



## ВЛИЯНИЕ ТИАМАЗОЛА НА ФУНКЦИОНАЛЬНУЮ АКТИВНОСТЬ ГЛИКОПРОТЕИНА-R

**Е.Н. ЯКУШЕВА**  
**А.С. БИРЮКОВА**  
**А.В. ЩУЛЬКИН**

*Рязанский государственный  
медицинский университет*

*e-mail: enya.rzn@yandex.ru*

В исследовании на кроликах изучено влияние тиамазола на функциональную активность белка-транспортера гликопротеина-R (Pgp). Активность Pgp изучали по фармакокинетике его маркерного субстрата фексофенадина. Установлено, что введение тиамазола в дозах 2,5 мг/кг и 5 мг/кг массы в течение 21 дня вызывает дозозависимое снижение активности Pgp, сохраняющееся на 5-й день отмены препарата.

Ключевые слова: гликопротеин-R, MDR1, тиамазол, гипотиреоз, фексофенадин.

### **Введение.**

За последние десятилетия значительно возросла частота заболеваний щитовидной железы (ЩЖ). По данным колорадского популяционного исследования, включавшего 25862 человека, распространенность *гипотиреоза* составляет 9,5% и варьирует от 4 до 21% у женщин и от 3 до 16% у мужчин в зависимости от возраста. В возрастной группе 45–54 года частота *гипотиреоза* у женщин составляет 10%, у мужчин – 5% [10].

Учитывая высокую распространенность тиреоидной патологии и преимущественно преклонный возраст данных пациентов, имеющих сопутствующие соматические заболевания, становится понятной актуальность изучения фармакокинетики лекарственных веществ при патологии щитовидной железы.

Одну из важных позиций в фармакокинетике ксенобиотиков занимает гликопротеин-R. *Гликопротеин-R (Pgp)* – это белок-транспортер, функцией которого является АТФ-зависимое выведение ксенобиотиков из клетки. Впервые Pgp был обнаружен в опухолевых тканях, где была выявлена его связь с устойчивостью к антибластомным препаратам. Позднее Pgp был идентифицирован во многих органах и тканях: в тонком кишечнике, печени, почках, эндотелиальных клетках капилляров головного мозга, плаценты, семенников, в клетках периферической крови [3, 6, 7, 11].

В настоящее время установлено, что Pgp обладает широкой субстратной специфичностью. К числу его субстратов относятся стероидные гормоны, статины, верапамил, морфин, дигоксин, азитромицин, атенолол, винкристин, винбластин, нифедипин, пароксетин, празозин и другие лекарственные средства [3].

Установлено, что ряд факторов, химических и лекарственных веществ способен изменять функциональную активность белка-транспортера [7, 11]. При совместном применении с ингибиторами Pgp концентрация его субстратов повышается, что может привести к развитию нежелательных лекарственных реакций, и, наоборот, при совместном приеме с индукторами белка-транспортера концентрация субстратов снижается, что приводит к уменьшению эффективности фармакотерапии. Таким образом, изучение функциональной активности Pgp является необходимым условием для проведения эффективной и безопасной фармакотерапии.

Функциональная активность Pgp при гипотиреозе остается мало изученной, что затрудняет рациональное применение лекарственных средств при данной патологии.

**Цель** настоящего исследования – изучить функциональную активность гликопротеина-R при экспериментальном гипотиреозе.

### **Материалы и методы.**

Работа выполнена на 12 половозрелых кроликах породы шиншилла, средней массой 3500±100 г. В исследование включались самки, которые находились в состоянии течки. Для моделирования экспериментального гипотиреоза животным перо-



рально вводили тиамазол (мерказолил, «Акрихин») в течение 21 дня в дозе 2,5 (n=6) и 5 мг/кг массы (n=6). До начала эксперимента, через 14, 21 день введения препарата и на 5-й день его отмены у животных определяли функциональную активность гликопротеина-P и сывороточный уровень ТТГ, Т3 и Т4.

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. Через 1, 2, 3, 4, 5, 6, 8, 12 и 24 часа 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 минут 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 Г.В. Раменской 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 4,0 и 64 мл ацетонитрила (Chem-Lab). Осуществляли жидкостную экстракцию фексофенадина из плазмы крови. В качестве 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, нг/мл. Коэффициент регрессии  $g$  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. Для каждого кролика рассчитывали  $C_{max}$  – максимальная концентрация при однократном введении,  $T_{max}$  – время достижения максимальной концентрации,  $AUC_{0-t}$  – площадь под кривой «концентрация-время» от нуля до последнего забора крови,  $AUC_{0-\infty}$  – площадь под кривой «концентрация-время» от нуля до бесконечности,  $MRT$  – среднее время удержания препарата в системном кровотоке,  $Vd$  – объем распределения, общий клиренс,  $T_{1/2}$  – период полувыведения,  $C_{max} / AUC_{0-t}$  – коэффициент абсорбции. Фармакокинетические рассчитывали модельно-независимым методом с использованием программы Kinetica 5.0. Отношение  $C_{max} / AUC_{0-\infty}$  вычисляли самостоятельно [4].

Уровень тиреоидных 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 полученных данных определяли по критерию Шапиро-Уилка. Для исследования статистической значимости показателей, имеющих нормальное распределение, внутри каждой серии использовали тест ANOVA повторных измерений, межгрупповые различия вычисляли по критерию Ньюмена-Кейсла. Для оценки статистической значимости различий групп при распределении признака, отличающегося от нормального, использовали критерий Фридмана, межгрупповые различия определяли по критерию Ньюмена-Кейсла [1].

Полученные данные представлены в виде среднего арифметического значения и стандартной ошибки среднего результата в случае нормального распределения при-



знака или в виде медианы, верхнего и нижнего квартиля – если распределение данных отличалось от нормального [1].

**Результаты.**

Введение низкой дозы (2,5 мг/кг массы) тиамазола приводило к развитию экспериментального гипотиреоза (табл. 1), что проявлялось к 14-му дню эксперимента снижением уровня Т4 на 15,0% (p<0,05) и повышением содержания ТТГ на 9,8% (p<0,05). На 21-й 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-й день отмены тиамазола отмечалось снижение содержания Т4 на 26,5% (p<0,05) и повышение концентрации ТТГ на 26,2% (p<0,05).

Таблица 1

**Основные фармакокинетические параметры фексофенадина и гормональный статус кроликов при введении тиамазола в дозе 2,5 мг/кг массы (M±m – при нормальном распределении признаков; медиана, нижний и верхний квартиль – при распределении признака, отличном от нормального)**

Изучаемые параметры	Исходные значения n=6	Тиамазол 14 дней n=6	Тиамазол 21 день n=6	5-й день отмены n=6
Сmax, нг/мл	314,9±27,4	367,5±25,2*	388,9±18,4*	388,6±18,7*
Tmax, 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
AUC0-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∞, 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
Сmax / AUC	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
MRTt, 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)
ТТГ, мМЕ/л	0,61±0,008	0,67±0,03*, **, ***	0,78±0,04*	0,77±0,04*
Т3, нмоль/л	2,0±0,17	1,9±0,18***	1,26±0,17*	1,67±0,17
Т4, нмоль/л	63,3±2,8	53,8±3,9*	47,0±5,3*	46,5±5,7*

\* – p<0,05 – достоверные различия с данными у интактных животных;  
 \*\* – p<0,05 – достоверные различия с данными на 5-й день отмены тиамазола;  
 \*\*\* – p<0,05 – достоверные различия с данными на 21-й день введения тиамазола.

Аналогичная динамика гормонального статуса животных наблюдалась и при введении высокой дозы (5 мг/кг массы) тиамазола (табл. 2). Так, на 14-й день гипотиреоза уровень Т4 снизился на 16,3% (p<0,05), а концентрация ТТГ увеличилась на 12,3% (p<0,05). К 21-му 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-й 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).



При изучении фармакокинетики фексофенадина при экспериментальном гипотиреозе были получены следующие результаты.

При введении низкой дозы тиамазола (2,5 мг/кг массы) происходило повышение  $C_{max}$  фексофенадина на 14-й день эксперимента на 16,7% ( $p < 0,05$ ), на 21-й день – на 23,5% ( $p < 0,05$ ), на 5-й день отмены препарата – на 23,4% ( $p < 0,05$ ). Остальные фармакокинетические параметры от исходных показателей достоверно не отличались ( $p > 0,05$ ) (табл. 1).

При введении высокой дозы тиамазола (5 мг/кг массы) на 14-й день исследования происходило повышение  $C_{max}$  фексофенадина на 9,6% ( $p < 0,05$ ). На 21-й день гипотиреоза наблюдалось 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% ( $p < 0,05$ ). На 5-й день отмены препарата превышали исходные значения  $C_{max}$  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 снижен относительно первоначального показателя на 51,3% ( $p < 0,05$ ) (табл. 2).

Таблица 2

**Основные фармакокинетические параметры фексофенадина и гормональный статус кроликов при введении тиамазола в дозе 5 мг/кг массы ( $M \pm m$  – при нормальном распределении признаков; медиана, нижний и верхний квартиль – при распределении признака, отличном от нормального)**

Изучаемые параметры	Исходные значения n=6	Тиамазол 14 дней n=6	Тиамазол 21 день n=6	5-й день отмены 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
$C_{max} / AUC$	0,073±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)
ТТГ, мМЕ/л	0,65±0,03	0,73±0,03*,**,***	0,9±0,05*	0,87±0,05*
$T_3$ , нмоль/л	1,85±0,1	1,7±0,09**,***	1,3±0,13*	1,4±0,09*
$T_4$ , нмоль/л	65,6±3,7	54,9±3,6*,**,***	41,3±3,2*	37,4±2,7*

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

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

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

При сравнении изучаемых фармакокинетических параметров животных двух серий (получавших низкую и высокую дозу тиамазола) между собой достоверные различия были получены только на 5-й день отмены антитиреоидного препарата. При введении тиамазола в дозе 5 мг/кг  $AUC_{0-\infty}$  и общий клиренс превышали аналогичные показатели у животных, получавших данный препарат в дозе 2,5 мг/кг на 34,4% ( $p < 0,05$ ) и 25,7% ( $p < 0,05$ ) соответственно.

### Обсуждение результатов.

В настоящем исследовании изучено влияние экспериментального гипотиреоза на функциональную активность Pgp на кроликах породы шиншилла. Данная тест-система является адекватной для доклинической оценки влияния различных лекарственных веществ на функционирование белка-транспортера [3].

В ходе эксперимента установлено, что введение низкой (2,5 мг/кг массы) и высокой (5 мг/кг массы) доз тиамазола приводит к подавлению функции щитовидной железы и развитию экспериментального гипотиреоза, что проявляется снижением уровней Т4 и Т3 и повышением содержания ТТГ. Причем концентрация Т3 начинает снижаться только с 21-го дня введения тиамазола, что, скорее всего, имеет приспособительное значение: в условиях нарушения синтеза тиреоидных гормонов в первую очередь сохраняется синтез более активного гормона [2]. Функциональные изменения сохраняются и на 5-й день отмены тиреостатика.

В экспериментальном исследовании функциональную активность Pgp определяли по фармакокинетике его маркерного субстрата – фексофенадина. Препарат практически не подвергается биотрансформации и выводится неизмененном виде с помощью Pgp в печени и почках. Таким образом, фармакокинетика фексофенадина полностью зависит от активности данного белка-транспортера [3].

Выявлено, что при введении низкой дозы тиамазола (2,5 мг/кг массы) происходит повышение  $C_{max}$  фексофенадина на 14, 21-й дни введения тиреостатика и на 5-й день его отмены. Остальные фармакокинетические параметры достоверно не отличаются от исходных показателей ( $p > 0,05$ ).

При введении высокой дозы тиамазола (5 мг/кг массы) на 14-й день исследования обнаружено повышение  $C_{max}$  фексофенадина; на 21-й день эксперимента наблюдается повышение  $C_{max}$ ,  $AUC_{0-t}$  и снижение общего клиренса; на 5-й день отмены препарата исходные значения превышают:  $C_{max}$ ,  $AUC_{0-t}$ ,  $AUC_{0-\infty}$ , MRT, а общий клиренс становится ниже первоначального показателя. Установленные изменения фармакокинетических параметров свидетельствуют о повышении содержания фексофенадина в плазме крови [4] и замедлении его выведения из организма лабораторных животных, что является следствием снижения функциональной активности Pgp [3, 5].

Выявленное в настоящем исследовании снижение функциональной активности гликопротеина-P могло происходить как за счет непосредственного влияния тиамазола на активность белка-транспортера и/или на экспрессию гена MDR1 (кодирующего Pgp), так и опосредованно, за счет снижения уровня тиреоидных гормонов.

Тиамазол кумулируется в щитовидной железе, период его полувыведения составляет 3–6 ч, а в течение 48 ч он полностью выводится из организма [2]. В настоящем исследовании показано, что активность Pgp оставалась сниженной и на 5-й день отмены тиреостатика, что может свидетельствовать об уменьшении активности белка-транспортера вследствие дефицита тиреоидных гормонов.

Высказанное предположение косвенно подтверждается данными других исследований. Показано, что тиреоидные гормоны (Т3 и Т4) повышают экспрессию гена MDR1 в культуре клеток карциномы толстой кишки (*LS180 and Caco-2*) [8].

Молекулярные механизмы повышения функциональной активности Pgp активно изучаются. Согласно современным представлениям ключевую роль в регуляции активности данного белка-транспортера играет уровень экспрессии гена MDR1. Его индуцибельная экспрессия в нормальных и трансформированных клетках инициируется сигналами от большого количества стимулов, которые сходятся на общей области промотора MDR1, называемого «MDR1 enhanceosome» [9]. Аналогичным образом могут непосредственно связываться и активизировать промотор MDR1 рецептор SXR/PXR, стероидные рецепторы и рецепторы ксенобиотика [9].

Большинство эффектов тиреоидных гормонов реализуется в результате взаимодействия Т3 и Т4 со специфическими ядерными рецепторами. Рецепторы тиреоидных гормонов всегда связаны с участками ДНК – «тиреоидчувствительными элементами» (thyroid response elements) [12]. В отсутствие гормонов соответствующие рецепторы ингибируют экспрессию генов.



Таким образом, на основе полученных данных о снижении функциональной активности Pgp на фоне экспериментального гипотиреоза можно рекомендовать снижение дозировок лекарственных веществ – субстратов Pgp при назначении их пациентам с выраженным гипотиреозом для безопасной и эффективной фармакотерапии.

#### **Выводы.**

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

2. Введение тиамазола кроликам в течение 21 дня в дозах 2,5 и 5 мг/кг массы вызывает дозозависимое ингибирование активности гликопротеина-P, определяемой по фармакокинетике его маркерного субстрата фексофенадина, сохраняющееся на 5-й день отмены препарата.

#### **Литература**

1. Гланц, С. Медико-биологическая статистика / С. Гланц : пер. с англ. – М. : Практика, 1998. – 459 с.
2. Кубарко, А.И. Щитовидная железа. Фундаментальные аспекты / А.И. Кубарко, S. Yamashita. – Минск ; Нагасаки, 1997. – 368 с.
3. Метаболизм лекарственных средств. Научные основы персонализационной медицины: руководство для врачей / В.Г. Кулес [и др.] – М. : ГЭОТАР-МЕДиа, 2008 – 304 с.
4. Мирошниченко, И.И. Биодоступность лекарственных средств / И.И. Мирошниченко, И.И. Тюляев, А.П. А.П. Зуев. – М. : Грамотей, 2003. – 110 с.
5. Раменская, Г.В. Разработка методики количественного определения маркера активности Р-гликопротеина фексофенадина в плазме крови / Г.В. Раменская, Е.В. Скуридина, Л.М. Красных // Хим. фарм. журн. – 2006. – Т. 40, № 12. – С. 47-50.
6. Середенин, С.Б. Лекции по фармакогенетике / С.Б. Середенин. – М. : МИА, 2004. – 303 с.
7. Human Multidrug Resistance ABCB and ABCG Transporters: Participation in a Chemoinmunity Defense System / B. Sarkadi [et al.] // *Physiol. Rev.* – 2006. – Vol. 86. – P.1179-1236.
8. Nishio, N. Thyroid hormone regulates the expression and function of P-glycoprotein in Ca-co-2 cells / N. Nishio, T. Katsura, K. Inui // *Pharm. Res.* – 2008. – Vol. 25(5). – P. 1037-1042.
9. Scotto, K.W. Transcription of the multidrug resistance gene MDR1: a therapeutic target / K.W. Scotto, R.A. Johnson // *Molecular Interventions.* – 2001. – Vol. 1. – P. 117-125.
10. The Colorado Thyroid Disease Prevalence Study / G.J. Canaris [et al.] // *Arch. Intern. Med.* – 2000. – Vol. 160. – P. 526-534.
11. The multidrug resistance protein family / P. Borst // *Biochim. Biophys. Acta.* – 1999. – Vol. 1461, №2. – P. 347-357.
12. Viguerie N. Effect of thyroid hormone on gene expression / N. Viguerie, D. Langin // *Curr. Opin. Clin. Nutr. Metab. Care.* – 2003. – Vol. 6. – P. 377-381.

## **INFLUENCE OF THE THIAMAZOLE ON THE P-GLYCOPROTEIN FUNCTIONAL ACTIVITY**

**E.N. YAKUSHEVA  
A.S. BYRYUKOVA  
A.V. SHCHULKIN**

*Ryazan State Medical University*

*e-mail: enya.rzn@yandex.ru*

In the research the influence of a thiamazole on the activity of the protein- transporter P-glycoprotein (Pgp) on the rabbits was studied. Activity of the Pgp was investigated by the pharmacokinetics of its marker substrate fexofenadine. It was established that introduction of a thiamazole in a dose 2,5 mg/kg and 5 mg/kg within 21 days lead to dose-dependent decline of Pgp activity, including 5-day drug withdrawal.

Key words: P-glycoprotein, MDR1, thiamazole, hypothyroidism, fexofenadine.