробоподготовке проводилось с применением ацетонитрила.

Суммарное количество фексофенадина, поступившее в системный кровоток, оценивали по площади под кривой “концентрация фексофенадина в плазме–время” ($AUC_{0-t(плазма)}$), а суммарное количество фексофенадина в коре больших полушарий – по площади под кривой “концентрация фексофенадина в коре головного мозга–время” ($AUC_{0-t(мозг)}$), которые рассчитывали методом трапеции [10]. Для оценки проницаемости ГЭБ и функциональной активности Pgr в нем был определен показатель $AUC_{0-t(мозг)}/AUC_{0-t(плазма)}$ – отношение площади под кривой “концентрация фексофенадина в коре головного мозга–время” к площади под кривой “концентрация фексофенадина в плазме–время” [11].

Животных второй серии выводили из исследования под эфирным наркозом через 24 ч после реперфузии СМА (первая группа) или “ложной” операции (вторая группа), извлекали лобную долю коры головного мозга, и часть ее фиксировали в 10%-ном растворе нейтрального формалина. Гистологический материал обезживали в растворах этилового спирта возрастающей концентрации, просветляли ксилолом и помещали в парафин. Перед реакцией иммунного окрашивания производили демаскировку антигенов тканей посредством нагревания на водяной бане в 10 мМ цитратном буфере (pH 6.0), блокировали эндогенную пероксидазу 3%-ным раствором перекиси водорода. Затем инкубировали срезы с первичными антителами к Pgr (ABCBI antibody-middle region, Aviva Systems Biology, США) в разведении 1 : 100. Для иммунного окрашивания использовали полимерную систему детекции с пероксидазной меткой (“ДАКО”, Дания) (вторичные антитела к чужеродному белку крыс). Ядра клеток окрашивали гематоксилином.

Микропрепарат фотографировали с помощью цифровой камеры “ЛОМО ТС-500” (Россия) при увеличении в 400 раз. В каждом гистологическом препарате оценивали 10 репрезентативных участков (10 фотографий). В дальнейшем изображения подвергали анализу с применением медицинской программы для анализа и обработки цифровых изображений ImageJ (США). Далее определяли относительную площадь мембран, экспрессирующих Pgr, которая рассчитывалась как площадь мембран, экспрессирующих Pgr (pix^2), деленная на общую площадь поля зрения (pix^2) [<https://imagej.nih.gov>].

Статистическая обработка результатов проводилась с использованием пакета MS Excel и Statistica 7.0. Характер распределения данных определяли по критерию Шапиро–Уилка. В случае нормального распределения статистическую значимость различий оценивали с помощью теста ANOVA, попарные сравнения выполняли с помощью критерия Ньюмена–Кейсла. При распределении данных, отличном от нормального, различия между сериями оценивали с помощью критерия Крускала–Уоллиса. При уровне значимости менее 0.05 проводили парное сравнение параметров с помощью критерия Манна–Уитни с поправкой Бонферонни. В таблицах данные представлены в виде среднего арифметического ± стандартное отклонение среднего (нормальное распределение данных) или медианы, нижнего и верхнего квартилей (распределение данных, отличное от нормального).

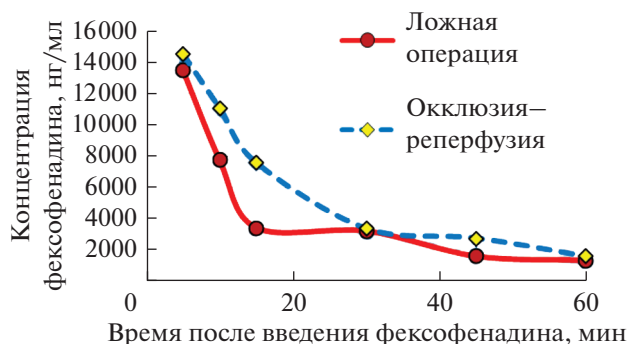


Рис. 1. Динамика концентраций фексофенадина в плазме крови крыс после его однократного внутривенного введения в дозе 10 мг/кг массы тела.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

При изучении фармакокинетики фексофенадина после его внутривенного введения у ложнооперированных животных 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 13.5 мкг/мл, затем постепенно снижалась и достигала значения 1.3 мкг/мл к 60-й минуте исследования. Окклюзия—реперфузия СМА статистически значимо не влияла на содержание фексофенадина в плазме крови: его концентрация в исследуемые временные точки, так же, как и площадь под фармакокинетической кривой концентрация—время ($AUC_{0-t(плазма)}$) достоверно не отличались от показателей контрольных животных (рис. 1).

Динамика концентраций фексофенадина в гомогенате коры больших полушарий головного мозга крыс в сериях контроля и окклюзии—реперфузии СМА представлена в табл. 1.

Установлено, что у ложнооперированных животных концентрация фексофенадина в коре больших полушарий головного мозга постепенно повышалась после его внутривенного введения, достигая своего максимума (759.35 нг/г) через 15 мин и постепенно снижалась к 60-й мин эксперимента.

Моделирование патологии приводило к повышению содержания фексофенадина в коре ишемизированного полушария головного мозга крыс через 5 мин после его внутривенного введения в 5 раз ($p < 0.05$), через 10 мин — в 2 раза ($p < 0.05$), через 30 мин — в 3 раза ($p < 0.05$), через 45 мин — в 6.2 раза ($p < 0.05$) и через 60 мин —

Таблица 1. Динамика концентраций фексофенадина в гомогенате коры больших полушарий головного мозга крыс в сериях “ложной” операции и окклюзии—реперфузии СМА

Группы эксперимента	Сроки эксперимента					
	5 мин	10 мин	15 мин	30 мин	45 мин	60 мин
“Ложная” операция	322.77 (251.20; 406.41)	442.12 (421.63; 472.86)	789.91 (702.81; 790.21)	364.06 (330.61; 395.10)	150.99 (147.82; 172.23)	58.01 (35.86; 68.56)
Окклюзия—реперфузия СМА	978.85 (874.38; 1244.70)*	678.98 (627.75; 1292.04)*	1083.21 (934.02; 1236.41)	1037.25 (1010.37; 1171.99)*	1005.98 (864.58; 1204.76)*	735.87 (567.97; 1056.33)*

* — достоверные различия с данными ложнооперированных животных ($p < 0.05$); $n = 5$.

Таблица 2. Усредненные значения площадей под фармакокинетическими кривыми фексофенадина в гомогенате головного мозга крыс и плазме, а также соотношение указанных параметров в сериях “ложной” операции и окклюзии–реперфузии СМА

Серия эксперимента	Параметр		
	AUC _{0-t(мозг)} , нг/(г мин)	AUC _{0-t(плазма)} , нг/(мл ч)	AUC _{0-t(мозг)} /AUC _{0-t(плазма)}
“Ложная” операция	19921.42 ± 1637.03	222683.55 ± 23247.77	0.0901 ± 0.0108
Окклюзия–реперфузия СМА	63622.49 ± 16039.13*	307234.11 ± 105486.80	0.2271 ± 0.1029*

* – достоверные различия с данными ложнооперированных животных ($p < 0.05$).

Таблица 3. Относительное количество Pgr (% от общей площади поля зрения) в ГЭБ в сериях “ложной” операции и окклюзии–реперфузии СМА

	“Ложная” операция	Окклюзия–реперфузия СМА
Среднее ± стандартное отклонение	0.296 ± 0.116	0.551 ± 0.138*

* – достоверные различия с данными ложнооперированных животных ($p < 0.05$).

в 17.8 раз ($p < 0.05$) по сравнению с показателями контроля. Площадь под кривой “концентрация фексофенадина в коре головного мозга–время” (AUC_{0-t(мозг)}), отражающая общее содержание маркерного субстрата в коре, в ишемизированном полушарии превышала аналогичный показатель контрольных животных в 3.2 раза ($p < 0.05$) (табл. 2).

Отношение AUC_{0-t(мозг)}/AUC_{0-t(плазма)}, характеризующее проницаемость ГЭБ и активность Pgr в нем, в ишемизированном полушарии у крыс, подвергнутых окклюзии–реперфузии СМА, превышало данный показатель ложнооперированных животных в 2.5 раза ($p < 0.05$) (табл. 2).

Иммуногистохимическая оценка относительного количества Pgr в ГЭБ после окклюзии–реперфузии СМА показала, что относительное количество транспортера возросло 1.86 раза по сравнению с крысами ($p < 0.05$), которые подвергались “ложной” операции (табл. 3; рис. 2).

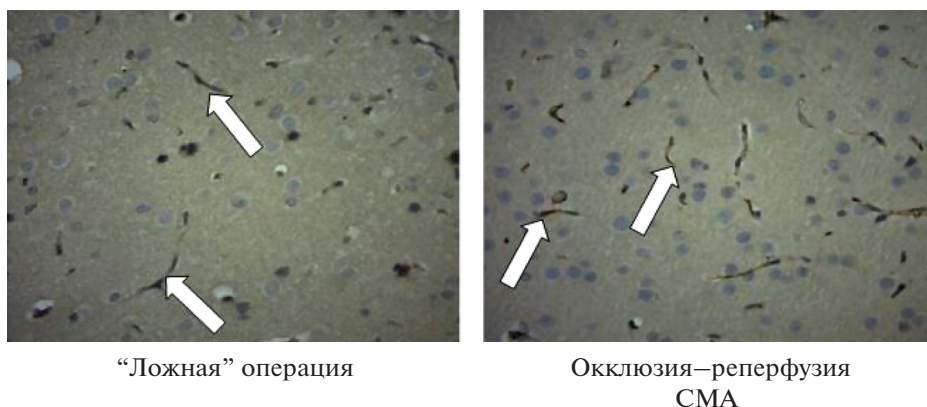


Рис. 2. Иммуногистохимически окрашенные срезы лобной доли коры головного мозга крыс (слой пирамидальных клеток, ув. 400 раз). Стрелками обозначены капилляры.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

В ходе данной работы исследовалось функционирование Pgp в ГЭБ на фоне окклюзии—реперфузии СМА. Активность белка-транспортера анализировали по проникновению его маркерного субстрата — фексофенадина в головной мозг. Особенностью фармакокинетики фексофенадина является то, что он не метаболизируется микросомальными ферментами печени, а его энтеральная абсорбция и проникновение в головной мозг через ГЭБ контролируется преимущественно Pgp [9]. Поэтому при внутривенном введении (когда исключено влияние абсорбции на фармакокинетику препарата) концентрация фексофенадина в головном мозге может характеризовать активность Pgp в ГЭБ.

В ходе настоящего исследования установлено, что моделирование окклюзии—реперфузии СМА не влияло на системную фармакокинетику фексофенадина: его концентрации в плазме крови в разные временные точки так же, как и $AUC_{0-t-плазма}$, отражающая общее количество препарата, попавшее в системный кровоток, статистически значимо не отличались у контрольных и ишемизированных животных.

При этом на фоне окклюзии—реперфузии СМА наблюдалось возрастание $AUC_{0-t(мозг)}$, отражающее общее содержание маркерного субстрата в коре, и отношения $AUC_{0-t(мозг)}/AUC_{0-t(плазма)}$, характеризующего проницаемость ГЭБ и активность Pgp в нем, в коре лобной доли ишемизированного полушария по сравнению с ложнооперированными крысами, что говорит о локальном снижении активности Pgp в ГЭБ на фоне моделируемой патологии.

Аналогичные результаты получены К. Уано с соавт. на крысах со спонтанной гипертонией при одновременной окклюзии дистальной СМА и ипсилатеральной общей сонной артерии с использованием силнидепина (антигипертензивного и нейропротекторного средства) в качестве маркерного субстрата. Показано повышение концентрации препарата в клетках пораженного полушария по сравнению с нормальной тканью, что, по мнению авторов, свидетельствует об ингибировании активности Pgp [12].

В нашем исследовании также выявлено, что ишемия-реперфузия приводила к увеличению относительного количества Pgp в ГЭБ, что согласуется с данными литературы. Так, в экспериментах, выполненных на культурах эндотелиальных клеток ГЭБ, установлено, что гипоксическая гипоксия и развитие окислительного стресса усиливают экспрессию белка-транспортера, причем важную роль в регуляции данного процесса играют транскрипционные факторы HIF1, Sp1, Nrf2 [13]. При локальной ишемии головного мозга показано повышение экспрессии Pgp в эндотелии капилляров [14]. Перманентная окклюзия СМА у крыс-самцов в течение 4 ч приводила к стимуляции экспрессии Pgp в ГЭБ и нейронах головного мозга, что было выявлено методом Вестерн-блоттинга [15].

Вероятно, при ишемии и ишемии—реперфузии СМА повышение относительного количества Pgp — это защитно-приспособительный механизм, однако развивающийся на фоне патологии окислительный стресс, активация протеолитических ферментов и энергодефицит повреждают ГЭБ с ростом его проницаемости. При этом Pgp не способен адекватно выполнять свою транспортную функцию, даже несмотря на повышение его синтеза. Кроме того, в литературе описаны случаи несоответствия экспрессии и эффлюксной активности данного белка-транспортера [16].

Таким образом, 30-минутная окклюзия СМА с последующей реперфузией в течение 24 ч вызывает повышение относительного количества Pgp в ГЭБ, однако его проницаемость для маркерного субстрата данного белка-транспортера возрастает, что, вероятно, связано с нарушением структуры барьера на фоне моделируемой патологии.

ИСТОЧНИКИ ФИНАНСИРОВАНИЯ

Работа выполнена при финансовой поддержке грантов РФФИ № 16-44-620292, № 18-415-620003.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Гацанова М.В., Черных И.В., Шулькин А.В., Якушева Е.Н., Попова Н.М. Можно ли оценить принадлежность лекарственных веществ к субстратам гликопротеина-P на самках кроликов породы Шиншилла. Наука молодых (Eruditio Juvenium). 4(4): 5–10. 2016. [Gatsanoga M.V., Chernykh I.V., Shchulkin A.V., Yakusheva E.N., Popova N.M. The method of assessment of drugs belonging to the substrates of P-glycoprotein on female rabbits. Nauka molodykh (Eruditio Juvenium). 3: 5–10. 2016. (In Russ.)].
2. Youdim K.A., Qaiser M.Z., Begley D.J., Rice-Evans C.A., Abbott N.J. Flavonoid permeability across an in situ model of the blood-brain barrier. Free Radic. Biol. Med. 36(5): 592–604. 2004.
3. Mohamed L.A., Keller J.N., Kaddoumi A. Role of P-glycoprotein in mediating rivastigmine effect on amyloid- β brain load and related pathology in Alzheimer's disease mouse model. Biochim. Biophys. Acta. 1862(4): 778–787. 2016.
4. Kumar A., Ekavali M., Mishra J., Chopra K., Dhull D.K. Possible role of P-glycoprotein in the neuroprotective mechanism of berberine in intracerebroventricular streptozotocin-induced cognitive dysfunction. Psychopharmacology (Berlin). 233(1): 137–152. 2016.
5. Черных И.В., Шулькин А.В., Якушева Е.Н., Гацанова М.В., Попова Н.М. Анализ принадлежности препарата ноопепт к субстратам и модуляторам функциональной активности ABCB1-белка в эксперименте *in vivo*. Рос. медико-биол. вестн. им. акад. И.П. Павлова. 25(1): 30–41. 2017. [Chernykh I.V., Shchulkin A.V., Yakusheva E.N., Gatsanoga M.V., Popova N.M. Analysis of attribution of Noopept to substrates and modulators of functional activity of ABCB1-protein in *in vivo* experiment. Rossiyskiy mediko-biologicheskiiy vestnik imeni akademika I.P. Pavlova. 25(1): 30–41. 2017. (In Russ.)].
6. Шулькин А.В., Якушева Е.Н., Попова Н.М. Роль гликопротеина-P в рациональной фармакотерапии в кардиологии. Рациональная фармакотерапия в кардиологии. 9(6): 701–707. 2013. [Shchulkin A.V., Yakusheva E.N., Popova N.M. The role of P-glycoprotein in rational pharmacotherapy in cardiology. Ratsional'naya farmakoterapiya v kardiologii. 9(6): 701–707. 2013. (In Russ.)].
7. Ивашев М.Н., Арлыт А.В., Савенко И.А., Сергиенко А.В., Зацепина Е.Е., Лысенко Т.А., Куянцева А.М., Саркисян К.Х. Особенности кардиогеодинамики при применении золетила у лабораторных животных. Научные ведомости БелГУ. Серия: Медицина. Фармация. 123(4–1): 168–171. 2012. [Ivashev M.N., Arlyt A.V., Savenko I.A., Sergiyenko A.V., Zatsypina E.E., Ly-senko T.A., Kuyantseva A.M., Sarkisyan K.H. Features of cardiohaemodynamics after usage of zoletil at laboratory animals. Nauchnyye vedomosti BelGU. Seriya: Meditsina. 123(4–1): 168–171. 2012. (In Russ.)].
8. Liu W.J., Jiang H.F., Rehman F.U., Zhang J.W., Chang Y., Jing L., Zhang J.Z. Lycium barbarum polysaccharides decrease hyperglycemia-aggravated ischemic brain injury through maintaining mitochondrial fission and fusion balance. Int. J. Biol. Sci. 13(7): 901–910. 2017.
9. Ohura K., Nakada Y., Kotani S., Imai T. Design of fexofenadine prodrugs based on tissue-specific esterase activity and their dissimilar recognition by P-glycoprotein. J. Pharm. Sci. 104(9): 3076–3083. 2015.
10. Каркищенко Н.Н., Хоронько В.В., Сергеева С.А., Каркищенко В.Н. Фармакокинетика. Ростов-на-Дону. Феникс. 2001. [Karkishchenko N.N., Khoronko V.V., Sergeeva S.A., Karkishchenko N.N. Farmakokinetika. [Pharmacokinetics]. Rostov-na-Donu. Feniks. 2001.
11. Kerns E.H., Di L. Drug-like properties: Concepts, structure design and methods: from ADME to toxicity optimizati. Acad. Press. 2016.
12. Yano K., Takimoto S., Motegi T., Tomono T., Hagiwara M., Idota Y., Moromot K., Takahara A., Oghihara T. Role of P-glycoprotein in regulating cilnidipine distribution to intact and ischemic brain. Drug Metab. Pharmacokinet. 29(3): 254–258. 2014.
13. Ji B.S., Cen J., He L., Liu M., Liu Y.Q., Liu L. Modulation of P-glycoprotein in rat brain microvessel endothelial cells under oxygen glucose deprivation. J. Pharm. Pharmacol. 65(10): 1508–1517. 2013.
14. Spudich A., Kilic E., Xing H., Kilic U., Rentsch K.M., Wunderli-Allenspach H., Bassetti C.L., Her-mann D.M. Inhibition of multidrug resistance transporter-1 facilitates neuroprotective therapies after focal cerebral ischemia. Nat. Neurosci. 9(4): 487–488. 2006.
15. Cen J., Liu L., Li M.S., He L., Wang L.J., Liu Y.Q., Liu M., Ji B.S. Alteration in P-glycoprotein at the blood-brain barrier in the early period of MCAO in rats. J. Pharm. Pharmacol. 65: 665–672. 2013.

16. Dickens D., Owen A., Alfirevic A., Pirmohamed M. ABCB1 single nucleotide polymorphisms (1236C > T, 2677G > T, and 3435C > T) do not affect transport activity of human P-glycoprotein. *Pharmacogenet. Genomics*. 23(6): 314–323. 2013.

P-Glycoprotein Functional Activity in Blood–Brain Barrier During Ischemia–Reperfusion

I. V. Chernykh^{a,*}, A. V. Shchulkin^a, E. N. Yakusheva^a, A. S. Esenina^a,
M. M. Gradinar^a, P. Yu. Mylnikov^a, M. V. Gatsanoga^a

^a*Pavlov Ryazan state medical university, Ryazan, Russia*

**e-mail: ivchernykh88@mail.ru*

Abstract—On 70 male Wistar rats, the activity of the protein transporter P-glycoprotein (Pgp) and relative transporter amount were studied in blood–brain barrier (BBB) of frontal lobe cerebral cortex during middle cerebral artery (MCA) occlusion–reperfusion. Occlusion was performed endovascularly for 30 min. The Pgp activity in BBB was assessed indirectly by the concentration of its marker substrate – fexofenadine in rats cerebral cortex after intravenous administration at a dose of 10 mg/kg 24 hours after reperfusion. Cortical tissue samples of the cerebral hemispheres and blood plasma were collected 5, 10, 15, 30, 45, and 60 minutes after fexofenadine administration. Fexofenadine concentrations in tissues were determined by HPLC. The Pgp relative amount was assessed using immunohistochemistry. It was found that MCA occlusion–reperfusion led to increasing BBB permeability for Pgp marker substrate – fexofenadine. It was proved by an increase of fexofenadine area under ‘concentration–time’ curve in the cerebral cortex and of the ratio between the area under it’s ‘concentration–time’ curves in the cerebral cortex and blood plasma in 3.2 and 2.5 times respectively in comparison with the sham-operated animals. Immunohistochemical assessment of Pgp relative amount in BBB after the middle cerebral artery occlusion–reperfusion showed that the transporter amount increases 1.9 times compared with sham-operated rats. Thus, despite the increase in Pgp relative amount in BBB against during MCA occlusion–reperfusion, its permeability to fexofenadine increases, which is probably due to violation of its structure during oxygen deficiency.

Keywords: P-glycoprotein, blood–brain barrier, occlusion–reperfusion of the middle cerebral artery

ЦИТИРОВАТЬ:

Черных И.В., Шулькин А.В., Якушева Е.Н., Есенина А.С., Градинарь М.М., Мыльников П.Ю., Гацаноба М.В. Функциональная активность гликопротеина-Р в гематоэнцефалическом барьере на фоне ишемии-реперфузии головного мозга. *Рос. физиол. журн. им. И.М. Сеченова*. 105(5): 657–664.

DOI: 10.1134/S0869813919050133

TO CITE THIS ARTICLE:

Chernykh I.V., Shchulkin A.V., Yakusheva E.N., Esenina A.S., Gradinar M.M., Mylnikov P.Yu., Gatsanoga M.V. PGlycoprotein Functional Activity in Blood–Brain Barrier During Ischemia–Reperfusion. *Russian Journal of Physiology*. 105(5): 657–664.

DOI: 10.1134/S0869813919050133