

Оценка функциональной активности Р-гликопротеина путем измерения фармакокинетических параметров его субстрата фексофенадина

Г. В. Раменская, Е. А. Скуридина, Д. А. Сычев, В. Г. Кукес
ММА им. И. М. Сеченова, г. Москва

Изучена динамика концентрации фексофенадина у человека и животных после приема верапамила и негрустина (действующее вещество — экстракт зверобоя). Установлено, что прием верапамила приводит к повышению биодоступности субстрата Р-гликопротеина — фексофенадина, а прием негрустина — к ее снижению. На основании полученных результатов сделан вывод о том, что верапамил ингибирует, а экстракт зверобоя индуцирует активность Р-гликопротеина.

Для современной медицины характерен комплексный подход к фармакотерапии большинства заболеваний. В целях повышения эффективности проводимой фармакотерапии пациенту назначается сразу несколько лекарственных препаратов. Невозможно избежать назначения целого комплекса препаратов и при наличии у пациента нескольких заболеваний. Одновременный прием пациентом нескольких лекарственных средств очень часто приводит к нежелательным лекарственным реакциям, в основе которых лежат различные виды взаимодействия. Различают фармацевтическое, фармакодинамическое и фармакокинетическое взаимодействие лекарственных средств. Данное исследование посвящено изучению взаимодействия препаратов на фармакокинетическом уровне. В последние годы этому виду взаимодействия посвящено большое количество работ.

Индивидуальная чувствительность и переносимость лекарственных средств в значительной степени зависит от состояния системы биотрансформации ксенобиотиков. К важнейшим системам защиты клетки от токсического действия ксенобиотиков принадлежит цитохром Р-450, локализованный в мембранах эндоплазматического ретикулума, разрушающий ксенобиотики путем окисления, а также трансмембранный Р-гликопротеин, локализованный в плазматической мембране и выполняющий функции насоса, удаляющего из клетки потенциально токсические липофильные соединения [1].

Важным фактором, определяющим эффективность обезвреживания токсических веществ, является способность цитохрома Р-450 и Р-гликопротеина

к индукции и ингибированию под действием различных лекарственных препаратов, приводящая к недостаточности или, напротив, чрезмерности назначаемой пациенту фармакотерапии.

Целью нашего исследования было изучение влияния верапамила и негрустина (действующее вещество — сухой экстракт зверобоя) на функциональную активность Р-гликопротеина. В качестве маркера активности данного белка использовался препарат Телфаст (фексофенадин), являющийся субстратом гликопротеина Р, не оказывающий влияния на его активность и не подвергающийся метаболизму с помощью системы цитохрома Р-450 [2, 3].

СТРОЕНИЕ И ФУНКЦИИ Р-ГЛИКОПРОТЕИНА

Роли транспортных белков в распределении и достижении клинического эффекта препаратов в последние годы уделяется большое внимание. Лучше всего изучены свойства гликопротеина Р, который транспортирует множество структурно различных препаратов. Он расположен на поверхности эпителиальных клеток тонкой кишки, мембране желчных канальцев печени, проксимальных канальцах почек и эпителиальных клетках, входящих в состав гематоэнцефалического и гематотестикулярного барьеров. Р-гликопротеин влияет на распределение препаратов за счет ограничения их абсорбции в кишечнике, облегчая их выделение путем секреции с желчью и мочой, уменьшая их проникновение в головной мозг и яички [4-7].

В настоящее время установлено, что Р-гликопротеин, фосфорилированный и гликозилированный полипептид, содержащий 1280 аминокислот, и имеющий

молекулярную массу 179 кДа, является интегральным белком плазматической мембраны клетки. Р-гликопротеин принадлежит к семейству белков ABC. В это семейство входит более 100 белков, использующих для своей работы энергию АТФ [2, 5, 8].

Р-гликопротеин (Р — начальная буква в слове «permeability» — проницаемость) был открыт в 1976 году Juliano и Ling, он принадлежит к большому семейству белков, которые называют семейством ABC (от англ. ATP Binding Cassette — группа белков, связывающих АТФ). В это семейство входит более 100 белков различных организмов — от бактерий до человека, для своей работы они используют энергию АТФ. Эти весьма разнообразные белки построены по сходному принципу и представляют собой tandemно дуплицированные молекулы, состоящие из двух гомологичных половин, состоящих из 610 аминокислот, содержащих 6 трансмембранных (ТМ) α -спиральных доменов каждая (см. домены 1, рис. 1, а) и цитоплазматического домена, связывающего АТФ, состоящего из 60 аминокислот (домен 2, рис. 1, а). Обе половины белка соединены между собой с помощью подвижного линкерного полипептида, обеспечивающего точное пространственное взаимодействие двух половин Р-гликопротеина. Домены ABC или АТФ-связывающие домены разных белков этого семейства имеют высокую степень сходства (гомологии) по аминокислотным последовательностям.

В настоящее время известно, что все 12 ТМ доменов белка формируют лиганд-связывающий «карман», 2 цитоплазматических домена образуют 2 каталитических центра Р-гликопротеина, обеспечивающих гидролиз АТФ [2].

Результаты проводимых исследований Р-гликопротеина позволяют выделить следующие функции данного белка.

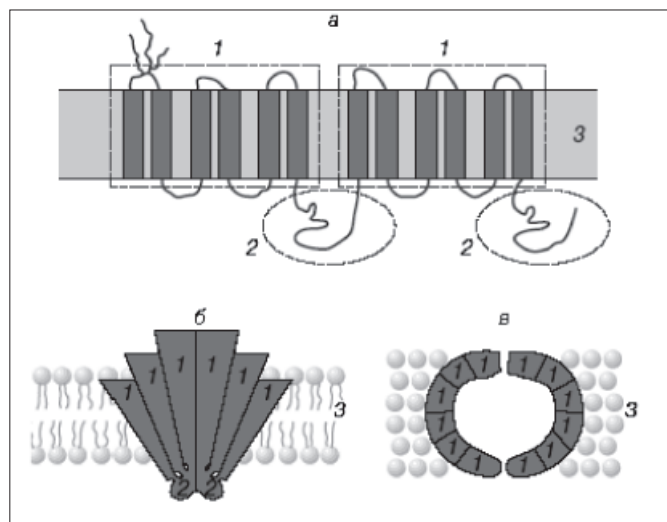
- 1. Барьерная функция** (защита организма от ксенобиотиков). Препятствие всасыванию препаратов в кишечнике и экскреция эндогенных и экзогенных токсинов с желчью, мочой, а также защита от ксенобиотиков тканей мозга, гонад и организма плода [7, 12-15].
- 2. Участие в стероидном обмене.** Присутствие Р-гликопротеина в клетках надпочечников и эндометрия, вырабатывающих стероиды, возможно, необходимо для защиты цитоплазматической мембраны клеток. Обнаружено, что Р-гликопротеин, вырабатываемый эпителиальным монослоем, способен транспортировать стероиды [16].
- 3. Влияние на обмен холестерина.** Этерификация холестерина, являющаяся одним из механизмов обезвреживания этого токсичного для клеток вещества, происходит в эндоплазматическом ретикулуме. Интенсивность этого процесса лимитируется количеством холестерина в этой части клетки. Р-гликопротеин облегчает транспорт холестерина из цитоплазматической мембраны в эндоплазматический ретикулум.
- 4. Участие в работе иммунной системы.** Роль Р-гликопротеина в работе кроветворной и иммунной системы еще недостаточно изучена. Существуют предположения, что этот белок вовлечен в транспорт некоторых цитокинов, например, ИЛ-1, ИЛ-2, ИЛ-4 и γ -ИФ, но не ИЛ-6 из активированных лимфоцитов [17].
- 5. Участие в гибели клеток и в клеточной дифференциации.** Обнаружено, что высокий уровень экспрессии Р-гликопротеина естественными киллерами и Т-лимфоцитами CD8⁺ является причиной снижения цитотоксической активности этих клеток. Р-гликопротеин обуславливает резистентность опухолевых клеток к апоптозу [18].

Разнообразные субстраты Р-гликопротеина объединяет следующее: все эти вещества липофильны, имеют небольшие размеры, ароматические кольца в химической структуре и несут положительный заряд [5].

При исследованиях разных препаратов Р-гликопротеина в отсутствие субстратов обнаружена существенная базальная АТФ-азная активность белка. Установлено, что эта активность является внутренним свойством белка, поскольку она присутствует только в препаратах, выделенных из клеток, экспрессирующих Р-гликопротеин, и отсутствует в таких же препаратах, выделенных из клеток, не экспрессирующих данный белок. К тому же эта активность может увеличиваться в присутствии

Строение и функции Р-гликопротеина

Рис. 1.



Примечание:

- а — схема линейной структуры белка:
 1 — домены,
 2 — участок белка, связывающий АТФ;
- б — схема расположения белка в мембране клетки:
 1 — домены белка, пересекающие мембрану,
 2 — домены, связывающие АТФ,
 3 — мембрана клетки;
- в — схема расположения Р-гликопротеина в мембране клетки:
 1 — домены белка, пересекающие мембрану,
 3 — мембрана клетки.

одних специфических для Р-гликопротеина субстратов и снижаться ниже базального уровня в присутствии других. Практически все субстраты, связывающиеся с транспортным доменом белка, влияют на активность Р-гликопротеина, стимулируя или угнетая ее. Необходимо отметить, что некоторые лекарственные вещества являются одновременно и субстратами и ингибиторами гликопротеина Р.

Совместное применение ингибиторов Р-гликопротеина с его субстратами может приводить к увеличению в крови концентрации последних, в результате чего повышается риск развития нежелательных лекарственных реакций.

Известно, что хинидин, являясь мощным ингибитором Р-гликопротеина, способствует повышению концентрации его субстрата дигоксина. Это является причиной повышения риска развития нежелательных реакций дигоксина, вплоть до дигиталисной интоксикации, при его совместном применении с хинидином. С другой стороны, терапия стандартными дозами дигоксина может оказаться недостаточно эффективной при его совместном приеме с рифампином, который, являясь индуктором Р-гликопротеина, способствует усилению обратного выброса дигоксина [1, 3].

Способность рифампина повышать активность Р-гликопротеина кишечника, тем самым, уменьшая биодоступность лекарственных препаратов, была обнаружена и в другом исследовании: биодоступность фексофенадина после шестидневного приема рифампина снизилась на 47% [19].

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

В нашем исследовании фармакокинетики препарата Телфаст (фексофенадин) принимали участие 14 пациентов без патологии печени, почек и ЖКТ. Образцы крови отбирались непосредственно перед приемом Телфаста в дозе 180 мг и через каждые 1, 2, 3, 4, 5, 6, 8, 12, 24 часа после приема. Затем пациенты принимали верапамил в дозе 80 мг×3 раза в день в течение 10 дней (группа 1) или капсулы негрустина (действующее вещество — сухой экстракт зверобоя) ×3 раза в день в течение 14 дней (группа 2). После этого вновь получали таблетку Телфаста 180 мг и через вышеуказанные промежутки времени производился отбор образцов крови. Аналогичным образом исследование препарата проводилось у 12 кроликов (группы 3 и 4).

Образцы крови объемом 5–7 мл отбирали в пластиковые пробирки с гепарином, центрифугировали для отделения плазмы при 3000 мин⁻¹ в течение 10 минут. На анализ отбирали 1 мл плазмы и хранили до анализа при температуре –37°С.

Количественное определение фексофенадина в плазме крови человека и животных осуществлялось при помощи ВЭЖХ. Анализ проводился с помощью хроматографической системы «Shimadzu» при длине волны спектрофотометрического детектора 220 нм, разделение компонентов плазмы осуществлялось на колонке «μ-Bondapak Phenyl» 3,9×300 мм (зернением 10 мкм).

Экспериментально полученные фармакокинетические кривые были обработаны с помощью программы «Kinetica 2000». Данный метод позволяет дать обобщенную характеристику фармакокинетических процессов без применения структурных моделей путем оценки интегральных параметров, относящихся ко всему организму в целом.

Анализ изменения фармакокинетических параметров фексофенадина проводился с помощью однофакторного дисперсионного анализа и t-теста Стьюдента при доверительной вероятности 95%.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

В ходе исследования для каждой группы испытуемых были получены данные динамики содержания фексофенадина в плазме крови. Анализ данных выявил как у пациентов, так и у кроликов значительный разброс концентраций препарата между испытуемыми, что может быть связано с вариабельностью исходной активности гликопротеина Р вследствие различного уровня экспрессии гена MDR1, кодирующего активность гликопротеина Р [9].

Коэффициент вариации при анализе индивидуальных значений концентрации фексофенадина составил около 30% у пациентов и 40% у кроликов. Проведенный дисперсионный анализ данных, относящихся к первоначальному приему Телфаста, не выявил достоверного различия средних концентраций фексофенадина в группах 1, 2, а также 3, 4.

По усредненным концентрациям препарата для каждой группы испытуемых были построены графики зависимости концентрации фексофенадина от времени, прошедшего с момента его приема (рис. 2 и 3).

Помимо представленного на графике статистически достоверного увеличения максимальной концентрации фексофенадина в плазме крови до и после курсового приема пациентами верапамила с 310,2±26 нг/мл до 571,8±53 нг/мл (p<0,01) наблюдается значительное сокращение времени, необходимого для ее наступления, с 2,3±0,67 часа до 1,4±0,44 часа.

В случае негрустина, напротив, максимальная концентрация препарата у пациентов статистически достоверно снизилась с 393,7±42 нг/мл до 161,4±38 нг/мл (p<0,01), а время ее наступления статистически достоверно (p<0,05) увеличилось с 1,6±0,43 до 3,2±1,19 часов.

На рис. 3 показана динамика концентрации фексофенадина у кроликов. Максимум концентрации после 10-дневного приема верапамила в среднем увеличился с 240,4±15 нг/мл до 483,7±168 нг/мл (p<0,05), а время, необходимое для его наступления статистически достоверно сократилось почти вдвое — с 4,0 до 2,0±1,34 часа (p<0,05). После курсового приема негрустина среднее значение максимальной концентрации фексофенадина у кроликов снизилось с 385,3±132 нг/мл до 158,9±42,6 нг/мл (p<0,05), а наблюдавшееся увеличение времени, необходимого для ее наступления, не было статистически достоверным — с 2,3±0,5 до 3,0±1,4 часа.

В табл. 1 представлены фармакокинетические параметры фексофенадина у пациентов и кроликов до и после курсового приема верапамила или негрустина. Различия, являющиеся статистически достоверными, отмечены в таблице звездочками.

На рис. 4 изображены диаграммы, отражающие количественное изменение фармакокинетических параметров после приема верапамила пациентами и кроликами. Можно отметить увеличение площади под фармакокинетической кривой в среднем в 2,7 раза (CV=50,2%)

Рис. 2.

Динамика изменения концентрации фексофенадина в плазме крови пациентов до и после курсового приема верапамила (группа 1) или негрустина (группа 2)

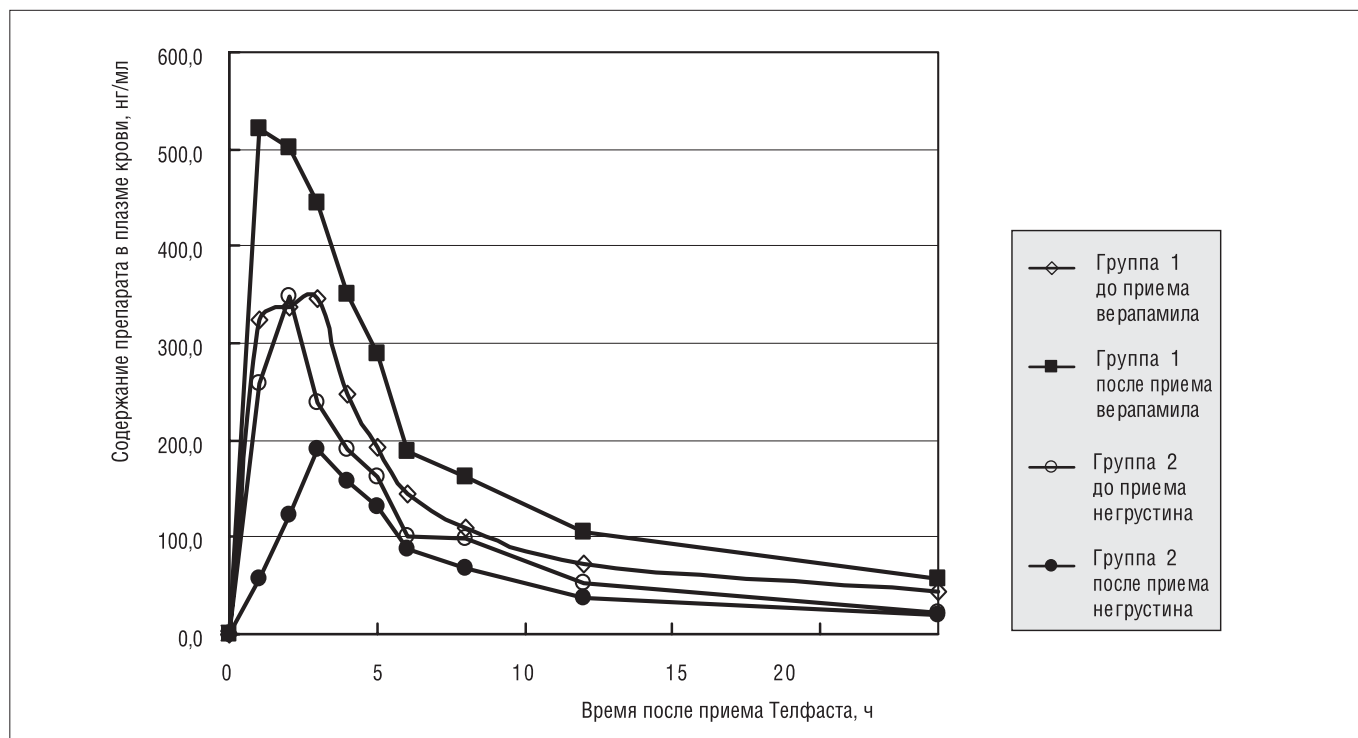
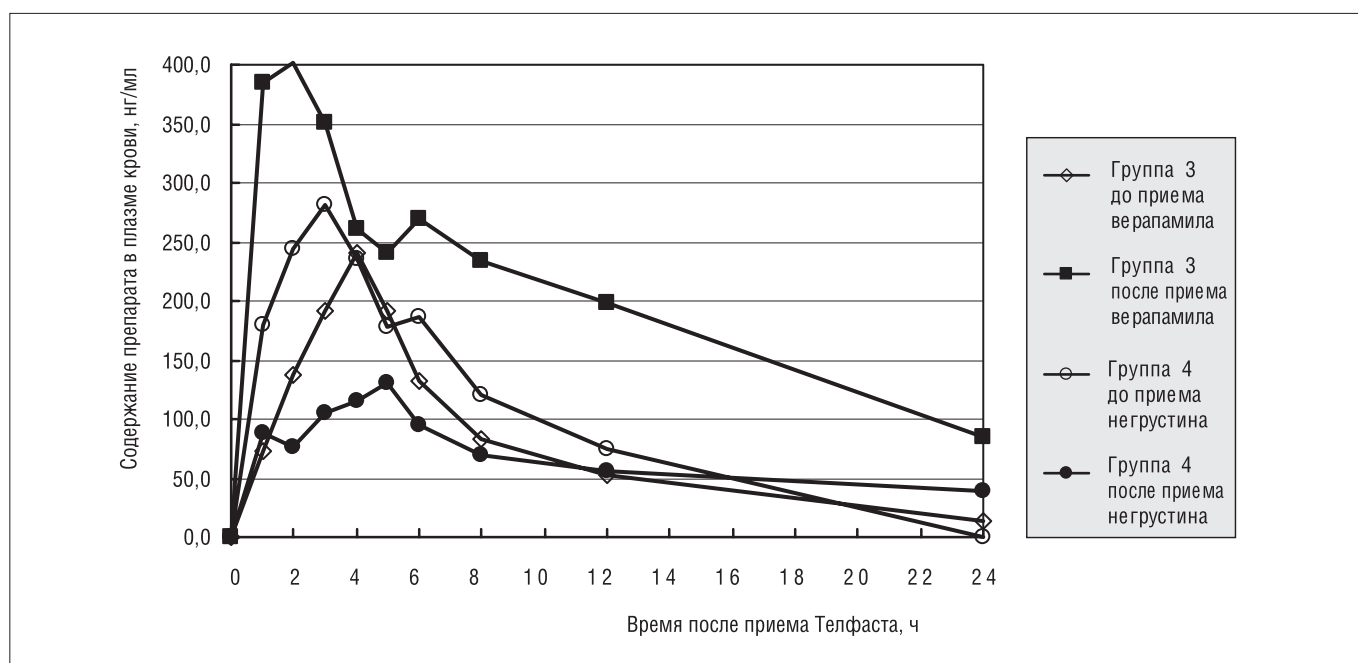


Рис. 3.

Динамика изменения концентрации фексофенадина в плазме крови кроликов до и после курсового приема верапамила (группа 1) или негрустина (группа 2)



у пациентов и в среднем в 2,4 раза ($CV=38,0\%$) у кроликов, а также увеличение максимальной концентрации фексофенадина в среднем в 2,1 раза как у пациентов ($CV=28,3\%$), так и у кроликов ($CV=45,5\%$). В отличие от кроликов ($p=0,03$) у пациентов не наблюдается статистически достоверного сокращения времени

достижения максимальной концентрации фексофенадина ($p=0,07$).

На рис. 4 показано изменение тех же фармакокинетических параметров фексофенадина после приема негрустина. У людей отмечается статистически достоверное уменьшение площади под фармакоки-

Рис. 4.

Относительные изменения фармакокинетических параметров фексофенадина до (светлые столбики) и после (темные столбики) приема верапамила и негрустина у пациентов и кроликов (группы 3 и 4)

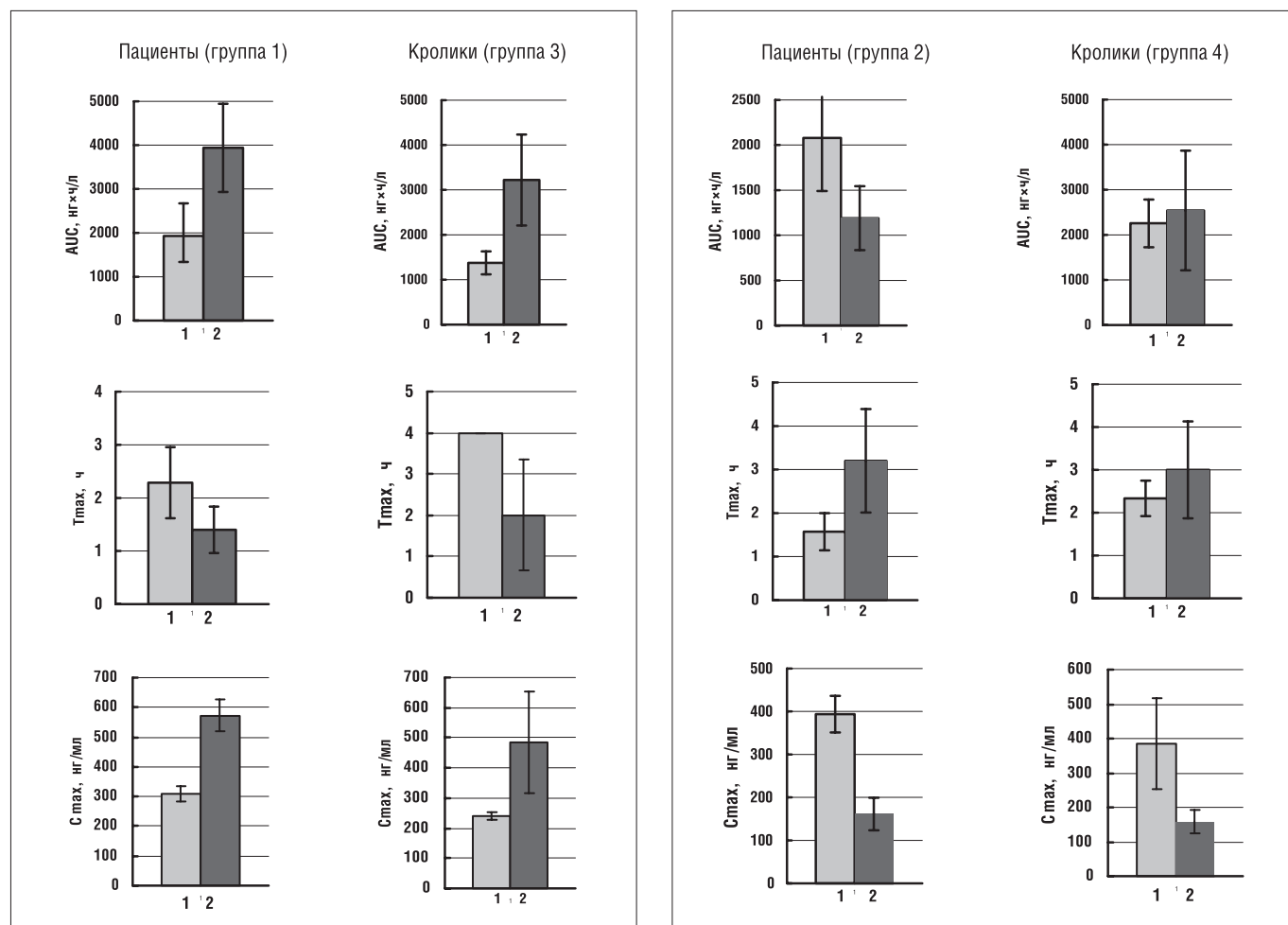


Таблица 1.

Фармакокинетические параметры фексофенадина у испытуемых до и после курсового приема верапамила или негрустина

Фармакокинетический параметр	Верапамил				Негрустин			
	Кролики		Пациенты		Кролики		Пациенты	
	до	после	до	после	до	после	до	после
AUC_{0-4} , нг·ч/л	1375 ±255	3222* ±1014	1929 ±594	3940* ±1005	2257 ±530	2538 ±1326	2079 ±589	1190* ±354
$AUC_{0-\infty}$, нг·ч/л	2449 ±1288	3800 ±1014	4284 ±2940	5633 ±2807	3110 ±1153	4175 ±2134	2511 ±897	1387 ±508
T_{max} , ч	4,00	2,00* ±1,34	2,29 ±0,67	1,40 ±0,44	2,33 ±0,52	3,00 ±1,4	1,57 ±0,43	3,20* ±1,19
C_{max} , нг/мл	240 ±15	484* ±168	310 ±26	572** ±53	385 ±132	159* ±34	394 ±42	161** ±38
MRT, ч	14,35 ±7,64	10,04 ±3,53	15,39 ±5,90	14,10 ±4,27	6,3 ±1,2	25,7* ±10,0	13,2 ±3,5	10,5 ±2,7

Примечание: * – достоверность различий фармакокинетических параметров фексофенадина до и после курсового приема верапамила или негрустина испытуемыми (* – $p \leq 0,05$; ** – $p \leq 0,01$; *** – $p \leq 0,001$).

нетической кривой ($p=0,014$), а также увеличение времени, необходимого для ее достижения ($p=0,035$). И у кроликов, и у людей наблюдается статистически достоверное уменьшение максимальной концентрации препарата в плазме ($p=0,005$ и $p=0,02$ соответственно).

Таким образом, наше исследование показало значительное увеличение биодоступности фексофенадина на фоне приема верапамила и ее уменьшение на фоне приема экстракта зверобоя. Данные явления, возможно, связаны с ингибированием верапамилом и индуцированием экстрактом зверобоя Р-гликопротеина энтероцитов кишечника. Маловероятно, что изменение фармакокинетических параметров связано

с влиянием препаратов на Р-гликопротеин гепатоцитов, так как фексофенадин практически не подвергается метаболизму в печени.

Полученные в ходе эксперимента результаты необходимо учитывать при назначении препаратов-индукторов или ингибиторов Р-гликопротеина одновременно с препаратами, которые, подобно фексофенадину, являются субстратами данного белка.

Правильно подобрав дозу, а также кратность приема препаратов, которые являются субстратами Р-гликопротеина, можно в значительной степени снизить риск развития нежелательных лекарственных реакций, а также повысить эффективность и безопасность лечения.

ЛИТЕРАТУРА

1. Пальцев М.А., Кукес В.Г., Фисенко В.П. (ред.). Молекулярные механизмы взаимодействия лекарственных средств. М.: АстраФармаСервис. 2004;. 224.
2. Новиков А.Г., Логунова З.В., Потеева Н.Н. Фексофенадин в терапии хронической идиопатической крапивницы. Клиническая дерматология и венерология 2003; 2: 53 – 54.
3. Федосеев Г.Б., Зинакова М.К., Ровкина Е.И. Клинические испытания препарата Фексадин (фексофенадин). Иммунология 2004; 4: 19 – 21.
4. Остроумова О.Д., Батурина А.М., Зыкова А.А. Лекарственное взаимодействие: существуют ли «идеальные» лекарственные препараты для использования в условиях полипрагмазии. Русский медицинский журнал 2003; 11: 21: 43 – 50.
5. Eichelbaum M., Greiner B., Fritz P. et al. The role of intestinal P-glycoprotein in the interaction of digoxin and rifampin. Journal of Clinical Investigations 1999; 104: 147 – 153.
6. Miyama T., Takanaga H., Matsuo H. et al. Glycoprotein-Mediated Transport of Itraconazole across the Blood-Brain Barrier. Antimicrobial Agents and Chemotherapy 1998; 42: 7: 1738-1744.
7. Сидорова Т.А., Солнцева Т.И. Р-гликопротеин – АТФ-аза с конститутивной активностью. Биологические мембраны 2003; 20: 3: 225 – 235.
8. Fardel O., Lecureur V. et al. The P-glycoprotein multidrug transporter. General Pharmacology 1996; 27: 8: 1283 - 1291.
9. Стромская Т.П., Рыбалкина Е.Ю. Множественная лекарственная устойчивость опухолевых клеток, обусловленная Р-гликопротеином, и их дифференцировка. Биологические мембраны 2003; 20: 3: 244 – 255.
10. Smit J., Schinkel A., Van O. et al. Homozygous disruption of the murine mdr2 P-glycoprotein gene leads to a complete absence of phospholipids from bile and to liver disease. Cell 1993; 75: 3: 451 - 462.
11. Smit J., Shinkel A., Mol C. et al. Tissue distribution of the human MDR3 P-glycoprotein. Laboratory Investigations 1994; 71: 5: 638 - 649.
12. Jonker J.W., Wagenaar E.L. van Deemter et al. Role of blood-brain barrier P-glycoprotein in limiting brain accumulation and sedative side-effects of asimadoline, a peripherally acting analgesic drug. British Journal of Pharmacology 1999; 127: 43 – 50.
13. Richard B.K., Fromm M.F., Wandel C. et al. The Drug Transporter P-glycoprotein Limits Oral Absorption and Brain Entry of HIV-1 Protease Inhibitors. Journal of Clinical Investigation 1998; 101: 2: 289 – 294.
14. Thiebaut F., Tsuruo T., Hamada H. et al. Cellular localization of the multidrug resistance gene product in normal human tissues. Proceedings of the National Academy of Sciences 1987; 84: 7735 - 7738.
15. Bleasby K., Chauhan S. and Brown C.D.A. Characterization of MPP⁺secretion across human intestinal Caco-2 cell monolayers: role of P-glycoprotein and a novel Na⁺-dependent organic cation transport mechanism. British Journal of Pharmacology 1999; 129: 619 – 625.
16. Gottesman M.M., Pastan I., Ambudkar S.V. P-glycoprotein and multidrug resistance. Current Opinion Genetics and Development 1996; 6: 610 - 617.
17. Johnstone R.W., Cretney E., and Smyth M.J. P-Glycoprotein Protects Leukemia Cells Against Caspase-Dependent, but not Caspase-Independent, Cell Death. Blood 1999; 93: 3: 1075 – 1085.
18. Pavek P., Staud F., Fendrich Z. et al. Examination of the Functional Activity of P-glycoprotein in the Rat Placental Barrier Using Rhodamine 123. Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics 2003; 305: 1239 - 1250.
19. Molimard M., Diquet B., Benedetti M.S. Comparison of pharmacokinetics and metabolism of desloratadine, fexofenadine, levocetirizine and mizolastine in humans. Fundamental and Clinical Pharmacology 2004; 18: 4: 399 – 403.
20. Potschka H., Löscher W. In Vivo Evidence for P-Glycoprotein-Mediated Transport of Phenytoin at the Blood-Brain Barrier of Rats. Epilepsia 2001; 42: 10: 1231.
21. Li Y.C., Fung K.P., Kwok T.T. et al. Mitochondria-Targeting Drug Oligomycin Blocked P-glycoprotein Activity and Triggered Apoptosis in Doxorubicin-Resistant HepG2 Cells. Chemotherapy 2004; 50: 2: 55 – 62.