

На правах рукописи

БИРЮКОВА Алина Сергеевна

**ВЛИЯНИЕ ТИРОКСИНА И ТИАМАЗОЛА НА
ФУНКЦИОНАЛЬНУЮ АКТИВНОСТЬ ГЛИКОПРОТЕИНА-R
В ЭКСПЕРИМЕНТЕ**

14.03.06 – фармакология, клиническая фармакология

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Белгород - 2013

Работа выполнена в Государственном бюджетном образовательном учреждении высшего профессионального образования "Рязанский государственный медицинский университет имени академика И.П. Павлова» Министерства здравоохранения Российской Федерации

Научный руководитель: **Якушева Елена Николаевна,**
доктор медицинских наук

Официальные оппоненты: **Сычев Дмитрий Алексеевич,**
доктор медицинских наук,
профессор, ГБОУ ДПО «Российская медицинская академия последипломного образования» Министерства здравоохранения Российской Федерации, и.о. заведующего кафедрой клинической фармакологии и терапии
Шапошников Андрей Александрович,
доктор биологических наук, профессор,
ФГАОУ ВПО « Белгородский государственный национальный исследовательский университет» Министерства образования и науки Российской Федерации, заведующий кафедрой биохимии и фармакологии

Ведущая организация: Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего профессионального образования «Российский университет дружбы народов» Министерства образования и науки Российской Федерации

Защита диссертации состоится «__» _____ 2013 года в «__» часов на заседании совета по защите диссертаций на соискание ученой степени кандидата наук, на соискание ученой степени доктора наук Д 212.015.013 при ФГАОУ ВПО «Белгородский государственный национальный исследовательский университет» по адресу: 308015, г. Белгород, ул. Победы, 85

С диссертацией можно ознакомиться в научной библиотеке ФГАОУ ВПО «Белгородский государственный национальный исследовательский университет»

Автореферат разослан «__» _____ 2013 г.

Ученый секретарь
совета по защите диссертаций на соискание
учёной степени кандидата наук, на соискание
учёной степени доктора наук,
доктор биологических наук

В.И. Кочкаров

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность исследования

Гликопротеин-Р – белок-транспортер с молекулярной массой ~170 кДа, состоящий из двух одинаковых частей, каждая из которых включает шесть гидрофобных трансмембранных участков, формирующих поры или каналы. Гликопротеин-Р является эффлюксным белком, активно удаляющим вещества из клетки, используя энергию гидролиза АТФ (Aller S.G. et al., 2009; Yamaguchi H. et al., 2012).

Гликопротеин-Р локализован на апикальной мембране энтероцитов, гепатоцитов, эпителиоцитов почечных канальцев и коры надпочечников, в эндотелиоцитах гистогематических барьеров (гематоэнцефалического, гематоовариального, гематотестикулярного и гематоплацентарного), а также на плазматической мембране раковых клеток (Кукес В.Г. и др., 2008; Sharom F.J., 2011).

Основные физиологические функции гликопротеина-Р связаны с выведением липофильных ксенобиотиков и ряда биобиотиков из клеток и защитой организма от действия лекарственных и токсических веществ. Гликопротеин-Р активно участвует в процессах всасывания, распределения и выведения – снижает всасывание лекарственных веществ в кишечнике, препятствует их проникновению в ткани и ускоряет выведение из кровотока в желчь и мочу (Сычев Д.А., Кукес В.Г., 2009). Гиперэкспрессия гликопротеина-Р определяет резистентность опухолевых клеток к цитостатикам (Nobili S. et al., 2012). Показано, что гликопротеин-Р может отвечать за блокировку системы апоптоза в опухолевых клетках и влияет на процессы деления в нормальных стволовых клетках (Carson S.W. et al., 2002).

Гликопротеин-Р – белок-переносчик с широкой субстратной специфичностью. Исследования *in vitro* и *in vivo* показали, что спектр его субстратов включает сердечные гликозиды, блокаторы медленных кальциевых каналов, макролиды, фторхинолоны, ингибиторы ВИЧ-протеиназы, статины, флуоресцентные красители, стероидные гормоны, противоопухолевые средства (Кукес В.Г. и др., 2008; Chin L.W., Kroetz D.L., 2007). Препараты, являющиеся субстратами гликопротеина-Р, как правило, обладают следующими признаками: гидрофобность, наличие водородных связей и положительно заряженные при физиологических значениях рН атомы азота. Некоторые субстраты гликопротеина-Р способны вызывать его индукцию или ингибирование, что существенно изменяет фармакокинетику лекарственных веществ (Seelig A., Landwojtowicz E., 2000; Poongavanam V. et al., 2012).

Учитывая широкую распространенность патологии щитовидной железы, актуальным является изучение влияния тироксина и тиамазола на функциональную активность гликопротеина-Р с целью прогноза нежелательных фармакологических взаимодействий.

Тироксин как гормональный препарат щитовидной железы изменяет окислительный обмен в митохондриях, регулирует поток субстратов и катионов вне и внутри клетки. В малых дозах обладает анаболическим действием на белковый и жировой обмен. В средних дозах стимулирует

метаболизм белков, жиров и углеводов (Кубарко А.И., Yamashita S., 1997; Yen P.M., 2001). Активация белково-синтетической функции и действие на энергетические процессы в клетке, характерные для тироксина, потенциально способны оказать влияние на функциональную активность гликопротеина-Р

Тиамазол – производное 1-метил-2-меркаптоимидазола имеет 2 положительно заряженных атома азота и водородные связи, поэтому может являться субстратом гликопротеина-Р. Тиамазол – анти tireоидный препарат, который блокирует фермент пероксидазу, участвующую в йодировании тиреоидных гормонов щитовидной железы, что приводит к нарушению их синтеза, торможению йодирования тиреоглобулина и задержке превращения дийодтирозина в тироксин (Кубарко А.И., Yamashita S., 1997).

Для прогнозирования фармакокинетического межлекарственного взаимодействия на этапах всасывания, распределения и выведения и исключения нежелательных эффектов лекарственных средств необходимо знать, является ли лекарственное вещество субстратом гликопротеина-Р и способно ли оно изменять его функциональную активность. Учитывая недостаточную изученность данной проблемы, представляется актуальным изучение характера и дозозависимости влияния тироксина и тиамазола на функционирование белка-транспортера гликопротеина-Р.

Цель исследования

Изучить возможность дозозависимой регуляции функциональной активности гликопротеина-Р тироксином и тиамазолом.

Задачи исследования

Для реализации поставленной цели необходимо решить следующие задачи:

1. Исследовать уровень тиреоидных гормонов в крови при назначении тироксина и тиамазола.
2. Изучить дозозависимое влияние тироксина на функциональную активность гликопротеина-Р.
3. Изучить дозозависимое влияние тиамазола на функциональную активность гликопротеина-Р.
4. Оценить корреляционную связь между функциональной активностью гликопротеина-Р и уровнем тиреоидных гормонов в крови при введении тироксина и тиамазола.

Научная новизна

Впервые в эксперименте:

- установлено изменение фармакокинетики фексофенадина при назначении тироксина, характеризующееся снижением C_{max} , AUC_{0-t} , MRT_t (дозы 25 и 100 мкг/кг) и увеличением общего клиренса (доза 100 мкг/кг);
- установлено изменение фармакокинетики фексофенадина при назначении тиамазола, характеризующееся повышением C_{max} на 14, 21 сутки введения тиреостатика и на 5 день его отмены (дозы 2,5 и 5 мг/кг), а также увеличением AUC_{0-t} и снижением общего клиренса на 21 день эксперимента (доза 5 мг/кг) и

повышением C_{\max} , AUC_{0-t} , $AUC_{0-\infty}$, MRT и уменьшением общего клиренса (доза 5 мг/кг) на 5 день отмены тиамазола;

- выявлено дозозависимое индуцирующее влияние тироксина на функциональную активность гликопротеина-Р;

- выявлено дозозависимое ингибирующее влияние тиамазола на функциональную активность гликопротеина-Р;

- установлены корреляционные связи между активностью гликопротеина-Р и уровнем тиреоидных гормонов, которые свидетельствуют о взаимосвязи между функцией щитовидной железы и активностью белка-транспортера.

Практическая значимость работы

Модифицированная методика определения концентрации фексофенадина в плазме крови с помощью ВЭЖХ позволяет оценивать биоэквивалентность оригинального и воспроизведенных препаратов фексофенадина и определять функциональную активность белка-транспортера гликопротеина-Р по фармакокинетике его маркерного субстрата.

Полученные результаты об изменении функциональной активности гликопротеина-Р позволяют прогнозировать взаимодействия тироксина и тиамазола с другими лекарственными веществами-субстратами данного белка-транспортера особенно с низким терапевтическим индексом, что повысит эффективность и безопасность комбинированной фармакотерапии дисфункций щитовидной железы.

Положения, выносимые на защиту

- Введение тироксина кроликам породы шиншилла подкожно в дозах 25 мкг/кг и 100 мкг/кг массы в течение 14 дней вызывает развитие экспериментального гипертиреоза.

- Введение тиамазола кроликам породы шиншилла *per os* в дозах 2,5 мг/кг и 5 мг/кг массы в течение 21 дня приводит к развитию экспериментального гипотиреоза.

- Введение тироксина подкожно в дозах 25 мкг/кг и 100 мкг/кг массы в течение 14 дней вызывает индукцию функциональной активности гликопротеина-Р.

- Введение тиамазола *per os* в дозах 2,5 мг/кг и 5 мг/кг массы в течение 21 дня вызывает ингибирование функциональной активности гликопротеина-Р.

- Изменения функциональной активности гликопротеина-Р под действием тироксина и тиамазола носят дозозависимый характер.

- Наблюдается корреляция между уровнем тиреоидных гормонов и параметрами фармакокинетики фексофенадина – маркерного субстрата гликопротеина-Р.

Личное участие автора

Автором самостоятельно подготовлен аналитический обзор литературы по изучаемой проблеме, составлена программа исследования, проведены экспериментальные, биохимические и хроматографические исследования, обработка и интерпретация данных, подготовка публикаций по диссертационной работе.

Апробация работы

Основные материалы исследования были представлены на: IV Международном молодежном медицинском конгрессе «Санкт-Петербургские научные чтения – 2011» (Санкт-Петербург, 2011); Международном конгрессе «Актуальные проблемы современной медицины» (Киев, Украина, 2011); Международной научно-практической конференции, посвященной 90-летию учреждения образования «Белорусский государственный медицинский университет» (Минск, Белоруссия, 2011); XIX Российском национальном конгрессе «Человек и лекарство» (Москва, 2012); IV съезде фармакологов России «Инновации в современной фармакологии» (Казань, 2012); International Student Congress of (bio)Medical Sciences (Groningen, The Netherlands, 2012); 6th European Congress of Pharmacology (Granada, Spain, 2012). По теме диссертации опубликовано 16 печатных работ, из них 4 – в журналах, рекомендованных ВАК Минобрнауки РФ.

Внедрение результатов в практику

Основные положения работы используются в учебном процессе при обучении студентов, клинических интернов и ординаторов на кафедре фармакологии с курсом фармации и фармакотерапии ФДПО ГБОУ ВПО РязГМУ Минздрава России.

Объем и структура диссертации

Диссертация изложена на 126 страницах машинописного текста и состоит из следующих разделов: введения, обзора литературы, описания материалов и методов исследования, результатов собственных исследований, обсуждения полученных результатов, выводов и практических рекомендаций, списка литературы. Диссертация иллюстрирована 27 рисунками и 31 таблицей. Список литературы включает 33 источника отечественной и 165 – зарубежной литературы.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Работа выполнена на 24 самках кроликов породы шиншилла, массой 3100-4200 г. Все животные были разделены на 2 серии.

I серия – изучение дозозависимого влияния тироксина на функциональную активность гликопротеина-Р, включала 2 группы опытов:

1 группа – животные, которым в течение 14 дней вводили тироксин (L-тироксин, «Berlin-Chemi Menarini») подкожно в дозе 25 мкг/кг массы (n=6) (Айвазова А.С., Колхир В.К., 2007).

2 группа – животные, которым в течение 14 дней вводили тироксин (L-тироксин, «Berlin-Chemi Menarini») подкожно в дозе 100 мкг/кг массы (n=6) (Годовалов А.П., 2010).

II серия – изучение дозозависимого влияния тиамазола на функциональную активность гликопротеина-Р, включала 2 группы опытов:

1 группа – животные, которым в течение 21 дня вводили тиамазол (мерказолил, «Акрихин») *per os* в дозе 2,5 мг/кг массы (n=6) (Козлов В.Н., 2008).

2 группа – животные, которым в течение 21 дня вводили тиамазол (мерказолил, «Акрихин») *per os* в дозе 5 мг/кг массы (n=6) (Козлов В.Н., 2008).

Перед введением тироксин растворяли в воде для инъекций, а тиамазол – в крахмальной взвеси.

Для определения активности гликопротеина-Р и уровней ТТГ, Т3 и Т4 у кроликов забирали кровь из ушной вены перед введением изучаемых препаратов (тироксина и тиамазола), после их курсового введения (тироксин 14 дней, тиамазол 14 и 21 день) и на 5 день их отмены.

Активность гликопротеина-Р определяли по фармакокинетике его маркерного субстрата – фексофенадина по методике Раменской Г.В. и соавт. (2006) в собственной модификации. Фексофенадин («Sanofi Aventis») вводили однократно внутрь через металлический желудочный зонд в виде свежеприготовленной суспензии на дистиллированной воде в дозе 30 мг/кг массы (Колхир П.В., 2007; Скуридина Е.А., 2007). Для полноты растворения смесь подвергали обработке в течение 10 мин в ультразвуковой бане. За 12 часов до забора крови животных лишали корма, при свободном доступе к воде. Через 1, 2, 3, 4, 5, 6, 8, 12, 24 ч после однократного введения фексофенадина у лабораторных животных забирали кровь из ушной вены в объеме 5 мл в сухие гепаринизированные пробирки. Для получения плазмы кровь центрифугировали 10 минут при 3000 об/мин. Плазму переносили в чистые полиуретановые пробирки и хранили при температуре -29°C до анализа.

Определение концентрации фексофенадина в плазме крови животных проводили с применением ВЭЖХ системы «Beckman Coulter» с УФ-спектрофотометрическим детектором, при длине волны 225 нм. Исследование проводили с применением обращенно-фазной колонки «Beckman Coulter» с привитой алкильной фазой C18 4,6*250 мм, зернением сорбента 5 мкм, с термостатированием при температуре 35°C .

Элюирование проводили в изократическом режиме подвижной фазой состава: кислота уксусная («ХИММЕД») 0,03 М с содержанием триэтиламина («Chem-lab») 0,5%, подкисленная кислотой ортофосфорной («Химмед») до pH 4,0 и ацетонитрил («Chem-lab») в соотношении 68:32 по объему. Скорость потока составила 1,0 мл/мин.

Для экстракции исследуемого вещества брали 1,5 мл плазмы, осаждали белок 375 мкл 2М HCl («ХИММЕД») и перемешивали на приборе «Vortex». Затем добавляли по 2 мл экстрагентов: дихлорметана («ACROS ORGANICS»), этилацетата («ACROS ORGANICS») и диэтилового эфира («ACROS ORGANICS»), на 10 минут помещали на встряхиватель пробирок. После центрифугировали в течение 10 минут при 3000 об/мин. В супернатанте органический слой упаривали на роторно-вакуумном испарителе («Heidolph»). Сухой остаток растворяли в 300 мкл подвижной фазы, затем 100 мкл наносили на хроматографическую колонку.

Калибровку проводили с использованием стандарта фексофенадина «Фексофенадин гидрохлорид» производства «Strasbourg cedex», имеющий сертификат качества, подтверждающий количественное содержание фексофенадина гидрохлорида 99,2%. Рабочий раствор (1 мг/мл) готовили на метаноле и хранили при температуре 4°C .

Для валидации метода рассчитывали следующие метрологические характеристики: процент экстракции, диапазон линейности отклика, чувствительность, воспроизводимость и точность (Мирошниченко И.И., 2002, Шатц В.Д., 1988; Бидлингмейер Б., 1990).

Используя модельно-независимый метод с помощью программы «Kinetic 5.0», рассчитывали следующие фармакокинетические параметры фексофенадина (Мирошниченко И.И., 2002; Мирошниченко И.И., 2010; Lacey L.F. et al., 1994): C_{max} – максимальная концентрация при однократном введении (нг/мл); T_{max} – время достижения максимальной концентрации (ч); AUC_{0-t} – площадь под кривой «концентрация-время» от нуля до последнего забора крови (нг*ч/мл); $AUC_{0-\infty}$ – площадь под кривой «концентрация-время» от нуля до бесконечности (нг*ч/мл); $T_{1/2}$ – период полувыведения (ч); MRT – среднее время удержания препарата в системном кровотоке (ч); Vd – объем распределения (л); Cl – общий клиренс (мл/мин); C_{max} / AUC_{0-t} – коэффициент абсорбции.

Кровь, предназначенную для радиотестирования, забирали в центрифужные пробирки, встряхивали и центрифугировали на холоде, после чего полученную сыворотку разливали по аликвотам в пластмассовые пробирки типа эппендорф. Аликвоты замораживали и хранили в холодильнике при -29°C до момента исследования (Белевитин А.Б., Щербак С.Г., 2006).

Уровень тиреоидных гормонов (общий Т3, общий Т4 и ТТГ) определяли радиоиммунным методом с использованием стандартных тест-систем производства IMMUNOTECH (Чехия), с дальнейшей обработкой полученных результатов на анализаторе «Иммунотест» (Москва) в ЦНИЛ РязГМУ. Уровень ТТГ выражали в мМЕ/л, Т3 и Т4 в нмоль/л.

Полученные данные обрабатывали статистически с помощью программ Microsoft Excel 2007, Statsoft Statistica 6.1., Биостат. Характер распределения данных определяли по критерию Шапиро-Уилка. Для исследования статистической значимости показателей, имеющих нормальное распределение, внутри каждой группы использовали тест ANOVA повторных измерений, критерий Ньюмена-Кейсла. Для оценки статистической значимости различий внутри каждой группы при распределении данных, которое отличается от нормального, использовали тест Фридмана, критерий Ньюмена-Кейсла. Для исследования статистической значимости межгрупповых различий показателей, имеющих нормальное распределение, внутри одной серии использовали критерий Стьюдента. Для исследования статистической значимости межгрупповых различий показателей, имеющих распределение отличное от нормального, внутри одной серии использовали критерий Манна-Уитни. Зависимость изучаемых фармакокинетических параметров от уровня гормонов определяли по коэффициенту корреляции Пирсона для выборок с нормальным распределением (r) или по коэффициенту корреляции Спирмена (R_s) для выборок с распределением данных отличным от нормального (Гланц С., 1998).

Для данных, имеющих нормальное распределение, рассчитывали среднее арифметическое значение и стандартную ошибку среднего результата. Для

данных, имеющих распределение отличное от нормального, рассчитывали медиану, верхний и нижний квартиль.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Исследование влияния тироксина и тиамазола на гормональный статус кроликов.

Введение кроликам низкой дозы (25 мкг/кг массы) тироксина в течение 14 дней приводило к развитию выраженного гипертиреоза, что проявлялось повышением уровней Т4 на 249,5% ($p<0,05$), Т3 – на 496,1% ($p<0,05$) и снижением содержания ТТГ в сыворотке крови на 36,9% ($p<0,05$) (табл. 1). Аналогичные по динамике и степени выраженности изменения наблюдались и у животных, получающих тироксин в высокой дозе (100 мкг/кг массы) в течение 14 дней. Концентрация Т4 повышалась на 245,1% ($p<0,05$), Т3 – на 450,0% ($p<0,05$), а уровень ТТГ в сыворотке крови снижался на 19,4% ($p<0,05$) по сравнению с исходными значениями (табл. 1).

Таблица 1

Влияние тироксина (25 мкг/кг и 100 мкг/кг массы) на гормональный статус кроликов ($M\pm m$ – при нормальном распределении данных; медиана, нижний и верхний квартиль – при распределении данных отличном от нормального)

Серии эксперимента		ТТГ, n=6	Т3, n=6	Т4, n=6
Введение тироксина в дозе 25 мкг/кг	Исходные значения	0,7 (0,7; 0,8)	1,2 (1,1; 1,6)	39,8±0,6
	14 день введения тироксина	0,5 (0,4; 0,5)*, **	7,7 (7,2; 8,3)*, **, ***	139,1±13,0*, **, ***
	5 день отмены тироксина	0,7 (0,6; 0,8)	1,1 (1,0; 1,1)***	60,7±7,5
Введение тироксина в дозе 100 мкг/кг	Исходные значения	0,6±0,02	1,8±0,09	70,0±4,3
	14 день введения тироксина	0,5±0,03*	9,9±0,5*, **	241,6±12,9*, **
	5 день отмены тироксина	0,6±0,03	4,2±0,6*, ***	42,1±1,8 *

* - $p<0,05$ – достоверные различия с данными у интактных животных,

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

*** - $p<0,05$ – достоверные различия между изучаемыми сериями

Следует отметить, что при введении тироксина в дозе 100 мкг/кг массы на 14 день эксперимента уровни Т3 и Т4 превышали показатели животных, получавших тироксин в дозе 25 мкг/кг массы, на 28,6% ($p<0,05$) и 73,7% ($p<0,05$) соответственно.

На 5 день отмены низкой дозы тироксина происходила нормализация гормонального статуса лабораторных животных. В отличие от данных этой серии, на 5 день отмены высокой дозы тироксина содержание Т3 оставалось

повышенным на 133,3% ($p < 0,05$), концентрация Т4 снижалась на 39,9% ($p < 0,05$), а уровень ТТГ соответствовал норме.

При сравнении гормонального статуса животных в периоде отмены выявлено, что уровень Т3 у животных, получавших высокую дозу тироксина, превышал показатели животных, получавших низкую дозу на 290,9% ($p < 0,05$). Концентрация ТТГ достоверно между данными сериями опытов не отличалась ($p > 0,05$).

Введение кроликам низкой дозы (2,5 мг/кг массы) тиамазола приводило к подавлению функции щитовидной железы, что проявлялось к 14 дню эксперимента снижением уровня Т4 на 15,0% ($p < 0,05$) и повышением содержания ТТГ на 9,8% ($p < 0,05$) (табл. 2). На 21 день эксперимента происходило снижение концентрации Т4 на 25,8% ($p < 0,05$), Т3 – на 37,0% ($p < 0,05$), и увеличение уровня ТТГ на 27,9% ($p < 0,05$). На 5 день отмены тиамазола содержание Т4 оставалось сниженным на 26,5% ($p < 0,05$), а концентрация ТТГ сохранялась повышенной на 26,2% ($p < 0,05$).

Таблица 2

Влияние тиамазола (2,5 мг/кг и 5 мг/кг массы) на гормональный статус кроликов ($M \pm m$ – при нормальном распределении данных, медиана, нижний и верхний квартиль – при распределении данных отличном от нормального)

Серии эксперимента		ТТГ, n=6	Т3, n=6	Т4, n=6
Введение тиамазола в дозе 2,5 мг/кг	Исходные значения	0,61±0,008	2,0±0,17	63,3±2,8
	Тиамазол 14 дней	0,67±0,03*,**,***	1,9±0,18***	53,8±3,9*
	Тиамазол 21 день	0,78±0,04*	1,26±0,17*	47,0±5,3*
	5 день отмены тиамазола	0,77±0,04*	1,67±0,17	46,5±5,7*
Введение тиамазола в дозе 5 мг/кг	Исходные значения	0,65±0,03	1,85±0,1	65,6±3,7
	Тиамазол 14 дней	0,73±0,03*,**,***	1,7±0,09**,***	54,9±3,6*,**,***
	Тиамазол 21 день	0,9±0,05*	1,3±0,13*	41,3±3,2*
	5 день отмены тиамазола	0,87±0,05*	1,4±0,09*	37,4±2,7*

* - $p < 0,05$ – достоверные различия с данными у интактных животных,

** - $p < 0,05$ – достоверные различия с данными на 5 день отмены тиамазола,

*** - $p < 0,05$ – достоверные различия с данными на 21 день введения тиамазола

Аналогичная динамика гормонального статуса животных наблюдалась и при введении высокой дозы (5 мг/кг массы) тиамазола (табл. 2). На 14 день применения тиреостатика уровень Т4 снизился на 16,3% ($p < 0,05$), а

концентрация ТТГ увеличилась на 12,3% ($p<0,05$). К 21 дню эксперимента концентрация Т4 уменьшилась на 37,0% ($p<0,05$), Т3 – на 29,7% ($p<0,05$), а уровень ТТГ увеличился на 38,4% ($p<0,05$). На 5 день отмены тиамазола содержание Т4 оставалось ниже исходного значения на 43,0% ($p<0,05$), Т3 – на 24,3% ($p<0,05$), а концентрация ТТГ превышала исходное значение на 33,8% ($p<0,05$).

Следует подчеркнуть, что достоверных различий между показателями гормонального статуса животных, получавших разные дозы тиамазола, получено не было ($p>0,05$). Отмечалась лишь тенденция к увеличению концентрации ТТГ на 21 день введения высокой дозы тиамазола на 15,4% ($p=0,0599$) и снижению уровня Т3 на 14 день введения высокой дозы тиамазола на 10,5% ($p=0,1$) по сравнению с показателями животных, получавших низкую дозу тиреостатика.

Исследование влияния тироксина и тиамазола на фармакокинетику фексофенадина.

Таблица 3

Фармакокинетические параметры фексофенадина при введении кроликам тироксина в дозе 25 мкг/кг массы ($M\pm m$ – при нормальном распределении данных; медиана, нижний и верхний квартиль – при распределении данных отличном от нормального)

Изучаемые параметры	Исходные значения n=6	Тироксин 14 дней n=6	5 день отмены тироксина n=6
C_{max} , нг/мл	385,9±54,7	234,0±22,4*, **	320,1±24,1
T_{max} , ч	4,0 (3,0; 4,0)	4,0 (4,0; 5,0)	4,0 (4,0; 4,0)
$T_{1/2}$, ч	28,9 (5,4; 29,02)	10,17 (6,07; 14,56)	8,17 (6,47; 20,34)
AUC_{0-t} , нг/ч×мл	4058,4 (3609; 4394,9)	1526 (1449,3; 2148,8)*	2191,8 (2054,1; 3644,8)
$AUC_{0-\infty}$, нг/ч×мл	6886,9±1351,5	3795,7±767,7	4841,6±1011,8
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
C_{max}/AUC_{0-t}	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)
MRT _t , ч	10,0 (8,8; 11,9)	6,5 (4,1; 6,7)*	6,0 (5,9; 9,7)*

* - $p<0,05$ – достоверные различия с данными у интактных животных,

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

Введение кроликам тироксина в дозе 25 мкг/кг массы в течение 14 дней вызывало снижение C_{\max} фексофенадина 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 (табл. 3). На 5 день отмены 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 тироксина в дозе 100 мкг/кг массы в течение 14 дней наблюдалась схожая динамика показателей, но выраженная в большей степени. C_{\max} фексофенадина 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% ($p<0,05$) (табл. 4). На 5 день отмены высокой дозы тироксина C_{\max} фексофенадина оставалась сниженной на 16,8% ($p<0,05$), остальные изучаемые фармакокинетические параметры достоверно от исходных значений не отличались ($p>0,05$).

Таблица 4

Фармакокинетические параметры фексофенадина при введении кроликам тироксина в дозе 100 мкг/кг массы ($M\pm m$ – при нормальном распределении данных; медиана, нижний и верхний квартиль – при распределении данных отличном от нормального)

Изучаемые параметры	Исходные значения n=6	Тироксин 14 дней n=6	5 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)
$T_{1/2}$, ч	13,5±4,0	7,7±4,4	12,8±1,9
AUC_{0-t} , нг/ч×мл	3522,4 (3303,0; 3631,3)	1195,0 (1032,1; 1202,4)*, **	3237,7 (1875,6; 3992,1)
$AUC_{0-\infty}$, нг/ч×мл	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-t}	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)

* - $p<0,05$ – достоверные различия с данными у интактных животных,

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

При сравнении, изучаемых фармакокинетических параметров животных двух серий (получавших низкую и высокую дозу тироксина) между собой, выявлено, что C_{max} и $AUC_{0-\infty}$ на 14 день введения гормонального препарата были достоверно ниже у животных, которым вводили тироксин в дозе 100 мкг/кг массы на 22,9% ($p < 0,05$) и на 48,9% ($p < 0,05$) соответственно.

Оценка зависимости фармакокинетических параметров от гормонального статуса выявила ряд достоверных корреляционных взаимосвязей (рис. 1 и 2).

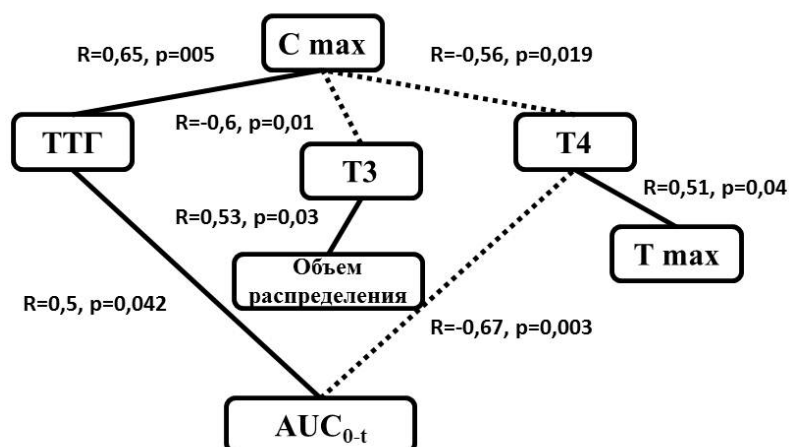


Рисунок 1. Зависимость изучаемых фармакокинетических параметров фексофенадина от гормонального статуса кроликов при введении тироксина в дозе 25 мкг/кг массы (коэффициент корреляции Спирмена). Непрерывной линией показана прямопропорциональная связь, пунктирной линией – обратнопропорциональная связь

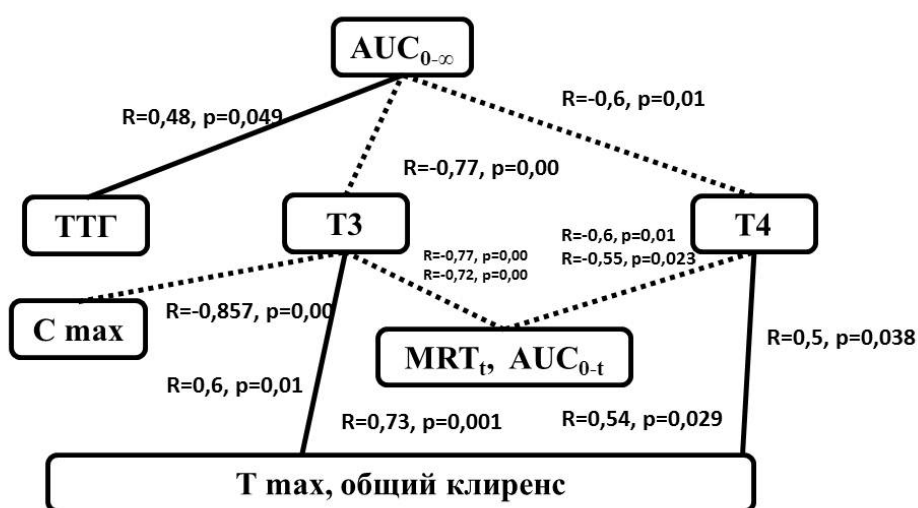


Рисунок 2. Зависимость изучаемых фармакокинетических параметров фексофенадина от гормонального статуса кроликов при введении тироксина в дозе 100 мкг/кг массы (коэффициент корреляции Пирсона). Непрерывной линией показана прямопропорциональная связь, пунктирной линией – обратнопропорциональная связь

Таким образом, подкожное введение тироксина кроликам в дозах 25 и 100 мкг/кг массы приводит к ускорению выведения фексофенадина, что свидетельствует о повышении функциональной активности гликопротеина-Р. Наличие достоверных различий в фармакокинетических параметрах фексофенадина у животных, получающих разные дозы тироксина, можно рассматривать как проявление дозозависимой индукции белка-транспортера под действием тиреоидного гормона.

Таблица 5

Фармакокинетические параметры фексофенадина при введении кроликам тиамазола в дозе 2,5 мг/кг массы ($M \pm m$ – при нормальном распределении данных; медиана, нижний и верхний квартиль – при распределении данных отличном от нормального)

Исследуемые параметры	Исходные значения, n=6	Тиамазол 14 дней, n=6	Тиамазол 21 дней, n=6	5 день отмены тиамазола, n=6
C_{max} , нг/мл	314,9±27,4	367,5±25,2*	388,9±18,4*	388,6±18,7*
T_{max} , ч	4 (2; 4)	3 (3; 4)	3 (3; 3)	3 (3; 3)
$T_{1/2}$, ч	10,9±1,9	10,5±1,7	18,1±4,1	15,0±1,7
AUC_{0-t} , нг/ч×мл	2084,2 (1773,1; 2544,4)	2589,6 (2439,7; 3247,5)	3746,2 (3549,3; 4698,8)	4306,8 (3494,8; 4513,9)
$AUC_{0-\infty}$, нг/ч×мл	4645,2±972,9	4420,6±569,9	6843,5±920,8	6141,4±558,7
Общий клиренс, л	23,4±5,1	21,8±2,2	14,1±1,9	15,2±1,3
Объем распределения, л	345,0±32,7	331,2±37,4	333,8±43,6	323,0±21,5
C_{max}/AUC_{0-t}	0,08±0,014	0,089±0,01	0,061±0,0082	0,065±0,0044
MRT, ч	16,6±2,4	16,0±2,3	25,8±5,2	21,9±2,2
MRT _t , ч	5,8 (5,7; 5,9)	7,7 (5,7; 5,9)	9,9 (9,5; 10,2)	9,8 (9,6; 10,5)

* - $p < 0,05$ – достоверные различия с данными у интактных животных,

** - $p < 0,05$ – достоверные различия с данными на 5 день отмены тиамазола,

*** - $p < 0,05$ – достоверные различия с данными на 21 день введения тиамазола

При введении кроликам низкой дозы тиамазола (2,5 мг/кг массы) происходило повышение C_{max} фексофенадина на 14 день эксперимента на 16,7%

($p < 0,05$), на 21 день – на 23,5% ($p < 0,05$), на 5 день отмены препарата – на 23,4% ($p < 0,05$) по сравнению с исходным уровнем (табл. 5). Остальные изученные фармакокинетические параметры от исходных показателей достоверно не отличались ($p > 0,05$).

Таблица 6

Фармакокинетические параметры фексофенадина при введении кроликам тиамазола в дозе 5 мг/кг массы ($M \pm m$ – при нормальном распределении данных; медиана, нижний и верхний квартиль – при распределении данных отличном от нормального)

Изучаемые параметры	Исходные значения, n=6	Тиамазол 14 дней, n=6	Тиамазол 21 день, n=6	5 день отмены тиамазола, n=6
C_{\max} , нг/мл	311,3±15,5	341,2±19,0**, ***	407,9±19,7*	421,1±25,9*
T_{\max} , ч	3 (3; 4)	3 (3; 3)	3 (3; 3)	3 (2; 3)
$T_{1/2}$, ч	13,5±2,7	14,7±2,5	20,1±4,8	25,6±6,0
AUC_{0-t} , нг/ч×мл	2781,4±453,1	3372,9±428**	4024,1±280,0*	4462,6±265,1*
$AUC_{0-\infty}$, нг/ч×мл	4796,1±682,6	5693,7±812,4	7520,9±929	8255,4±838,1*
Общий клиренс, л	23,2±4,12	17,6±2,6	14,3±2,3*	11,3±1,2*
Объем распределения, л	384,7±28,3	348,8±10,2	334,1±37,5	349,5±53,1
C_{\max}/AUC_{0-t}	0,073±0,01	0,065±0,0083	0,057±0,006	0,052±0,0052
MRT, ч	16,6±3,7	22,2±3,4	31,0±6,3	33,3±8,2*
MRT _t , ч	7,9 (5,9; 10,6)	10,4 (5,9; 10,9)	10,3 (10,1; 10,3)	10,15 (9,85; 10,35)

* - $p < 0,05$ – достоверные различия с данными у интактных животных,

** - $p < 0,05$ – достоверные различия с данными на 5 день отмены тиамазола,

*** - $p < 0,05$ – достоверные различия с данными на 21 день введения тиамазола

При введении высокой дозы тиамазола (5 мг/кг массы) на 14 день исследования наблюдалось повышение C_{\max} фексофенадина на 9,6% ($p < 0,05$) (табл. 6). На 21 день эксперимента выявлено повышение C_{\max} на 31,0% ($p < 0,05$), AUC_{0-t} – на 44,7% ($p < 0,05$) и снижение общего клиренса на 38,4% ($p < 0,05$) по отношению к исходному уровню. На 5 день отмены препарата C_{\max}

фексофенадина превышала исходные значения на 35,3% ($p < 0,05$), AUC_{0-t} – на 60,4% ($p < 0,05$), $AUC_{0-\infty}$ – на 72,1% ($p < 0,05$), MRT – на 100,6% ($p < 0,05$), а общий клиренс был ниже первоначального показателя на 51,3% ($p < 0,05$).

При сравнении, изучаемых фармакокинетических параметров фексофенадина животных двух серий (получавших низкую и высокую дозу тиамазола) между собой, достоверные различия были получены только на 5 день отмены антитиреотического препарата.

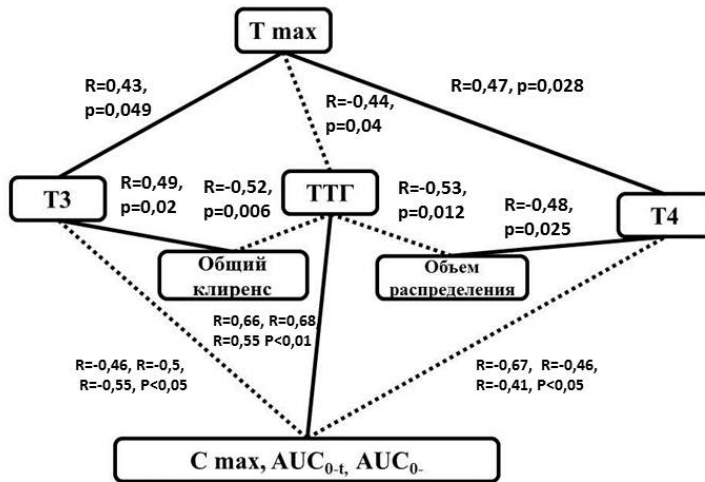


Рисунок 3. Зависимость изучаемых фармакокинетических параметров фексофенадина от гормонального статуса кроликов при введении тиамазола в дозе 2,5 мг/кг массы (коэффициент корреляции Спирмена). Непрерывной линией показана прямопропорциональная связь, пунктирной линией – обратнопропорциональная связь

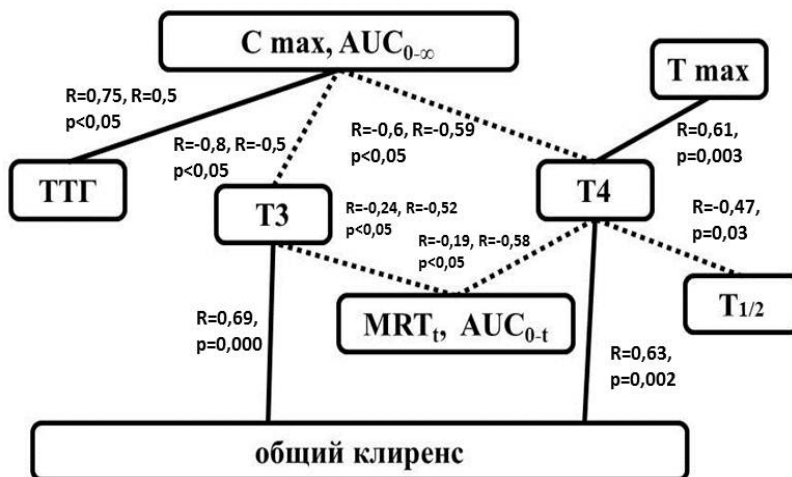


Рисунок 4. Зависимость изучаемых фармакокинетических параметров фексофенадина от гормонального статуса кроликов при введении тиамазола в дозе 5 мг/кг массы (коэффициент корреляции Пирсона). Непрерывной линией показана прямопропорциональная связь, пунктирной линией – обратнопропорциональная связь

При введении тиамазола в дозе 5 мг/кг массы $AUC_{0-\infty}$ фексофенадина в периоде отмены тиамазола превышала аналогичный показатель у животных, получавших данный препарат в дозе 2,5 мг/кг на 34,4% ($p < 0,05$), а общий клиренс был меньше на 25,7% ($p < 0,05$).

Изучение зависимости фармакокинетических параметров от гормонального статуса показало, наличие ряда корреляционных взаимосвязей (рис. 3 и 4).

Таким образом, пероральное введение тиамазола кроликам в дозах 2,5 и 5 мг/кг массы приводит к увеличению концентрации фексофенадина в плазме крови, что свидетельствует о снижении функциональной активности гликопротеина-Р. Более значительные по спектру показателей и степени выраженности изменения фармакокинетических параметров фексофенадина наблюдаются при введении тиамазола в высокой дозе, что можно рассматривать как проявление дозозависимого ингибирования изучаемого белка-транспортера.

ВЫВОДЫ

1. Введение кроликам тироксина подкожно в дозах 25 и 100 мкг/кг массы в течение 14 дней приводит к развитию экспериментального гипертиреоза, который характеризуется повышением уровней Т3 и Т4 и снижением уровня ТТГ в сыворотке крови.

2. Пероральное введение кроликам тиамазола в дозах 2,5 и 5 мг/кг массы в течение 21 дня приводит к развитию экспериментального гипотиреоза, который характеризуется снижением уровней Т3 и Т4 и повышением уровня ТТГ в сыворотке крови на 14, 21 сутки применения тиамазола и на 5 день отмены препарата.

3. Тироксин, назначаемый кроликам в течение 14 дней, вызывает дозозависимую индукцию активности гликопротеина-Р, определяемой по фармакокинетике его маркерного субстрата фексофенадина, что подтверждается снижением C_{max} , AUC_{0-t} , MRT_t (дозы 25 и 100 мкг/кг) и увеличением общего клиренса (доза 100 мкг/кг).

4. Введение кроликам тиамазола *per os* в течение 21 дня вызывает дозозависимое ингибирование активности гликопротеина-Р, определяемой по фармакокинетике его маркерного субстрата фексофенадина, что проявляется повышением C_{max} на 14, 21 сутки введения тиреостатика и на 5 день его отмены (дозы 2,5 и 5 мг/кг), а также увеличением AUC_{0-t} и снижением общего клиренса на 21 день эксперимента (доза 5 мг/кг) и повышением C_{max} , AUC_{0-t} , $AUC_{0-\infty}$, MRT и уменьшением общего клиренса (доза 5 мг/кг) на 5 день отмены тиамазола.

5. Установленные корреляционные связи между уровнями Т3, Т4, ТТГ и фармакокинетическими параметрами фексофенадина свидетельствуют о наличии тесной взаимосвязи между функционированием щитовидной железы и активностью белка-транспортера гликопротеина-Р.

ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

Полученные результаты изменения функциональной активности гликопротеина-Р позволяют прогнозировать взаимодействия тироксина и тиамазола с другими лекарственными веществами-субстратами данного белка-транспортера особенно с низким терапевтическим индексом, что повысит эффективность и безопасность комбинированной фармакотерапии дисфункций щитовидной железы и снизит риск нежелательных лекарственных взаимодействий.

СПИСОК ОПУБЛИКОВАННЫХ РАБОТ

1. **Бирюкова А.С.** Влияние тироксина на функциональную активность гликопротеина-Р в эксперименте / А.С. Бирюкова, Е.Н. Якушева, А.В. Щулькин, Л.В. Никифорова // Рос. медико-биол. вестн. им. акад. И.П. Павлова. – 2011. – № 4. – С. 49-53.
2. Якушева Е.Н. Характеристика гликопротеина-Р как белка транспортера лекарственных веществ / Е.Н. Якушева, И.В. Черных, **А.С. Бирюкова** // Рос. медико-биол. вестн. им. акад. И.П. Павлова. – 2011. – № 3. – С. 142-148.
3. Якушева Е.Н. Дозозависимое влияние тироксина на функциональную активность гликопротеина-Р в эксперименте / Е.Н. Якушева, А.В. Щулькин, **А.С. Бирюкова** // Биомедицина. – 2012. - №2. – С. 53-60.
4. Якушева Е.Н. Влияние тиамазола на функциональную активность гликопротеина-Р / Е.Н. Якушева, **А.С. Бирюкова**, А.В. Щулькин // Науч. ведомости Белгородского гос. университета. – 2012. – № 10 (129). – Вып.18/3. – С. 133-138.
5. **Бирюкова А.С.** Методика определения фексофенадина в плазме кроликов методом ВЭЖХ / А.С. Бирюкова, А.В. Щулькин // Материалы науч. конф. университета, посвященной 60-летию со дня основания Рязанского мед. университета им. акад. И.П. Павлова на Рязанской земле. – Рязань, 2010. – С. 25-27.
6. **Бирюкова А.С.** Методы определения функциональной активности гликопротеина-Р / А.С. Бирюкова, А.А. Ларина // Материалы науч.-практ. конф. «Актуальные вопросы современной медицины: взгляд молодого специалиста», посвященной 60-летию со дня основания ГОУ ВПО РязГМУ Росздрава на Рязанской земле. – Рязань, 2010. – С. 25-27.
7. Якушева Е.Н. Изменение функциональной активности гликопротеина-Р при экспериментальном гипертиреозе / Е.Н. Якушева, **А.С. Бирюкова**, А.В. Щулькин // БГМУ: 90 лет в авангарде медицинской науки и практики / Сборник науч. трудов Белорусского гос. мед. университета. – Минск, 2011. – С. 96.
8. **Бирюкова А.С.** Функциональная активность белка-транспортера гликопротеина-Р при экспериментальном гипертиреозе / А.С. Бирюкова, А.В. Щулькин, Е.Н. Якушева // Материалы конф. «Профилактическая медицина – 2011». - СПб., 2011. - С. 52-54.

9. **Бирюкова А.С.** Изменение функциональной активности гликопротеина-Р под действием тироксина в эксперименте / А.С. Бирюкова, А.В. Щулькин // Тез. IV междунар. молодежного медицинского конгресса «Санкт-Петербургские научные чтения – 2011». – Спб., 2011. – С. 155.

10. **Бирюкова А.С.** Функциональная активность гликопротеина-Р при экспериментальном гипотиреозе / А.С. Бирюкова, А.В. Щулькин // Украинский научно-медицинский молодежный журнал / Материалы междунар. конгрес. «Актуальные проблемы современной медицины». – Киев, 2011. – № 1. – С. 444.

11. **Бирюкова А.С.** Влияние экспериментального гипертиреоза на функциональную активность гликопротеина-Р / А.С. Бирюкова, Е.Н. Якушева, А.В. Щулькин / Актуальные вопросы медицинской биохимии / сборник научных трудов по материалам Всероссийской научно-практической конференции «Биохимические научные чтения памяти академика РАН Е.А. Строева». – Рязань, 2012. – С. 56-59.

12. Якушева Е.Н. Влияние L-тироксина на функциональную активность гликопротеина-Р в эксперименте / Е.Н. Якушева, **А.С. Бирюкова**, А.В. Щулькин // Материалы IV съезда фармакологов России «Инновации в современной фармакологии». – М.: Фолиум, 2012. – С. 206-207.

13. Якушева Е.Н. Влияние низкой дозы L-тироксина на функциональную активность гликопротеина-Р / Е.Н. Якушева, **А.С. Бирюкова**, А.В. Щулькин // Сборник материалов XIX Российского национального конгресса «Человек и лекарство» (Москва, 23-27 апреля 2012 г.). – М., 2012. – С. 603.

14. Якушева Е.Н. Влияние тиамазола на функциональную активность гликопротеина-Р в эксперименте / Е.Н. Якушева, **А.С. Бирюкова**, А.В. Щулькин // Материалы IV съезда фармакологов России «Инновации в современной фармакологии». – М.: Фолиум, 2012. – С. 207.

15. **Biriukova A.S.** The influence of L-thyroxine on the function activity of glycoprotein-P / A.S. Biriukova, A.V. Shulkin, E.N. Yakusheva // International Student Congress of (bio)Medical Sciences. – Groningen, 2012. – P. 528.

16. Yakusheva E.N. Influence of L-thyroxine on the P-glycoprotein function activity / E.N. Yakusheva, **A.S. Biriukova**, A.V. Shulkin // 6th European Congress of Pharmacology. – Granada, 2012. – P. 101.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

ВЭЖХ – высокоэффективная жидкостная хроматография

$T_{1/2}$ – период полувыведения

T3 – трийодтиронин

T4 – тетраiodтиронин (тироксин)

ТТГ – тиреотропный гормон

AUC – площадь под фармакокинетической кривой концентрация-время

C_{max} – максимальная концентрация

M – среднее арифметическое значение

m – ошибка среднего арифметического значения

MRT – среднее время удерживания