

Дозозависимое влияние тироксина на функциональную активность гликопротеина-Р в эксперименте

Е.Н. Якушева, А.В. Шулькин, А.С. Бирюкова

Рязанский государственный медицинский университет, Минздравсоцразвития РФ, Рязань

Контактная информация: Якушева Елена Николаевна enya.rzn@yandex.ru

В исследовании на кроликах изучено влияние L-тироксина на активность белка-транспортера гликопротеина-Р (Pgp). Активность Pgp изучали по фармакокинетике его маркерного субстрата фексофенадина. Установлено, что введение L-тироксина в течение 14 дней приводит к дозозависимой индукции активности Pgp.

Ключевые слова: гликопротеин-Р, MDR1, L-тироксин, гипертиреоз, фексофенадин.

Суперсемейство ABC-транспортеров (ATP-binding cassette), к которому относятся более ста транспортных белков, обнаруженных как у бактерий, так и у человека, в настоящее время находится под пристальным вниманием исследователей. Белки указанного суперсемейства транспортируют самые разнообразные субстраты — от неорганических ионов до полисахаридов и белков, для них характерна общая доменная организация в клетках и высокая консервативность. Одним из наиболее изученных транспортеров является гликопротеин-Р (от англ. permeability — проницаемость) — крупный трансмембранный белок с молекулярной массой 170 кДа, состоящий из двух одинаковых частей, каждая из которых включает шесть трансмембранных участков [9].

Гликопротеин-Р (Pgp) — АТФ-зависимый насос, локализованный на цитоплазматических мембранах различных клеток и осуществляющий выброс во внеклеточное пространство различных ксенобиотиков, в том числе и лекар-

ственных веществ. Ряд химических соединений как естественного, так и синтетического происхождения оказывают индуцирующее или ингибирующее влияние на функциональную активность Pgp, что приводит, в конечном счете, к значительному изменению фармакокинетики, активности и токсичности лекарственных веществ [4].

Влияние тиреоидных гормонов на функциональную активность Pgp остается недостаточно изученным. Активация белково-синтетических функций и повышение интенсивности энергетических процессов в клетке под действием тироксина гипотетически способны оказать влияние на функциональную активность Pgp.

Цель настоящего исследования: изучить влияние L-тироксина на функциональную активность гликопротеина-Р в эксперименте.

Материалы и методы

Работа выполнена на 12 половозрелых кроликах породы шиншилла, средней массой 3500±100 г. В исследование

включали самок, которые находились в состоянии течки. L-тироксин (Berlin-Chemi Menarini) вводили подкожно в течение 14 дней: 6 самкам — в дозе 25 мкг/кг массы (серия с низкой дозой тирокина) и 6 самкам — в дозе 100 мкг/кг массы (серия с высокой дозой тирокина) [1, 2]. За сутки до начала эксперимента, через 14 дней введения L-тироксина и на 5-й день отмены препарата у животных определяли активность Pgr и уровень ТТГ, Т3 и Т4 в сыворотке крови.

Активность белка-транспортера оценивали по концентрации в плазме крови его маркерного субстрата — фексофенадина. Фексофенадин (Sanofi Aventis) вводили животным перорально с помощью металлического зонда в дозе 30 мг/кг массы [3]. Через 1, 2, 3, 4, 5, 6, 8, 12 и 24 ч от момента введения препарата из ушной вены кроликов забирали кровь в объеме 5 мл. Для получения плазмы пробы центрифугировали при 3000 об/мин в течение 10 мин и хранили до анализа при температуре -29°C. Содержание фексофенадина в плазме крови определяли методом ВЭЖХ на хроматографе «Beckman Coulter» с ультрафиолетовым детектором и колонке «Beckman Coulter» 4,6*250 мм, зернением 5 мкм. Экстракцию и хроматографирование маркерного субстрата осуществляли по методу Раменской Г.В. с соавт. [5] в собственной модификации. Анализ выполняли при длине волны 225 нм и скорости подвижной фазы 1 мл/мин. Использовали подвижную фазу следующего состава: 133,7 мл бидистиллированной воды, содержащей 2,33 мл ледяной уксусной кислоты (ХИММЕД) и 0,936 мл триэтиламина (Chem-Lab), доведенной ортофосфорной кислотой до pH 4 и 64 мл ацетонитрила (Chem-Lab). Осуществляли жидкостную экстракцию фексофенадина из плазмы крови. В каче-

стве экстрагентов использовали дихлорметан (ACROS ORGANICS), этилацетат (ACROS ORGANICS) и диэтиловый эфир (ХИММЕД). Коэффициент экстракции составил 53%.

Количественное определение фексофенадина выполняли по методу абсолютной калибровки, с использованием стандарта фексофенадина (Strasbourg cedex). Представлено уравнение калибровочной зависимости для определения фексофенадина в плазме крови:

$$y = ax + b = -0,0001 + 9,4089 \cdot 10^{-6} \cdot x,$$

где y — высота пика фексофенадина в единицах экстинкции, x — содержание фексофенадина в стандартном растворе в нг/мл. Коэффициент регрессии r для данной калибровочной зависимости равнялся 0,9958.

Примененный метод хроматографического анализа обладал следующими характеристиками: время удерживания — 13,7 мин; предел обнаружения фексофенадина в плазме крови — 90 нг/мл; точность — 4,2%.

Вычисление концентрации фексофенадина осуществляли с помощью программы Gold. Фармакокинетические параметры (максимальную концентрацию $C_{\max}$, площадь под фармакокинетической кривой концентрация-время $AUC_{0-\infty}$, общий клиренс, объем распределения) рассчитывали модельно-независимым методом с использованием программы Kinetica 5.0. Отношение $C_{\max}/AUC_{0-\infty}$ рассчитывали самостоятельно.

Уровень гормонов определяли радиоиммунным методом с применением стандартных тест-систем производства IMMUNOTECH (Чехия) и дальнейшей обработкой результатов на анализаторе «Иммунотест» (Москва) в ЦНИЛ РязГМУ.

Полученные данные обрабатывали статистически с помощью программ

Statsoft Statistica 6.1. Характер распределения данных определяли по критерию Шапиро-Уилка. Для исследования статистической значимости показателей, имеющих нормальное распределение, внутри каждой серии использовали тест ANOVA повторных измерений, межгрупповые различия определяли по критерию Ньюмена-Кейсла. Для оценки статистической значимости различий групп при распределении признака, которое от-

личается от нормального, использовали критерий Фридмана, межгрупповые различия определяли по критерию Ньюмена-Кейсла. Зависимость изучаемых фармакокинетических параметров от уровня гормонов определяли по коэффициенту корреляции Пирсона для выборок с нормальным распределением (r) и по коэффициенту корреляции Спирмена (R_s) для выборок с распределением отличным от нормального.

Таблица 1

Основные фармакокинетические параметры фексофенадина и гормональный статус кроликов при введении тироксина в дозе 25 мкг/кг массы ($M \pm m$ — при нормальном распределении признаков; медиана, нижний и верхний квартиль — при распределении признака, отличным от нормального)

Изучаемые параметры	Исходные значения n=6	Тироксин 14 дней n=6	5-й день отмены тироксина n=6
Cmax, нг/мл	385,9±54,7	234,0±22,4*, **	320,1±24,1
Tmax, ч	4,0 (3,0; 4,0)	4,0 (4,0; 5,0)	4,0 (4,0; 4,0)
T, ч	28,9 (5,4; 29,02)	10,17 (6,07; 14,56)	8,17 (6,47; 20,34)
AUC0-t, нг/чмл	6886,9±1351,5	3795,7±767,7	4841,6±1011,8
AUC0-∞, нг/чмл	4058,4 (3609; 4394,9)	1526 (1449,3; 2148,8)*	2191,8 (2054,1; 3644,8)
Общий клиренс, л	16,1±4,0	30,1±6,5	22,2±3,6
Объем распределения, л	344,3±52,3	446,1±49,2	360,3±25,1
Cmax / AUC	0,072±0,021	0,077±0,017	0,081±0,016
MRT, ч	38,9 (10,0; 41,8)	17,1 (11,1; 22,5)	14,8 (11,0; 27,8)
MRTt, ч	10,0 (8,8; 11,9)	6,5 (4,1; 6,7)*	6,0 (5,9; 9,7)*
ТТГ, мМЕ/л	0,7 (0,7; 0,8)	0,5 (0,4; 0,5)*, **	0,7 (0,6; 0,8)
T3, нмоль/л	1,2 (1,1; 1,6)	7,7 (7,2; 8,3)*, **	1,1 (1,0; 1,1)
T4, нмоль/л	39,8±0,6	139,1±13,0*, **	60,7±7,5

Примечание: * — достоверные различия с данными у интактных животных, $p < 0,05$;

** — достоверные различия с данными на 5 день отмены тироксина, $p < 0,05$.

Таблица 2

Основные фармакокинетические параметры фексофенадина и гормональный статус кроликов при введении тироксина в дозе 100 мкг/кг массы ($M \pm m$ — при распределении признаков; медиана, нижний и верхний квартиль — при распределении признака отличным от нормального)

Изучаемые параметры	Исходные значения n=6	Тироксин 14 дней n=6	5-й день отмены тироксина n=6
$C_{\max}$, нг/мл	399,8±14,2	180,3±9,8*, **	332,4±14,3*
$T_{\max}$, ч	4,0 (3,0; 4,0)	4,0 (4,0; 5,0)	4,0 (4,0; 4,0)
T , ч	13,5±4,0	7,7±4,4	12,8±1,9
AUC_{0-1} , нг/чмл	3522,4 (3303,0; 3631,3)	1195,0 (1032,1; 1202,4)*, **	3237,7 (1875,6; 3992,1)
$AUC_{0-\infty}$, нг/чмл	5336,4±717,3	1937,1±666,3*, **	4881,5±763,0
Общий клиренс, л	18,6±2,6	52,7±14,4*, **	21,3±3,7
Объем распределения, л	329,9±47,5	445,9±72,9	372,5±20,8
$C_{\max}/AUC$	0,084±0,0135	0,144±0,04	0,076±0,01
MRT, ч	20,9±5,1	13,8±6,2	19,7±2,6
MRT _t , ч	10,5 (8,3; 10,8)	5,7 (5,1; 6,9)*	10,3 (6,3; 11,1)
ТТГ, мМЕ/л	0,6±0,02	0,5±0,03*	0,6±0,03
Т3, нмоль/л	1,8±0,09	9,9±0,5*, **	4,2±0,6*
Т4, нмоль/л	70,0±4,3	241,6±12,9*, **	42,1±1,8*

Примечание: * — достоверные различия с данными у интактных животных, $p < 0,05$;

** — достоверные различия с данными на 5 день отмены тироксина, $p < 0,05$.

Полученные данные представлены в виде среднего арифметического значения и стандартной ошибки среднего результата в случае нормального распределения признака или в виде медианы, верхнего и нижнего квартиля — если распределение данных отличалось от нормального.

Результаты и их обсуждение

Введение как низкой (25 мкг/кг массы), так и высокой дозы (100 мкг/кг массы) L-тироксина приводило к раз-

витию выраженного гипертиреоза, что проявлялось повышением уровней Т4 на 249,5% ($p < 0,05$) и 245,1% ($p < 0,05$), Т3 на 496,1% ($p < 0,05$) и 450,0% ($p < 0,05$) и снижением содержания ТТГ в сыворотке крови на 36,9% ($p < 0,05$) и 19,4% ($p < 0,05$) соответственно по сравнению с исходными значениями (табл. 1 и 2). Более выраженные изменения показателей у животных, получавших низкую дозу L-тироксина, связаны с исходно более низкими показателями уровней Т4, Т3

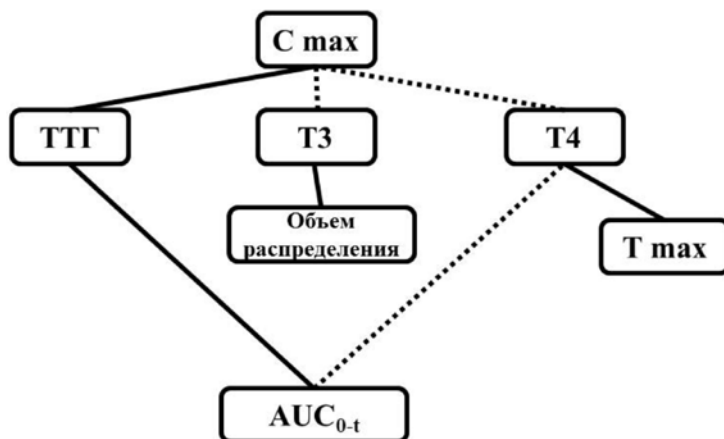


Рис. 1. Зависимость изучаемых фармакокинетических параметров от гормонального статуса кроликов при введении тироксина в дозе 25 мкг/кг массы (коэффициент корреляции Спирмена). Обозначения: непрерывная линия — прямопропорциональная связь; пунктирная линия — обратнопропорциональная связь между признаками.

и более высоким уровнем ТТГ в данной серии опыта (табл. 1). На 5-й день отмены низкой дозы L-тироксина происходила нормализация гормонального статуса лабораторных животных. В отличие от данных этой серии, на 5-й день отмены высокой дозы L-тироксина содержание Т3 оставалось повышенным на 133,3% ($p<0,05$), концентрация Т4 снижалась на 39,9% ($p<0,05$), уровень ТТГ соответствовал норме.

При изучении фармакокинетики фексофенадина — маркерного субстрата Рgr на фоне введения тироксина — получены результаты, которые представлены в табл. 1 и 2.

Применение кроликам L-тироксина в дозе 25 мкг/кг в течение 14 дней вызывало снижение $C_{\max}$ на 39,4% ($p<0,05$), AUC_{0-t} — на 62,4% ($p<0,05$), MRT_t — на 35,0% ($p<0,05$) по сравнению с исходными значениями. На 5-й день отмены L-тироксина изучаемые параметры возвращались к норме и достоверно от исходных значений не отличались, за исключением MRT_t , которое оставалось сниженным на 40,0% ($p<0,05$).

При введении L-тироксина в дозе 100 мкг/кг массы в течение 14 дней наблюдалась схожая динамика показателей, но выраженная в большей степени. $C_{\max}$ снизилась на 54,9% ($p<0,05$), $AUC_{0-\infty}$ — на 63,7% ($p<0,05$), MRT_t — на 45,7% ($p<0,05$), общий клиренс увеличился на 183,3% ($p<0,05$). На 5-й день отмены высокой дозы L-тироксина $C_{\max}$ оставалась сниженной на 16,8% ($p<0,05$), остальные изучаемые фармакокинетические параметры достоверно от исходных значений не отличались ($p>0,05$).

Оценка зависимости фармакокинетических параметров от гормонального статуса показала (рис. 1), что у животных, получавших L-тироксин в низкой дозе, имелась прямая пропорциональная связь между уровнем ТТГ — $C_{\max}$ фексофенадина ($R=0,65$, $p=0,005$) и AUC_{0-t} ($R=0,5$, $p=0,042$); уровнем Т3 и объемом распределения ($R=0,53$, $p=0,03$); содержанием Т4 и $T_{\max}$ ($R=0,51$; $p=0,04$) и обратно пропорциональная связь между уровнем Т3 и $C_{\max}$ ($R=-0,6$; $p=0,01$); содержанием Т4 — $C_{\max}$ ($R=-0,56$; $p=0,019$) и AUC_{0-t} ($R=-0,67$; $p=0,003$).

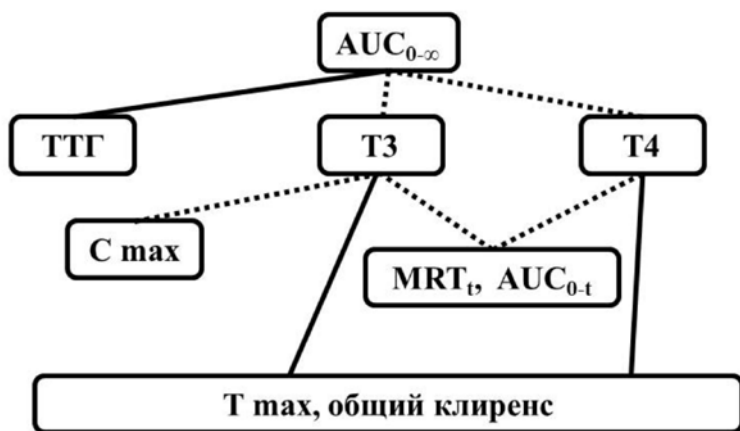


Рис. 2. Зависимость изучаемых фармакокинетических параметров от гормонального статуса кроликов при введении высокой дозы тироксина в дозе 100 мкг/кг массы (коэффициент корреляции Спирмена). Обозначения: непрерывная линия — прямопропорциональная связь; пунктирная линия — обратно-пропорциональная связь между признаками.

У животных, получавших L-тироксин в высокой дозе, наблюдалась (рис. 2) прямая пропорциональная связь между уровнем ТТГ и $AUC_{0-\infty}$ ($R=0,48$; $p=0,049$); содержанием Т3 — T_{max} ($R=0,6$; $p=0,01$), общим клиренсом ($R=0,73$; $p=0,0012$); концентрацией Т4 — T_{max} ($R=0,5$; $p=0,038$), общим клиренсом ($R=0,54$; $p=0,029$). Обратно пропорциональная связь отмечалась между концентрацией Т3 — C_{max} ($R=-0,857$; $p=0,0001$), AUC_{0-t} ($R=-0,77$; $p=0,0003$), $AUC_{0-\infty}$ ($R=-0,77$; $p=0,0002$) и MRT_t ($R=-0,72$; $p=0,001$); уровнем Т4 — AUC_{0-t} ($R=-0,6$; $p=0,01$), $AUC_{0-\infty}$ ($R=-0,6$; $p=0,01$) и MRT_t ($R=-0,55$; $p=0,023$).

Pgr — белок-транспортёр, обладающий широкой субстратной специфичностью. В научной литературе описан ряд лекарственных средств, влияющих на функциональную активность гликопротеина-P, повышающих ее (индукторы) или снижающих (ингибиторы) [2].

В настоящем исследовании изучено влияние L-тироксина на функциональную активность Pgr на уровне целого ор-

ганизма, что позволяет прогнозировать фармакокинетику субстратов белка-транспортёра. Показано, что на фоне введения L-тироксина происходит снижение C_{max} , $AUC_{0-\infty}$, AUC_{0-t} , MRT_t и одновременно повышение общего клиренса фексофенадина, что свидетельствует о повышении активности белка-транспортёра Pgr. В то же время увеличение общего клиренса (характеризующего выведение лекарственных веществ из организма) и отсутствие изменений в отношении $C_{max}/AUC_{0-\infty}$ (характеризующего всасывание лекарственных веществ) можно рассматривать как селективное повышение активности Pgr под действием L-тироксина в печени и почках — органах, ответственных за выведение фексофенадина. Полученные данные косвенно свидетельствуют о тканеспецифичной индукции Pgr. Более выраженные изменения фармакокинетики фексофенадина при введении L-тироксина в дозе 100 мкг/кг массы по сравнению с дозой 25 мкг/кг являются следствием дозозависимой стимуляции активности Pgr.

Результаты исследования сопоставимы с данными по изучению экспрессии Pgp у крыс с гипертиреозом. Авторы выявили существенное повышение экспрессии Pgp в печени и почках, умеренное — в тощей и подвздошной кишке, что позволило им сделать вывод о тканеспецифичной индукции экспрессии белка-транспортера [7]. Активация Pgp под влиянием тироксина может быть связана со стимуляцией ядерных рецепторов и индукцией экспрессии Pgp, которая опосредована увеличением транскрипции мРНК, кодируемой геном *mdr1a/b*, что обнаружено в ткани почек у крыс [7, 10].

На культуре клеток с повышенной экспрессией MDR1 обнаружено, что ТЗ выводится из клеток Pgp [6]. Аналогичные данные получены для Pgp в гематоэнцефалическом барьере. Показано, что белок-транспортер регулирует проникновение Т4 в спинно-мозговую жидкость [11].

На культуре клеток кишечника человека Сасо-2 выявлено, что ТЗ регулирует экспрессию и функции Pgp. Установлено, что накопление дигоксина в клетках Сасо-2 существенно снижалось при использовании ТЗ. [8]. Таким образом, тиреоидные гормоны являются субстратами и тканеспецифичными индукторами Pgp, а дисфункция щитовидной железы способна существенно изменять фармакокинетику лекарственных веществ.

Выводы

1. Введение кроликам L-тироксина подкожно в дозах 25 и 100 мкг/кг массы в течение 14 дней приводит к развитию экспериментального гипертиреоза, который характеризуется повышением уровней ТЗ и Т4 и снижением уровня ТТГ в сыворотке крови.

2. L-тироксин, назначаемый кроли-

кам в течение 14 дней, вызывает дозозависимую индукцию активности гликопротеина-Р, определяемую по фармакокинетики его маркерного субстрата фексофенадина, что подтверждается снижением C_{max} , AUC_{0-t} , MRTt (дозы 25 и 100 мкг/кг) и увеличением общего клиренса (доза 100 мкг/кг).

3. Выявляется обратная корреляция между уровнем ТЗ и C_{max} фексофенадина при назначении L-тироксина в низкой и высокой дозах.

Список литературы

1. Айвазова А.С., Колхир В.К. Патент 2357296 Рос. Федерация. МПК 609823/28 Способ моделирования тиреотоксикоза и коллоидного зоба. Всероссийский научно-исследовательский институт лекарственных и ароматических растений (ВИЛАР); № 2007143562/14; заявл. 27.11.2007; опублик. 27.06.2009.
2. Годовалов А.П. Адренергическая регуляция фагоцитарной активности нейтрофилов при экспериментальном тиреотоксикозе // Вестник уральской медицинской академической науки. 2010. № 2/1 (29). 112 с.
3. Колхир С.В. Клиническое значение изучения активности транспортера лекарственных средств гликопротеина-Р для оптимизации фармакотерапии: диссертация на соискание ученой степени кандидата медицинских наук: 14.00.25 / С.В. Колхир; ГОУ ВПО ММА им. И.М. Сеченова. М. 2007. 21 с.
4. Кулес В.Г., Грачев С.В., Сычев Д.А., Раменская Г.В. Метаболизм лекарственных средств. Научные основы персонализационной медицины: руководство для врачей — М.: ГЭОТАР-МЕДиа. 2008. 304 с.

5. **Раменская Г.В., Скуридина Е.В., Красных Л.М.** Разработка методики количественного определения маркера активности Р-гликопротеина фексофенадина в плазме крови // Хим. фарм. журн. 2006. том 40. № 12. С. 47–50.
6. **Kassem N. et al.** Thyroxine (T4) transfer from CSF to choroid plexus and ventricular brain regions in rabbit: contributory role of P-glycoprotein and organic anion transporting polypeptides // Brain Res. 2007. Vol. 1181. P. 44–50.
7. **Mitchell A.** Thyroid hormone export from cells: contribution of P-glycoprotein / A. Mitchell, M. Tom, R. Mortimer // Endocrinol. 2005. Vol. 185. № 1. P. 93–98.
8. **Nishio N.** Modulation of P-glycoprotein expression in hyperthyroid rat tissues / [et al.] // Journal of endocrinology. 2005. Vol. 185. P. 93–98.
9. **Nishio N., Katsura T., Inui K.** Thyroid hormone regulates the expression and function of P-glycoprotein in Caco-2 cells // Pharm. Res. 2008. Vol. 25(5). P. 1037–1042.
10. **Reibeiro R.C.J. et al.** The molecular biology of thyroid hormone action // Ann NY Acad Sci. 1995. Vol. 758. P. 366–389.
11. **Sarkadi B., Homolya L., Szakocs G. et al.** Human Multidrug Resistance ABCB and ABCG Transporters: Participation in a Chemoinnity Defense System // Physiol. Rev. 2006. Vol. 86. P. 1179–1236.

Dose-dependent thyroxine influence of P-glycoprotein functional activity in the experiment

Е.Н. Yakusheva, А.В. Shchulkin, А.С. Byryukova

In the research on the rabbits influence of L-thyroxine on the activity of the protein-transporter P-glycoprotein (Pgp) was studied. Activity of the Pgp was studied on the pharmacokinetics of its marker substrate fexofenadine. It was established that introduction of L-thyroxine within 14 days lead to the dose-dependent induction of Pgp activity.

Key words: P-glycoprotein, MDR1, L-thyroxine, hyperthyroidism, fexofenadine.