

Влияние Р-гликопротеина на транспорт противосудорожных средств в головной мозг

А.М. Зыбина¹, К.Н. Куличенкова¹, В.Ю. Балабаньян², С.Э. Гельперина², К.Р. Аббасова¹

¹ – Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, Москва

² – ООО «Технология лекарств», г. Химки Московской обл.

Контактная информация: Балабаньян Вадим Юрьевич, bal.pharm@mail.ru

Резистентность к антиэпилептическим препаратам (АЭП) является серьезной клинической проблемой. Среди факторов, обуславливающих устойчивость к АЭП, определенную роль играет гиперэкспрессия Р-гликопротеина (Р-гр) – одного из основных транспортеров, ограничивающих поступление ксенобиотиков в мозг. В настоящее время нет единого мнения о взаимодействии карбамазепина (КБЗ) с Р-гр. Целью настоящего исследования явилось изучение влияния верапамила – ингибитора Р-гр на противосудорожный эффект КБЗ на модели эпилепсии у крыс, вызванной изониазидом. Показано, что применение верапамила позволяет значительно усилить противосудорожное действие КБЗ и обеспечивает снижение его эффективной дозы не менее, чем на 30% (с 30 мг/кг до 20 мг/кг). Полученные данные свидетельствуют о том, что Р-гр существенно ограничивает поступление КБЗ в мозг.

Ключевые слова: гематоэнцефалический барьер, изониазид, карбамазепин, Р-гликопротеин, эпилепсия.

Введение

Возникновение фармакорезистентных форм эпилепсии в определенной мере связано с повышенной экспрессией специфических трансмембранных белков – АВС-транспортеров (от англ. «ATP-binding cassette» – АТФ-связывающая кассета), в частности, Р-гликопротеина (Р-гр) в различных структурах мозга [15]. Гиперэкспрессия Р-гр обнаружена как в эндотелиальных клетках капилляров мозга пациентов с резистентной формой эпилепсией [4], так и на моделях эпилепсии у животных, индуцированных введением каината или электрическим киндлингом [22].

В настоящее время остается неясным, является ли гиперэкспрессия Р-гр причиной или следствием устойчивой

формы эпилепсии [11, 7]. Тем не менее, поскольку многие АЭП являются субстратами Р-гр, гиперэкспрессия этого транспортера на поверхности церебрального эндотелия ограничивает транспорт АЭП в мозг и, таким образом, приводит к снижению их терапевтического эффекта. Данные о влиянии гиперэкспрессии Р-гр на эффективность транспорта АЭП (в т.ч. фенитоина, ламотриджина, топирамата и др.) через гематоэнцефалический барьер (ГЭБ) были получены в экспериментах *in vitro* и *in vivo* [12].

Резистентность наблюдается также и к карбамазепину (КБЗ) – одному из основных АЭП, эффективных в отношении генерализованных тоникоклонических и парциальных судорог. Причиной резистентности считают

генетический полиморфизм генов, кодирующих белки, модулирующие активность ферментов, участвующих в метаболизме КБЗ (CYP3A4, CYP3A5, CYP2C9, CYP2C19 и EPHX1), снижение эффективности связывания или плотности соответствующих рецепторов (SCN1A, SCN2A), а также повышенную экспрессию P-gr [2, 16].

Ингибирование P-gr верапамилом приводит к повышению эффективности КБЗ при лечении резистентной эпилепсии у людей [21], что свидетельствует об ограниченном проникновении препарата в мозг в условиях гиперэкспрессии P-gr. На модели резистентной эпилепсии крыс, вызванной электрическим киндлингом миндалевидного тела, показано, что ингибирование P-gr путем предварительного введения верапамила приводит к повышению концентраций КБЗ в интерстициальной жидкости кортекса [13]. В то же время, влияние P-gr на транспорт КБЗ через ГЭБ в условиях нормальной экспрессии транспортера изучено недостаточно.

Целью настоящего исследования явилось изучение влияния верапамила на противосудорожный эффект карбамазепина на изониазидовой модели эпилепсии у крыс.

Материалы и методы

Исследование выполнено на крысах-самцах популяции линий Wistar (n=81) массой 300-350 г, полученных из вивария экспериментальных животных ИМБП РАН, с соблюдением требований, предъявляемых к работе с экспериментальными животными в РФ, а также в соответствии с Европей-

ской конвенцией по охране позвоночных животных.

Животных содержали в стандартных условиях со свободным доступом к воде и комбикорму.

Судороги у крыс инициировали внутрибрюшинным введением изониазида (ИЗН) в дозе 300 мг/кг [14]. После введения ИЗН за поведением животных наблюдали в течение 120 мин, оценивая их состояние по шкале Рэйсина, где 0 – нормальное поведение животного, 1 – тремор лицевых и жевательных мышц, 2 – кивания головой, 3 – клонус передних конечностей, 4 – подъем на задние лапы (поза «кенгуру»), 5 – подъем на задние лапы с падением, тяжелые тонико-клонические судороги с потерей позы [17]. Также учитывали латентный период наступления и продолжительность судорог. КБЗ вводили в хвостовую вену за 45 мин до введения изониазида в дозе 30 мг/кг (минимальная противосудорожная доза, купирующая судороги, установленная в пилотных экспериментах). Поскольку КБЗ практически нерастворим в воде, в качестве растворителя использовали р-р полиэтиленгликоля-400 10% (ПЭГ-400). В качестве ингибитора P-gr использовали верапамил (40 мг/кг внутрибрюшинно), введенный за 1 ч до КБЗ [1]. Отдельной группе животных вводили верапамил и хемоконвульсант без АЭП с целью исключения собственной противосудорожной активности верапамила. На фоне верапамила КБЗ вводили внутривенно в субтерапевтической дозе 20 мг/кг. Животным контрольной группы вводили физ. р-р за 1 ч до КБЗ. Дизайн эксперимента представлен в табл. 1.

Таблица 1

Дизайн эксперимента по исследованию противосудорожного действия карбамазепина

Группы	Количество животных	Препарат			
		Изониазид (ИЗН), 300 мг/кг в/б	Карбамазепин, в/в за 45 мин до ИЗН	Верапамил, в/б за 60 мин до КБЗ	Плацебо
1 (контроль)	16	+	-	-	0,9% NaCl
2 (контроль)	8	+	-	-	ПЭГ-400
3	7	+	-	40 мг/кг	ПЭГ-400
4	12	+	20 мг/кг	-	-
5	12	+	20 мг/кг	40 мг/кг	-
6	10	+	30 мг/кг	-	-

Для оценки проницаемости ГЭБ после эпилептического приступа, индуцированного введением ИЗН, животным вводили внутривенно краситель Evans Blue в дозе 40 мг/кг [10]. Через 2 ч после введения красителя крысам внутрибрюшинно вводили хлоралгидрат (ХГ, 400 мг/кг) и проводили транскардиальную перфузию физ. р-ром, а затем – формалином 4%, который вводили в кровоток в объеме 40-60 мл. После этого извлекали головной мозг, выдерживали в формалине 3 дня, потом его помещали

на 3-4 дня в р-р сахарозы 30% для криопротекции.

Проникновение красителя в мозг оценивали визуально (при проникновении Evans Blue ткань головного мозга должна была окраситься синим) и методом флуоресцентной микроскопии «postmortem» на криосрезях толщиной 20 мкм. Исследование было проведено на конфокальной лазерной сканирующей установке «Nikon» (Япония). Дизайн эксперимента представлен в табл. 2.

Таблица 2

Дизайн эксперимента по исследованию проницаемости ГЭБ

Группы	Количество животных	Препарат	
		Evans Blue (EB), 40 мг/кг в/в	Изониазид (ИЗН), через 45 мин после EB 300 мг/кг
1 (контроль)	2	-	-
2	2	+	-
3	2	+	+

Статистическую обработку данных проводили с помощью программы Microsoft Excel и пакета статистических программ Statistica 8.0, используя критерий Манна-Уитни. Различия считали достоверными при уровне значимости $p < 0,05$.

Результаты и их обсуждение

На фоне введения ИЗН у всех экспериментальных животных наблюдалось возникновение эпилептического приступа, при этом первый приступ начинался, как правило, через 40-50 мин после введения. ПЭГ-400 и верапамил не оказывали противосудорожного действия (рис. 1-3). Введение КБЗ в дозе 30 мг/кг приводило к развитию выраженного противосудорожного действия, которое проявлялось достоверным снижением тяжести (рис. 1) и продолжительности

(рис. 2) судорог, а также увеличением латентного периода их наступления (рис. 3). При снижении дозы КБЗ до 20 мг/кг противосудорожный эффект не наблюдался; тяжесть и латентный период наступления судорог не отличались от данных контрольной группы животных, однако продолжительность судорог оказалась достоверно ниже, чем в контроле, и достоверно выше по сравнению с эффективными дозами КБЗ. В то же время, на фоне введения верапамила КБЗ в дозе 20 мг/кг вызвал выраженный противосудорожный эффект. При этом все оцениваемые параметры (тяжесть, продолжительность и латентный период) в этой группе достоверно отличались от параметров контрольной группы животных (рис. 2, 3): максимальная тяжесть судорог снижалась, а латентный период был достоверно повышен.

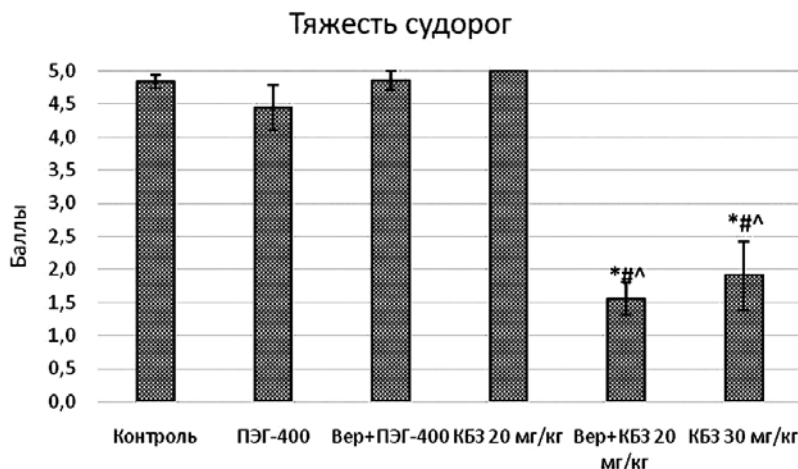


Рис. 1. Средняя тяжесть судорог по шкале Рэйсина в исследуемых группах (ПЭГ-400 – полиэтиленгликоль-400, КБЗ – карбамазепин, Вер – верапамил).

Примечание (здесь и далее): * – $p < 0,05$ по сравнению с контролем ($n=16$),

– $p < 0,05$ по сравнению с группой КБЗ 20 мг/кг ($n=12$),

^ – $p < 0,05$ по сравнению с Вер+ПЭГ-400 ($n=7$).

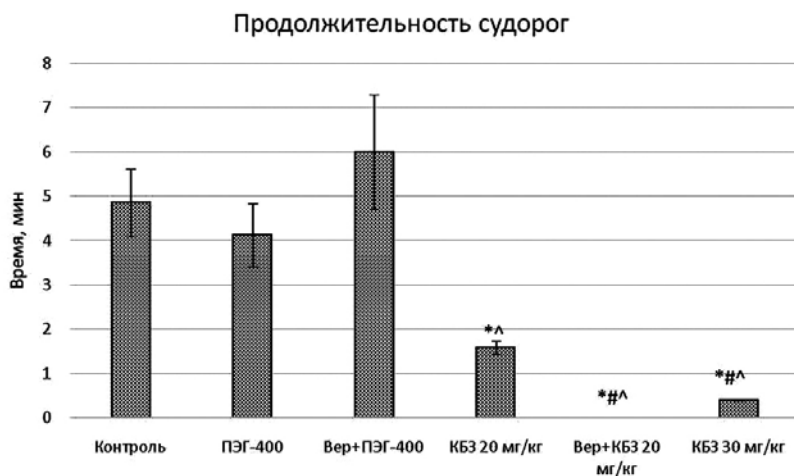


Рис. 2. Средняя продолжительность тяжелых судорог (4-5 баллов по шкале Рэйсина) в исследуемых группах животных.

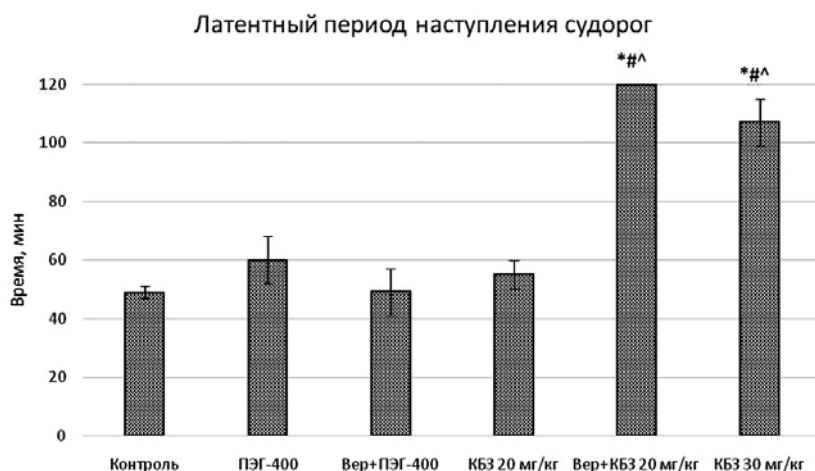


Рис. 3. Средний латентный период наступления клонико-тонических судорог в исследуемых группах животных.

С целью качественной оценки проницаемости ГЭБ на фоне судорог, вызванных ИЗН, животным вводили внутривенно флуоресцентный краситель Evans Blue, не проникающий через нормальный (неповрежденный) ГЭБ [18] и являющийся маркером его структурно-функциональной целостности. Визуальная оценка срезов го-

ловного мозга показала отсутствие проникновения ЕВ в головной мозг (рис. 4А-В). Флуоресцентная микроскопия срезов мозга также не выявила флуоресценции ни в одной из исследуемых групп (рис. 4Г-Е). Полученные результаты свидетельствуют о сохранении целостности ГЭБ в течение всего эксперимента.

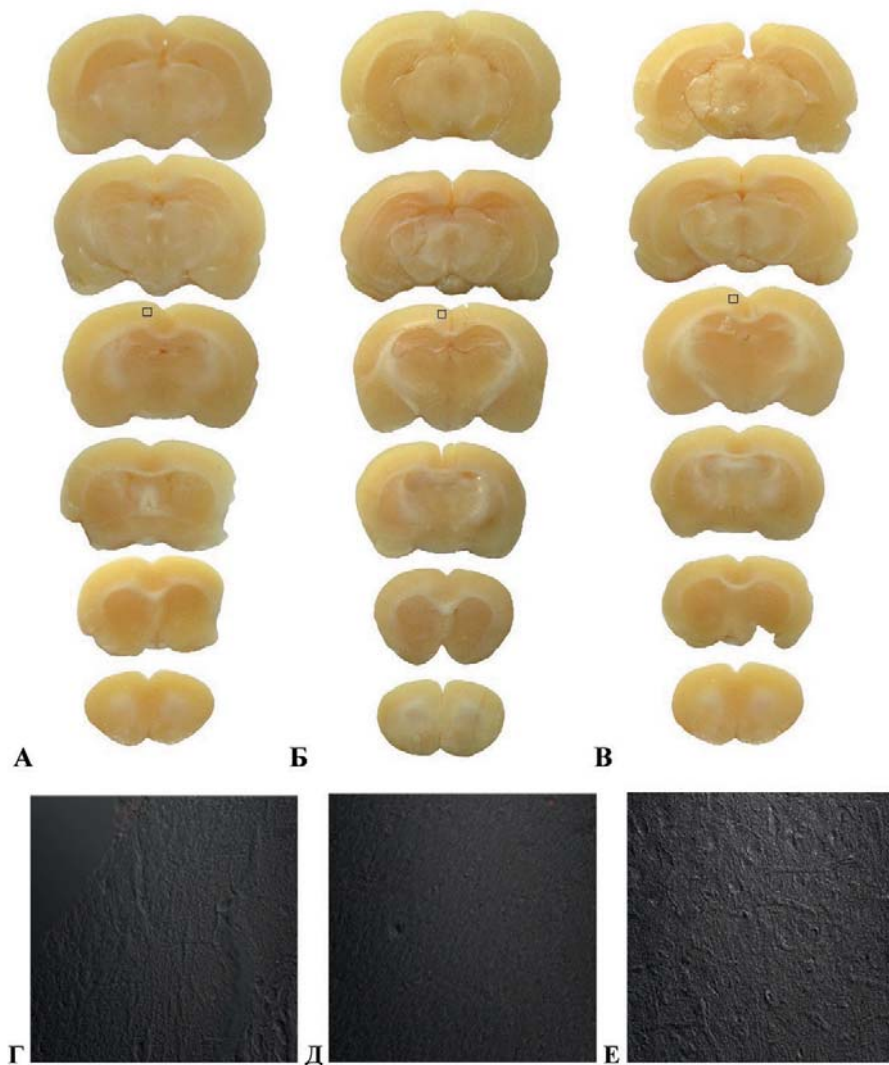


Рис. 4. Репрезентативные гистологические срезы головного мозга крыс через 2 ч после внутривенного введения Evans Blue. А, Г – отрицательный контроль (без красителя); Б, Д – внутривенное введение; В, Е – внутривенное введение с последующим введением ИЗН. Черным квадратом на срезах А-В обозначена область фотографий Г-Е.

В настоящее время существуют различные экспериментальные модели эпилепсии. При этом некоторые противосудорожные препараты проявляют активность только на определенных моделях эпилепсии [20]. Так, например, КБЗ эффективен на моделях эпилепсии у крыс, индуцированных методом электрического киндлинга, а также введением некоторых хемоконвульсантов: пилокарпина, каината и ИЗН [11]. Известно, что модель электрического киндлинга приводит к повышению проницаемости ГЭБ [22], а введение

лепсии у крыс, индуцированных методом электрического киндлинга, а также введением некоторых хемоконвульсантов: пилокарпина, каината и ИЗН [11]. Известно, что модель электрического киндлинга приводит к повышению проницаемости ГЭБ [22], а введение

каината и пилокарпина – к гиперэкспрессии Р-гр [8]. Выбор изониазидовой модели эпилепсии определялся, с одной стороны, ее чувствительностью к КБЗ, а с другой стороны – отсутствием значительных структурно-функциональных изменений ГЭБ [9]. При введении высокой дозы ИЗН происходит замедление синтеза ГАМК, вследствие чего снижается активность тормозной системы головного мозга и возникают судороги [5]. Выбранная модель эпилепсии технически проста, отличается хорошей воспроизводимостью и поэтому применяется для экспресс-скрининга новых АЭП [19]. Известно, что ИЗН – мощный ингибитор цитохрома Р450 (CYP450), который может приводить к снижению клиренса КБЗ [3], однако ИЗН не является субстратом или индуктором Р-гр [9].

В настоящее время нет единого мнения о взаимодействии КБЗ и Р-гр. Как отмечалось выше, при фармакорезистентной форме эпилепсии, сопровождающейся гиперэкспрессией Р-гр, применение верапамила позволяет повысить эффективность КБЗ путем облегчения его транспорта в мозг [21]. Тем не менее, результаты ряда исследований предполагают, что хотя КБЗ и является индуктором Р-гр, его транспорт через ГЭБ в большей степени зависит от других АВС-транспортёров – в частности, таких, как MRP (multidrug resistance-associated proteins) и BCRP (breast cancer resistance protein) [15].

Данные исследований *in vitro* с использованием монослоя поляризованных клеток MDCK [23] и сегментов тощей кишки мыши, экспрессирующих Р-гр [6], подтверждают отсутствие заметного влияния Р-гр как на абсорбцию

КБЗ, так и на его обратный транспорт из клеток. В то же время эти исследования свидетельствуют об активном Р-гр-зависимом обратном транспорте его главного активного метаболита КБЗ-10,11-эпоксида, образующегося в печени. Это важный факт, поскольку, как известно, КБЗ является аутоиндуктором собственного метаболизма в печени, и при регулярном приеме его эффективность может значительно снижаться именно из-за быстрой трансформации в печени с образованием метаболита, ограниченно проникающего в мозг.

Как показывают результаты данного исследования, применение верапамила – селективного ингибитора Р-гр позволяет значительно усилить противосудорожное действие КБЗ в отношении судорог, индуцированных ИЗН, обеспечивая снижение эффективной дозы не менее чем на 30% – с 30 мг/кг до 20 мг/кг. Можно было бы предположить, что усиление эффекта происходит в результате облегченного проникновения в мозг активного метаболита КБЗ. Однако это маловероятно, поскольку условия эксперимента не способствовали образованию метаболита: во-первых, КБЗ был введен внутривенно, т.е. его поступление в печень было ниже, чем в случае обычно применяемого перорального введения; во-вторых, препарат вводился животному впервые, что исключает аутоиндукцию метаболизма.

Заключение

Таким образом, полученные данные отчетливо подтверждают, что Р-гр играет существенную роль в транспорте КБЗ через ГЭБ, значительно ограничивая его поступление в мозг.

Список литературы

1. *Alvariza S., Fagiolino P., Vázquez M., et al.* Verapamil effect on phenytoin pharmacokinetics in rats // *Epilepsy Res.* 2013. Vol. 107. No. 1-2. P. 51-55.
2. *Daci A., Beretta G., Vllasaliu D., Shala, et al.* Polymorphic variants of SCN1A and EPHX1 influence plasma carbamazepine concentration, metabolism and pharmacoresistance in a population of Kosovar Albanian epileptic patients // *PLoS One.* 2015. Vol. 10. P. 1-17.
3. *Desta Z., Soukhova N.V., Flockhart D.A.* Inhibition of cytochrome P450 (CYP450) isoforms by isoniazid: potent inhibition of CYP2C19 and CYP3A // *Antimicrob agents chemother.* 2001. Vol. 45. No. 2. P. 382-392.
4. *Dombrowski S.M., Desai S.Y., Marroni M., et al.* Overexpression of multiple drug resistance genes in endothelial cells from patients with refractory epilepsy // *Epilepsia.* 2001. Vol. 42. P. 1501-1506.
5. *El Idrissi A., 'Amoreaux W.J.L.* Selective resistance of taurine-fed mice to isoniazide-potentiated seizures: in vivo functional test for the activity of glutamic acid decarboxylase // *Neuroscience.* 2008. Vol. 156. No. 3. P. 693-699.
6. *Fortuna A., Alves G., Falcão A., et al.* Evaluation of the permeability and P-glycoprotein efflux of carbamazepine and several derivatives across mouse small intestine by the using chamber technique // *Epilepsia.* 2012. Vol. 53. No. 3. P. 529-538.
7. *Gidal B.E.* P-glycoprotein expression and pharmacoresistant epilepsy: cause or consequence? // *Epilepsy. Curr.* 2014. Vol. 14. No. 3. P. 136-138.
8. *Han J.Y., Ahn S.Y., Yoo J.H., et al.* Alleviation of kainic acid-induced brain barrier dysfunction by 4-o-methylhonokiol in *in vitro* and *in vivo* models // *Biomed. Res. Int.* 2015. Article ID 893163.
9. *Horita Y., Doi N.* Comparative study of the effects of antituberculosis drugs and antiretroviral drugs on cytochrome P450 3A4 and P-glycoprotein. *Antimicrob Agents Chemother* // *Antimicrob Agents Chemother.* 2014. Vol. 58. No. 6. P. 3168-3176.
10. *Hoffmann A., Bredno J., Wendland M., et al.* High and low molecular weight fluorescein isothiocyanate (FITC)-dextran to assess blood-brain barrier disruption: technical considerations // *Transl. stroke res.* 2011. Vol. 2. No. 1. P. 106-111.
11. *Löscher W., Luna-Tortós C., Römermann K., et al.* Do ATP-binding cassette transporters cause pharmacoresistance in epilepsy? Problems and approaches in determining which anti-epileptic drugs are affected // *Curr. Pharm. Des.* 2011. Vol. 17. No.26. P. 2808-2828.
12. *Luna-Tortós C., Fedrowitz M., Löscher W.* Several major antiepileptic drugs are substrates for human P-glycoprotein // *Neuropharmacology.* 2008. Vol. 55. No. 8. P. 1364-1375.
13. *Ma A., Wang C., Chen Y., et al.* P-glycoprotein alters blood-brain barrier penetration of antiepileptic drugs in rats with medically intractable epilepsy // *Drug. des. devel. ther.* 2013. Vol. 7. P. 1447-1454.
14. *Nair R., Kumar A.C., Priya V.K., et al.* // *Lipids Health Dis.* 2012.
15. *Potschka H.* Role of CNS efflux drug transporters in antiepileptic drug delivery: overcoming CNS efflux drug transport // *Adv. Drug deliv. Rev.* 2012. Vol. 64. No. 10. P. 943-952.
16. *Puranik Y.G., Birnbaum A.K., Marino S.E., et al.* Association of carbamazepine major metabolism and transport pathway gene polymorphisms and pharmacokinetics in patients with epilepsy // *Pharmacogenomics.* 2013. Vol. 14. No. 1. P. 35-45.
17. *Racine R.J.* Modification of seizure activity by electrical stimulation. II. Motor seizure // *Electroencephalogr. clin. neurophysiol.* 1972. Vol. 32. No. 3. P. 281-294.
18. *Rubin L.L., Staddon J.M.* The cell biology of the blood-brain barrier ann. rev. // *Neurosci.* 1999. Vol. 22. P. 11-28.
19. *Sun X.Y., Wei C.X., Deng X.Q., et al.* Evaluation of the anticonvulsant activity of 6-(4-chlorophenoxy)-tetrazolo[5,1-a]phthalazine in various experimental seizure models in mice // *Pharmacol. Rep.* 2010. Vol. 62. No. 2. P. 273-277.
20. *Smith M., Wilcox K.S., White H.S.* Discovery of antiepileptic drugs // *Neurotherapeutics.* 2007. Vol. 4. No. 1. P. 12-17.

21. *Summers M.A., Moore J.L., McAuley J.W.* Use of verapamil as a potential P-glycoprotein inhibitor in a patient with refractory epilepsy // *Ann. Pharmacother.* 2004. Vol. 38. No. 10. P. 1631-1634.
22. *Volk H.A., Potschka H., Löscher W.* Increased expression of the multidrug transporter P-glycoprotein in limbic brain regions after amygdala-kindled seizures in rats // *Epilepsy Res.* 2004. Vol. 58. No. 1. P. 67-79.
23. *Zhang C., Zuo Z., Kwan P., et al.* In vitro transport profile of carbamazepine, oxcarbazepine, eslicarbazepine acetate, and their active metabolites by human P-glycoprotein // *Epilepsia.* 2011. Vol. 52. No. 10. P. 1894-1904.

The influence of P-glycoprotein on the transport of anticonvulsants in the brain

A.M. Zybina, K.N. Kulichenkova, V.Yu. Balaban`yan, S.E. Gel`perina,
K.R. Abbasova

Pharmacoresistance to antiepileptic drugs (AEDs) is one of the major problems in the treatment of epilepsy. According to one of the current hypotheses, this pharmacoresistance may be associated with the reverse transport of AEDs by drug efflux transporters such as P-glycoprotein (Pgp) through the blood-brain barrier. However, so far there is no unequivocal opinion regarding the involvement of P-gp in the resistance to carbamazepine, one of the most important AEDs. The objective of the present study was to investigate the influence of verapamil, which is known to be P-gp inhibitor, on the anticonvulsive effect of carbamazepine in rat epilepsy induced by isoniazid. A significant enhancement of the anticonvulsive effect of carbamazepine in the presence of verapamil (30% decrease of the effective dose – from 30 mg/kg to 20 mg/kg) suggests that P-glycoprotein may considerably limit the transport of carbamazepine to the brain.

Key words: blood-brain barrier, isoniazid, carbamazepine, P-glycoprotein, epilepsy.