

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ
ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ
ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ
«РЯЗАНСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ МЕДИЦИНСКИЙ
УНИВЕРСИТЕТ ИМЕНИ АКАДЕМИКА И.П. ПАВЛОВА»
МИНИСТЕРСТВА ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

На правах рукописи

ЧЕРНЫХ ИВАН ВЛАДИМИРОВИЧ

ФАРМАКОЛОГИЧЕСКАЯ РЕГУЛЯЦИЯ ГЛИКОПРОТЕИНА-Р В ТЕРАПИИ
НАРУШЕНИЙ МОЗГОВОГО КРОВООБРАЩЕНИЯ

3.3.6 – фармакология, клиническая фармакология

Диссертация

на соискание ученой степени

доктора биологических наук

Научный консультант: доктор медицинских наук, профессор

Якушева Елена Николаевна

Рязань – 2021

ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ	7
ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ	23
1.1. Молекулярная структура гликопротеина-R.....	23
1.2. Локализация и функции гликопротеина-R.....	24
1.3. Гликопротеин-R как белок-транспортер лекарственных средств.....	26
1.4. Механизмы модуляции функционирования гликопротеина-R на фоне гипоксии.....	29
1.5. Механизмы изменения функционирования гликопротеина-R и способы его оценки	38
1.6. Гликопротеин-R и фармакотерапия нарушений мозгового кровообращения.....	39
1.7. Способы исследования лекарственных веществ на принадлежность к субстратам и модуляторам активности гликопротеина-R.....	47
1.8. Фармакологическая характеристика нейропротекторных лекарственных средств как потенциальных субстратов гликопротеина-R и модуляторов его функционирования.....	54
1.8.1. Фармакологическая характеристика этилметилгидроксипиридина сукцината.....	54
1.8.2. Фармакологическая характеристика омберацетама.....	59
1.8.3. Фармакологическая характеристика фабомотизола.....	62
ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ	68
2.1. Объект экспериментальных исследований.....	68
2.2. Дизайн экспериментальных исследований.....	69
2.3. Моделирование церебральной ишемии.....	71
2.3.1. Моделирование глобальной ишемии мозга.....	71
2.3.2. Моделирование фокальной ишемии мозга.....	71
2.3.3. Анализ проницаемости гематоэнцефалического барьера.....	72

2.4. Фармакокинетические методы исследования.....	73
2.4.1. Методика анализа принадлежности лекарственных веществ к субстратам гликопротеина-Р <i>in vivo</i>	73
2.4.2. Методика анализа влияния лекарственных веществ и окклюзии общей сонной артерии на функциональную активность гликопротеина-Р на уровне целостного организма.....	76
2.4.3. Методики количественного анализа фексофенадина, этилметилгидроксипиридина сукцината, омберацетама и фабомотизола.....	79
2.4.4. Расчет фармакокинетических параметров тестируемых веществ в плазме крови кроликов.....	82
2.5. Иммуногистохимические методы исследования.....	83
2.6. Иммуноферментные методы исследования.....	84
2.7. Биохимические методы исследования.....	85
2.7.1. Подготовка биологического материала для оценки свободнорадикального статуса.....	86
2.7.2. Определение концентрации малонового диальдегида.....	86
2.7.3. Определение уровня общих сульфгидрильных (тиоловых) групп.....	87
2.7.4. Определение активности глутатионпероксидазы.....	87
2.8. Методика оценки эффективности комбинированного применения нейропротектора-субстрата и ингибитора гликопротеина-Р при глобальной и фокальной ишемии мозга.....	88
2.8.1. Оценка выживаемости и уровня неврологического дефицита животных при билатеральной окклюзии общих сонных артерий при комбинированном применении нейропротектора-субстрата и ингибитора гликопротеина-Р.....	88

2.8.2. Оценка зоны инфаркта мозга животных при окклюзии-реперфузии средней мозговой артерии при комбинированном применении нейропротектора-субстрата и ингибитора гликопротеина-Р	90
2.9. Анализ функциональной активности гликопротеина-Р в гематоэнцефалическом барьере.....	91
2.10. Математико-статистические методы исследования.....	93
ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ.....	95
3.1. Функционирование гликопротеина-Р на фоне нарушений мозгового кровообращения.....	95
3.1.1. Функционирование гликопротеина-Р на фоне глобальной ишемии мозга.....	95
3.1.1.1. Абсолютное количество гликопротеина-Р и показатели липопероксидации в коре головного мозга крыс на фоне билатеральной окклюзии общих сонных артерий.....	95
3.1.1.2. Количество транскрипционных факторов Nrf2 и HIF-1 в коре головного мозга крыс на фоне билатеральной окклюзии общих сонных артерий.....	98
3.1.2. Функционирование гликопротеина-Р на фоне фокальной ишемии мозга.....	101
3.1.2.1. Абсолютное количество гликопротеина-Р и показатели липопероксидации в коре головного мозга крыс на фоне окклюзии и окклюзии-реперфузии средней мозговой артерии.....	101
3.1.2.2. Количество транскрипционных факторов Nrf2 и HIF-1 в коре головного мозга крыс на фоне окклюзии-реперфузии средней мозговой артерии.....	103
3.2. Оценка принадлежности нейропротекторных лекарственных средств к субстратам и модуляторам активности гликопротеина-Р.....	105
3.2.1. ВЭЖХ-методики количественного определения нейропротекторов в плазме крови кроликов.....	105

3.2.1.1. ВЭЖХ-методика количественного определения этилметилгидроксипиридина сукцината в плазме крови кроликов.....	105
3.2.1.2. ВЭЖХ-методика количественного определения омберацетама в плазме крови кроликов.....	113
3.2.1.3. ВЭЖХ-методика количественного определения фабомотизола в плазме крови кроликов.....	120
3.2.1.4. Принадлежность нейропротекторов к субстратам гликопротеина-Р и модуляторам его функционирования.....	127
3.2.1.4.1. Принадлежность этилметилгидроксипиридина сукцината к субстратам гликопротеина-Р и модуляторам его функционирования.....	127
3.2.1.4.2. Принадлежность омберацетама к субстратам гликопротеина-Р и модуляторам его функционирования.....	133
3.2.1.4.3. Принадлежность фабомотизола к субстратам гликопротеина-Р и модуляторам его функционирования.....	138
3.3. Функциональная активность гликопротеина-Р на уровне целостного организма на фоне глобальной ишемии мозга.....	145
3.4. Метод оценки функциональной активности гликопротеина-Р в гематоэнцефалическом барьере коры больших полушарий головного мозга.....	148
3.4.1. Валидация методики количественного определения фексофенадина в плазме крови крыс.....	148
3.4.2. Валидация методики количественного определения фексофенадина в коре головного мозга крыс.....	156
3.4.3. Функциональная активность гликопротеина-Р в гематоэнцефалическом барьере в норме на фоне введения классических индуктора и ингибиторов транспортера.....	162

3.5. Оценка целесообразности ингибирования гликопротеина-Р в гематоэнцефалическом барьере при нарушениях мозгового кровообращения..... 167

3.5.1. Оценка выживаемости и уровня неврологического дефицита животных при билатеральной окклюзии общих сонных артерий при комбинированном применении нейропротектора-субстрата и ингибитора гликопротеина-Р..... 167

3.5.2. Оценка зоны инфаркта мозга животных при окклюзии-реперфузии средней мозговой артерии при комбинированном применении нейропротектора-субстрата и ингибитора гликопротеина-Р.....170

3.5.2.1. Функциональная активность гликопротеина-Р в гематоэнцефалическом барьере на фоне окклюзии-реперфузии средней мозговой артерии..... 172

3.5.2.2. Проницаемость гематоэнцефалического барьера на фоне окклюзии-реперфузии средней мозговой артерии..... 175

ГЛАВА 4. ОБСУЖДЕНИЕ ПОЛУЧЕННЫХ РЕЗУЛЬТАТОВ.....178

ВЫВОДЫ..... 209

ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ..... 211

ПЕРСПЕКТИВЫ ДАЛЬНЕЙШЕЙ РАЗРАБОТКИ ТЕМЫ..... 213

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ..... 214

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ..... 215

БЛАГОДАРНОСТИ..... 262

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность темы исследования и степень ее разработанности

Гликопротеин-P (Pgp) – это мембранный белок-транспортер, удаляющий из клеток широкий спектр преимущественно липофильных субстратов за счет энергии гидролиза АТФ. Локализуясь в слизистой оболочке тонкого кишечника, на билиарной мембране гепатоцитов, в эпителиоцитах канальцев нефронов, в гистогематических барьерах транспортер обеспечивает эффлюкс из клеток потенциально опасных экзогенных субстратов. Pgp препятствует их всасыванию в желудочно-кишечном тракте, выводит в мочу и желчь и предотвращает проникновение из крови в ткани мозга, яичников, внутреннюю среду глаза или плод. Функциональная активность транспортера может различаться в зависимости от генетических особенностей организма, наличия патологических состояний, приема некоторых пищевых продуктов и лекарственных средств. Изменение функционирования транспортера способно привести к нежелательным лекарственным реакциям и межлекарственным взаимодействиям, т.к. к числу субстратов Pgp относится большое количество современных лекарственных препаратов, фармакокинетика которых существенно зависит от его функциональной активности. При этом индукция Pgp может повлечь неэффективность фармакотерапии в связи с угнетением всасывания лекарственного вещества-субстрата в кишечнике и его ускоренной экскрецией почками или печенью, а также затруднением проникновения через гистогематические барьеры, а ингибирование – привести к относительной лекарственной передозировке, что особенно актуально для препаратов с узким «терапевтическим окном» [43].

В связи с этим по рекомендациям FDA лекарственные средства анализируются на предмет принадлежности к числу субстратов Pgp или ингибиторов его активности [161, 213].

Изменение интенсивности функционирования транспортера может являться патогенетическим звеном некоторых патологических состояний центральной

нервной системы (ЦНС), таких как множественная лекарственная устойчивость опухолей мозга [177, 183], болезнь Альцгеймера [137, 145, 169], эпилепсия, резистентная к фармакотерапии [151], неэффективность нейропротекторного лечения последствий нарушений мозгового кровообращения [168] и ряда других [86]. Поэтому направленную фармакологическую регуляцию Pgr можно рассматривать в качестве дополнительной к традиционной терапевтической стратегии при терапии указанных патологий, а также для изменения фармакокинетики веществ, являющихся его субстратами.

На сегодняшний день цереброваскулярные заболевания являются второй по частоте причиной смерти после ишемической болезни сердца и ведущей по частоте причиной инвалидности. Инсульт встречается в среднем в 68 случаях на 100000 населения в зависимости от страны (в нашей стране – 123,2 [70]). Причем среди нарушений мозгового кровообращения ишемические инсульты диагностируются в 65% случаев [127].

Терапия ишемического инсульта преследует несколько целей: реперфузия, т.е. восстановление кровотока в зоне ишемии (тромболизис – в пределах временного терапевтического окна – 4,5 часа [200]; эндоваскулярные хирургические методы лечения, которые одобрены также на более поздних сроках [2]), базисная терапия [33], а также нейрональная протекция – предотвращение гибели еще жизнеспособных нейронов, располагающихся в зоне пенумбры [76].

В связи с ограниченным значением временного терапевтического окна, а также с тем, что применение альтеплазы [249] возможно только после исключения внутримозгового кровоизлияния, в США реканализацию используют только у 2–7% пациентов с острым нарушением мозгового кровообращения [301]. В России данный показатель составляет 3,3% [70]. Поэтому нейропротекция является важной стратегией в лечении острых нарушений мозгового кровообращения [191].

Множеством исследований установлена локализация Pgr в эндотелиоцитах гематоэнцефалического барьера (ГЭБ) (на люминальной мембране, в

эндоплазматическом ретикулуме, везикулах, ядерной оболочке), глиальных клетках и нейронах головного мозга [270, 335]. Продемонстрировано его функционирование (совместно с плотными контактами эндотелиальных клеток и перицитов, глиальными клетками) в качестве механизма, обеспечивающего избирательное проникновение в ткани мозга лишь ряда низкомолекулярных веществ.

Несмотря на высокие энергетические потребности мозга, он не обладает запасом кислорода или субстратов, таких как АТФ, глюкоза, гликоген, креатинфосфат, поэтому его нормальное функционирование сильно зависит от интенсивности мозгового кровотока [123]. В связи с этим в современной неврологии заболевания, основой патогенеза которых считается гипоксия того или иного вида, являются лидирующими. Ишемическо-гипоксическое поражение головного мозга является важным звеном патогенеза многих болезней и патологических состояний: инсультов, ишемическо-гипоксической энцефалопатии (в условиях глобальной гипоперфузии и гипоксии, например, при остановке сердечной деятельности и дыхания и др.), хронической церебральной ишемии (дисциркуляторной энцефалопатии), метаболических нарушений, токсических поражений ЦНС и пр. [23].

В научной литературе имеется достаточно информации о влиянии гипоксии на функциональную активность Pgp. Гипоксия – это типовой патологический процесс, в патогенезе которого, вне зависимости от вида и инициирующего фактора, лежит недостаточная для нормального функционирования доставка клеткам кислорода. В свою очередь гипоксический ответ на клеточном и тканевом уровнях – это типовой процесс в ряду нозологий, таких как опухоли, кардиоваскулярные и респираторные заболевания [347]. Большинство исследований *in vitro* продемонстрировало повышение функциональной активности Pgp, экспрессии гена *MDR1*, кодирующего его, и синтеза самого белка-транспортера на фоне гипоксической гипоксии различной продолжительности и тяжести [162, 346]. Однако функционирование данного

транспортера на фоне циркуляторной гипоксии на уровне целостного организма или локально в ГЭБ освещено слабо. Кроме того, заключения исследователей о влиянии церебральной ишемии, а также ишемии-реперфузии на белок-транспортер *in vivo* крайне противоречивы [87, 134; 150]. Также недостаточно изучены механизмы регуляции работы транспортера на фоне данных патологий *in vivo*: участие транскрипционных факторов и роль окислительного стресса.

Таким образом, в связи с доказанной ролью Pgr в защите тканей мозга от потенциально токсичных веществ, а также его влиянием на эффективность и безопасность фармакотерапии особенности функционирования транспортера на фоне дефицита кислорода требуют дальнейшего более детального и комплексного изучения. Выявление механизмов регуляции Pgr позволит расширить спектр подходов к изменению его активности. Фармакологическое ингибирование Pgr может иметь терапевтическую ценность для стимуляции проникновения нейропротективных и вазоактивных лекарственных средств-субстратов Pgr через ГЭБ и повышения эффективности фармакотерапии глобальной или фокальной церебральной ишемии. Актуальным является анализ влияния различных церебральных ишемических патологий на функционирование Pgr в головном мозге. Оценка принадлежности нейропротекторных средств к субстратам и модуляторам Pgr позволит подобрать препарат для дальнейшего анализа целесообразности его совместного применения с веществом, снижающим функциональную активность транспортера локально в ГЭБ, на фоне ишемических повреждений головного мозга, сопровождающихся увеличением количества Pgr.

Степень разработанности проблемы

Научный коллектив кафедры фармакологии с курсом фармации ФДПО ФГБОУ ВО РязГМУ Минздрава России на протяжении нескольких лет исследует лекарственные вещества на принадлежность к ингибиторам и индукторам Pgr [104, 105, 109]. Для этого была разработана и апробирована методика *in vivo*, которая заключается в оценке фармакокинетики маркерного субстрата Pgr –

фексофенадина после его однократного внутрижелудочного введения кроликам-самцам породы Шиншилла на фоне курсового введения тестируемых веществ-потенциальных модуляторов активности данного белка-транспортера. При поиске возможных субстратов Pgp изучается уже их собственная фармакокинетика на фоне курсового введения животным классических индуктора и ингибитора транспортера.

Было показано более интенсивное функционирование транспортера на уровне целостного организма на фоне гипоксической гипоксии [110], что согласуется с результатами зарубежных исследований *in vitro*, в которых выявлена активация как эффлюксной активности транспортера, так и количества иРНК и самого белка на клеточных мембранах [173, 346]. Это, совместно с анализом научной литературы, послужило поводом продолжить исследования в данном направлении, но с применением более приближенной к клинике патологии – глобальной и фокальной ишемии головного мозга. Планируется оценить перспективность ингибирования Pgp для повышения эффективности нейропротекторной терапии глобальной и фокальной церебральной ишемии.

В ходе настоящего экспериментального исследования изучено влияние ишемии и ишемии-реперфузии головного мозга на функционирование Pgp, корреляция активности транспортера и уровня липопероксидации, проанализированы основные факторы, регулирующие работу транспортера в гипоксических условиях (HIF-1 и Nrf2), выявлены ишемические церебральные патологии крыс, при которых наиболее интенсивно повышается абсолютное количество транспортера в коре головного мозга, оценена принадлежность отечественных лекарственных средств с нейропротекторной активностью к субстратам и модуляторам активности белка-транспортера, и изучена возможность повышения эффективности нейропротекции при церебральной ишемии за счет ингибирования активности Pgp в ГЭБ.

Цель исследования

Изучить функционирование Pgr на фоне глобальной и фокальной церебральной ишемии для анализа возможности и перспективы направленной фармакологической регуляции транспортера и повышения эффективности нейропротекторной терапии ишемических патологий.

Задачи исследования

1. Оценить абсолютное количество Pgr в ткани коры головного мозга и его зависимость от уровня перекисного окисления липидов (ПОЛ) и количества транскрипционных факторов Nrf2 и HIF-1 на фоне глобальной ишемии мозга крыс.
2. Оценить абсолютное количество Pgr в ткани коры головного мозга и его зависимость от уровня ПОЛ и количества транскрипционных факторов HIF-1 и Nrf2 на фоне фокальной ишемии и ишемии-реперфузии мозга крыс.
3. Модифицировать и валидировать ВЭЖХ-методики количественного определения нейропротекторов этилметилгидроксипиридина сукцината, омберацетама и фабомотизола в плазме крови кроликов.
4. Исследовать принадлежность нейропротекторов этилметилгидроксипиридина сукцината, омберацетама и фабомотизола к числу субстратов и модуляторов функционирования Pgr.
5. Оценить функциональную активность Pgr на уровне целостного организма кроликов на фоне глобальной ишемии мозга.
6. Изучить функциональную активность Pgr в ГЭБ в норме и на фоне индуктора и ингибитора транспортера.
7. Оценить целесообразность ингибирования Pgr в ГЭБ для повышения фармакологического эффекта нейропротектора-субстрата Pgr нимодипина на фоне глобальной ишемии мозга крыс.

8. Оценить целесообразность ингибирования Pgp в ГЭБ для повышения фармакологического эффекта нейропротектора-субстрата Pgp нимодипина на фоне фокальной ишемии мозга крыс.

9. Оценить функциональную активность Pgp в ГЭБ и проницаемость барьера на фоне фокальной ишемии мозга крыс.

Научная новизна

Впервые показано, что абсолютное количество Pgp в коре головного мозга крыс повышается, начиная с 4-го часа после билатеральной окклюзии общих сонных артерий (модель глобальной ишемии мозга) и остается повышенным до 48 часов ишемии, что коррелирует с интенсификацией ПОЛ и количеством транскрипционного фактора Nrf2 в ткани коры головного мозга, а также сопровождается увеличением уровня транскрипционного фактора HIF-1.

Показано, что 30- и 60-минутная эндоваскулярная окклюзия средней мозговой артерии крыс с последующей 24-часовой реперфузией (модель фокальной ишемии мозга) приводит к повышению абсолютного количества Pgp в головном мозге через 24 часа после реканализации, что сопровождается значительной активацией липопероксидации и ростом количества транскрипционного фактора Nrf2 в коре головного мозга. 12-часовая реперфузия приводит к снижению количества транспортера при 4,5-часовой окклюзии, но при менее длительной окклюзии изменения его уровня не наблюдается. Продление срока окклюзии средней мозговой артерии до 3 и 4,5 часов приводит к снижению количества Pgp при суточной реперфузии.

Модифицированы и валидированы три оригинальные ВЭЖХ-методики количественного определения препаратов с нейропротективной активностью: этилметилгидроксипиридина сукцината, омберацетама и фабомотизола в плазме крови кроликов. Установлено, что фармакокинетика ни одного из тестируемых лекарственных средств не зависит от функционирования Pgp, т.е. они не являются субстратами данного транспортера. Выявлено, что этилметилгидроксипиридина

сукцинат и фабомотизол при курсовом введении кроликам ингибируют функциональную активность Pgr, а фабомотизол также снижает его относительное количество на билиарной поверхности гепатоцитов.

На кроликах продемонстрировано, что односторонняя окклюзия общей сонной артерии не вызывает изменения активности Pgr на уровне целостного организма. Это свидетельствует о том, что анализ количества фексофенадина в головном мозге на фоне его ишемии может характеризовать изменение активности транспортера локально в ГЭБ.

Проведена оценка функциональной активности Pgr локально в ГЭБ крыс, определяемая по содержанию фексофенадина – маркерного субстрата транспортера в коре головного мозга, в норме. Показано повышение функциональной активности транспортера в ГЭБ на фоне курсового введения животным классического индуктора Pgr – рифампицина и снижение на фоне ингибитора – омепразола.

Показано, что курсовое введение крысам комбинации нейропротективного средства-субстрата Pgr – нимодипина и ингибитора транспортера – омепразола на фоне двусторонней окклюзии общих сонных артерий (модели глобальной ишемии мозга) приводит к достоверному снижению смертности и уровня неврологического дефицита животных по сравнению с изолированным введением нимодипина. Однако данная комбинация препаратов после воспроизведения эндоваскулярной окклюзии средней мозговой артерии с последующей реперфузией не вызывает сокращение зоны некроза в мозге по сравнению с изолированным применением нейропротектора.

Неэффективность ингибирования Pgr в ГЭБ при фокальной церебральной ишемии связана со снижением функциональной активности транспортера в барьере и нарушением его проницаемости.

Теоретическая и практическая значимость работы

В результате исследования выяснены особенности функционирования белка-транспортера Pgp – показано повышение его абсолютного количества в мозге на фоне глобальной церебральной ишемии. Эти данные создают предпосылки для корректировки доз лекарственных средств-субстратов данного транспортера в сторону увеличения при фармакотерапии заболеваний мозга, в патогенезе которых присутствует дефицит кислорода ткани. Выявлено возрастание абсолютного количества транспортера в коре головного мозга на фоне 30- и 60-минутной окклюзии средней мозговой артерии с последующей 24-часовой реперфузией и его снижение – при использовании более продолжительной фокальной ишемии (3 часа окклюзии средней мозговой артерии с суточной реперфузией, 4,5 часа окклюзии без реперфузии и с реперфузией в течение 12 и 24 ч).

Модифицированные ВЭЖХ-методики количественного анализа этилметилгидроксипиридина сукцината, омберацетама и фабомотизола, а также способы их экстракции из плазмы крови кроликов можно рекомендовать к использованию для исследования фармакокинетики указанных лекарственных средств.

Установлена прямая зависимость функционирования Pgp от интенсивности ПОЛ. При этом количество Pgp на фоне глобальной и фокальной ишемии мозга коррелирует с уровнем транскрипционного фактора Nrf2 – внутриклеточного сенсора окислительного стресса, имеющего область связывания на промоторе гена *MDR1*, кодирующего белок-транспортер. Транскрипционный фактор NIF-1 вовлечен в регуляцию функционирования Pgp преимущественно при глобальной длительной церебральной ишемии, тогда как кратковременная (30 и 60 минут) окклюзия средней мозговой артерии его не стимулирует.

Оценка принадлежности этилметилгидроксипиридина сукцината, омберацетама и фабомотизола к числу субстратов Pgp показала, что их фармакокинетика не зависит от функционирования данного белка-транспортера,

что свидетельствует о возможности их безопасного применения в комбинации с веществами, модулирующими его активность, а также на фоне патологий, изменяющих интенсивность функционирования транспортера. Выявлено, что этилметилгидроксипиридина сукцинат и фабомотизол снижают активность Pgp на уровне целостного организма. Это позволяет применять указанные средства в качестве положительного контроля пониженной функциональной активности белка-транспортера при поиске веществ аналогичного действия в экспериментальных исследованиях, а также для выявления потенциальных субстратов Pgp при доклиническом изучении лекарственных веществ. Проведение клинических исследований с использованием этилметилгидроксипиридина сукцината и фабомотизола и подтверждение их ингибирующего потенциала по отношению к Pgp позволит прогнозировать фармакокинетические взаимодействия с участием данных лекарственных средств и веществ-субстратов транспортера (дигоксин, дабигатрана этексилат и др.) и избежать их относительной передозировки.

Повышение выживаемости экспериментальных животных при двусторонней перманентной окклюзии общих сонных артерий при комбинированном введении нимодипина (субстрата Pgp) и омепразола (ингибитора транспортера) по сравнению с изолированным использованием нимодипина показывает перспективность ингибирования функциональной активности транспортера в ГЭБ на фоне глобальной ишемии головного мозга.

Недостаточное сокращение площади зоны некроза при фокальной ишемии мозга при назначении комбинации нимодипина и омепразола свидетельствует о нецелесообразности ингибирования Pgp в ГЭБ для повышения эффективности терапии последствий фокальной церебральной ишемии, что связано с нарушением структуры и повышением проницаемости барьера.

Методология и методы исследования

При планировании экспериментальных исследований использовались методические рекомендации по доклиническому изучению лекарственных средств [48].

Влияние этилметилгидроксипиридина сукцината, омберацетама и фабомотизола, а также односторонней окклюзии общей сонной артерии на функционирование Pgp оценивалось на кроликах-самцах породы Шиншилла по фармакокинетике маркерного субстрата транспортера – фексофенадина после его однократного внутривенного введения с использованием последовательного дизайна. Данная модель в предварительных исследованиях была валидирована с использованием классического ингибитора белка-транспортера верапамила и индуктора – рифампицина [16].

Активность Pgp локально в ГЭБ анализировали по степени проникновения фексофенадина в кору головного мозга крыс. Концентрацию фексофенадина в плазме крови и в гомогенате коры головного мозга крыс оценивали методом высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) с УФ-детектированием по оригинальным валидированным методикам. При анализе принадлежности этилметилгидроксипиридина сукцината, омберацетама и фабомотизола к субстратам Pgp также были модифицированы и валидированы ВЭЖХ-методики их количественного определения в плазме крови кроликов.

Целостность ГЭБ оценивалась по степени накопления красителя Evans blue в ткани мозга.

Для выявления механизма изменения активности Pgp дополнительно иммуногистохимически оценивали относительное количество белка Pgp. Абсолютное количество Pgp и уровень транскрипционных факторов Nrf1 и Nrf2 в головном мозге животных определяли методом гетерогенного иммуноферментного анализа (гИФА). Интенсивность липопероксидации анализировали классическими биохимическими методами.

Полученные результаты подвергались комплексной адекватной статистической обработке.

Положения, выносимые на защиту

1. Билатеральная окклюзия общих сонных артерий крыс (модель глобальной ишемии мозга) приводит к возрастанию абсолютного количества Pgr в коре головного мозга, начиная с 4-го и до 48-го ч ишемии, что коррелирует с уровнем окислительного стресса и количеством транскрипционного фактора Nrf2 в ткани коры головного мозга, а также сопровождается возрастанием количества кислородчувствительного транскрипционного фактора HIF-1.

2. 30- и 60-минутная окклюзия средней мозговой артерии крыс с последующей реперфузией (модель фокальной ишемии мозга) приводит к возрастанию абсолютного количества Pgr в коре головного мозга через 24 ч после реканализации, что сопровождается увеличением уровня транскрипционного фактора Nrf2 в ткани коры головного мозга и развитием выраженного окислительного стресса. При использовании более продолжительной фокальной ишемии мозга (3 часа окклюзии средней мозговой артерии с суточной реперфузией, 4,5 часа окклюзии без реперфузии и с реперфузией в течение 12 и 24 ч) наблюдается снижение абсолютного количества Pgr.

3. Модифицированы и валидированы ВЭЖХ-методики количественного определения нейропротекторов этилметилгидроксипиридина сукцината, омберацетама и фабомотизола в плазме крови кроликов.

4. Этилметилгидроксипиридина сукцинат, омберацетам и фабомотизол не принадлежат к числу субстратов Pgr. Этилметилгидроксипиридина сукцинат и фабомотизол ингибируют, а омберацетам не изменяет функциональную активность Pgr на уровне целостного организма.

5. Односторонняя окклюзия общей сонной артерии кроликов не приводит к изменению функциональной активности Pgr на уровне целостного организма.

6. Функциональная активность Pgr в ГЭБ коры головного мозга крыс

повышается на фоне введения классического индуктора Pgp – рифампицина и снижается на фоне ингибитора Pgp – омепразола.

7. Введение крысам комбинации нейропротектора-субстрата Pgp – нимодипина совместно с ингибитором транспортера – омепразолом повышает выживаемость и снижает уровень неврологического дефицита животных на фоне билатеральной окклюзии общих сонных артерий по сравнению с изолированным введением нимодипина.

8. Введение крысам комбинации нейропротектора-субстрата Pgp – нимодипина совместно с ингибитором транспортера – омепразолом не уменьшает величину зоны некроза головного мозга, вызванного окклюзией-реперфузией средней мозговой артерии, по сравнению с изолированным введением нимодипина, что связано с нарушением проницаемости ГЭБ.

Степень достоверности

Достоверность результатов диссертационной работы подтверждается значительным объемом экспериментальных данных, полученных с использованием современных методов исследования с последующей систематизацией и статистической обработкой в соответствии с общими рекомендациями по тестированию лекарственных препаратов на принадлежность к субстратам и модуляторам активности белка-транспортера Pgp [47, 161, 213].

Апробация результатов

Материалы исследования доложены и представлены на IX Международной конференции «Биоантиоксидант» (Москва, 2015), на Одиннадцатом международном междисциплинарном конгрессе «Нейронаука для медицины и психологии» (Судак, 2015), на VI Всероссийской с международным участием школе-конференции «Физиология кровообращения» (Москва, 2016), на Ежегодной научной конференции Рязанского государственного медицинского университета имени академика И.П. Павлова (Рязань, 2016), на II Всероссийской

научной конференции студентов и молодых специалистов ФГБОУ ВО Рязанский государственный медицинский университет им. академика И.П. Павлова (Рязань, 2016), на Всероссийской научно-практической конференции студентов и молодых специалистов с международным участием «Биохимические научные чтения памяти академика РАН Е.А. Строева» (Рязань, 2016), на 21-й Международной Пущинской школе-конференции молодых ученых «Биология – наука XXI века» (Пушино, 2017), на XXIII съезде физиологического общества им. И.П. Павлова (Воронеж, 2017), на 65 годичной международной научно-практической конференции Таджикского государственного медицинского университета имени Абуали ибни Сино «Фундаментальные и прикладные исследования в современном мире» (Душанбе, 2017), на Всероссийской конференции молодых специалистов «Актуальные вопросы фундаментальной, экспериментальной и клинической морфологии» (Рязань, 2017), на Российской научной конференции, посвященной 125-летию академика С.В. Аничкова «Фармакология регуляторных нейропептидов» (Санкт-Петербург, 2017), на II Всероссийской научной конференции «Современная лекарственная токсикология: фундаментальные и прикладные аспекты» (Томск, 2017), на шестой конференции RUS-LASA (Рязань, 2017), на III Всероссийской научной конференции молодых специалистов, аспирантов, ординаторов «Инновационные технологии в медицине: взгляд молодого специалиста» (Рязань, 2017), на XVII Всероссийском симпозиуме «Эколого-физиологические проблемы адаптации» (Рязань, 2017), на Всероссийской конференции студентов и молодых ученых с международным участием «Естественнонаучные основы медико-биологических знаний» (Рязань, 2017), на 22-й Международной пущинской школе-конференции молодых ученых «Биология – наука XXI века» (Пушино, 2018), на V съезде фармакологов России «Научные основы поиска и создания новых лекарств» (Ярославль, 2018), на Международной конференции «Психофизиология и психоэндокринология» (Ставрополь, 2018), на XIV международном междисциплинарном конгрессе «Нейронаука для медицины и психологии» (Судак, 2018), на Всероссийской

научной конференции молодых ученых, посвященной 95-летию со дня рождения профессора А.А. Никулина «Достижения современной фармакологической науки» (Рязань, 2018), на Медицинском профессорском форуме «Межотраслевая интеграция и передовые технологии в здравоохранении» (Ярославль, 2018), на XV международном междисциплинарном конгрессе «Нейронаука для медицины и психологии» (Судак, 2019).

Научное исследование частично поддержано грантами Российского фонда фундаментальных исследований №14-04-97522 о_центр_а «Нейропротекторная роль гликопротеина-R, его экспрессия, функциональная активность и механизмы регуляции на фоне острой ишемии мозга» и №16-44-620292 р_а «Модулирование активности гликопротеина-R как новый подход к фармакотерапии острого нарушения мозгового кровообращения».

Внедрение результатов исследования в практику

Основные положения работы используются в учебном процессе при обучении студентов и ординаторов на кафедре фармакологии с курсом фармации ФДПО, кафедре нормальной физиологии с курсом психофизиологии, кафедре патофизиологии ФГБОУ ВО РязГМУ Минздрава России, а также внедрены в практику ЦНИЛ ФГБОУ ВО РязГМУ Минздрава России, тестирующей новые оригинальные отечественные лекарственные средства на принадлежность к субстратам, индукторам/ингибиторам Pgp.

Личный вклад автора

Автором самостоятельно подготовлен систематический обзор литературы по изучаемой проблеме, запланирован дизайн исследования, проведены эксперименты *in vivo*, хроматографический и иммуноферментный анализы, обработка и интерпретация данных, оформление публикаций по диссертационной работе.

Связь задач исследования с основным планом научно-исследовательских работ университета

Диссертационная работа выполнена в соответствии с тематическим планом научно-исследовательских работ ФГБОУ ВО РязГМУ Минздрава России. Исследование зарегистрировано в базе данных International register of preclinical trials protocol.

Сведения о публикациях по теме диссертации

По результатам диссертационной работы опубликована 51 работа: 20 – в журналах, рекомендованных ВАК Минобрнауки России, 8 – в журналах из списка Web of Science и Scopus. Получено 2 патента Российской Федерации и оформлены 4 рационализаторских предложения ФГБОУ ВО РязГМУ Минздрава России.

Структура и объем диссертации

Диссертация изложена на 262 страницах компьютерного текста и состоит из введения, обзора литературы, описания использованных материалов и методов исследования, результатов исследования, обсуждения результатов, выводов, практических рекомендаций, перспектив дальнейшей разработки темы, списка сокращений и списка литературы, включающего 375 источников, из них отечественной – 117 и зарубежной – 258 источников, за последние 5 лет более 25%. Работа иллюстрирована 50 таблицами и 59 рисунками.

ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1. Молекулярная структура гликопротеина-P

Гликопротеин-P (Pgp, ABCB1-белок, MDR1) представляет собой эффлюксный мембранный АТФ-зависимый белок-транспортер, который регулирует абсорбцию, распределение и экскрецию широкого ряда преимущественно липофильных соединений в условиях нормы и патологии [111, 240, 257]. Впервые Pgp был обнаружен и описан Juliano R.L. и Ling V. в 1976 году в опухолевых клетках китайских хомячков [226], а синтезирован в 1985 году Riordan J.R. и соавт. [294].

Pgp относится к суперсемейству ABC-транспортеров (Adenosinetriphosphate Binding Cassette), представители которого обнаружены во всех прокариотических и эукариотических организмах [122, 237]. У человека ABC-транспортеры кодируются 48 генами, формирующими 7 подсемейств (от ABCA до ABCG) со сходными нуклеотидными последовательностями. Ген *ABCB1*, или *MDR1* (*MultiDrug-Resistance gene 1*), изучен наиболее широко, в связи с тем, что именно он кодирует Pgp [146, 321]. Семейство *MDR* включает два гена человека: *MDR1* и *MDR2*, причем *MDR2* экспрессируются только в мембране гепатоцитов и секретирует фосфатидилхолин в желчь, а продукт экспрессии гена *MDR1* принимает участия в формировании клеточной лекарственной резистентности [201].

Молекулярная масса транспортера составляет 170 кДа, а его вторичная структура включает 1280 аминокислотных остатков, формирующих 2 гомологичные половины протяженностью 136 Å на 70 Å, соединенные подвижным полипептидным мостиком и образующие водную пору в мембране [208, 312]. Данная пора в экстрацеллюлярной части выстлана гидрофобными и ароматическими аминокислотами, а во внутриклеточной – полярными заряженными остатками. В свою очередь, каждую половину принято делить на трансмембранный и цитоплазматический нуклеотидсвязывающий домены. Первый включает 3 пары мембранно-связанных α -петель и формирует

гидрофобный карман для транспортировки субстратов, а в состав второго включен АТФ-связывающий сайт [309]. Первая экстрацеллюлярная петля Pgp N-гликозилирована, что необходимо для направленной пространственной ориентации и стабильности молекулы, но не играет ведущей роли в транспортировке субстратов [302].

Pgp транспортирует субстраты благодаря энергии гидролиза одной молекулы АТФ, в то время как вторая молекула АТФ необходима для возвращения молекулы транспортера к исходной пространственной структуре. Следует отметить, что лимитирующей по времени стадией данного процесса является отщепление от молекулы транспортера АДФ и неорганического фосфата. Однако гидролиз АТФ необходим Pgp не только для эффлюкса субстратов, но и для поддержания определенной конформационной структуры, обеспечивающей высокую активность и широкую субстратную специфичность, что подтверждается наличием у транспортера базальной АТФ-азной активности [271].

Таким образом, молекулярная структура и принцип работы Pgp достаточно подробно описаны в научной литературе, и дальнейшие исследования направлены преимущественно на изучение особенностей функционирования транспортера на фоне ряда патологий и оценку возможностей направленной фармакологической регуляции его активности.

1.2. Локализация и функции гликопротеина-P

В большом числе исследований продемонстрирована практически повсеместная распространенность Pgp в организме, что позволяет ему выполнять ряд функций, носящих физиологический характер. Основная роль транспортера в качестве эффлюксного насоса для эндогенных веществ и ксенобиотиков подтверждается его преимущественно апикальной локализацией. Лишь в надпочечниках Pgp распределен диффузно, что предполагает его участие в защите клетки от высокой локальной концентрации стероидов [31]. По последним

данным транспортер также локализуется на лизосомальной мембране, транспортируя субстраты внутрь органелл [304].

В слизистой оболочке тонкого кишечника роль транспортера заключается в ограничении абсорбции субстратов [204]. Также имеются данные об участии Pgp в защите организма от кишечной микрофлоры. Нокаутированные по гену *mdr1a* (ген, отвечающий за синтез транспортера у грызунов) новорожденные мыши значительно более подвержены ряду патологий, в том числе некротическому энтероколиту. Одним из стимуляторов синтеза кишечного транспортера является материнское молоко [199].

Локализация на билиарной поверхности гепатоцитов, апикальной поверхности эпителиоцитов проксимальных канальцев почек, а также протоков поджелудочной железы позволяет Pgp осуществлять эффлюкс субстратов в желчь, первичную мочу и панкреатический секрет соответственно [327]. Pgp обнаружен в β -клетках поджелудочной железы крыс, где он участвует в транспорте инсулина [325].

Pgp широко представлен в эндотелии капилляров, формирующих гистогематические барьеры: гематоэнцефалический, гематоовариальный, гематотестикулярный, гематоплацентарный и гематоофтальмический, где белок-транспортер совместно с другими защитными механизмами обеспечивает проникновение в забарьерные органы лишь ряда низкомолекулярных веществ [217, 259].

Pgp выявлен в беременной матке, где он транспортирует половые гормоны [330]; в трофобластах плаценты, где его роль – защита плода от проникновения веществ-субстратов из системного кровотока матери. Причем количество транспортера в плаценте человека максимально в I триместре беременности, таким образом, транспортер выполняет защитную функцию в критический период тератогенеза [57].

Данные о функциях транспортера в скелетной и сердечной мускулатуре [163], а также легочной ткани человека [296] в научной литературе отсутствуют.

Выраженная экспрессия гена *MDR1*, кодирующего Pgp, наблюдается в протоках потовых желез, дерме и кровеносных сосудах кожи, что выявлено методами полимеразной цепной реакции (ПЦР). Предполагается, что в указанных тканях транспортер выполняет барьерную функцию при трансдермальной абсорбции ксенобиотиков [315].

Pgp участвует также в защите гемопоэтических предшественников, Т-клеток, зрелых лимфоцитов периферической крови и натуральных киллеров от токсичных агентов и различных регуляторных факторов, вызывающих дифференцировку и пролиферацию [152], а также от ряда вирусов [208]. В активированных лимфоцитах транспортер вовлечен в транспорт цитокинов: интерлейкинов-1, 2 и 4 [273].

Обнаружено участие Pgp в транспорте холестерина [190], фосфатидилхолина и сфингомиелина [138] через цитоплазматическую мембрану.

В опухолевых клетках возрастание экспрессии и функциональной активности Pgp на цитоплазматической мембране (вызванное такими факторами, как гипоксия, окислительный стресс, недостаток питательных веществ и глюкозы) является одной из причин их множественной лекарственной устойчивости – феномена, когда приобретенная резистентность к одному типу терапии сопровождается нечувствительностью к другим лекарственным средствам, несмотря на значительные различия в их структуре и механизмах действия [121, 128].

Таким образом, наличие Pgp во многих тканях свидетельствует об участии транспортера в защите организма от потенциально токсичных ксенобиотиков, их метаболитов, а также эндогенных веществ и его немаловажной роли в модуляции клеточного роста, дифференцировки и смерти.

1.3. Гликопротеин-P как белок-транспортер лекарственных средств

Pgp является полиспецифичным транспортером, распознающим широкий спектр веществ различной химической структуры и молекулярной массы (от 330

до 4000 Да): органические катионы и анионы, слабые органические основания, ряд незаряженных соединений, в том числе полипептидные производные [43]. Субстраты транспортера имеют аминогруппу или атом азота, положительно заряженный при физиологических значениях рН, а также водородные связи в молекуле [28]. Причем, чем липофильнее молекула вещества и чем больше водородных связей присутствует в ней, тем большим сродством к Pgp она обладает [178].

Pgp транспортирует такие фармакологические группы лекарственных веществ, как противоопухолевые препараты, стероидные гормональные средства, сердечные гликозиды, блокаторы медленных кальциевых каналов, макролиды, фторхинолоны, ингибиторы ВИЧ-протеиназы, статины, иммунодепрессанты и др. [43]. По некоторым данным к субстратам транспортера относятся до 50% современных лекарственных средств [316].

Удивительно, что для субстратов Pgp характерна значительная вариабельность молекулярных масс, химических структур и топологий (органические молекулы, линейные и циклические пептиды, конъюгированные молекулы). Столь низкая субстратная специфичность транспортера объясняется наличием многочисленных молекулярных сайтов, связывающих ксенобиотики, а также его конформационной пластичностью в цитоплазматической мембране [226, 159]. Предполагается наличие нескольких субстрат-связывающих сайтов в молекуле транспортера: R-сайт, с которым специфически взаимодействует родамин-123, и H-сайт, связывающий вещество Hoechst 33342 (H33342). Указанные сайты локализованы на противоположных α -спиралях трансмембранного домена и, возможно, способны трансформироваться друг в друга. Кроме того, в молекуле имеется крупный D-сайт, контактирующий с дигоксином, и частично перекрывающий R-сайт. Взаимодействуя с указанными участками, вещества могут как транспортироваться Pgp, так и модулировать его функциональную активность [142]. Ряд ученых выделяет также наиболее гидрофобный сайт (с самым большим количеством ароматических аминокислот)

со значительной модулирующей активностью, с которым взаимодействует селективный ингибитор Pgp – тариквидар [187].

Как правило, транспортер и его субстрат связываются между собой водородными связями [306]. Причем в случае, если два субстрата Pgp применяются одновременно, то тот из них, который обладает большей способностью образовывать водородные связи, проявляет свойства ингибитора. Чем прочнее данные водородные связи, тем ниже скорость диссоциации комплекса субстрат-транспортер [306].

Воздействие большого числа лекарственных веществ может модулировать активность Pgp. Ингибиторы транспортера снижают его функциональную активность, что в ряде случаев ассоциировано с развитием нежелательных лекарственных реакций. Индукторы, напротив, стимулируют функционирование белка-транспортера, что изменяет фармакокинетику лекарственных веществ-субстратов и способствует снижению эффективности проводимой фармакотерапии. Ингибирование белка-транспортера является привлекательной целью для предотвращения множественной лекарственной устойчивости опухолей [171, 280] и повышения эффективности фармакотерапии ряда других нозологий.

В ингибировании АТФ-азной активности Pgp зосуквидаром, тариквидаром и элакридидаром показана немаловажная роль пары фенилаланин-тирозин-содержащих структурных мотивов в трансмембранном домене транспортера. Указанные вещества формируют водородные связи с остатками тирозина в результате их конформационной доступности [158]. О более подробных механизмах и примерах лекарственного воздействия на Pgp будет рассмотрено в следующих главах.

Межлекарственные взаимодействия на уровне Pgp носят дозозависимый и тканеспецифичный характер. Например, известно повышение нейротоксичности субстрата Pgp лоперамида при его комбинации с ингибиторами транспортера квинидином и ритонавиром. В то же время другой ингибитор Pgp – тариквидар

вызывает накопление лоперамида только в лимфоцитах [157]. При приеме субстрата Pgp пропранолола изменение активности транспортера не приводит к значимому колебанию параметров распределения β -адреноблокатора [208].

Таким образом, к субстратам Pgp относится широкий спектр ксенобиотиков и эндогенных веществ, различных по химической структуре и механизмам действия, и изменение функциональной активности транспортера может повлечь непредсказуемые колебания фармакокинетики многих лекарственных веществ, являющихся его субстратами. При этом часто принадлежность вещества к числу субстратов Pgp сопровождается его способностью ингибировать функциональную активность данного белка-транспортера.

1.4. Механизмы модуляции функционирования гликопротеина-P на фоне гипоксии

Заметное число научных работ посвящено изучению влияния гипоксии различных видов на функционирование Pgp. Являясь одним из ведущих экстремальных факторов в ряду естественных стрессоров, воздействующих на организм человека и животных, гипоксия различных видов осложняет течение многих патологий, таких как сердечно-сосудистые, легочные заболевания, анемии и др. [92].

Большинство исследователей сходятся во мнении, что дефицит кислорода является индуктором Pgp *in vitro*. Результаты экспериментов *in vivo*, особенно с применением циркуляторной гипоксии, более противоречивы [107].

Культура эпителиальных и эндотелиальных клеток человека при парциальном давлении кислорода 20 мм рт. ст., углекислого газа – 35 мм рт. ст. характеризовалась увеличением содержания иРНК гена *MDR1* в 2,2 и 7,1 раз по сравнению с контролем соответственно после 6 и 18 часов инкубации, а также увеличением количества самого транспортера с максимальным уровнем Pgp после 48 часов гипоксического воздействия, а также возрастанием его активности.

Увеличение продолжительности гипоксии до 72 и 96 часов не приводило к дальнейшему возрастанию содержания белка-транспортера [162].

Инкубирование сфероидов опухолевых клеток при содержании кислорода в воздухе 1% в течение 72 часов приводило к интенсификации синтеза Pgp, ассоциированного с возрастанием количества транскрипционного фактора NF-1 α . Сходные изменения наблюдались и при инкубировании клеток в среде, содержащей хлорид кобальта, вызывающий цитотоксический тип гипоксии [346]. Инъекции кобальта (II) хлорида во фронто-париетальную кору крыс в качестве модели цитотоксической гипоксии вызвало возрастание количества Pgp не только в эндотелиальных клетках сосудов мозга, но и в цитоплазме нейронов и в астроцитах [250]

При помещении клеток мозговых микрососудов и астроцитов крыс в среду, не содержащую глюкозу, а также воздействие на них бескислородной газовой смеси (5% CO₂, 95% N₂) приводило к снижению внутриклеточного накопления родамина-123 – субстрата Pgp в первые 3 часа экспериментального воздействия из-за увеличения экспрессии и активности транспортера. Начиная с 4 часов, проникновение субстрата постепенно увеличивалось. Возрастание синтеза Pgp авторы связывают с сигнальными механизмами, включающими фактор некроза опухолей α , эндотелин-1, синтазу оксида азота и протеинкиназу C [218].

В научной литературе встречаются и другие мнения. На культуре опухолевых клеток EMT6/R при 12-часовом воздействии газовой смеси, содержащей менее 10 ppm кислорода, не обнаружено различий между содержанием в клетках адриамицина – субстрата Pgp – по сравнению с условиями нормоксии. В то же время резистентность к препарату при гипоксии возрастала, что подтверждало отличную от Pgp-опосредованной химиорезистентность. Помещение клеток в среду с нормальным содержанием кислорода возвращало чувствительность к химиотерапии [298]. В другом исследовании устойчивость опухолевых клеток к 5-фторурацилу в условиях гипоксии объяснялась задержкой клеточного цикла на стадии G1 из-за активации экспрессии

ингибиторов митотического цикла p21 и p27 и стимуляции экспрессии циклина D; при этом активации Pgp не выявлено [362].

Показано формирование резистентности клеток фибробластов легких китайских хомячков к адриамицину и этопозиду на фоне гипоксического воздействия (менее 0,1% кислорода в течение 30 мин). Через 24 часа реоксигенации чувствительность клеток полностью восстанавливалась. При этом верапамил (ингибитор Pgp) не модулировал резистентности клеток к химиопрепаратам, что свидетельствует об отличном от Pgp-индуцированного механизме формирования устойчивости. Авторами не исключается роль модификации структуры цитоплазматической мембраны в связи с тем, что подвергнутые гипоксии клетки приобретали также резистентность к супероксидным радикалам [228].

В другом исследовании культура опухолевых клеток линии LS513 при инкубировании в течение суток при физиологическом значении pH и парциальном давлении кислорода в воздухе менее 0,5 мм рт. ст. не проявляла изменения активности и экспрессии Pgp [263].

Исследования функционирования Pgp на фоне гипоксии *in vivo* носят весьма противоречивый характер.

Применение модели 2-часовой ишемии у крыс путем ретроградного внутрипросветного наложения нейлонового шва, покрытого поли-L-лизином, через наружную сонную артерию во внутреннюю и среднюю мозговую артерию показало, что проникновение флюоресцентного красителя в мозг через ГЭБ не наблюдалось через 2–3 часа от начала патологии, но было явно выражено в более поздние сроки. Через 4 часа после начала ишемии экстравазация красителя была повышена на 179% по сравнению с интактными крысами, через 5 часов – на 407%, через 26 часов – на 311% и через 50 часов – на 264% ($p < 0,05$). Исследование выявило, что начальное острое нарушение ГЭБ происходит между третьим и пятым часом после развития ишемии и развивается вплоть до 48 часов [134].

Методами Western blotting и ПЦР на 30 крысах показано повышение экспрессии Pgp в миокарде, а также увеличение количества миокардиальной и печеночной иРНК гена *mdr1a* и миокардиальной иРНК гена *mdr1b* на фоне 2-недельной интермиттирующей дыхательной гипоксии. По мнению авторов, индукция транспортера под действием гипоксии может служить причиной фармакорезистентности сердечно-сосудистых патологий у пациентов с обструктивным апноэ во сне [175].

48-часовое воздействие на крыс нормобарической нормокапнической гипоксической гипоксии приводило к возрастанию уровня печеночного иРНК гена *mdr1b*, а также количества Pgp [188].

Частичная перевязка портальной вены крыс приводила к повышенной экспрессии HIF-1 α и Pgp отдаленно – в нейронах коры головного мозга, что авторы связывают с гипераммониемией и стабилизацией транскрипционного фактора [323]. Подобные изменения имеют приспособительный характер: гипераммониемия, вызванная патологией печени, вызывает повышение активности транспортера в ГЭБ, что позволяет защитить головной мозг от воздействия данного и других токсичных веществ [366].

4-часовая перманентная окклюзия средней мозговой артерии крыс-самцов приводила к возрастанию экспрессии Pgp в ГЭБ и нейронах головного мозга, что показано методом Western blotting, а также росту функциональной активности транспортера и снижению внутриклеточного содержания ряда его субстратов – родамина-123, флюоресцеина натрия и нимодипина. Через 6 часов в зоне ишемии содержание субстратов начинало возрастать, несмотря на все еще повышенную экспрессию Pgp, что могло быть вызвано значительным увеличением проницаемости ГЭБ в зоне ишемии [150].

На сегодняшний день доказана основная роль транскрипционных факторов HIF-1 [162, 260, 346, 349] и его кислородчувствительной субъединицы HIF-1 α , а также Sp1 [162] в индукции экспрессии гена *MDR1* и повышении функциональной активности Pgp в условиях гипоксии.

HIF-1 – это полипептид, представленный в клетках всех типов, который отвечает за компенсаторно-приспособительные изменения транскрипционной активности более 100 генов человека в условиях дефицита кислорода. Среди подобных изменений: модуляция синтеза транспортеров глюкозы, эритропоэтина, сосудистого эндотелиального ростового фактора, ряда ферментов гликолиза и цикла Кребса; изменение ангиогенеза и сосудистого тонуса; регуляция гипоксия-индуцируемого апоптоза [258, 264].

Транскрипционный фактор функционирует как белковый гетеродимер, включающий две субъединицы: HIF-1 α (120 кДа) и HIF-1 β (или ARNT – aryl hydrocarbon nuclear translocator; 91–94 кДа), каждая из которых на N-конце имеет домен типа «спираль-петля-спираль» (basic helix-loop-helix, или bHLH-домен) и зоны гомологии PER-ARNT-SIM (или PAS-домен), необходимые для димеризации и связывания с ДНК.

HIF-1 β -субъединица постоянно находится в клетке и способна формировать гетеродимеры с различными молекулами, содержащими домен bHLH-PAS. В то же время HIF-1 α -субъединица является обязательным кислородчувствительным компонентом HIF-1: экспрессия ее иРНК, период полужизни молекулы и активность трансактивационного домена определяются внутриклеточным уровнем кислорода. На фоне нормоксии она находится в форме доступного для убиквитирования и протеосомальной деградации комплекса с убиквитинлигазой von Hippel-Lindau (VHL). Для связывания с VHL субъединица предварительно гидроксилируется по двум остаткам пролина в положении 564 (фермент пролилгидроксилаза) и ацетируется по остатку пролина в ODD-домене (oxygen dependent degradation domain) с помощью ферментативных реакций, требующих наличия кислорода и ионов железа [264, 288]. Кислород запускает также гидроксилирование остатка аспарагина в положении 757–826 С-терминального домена трансактивации (C-TAD). Данный процесс контролируется специфической аспарагингидроксилазой, названной FIH1 (factor inhibiting HIF-1)

[264]. Описанные ферменты являются негемовыми железосодержащими 2-оксоглутаратзависимыми оксигеназами [64].

HIF-1 α на С-конце содержит два трансактивационных домена, связывающих ряд коактиваторов (CBP, p300, SRC-1 и TIF-2), активность которых угнетается внутриклеточным кислородом, а также ряд доменов, ответственных за гипоксия-индуцированную локализацию и стабилизацию полипептида [174, 264, 307].

Имеются данные о быстрой биодеградации субъединицы HIF-1 α в течение 5–10 мин после прекращения воздействия гипоксических условий, а к концу 30 мин нормоксии экспрессия гена, кодирующего данную субъединицу, не детектировалась [347]. Помещение культуры клеток гепатомы человека Нер 3В в газовую смесь, содержащую 20% кислорода после 4-часового воздействия на нее газовой смеси, содержащей 1% кислорода, приводило к снижению уровня иРНК HIF-1 α и HIF-1 β ниже исходного в течение 5 мин [340].

На фоне гипоксии субъединица HIF-1 α стабилизируется, транспортируется в ядро и формирует димер с ARNT, после чего связывается с областями ДНК, содержащими так называемые гипоксия-реактивные элементы – hypoxia response element, HRE, а также cis-активные элементы-регуляторы транскрипции (cis-acting transcriptional-regulatory element) генов-мишеней [307]. В гене *MDR1* данная область представляет собой последовательность нуклеотидов 5'-GCGTG-3', расположенную на расстоянии от –49 до –45 пар нуклеотидов от сайта старта транскрипции [162, 175].

Индущирующее влияние на экспрессию HIF-1 оказывают различные виды гипоксии. Так, методом ПЦР на крысах-самцах было показано увеличение количества иРНК HIF-1 α почти в 5 раз в гипокампе на фоне билатеральной окклюзии общих сонных артерий (20 мин) с последующей 2-дневной реперфузией. Кроме того, обнаружено более чем двукратное повышение уровня малонового диальдегида в ткани гипокампа и более чем двукратное угнетение антиоксидантной защиты [132].

В исследовании на кардиомиоцитах крыс продемонстрировано увеличение количества иРНК гена, кодирующего HIF-1 α , после 60-минутной гипоксии с последующей реперфузией в течение 15, 60, 180 мин и 8 ч. Экспрессия транскрипционного фактора в контрольной группе (без ишемии-реперфузии) была весьма низкой, в модельной группе экспрессия возрастала от начала реперфузии и достигала пика к 60 мин, затем после 180 мин начинала снижаться, но оставалась выше, чем в контроле, к 8 ч статистически от контроля не отличалась [339].

Также показана зависимость синтеза иРНК HIF-1 α не только от уровня кислорода, но и от наличия некоторых ионов. Так, ионы кобальта формировали более прочные связи с гемом, чем железо, и активировали HIF-1 за счет истощения внутриклеточного содержания аскорбиновой кислоты, которая является кофактором для фермента HIF-гидроксилазы [324]. Стабильность HIF-1 и интенсивность его связывания с ДНК угнетается у животных с возрастом [307].

Обнаружен полиморфизм кодирующей области Pro582-Ser гена, экспрессирующего кислородчувствительную субъединицу HIF-1 α 1772C>T, который определяет различный сосудистый ответ на гипоксию. Сочетание курения и носительства аллели 1772T статистически значимо повышает вероятность возникновения у ее носителей аневризмы абдоминальной аорты [318]. По последним данным выявлено 34 полиморфизма одного нуклеотида гена, кодирующего субъединицу HIF-1 α , ассоциированные с 49 фенотипами (в том числе 14 злокачественными новообразованиями) [192]

Среди эндогенных регуляторов функционирования HIF-1 можно выделить ряд факторов. Показано, что дыхательная цепь митохондрий вовлечена в регуляцию экспрессии HIF-1: блокада комплекса I электронотранспортной цепи приводила к практически полному устранению гипоксической индукции данного транскрипционного фактора. При этом сукцинат, являясь субстратом комплекса II, ее восстанавливал [120].

Белок p53 взаимодействует с HIF-1 α и модулирует ее стабильность в гипоксических условиях [264]. Выявлено влияние транскрипционного фактора NF- κ B (nuclear factor kappa-B), который функционирует как гетеродимер субъединиц p50 или p52 с субъединицей p65, на базальную экспрессию HIF-1 α с увеличением количества иРНК и уровня самого белка [72]

Продемонстрировано участие оксида азота (NO) в качестве транскрипционного коактиватора, приводящего к накоплению HIF-1 α за счет блокады пролилгидроксилазы – фермента, гидроксилирующего данную субъединицу транскрипционного фактора в условиях нормоксии, а также за счет нитрозилирования тиоловых групп белковой части HIF-1 α , ее стабилизации, и повышения тропности HIF-1 α к гипоксия-реактивным элементам таргетных генов. Кроме того, показано, что NO стимулирует синтез HIF-1 α за счет активации метаболического пути азот-активируемой протеинкиназы [220].

Регуляция синтеза HIF-1 α контролируется такими сигнальными системами, как MAPK (митогенактивируемая протеинкиназа) и PI3K (фосфатидилинозитол-3-киназа). Обе сигнальные системы активируются через рецептор тирозинкиназы, а также через специфический сукцинатзависимый рецептор, GPR-91. Показано, что сукцинат является агонистом указанных рецепторов [52].

Регуляция экспрессии HIF-1 α осуществляется также редокс-статусом клеток. Увеличение в культуральной среде клеток HepG2 концентрации прооксиданта, ингибитора глутамилцистеинсинтазы – DL-бутионинсульфоксимины перед гипоксическим воздействием приводило к концентрационнозависимому снижению экспрессии HIF-1 α в отличие от клеток, подвергнутых гипоксии (воздействие газовой смеси, содержащей 1% кислорода и 99% азота в течение 4 ч) без предварительной аппликации вещества. Аналогичным образом изменялся уровень иРНК гена *MDR1* и эритропоэтина. Степень данных изменений снижалась при добавлении в среду антиоксиданта N-ацетилцистеина в концентрации 5 ммоль/л на 8 ч перед гипоксическим воздействием, но только в

случаях, когда содержание прооксиданта в среде культивирования было менее 200 мкмоль/л [347].

На культурах клеток карциномы толстой кишки (HCT-116, HT-29, LoVo, SW480) показана корреляция между экспрессией HIF-1 и Pgr ($p < 0,01$) [371]. Снижение внутриклеточного содержания HIF-1 α приводило к угнетению экспрессии гена *MDR1* в условиях нормоксии и практически полностью устраняло индуцирующее влияние гипоксии на его экспрессию. Аналогичные результаты возникали при делеции зоны промотора гена *MDR1*, включающего HIF-1 α -связывающий сайт [162].

HIF-1-связывающий сайт промотора гена *MDR1* содержит также область связывания с транскрипционным фактором Sp1. Угнетение экспрессии данного транскрипционного фактора с помощью антисмысловых нуклеотидов вызывает снижение активности промотора *MDR1*-гена, однако в меньшей степени, чем при ингибировании экспрессии HIF-1 α . Таким образом, Sp1 совместно с HIF-1 способен индуцировать синтез Pgr в условиях кислородного дефицита [162].

Представители семейства Sp-белков (называемые также *krüppel-like factors* – KLF) вступают в контакт с «Sp1-сайтами» (GC-боксы, GT-боксы, CACCC-боксы) промоторов или энхансеров ряда генов и регулируют их экспрессию, участвуя в клеточной пролиферации, ангиогенезе, апоптозе и опухолевой прогрессии. Их молекулы включают три высоко консервативных ДНК-связывающих домена (65% сходства нуклеотидной последовательности у различных членов семейства), каждый из которых формирует структуру типа «цинковый палец» на С-конце и способствует связыванию транскрипционного фактора с соответствующими участками генома и межбелковым взаимодействиям, вариантный N-концевой домен, ответственный за трансактивационную или ингибирующую активность и способность связываться с корепрессорами и коактиваторами, а также структуру, регулирующую ядерную локализацию фактора [186, 227]. В активации и ингибировании экспрессии генов под влиянием членов Sp1/KLF-семейства ведущая роль отводится деацетилированию и ацетилированию гистонов [227].

Транскрипционный фактор Sp1 является наиболее активным индуктором экспрессии и относится к I подгруппе Sp/KLF-семейства [227].

Таким образом, влияние гипоксических условий на функционирование Pgp зависит от степени кислородного дефицита, типа гипоксии, а также сопутствующих условий, реализуется за счет множества эндогенных факторов и требует комплексного изучения с применением адекватных моделей, прежде всего *in vivo*.

1.5. Механизмы изменения функционирования гликопротеина-P и способы его оценки

Активность Pgp может изменяться вследствие следующих процессов:

- изменения экспрессии гена *MDR1*, кодирующего Pgp [254];
- полиморфизма гена *MDR1* [209, 374];
- амплификации участка генома, включающего ген *MDR1* [234];
- стабилизации иРНК гена *MDR1* [352];
- межклеточной передачи Pgp [373];
- изменения функциональной активности Pgp [160, 214, 333];
- изменения клеточного метаболизма [221, 331].

Наиболее широко используются следующие способы оценки функционирования Pgp [31]:

1. Определяется количество иРНК гена *MDR1* методами Northern blotting, ПЦР, и др.
2. Оценивается количество белка Pgp с применением метода иммуногистохимического окрашивания, Western blotting, иммуноферментного анализа и др.
3. Исследуется фармакокинетика маркерных субстратов белка-транспортера (фексофенадин, дигоксин, домперидон и др.) *in vivo* или их проникновение внутрь клеток или через клеточный монослой *in vitro* [16, 161].

4. Оценивается чувствительность клеточной культуры к химиотерапии (качественная оценка активности транспортера) [143].

Зачастую для полноценной характеристики функционирования Pgp следует использовать несколько представленных методов одновременно, так как количество иРНК гена *MDR1* или концентрация самого транспортера не всегда коррелирует с изменением его эффлюксной активности, что может быть вызвано различиями в транскрипционных и трансляционных процессах [166].

1.6. Гликопротеин-P и фармакотерапия нарушений мозгового кровообращения

Множеством исследований показано наличие Pgp в эндотелиоцитах ГЭБ (на люминальной и аблюминальной мембранах, в эндоплазматическом ретикулуме, везикулах, ядерной оболочке), глиальных клетках (астроцитах), перицитах и нейронах головного мозга с максимальным содержанием транспортера именно в церебральных микрососудах (25-кратно превышающим уровень в коре мозга человека) [136, 211]. Функционирование данного транспортера, плотные контакты эндотелиальных клеток и перицитов, отсутствие пор, наличие глиальных клеток и ряда других эффлюксных белков-переносчиков в комплексе обеспечивают избирательное проникновение в ткани мозга лишь ряда низкомолекулярных веществ [270, 335, 365]. Изменение функциональной активности и интенсивности синтеза Pgp в ГЭБ может приводить к формированию ряда патологий ЦНС.

По данным ВОЗ инсульт является одной из ведущих причин смертности взрослого населения планеты. В развитых странах заболеваемость инсультом составляет порядка 2,5 случаев на 1000 населения в год, в ряде регионов России данный показатель достигает 7,1 на 1000 населения в год [37]. При этом в структуру цереброваскулярных заболеваний входят как острые нарушения мозгового кровообращения (ишемический и геморрагический инсульты различных подтипов), так и хронические его формы (варианты так называемой

дисциркуляторной энцефалопатии). По некоторым данным, ежегодно в России инсульт поражает около полумиллиона человек с показателем заболеваемости 3 на 1000 населения, при этом 80% случаев патологии составляет ишемический инсульт. В так называемый острый период – в среднем 21 сутки от момента развития инсульта – летальность достигает 35%, в течение года погибают еще 15% из числа выживших пациентов [76].

Терапия ишемического инсульта преследует несколько целей: реперфузия, т.е. восстановление кровотока в зоне ишемии (тромболизис – в пределах временного терапевтического окна – 4,5 часа [200]; эндоваскулярные хирургические методы лечения, допустимые на более поздних сроках (до 24 ч) [2, 225]) и базисная терапия (коррекция дыхательных нарушений, контроль артериального давления и водно-электролитного баланса, терапия отека мозга и повышенного внутричерепного давления) [33], а также нейрональная протекция – предотвращение гибели еще жизнеспособных нейронов, располагающихся вокруг очага некроза (зона пенумбры) [76]. Нейропротекция является одним из ведущих направлений фармакотерапии хронического нарушения мозгового кровообращения [287].

Внутривенное введение рекомбинантного тканевого активатора плазминогена (альтеплазы, rt-PA) в дозе 0,9 мг/кг в первые 4,5 ч от начала ишемического инсульта на сегодняшний день имеет самый высокий уровень доказательности (класс I, уровень A). Подобная тактика рекомендуется в европейских (ESO) и американских (AHA-ASA) руководствах по терапии данной патологии [100] на основании ряда плацебо-контролируемых исследований (NINDS, ECASS I, ECASS II, ATLANTIS, ECASS III), а также в отечественных документах [35]. Однако в связи с узким значением временного терапевтического окна и тем, что применение альтеплазы возможно только после исключения внутримозгового кровоизлияния, в США ее используют только у 2–7% пациентов с острым нарушением мозгового кровообращения [301]. В России данный показатель составляет 3,3% [70].

Функционирование Pgp играет определенную роль в формировании побочных эффектов и межлекарственных взаимодействий препаратов, применяемых для базисной терапии инсульта, а также для лечения заболеваний, сопутствующих нарушению мозгового кровообращения, и патологий, являющихся его причинами.

Почти четверть инсультов развивается как тромбозэмболические осложнения фибрилляции предсердий [193], основным методом профилактики которых считается назначение пероральных антикоагулянтов.

Известно, что высокоселективный прямой ингибитор Ха фактора свертывания крови – ривароксабан и прямой селективный ингибитор тромбина – дабигатрана этексилат являются субстратами Pgp, который ограничивает их энтеральную абсорбцию. Оба вещества не влияют на функциональную активность белка-транспортера, что было показано при совместном применении антикоагулянтов и маркерных субстратов Pgp [219, 242].

Установлено, что комбинированное применение указанных средств с ингибиторами Pgp (кетоконазол, верапамил, кларитромицин, хинидин и амиодарон) значительно увеличивает площадь под фармакокинетической кривой антикоагулянтов концентрация-время, однако не влияет на степень их всасывания, максимальную концентрацию, время достижения максимальной концентрации и период полувыведения [286]. В другом исследовании выявлено, что концентрация дабигатрана этексилата в плазме крови повышалась примерно в 1,5 раза при его применении через час после введения амиодарона и верапамила [338]. Комбинирование дабигатрана этексилата с индуктором Pgp – рифампицином приводило к снижению AUC дабигатрана и устранению его эффектов [202]. При генотипировании 2944 пациентов, включенных в исследование RELY, установлена ассоциация полиморфизма *C3435T* гена *MDR1* с пиком концентрации дабигатрана [286].

Пероральный антикоагулянт эдоксабан продемонстрировал свою принадлежность одновременно к субстратам и ингибиторам функционирования

P_{gp}. На 48 пациентах в возрасте от 18 до 45 лет установлено, что AUC и C_{max} субстрата транспортера – дигоксина при совместном назначении с эдоксабаном увеличились на 8,3% и 28% соответственно, а фармакокинетические параметры эдоксабана достоверно не изменились [269], что свидетельствовало, по мнению авторов, о принадлежности последнего к ингибиторам, но не субстратам P_{gp}. В другом исследовании на пациентах, принимающих эдоксабан совместно с хинидином, верапамилом, аторвастатином и дронедароном выявлено увеличение AUC эдоксабана по сравнению с его изолированным назначением [269], что служило доказательством участия P_{gp} в контроле фармакокинетики эдоксабана.

Частой причиной развития ишемических нарушений головного мозга служит атеросклероз [50]. Субстратами белка-транспортера являются многие гиполипидемические лекарственные вещества: из них наиболее изучены статины (симвастатин и его кислота, аторвастатин) [207].

В случае возникновения недостаточности мозгового кровообращения из-за нарушения сердечного ритма, резкого снижения артериального давления, сердечной недостаточности и др. целесообразно назначать препараты, нормализующие системную гемодинамику: вазопрессорные и кардиотонические средства, низкомолекулярные декстраны, сердечные гликозиды, антиаритмические препараты. Показано, что дигоксин и его метаболиты являются субстратами P_{gp} [155]. Нарушение системы гемостаза и реологических свойств крови на фоне ишемического инсульта требует назначения тромбоцитарных антиагрегантов, прежде всего аспирина (рекомендован в течение 24–48 ч после ишемического инсульта, но не раньше, чем через 24 ч после внутривенного фибринолиза [198]), тиклопидина, клопидогреля, дипиридамола, пентоксифиллина. В случае тромботических и тромбоэмболических осложнений и неэффективности антиагрегантов можно прибегнуть к назначению прямых антикоагулянтов [76, 154]. Однако зарубежные ассоциации применение гепарина не рекомендуют [198].

Показана роль генетических факторов в формировании резистентности к антиагрегантному эффекту аспирина. В исследовании на 560 пациентах с ишемическим инсультом был выявлен большой риск клинической неэффективности аспирина у лиц с генотипом *TT* по полиморфизму *C3435T* гена *MDR1* по сравнению с генотипом *CC* [308].

Таким образом, ряд лекарственных средств, применяемых для терапии последствий острых нарушений мозгового кровообращения, показали свою принадлежность к числу субстратов или модуляторов функциональной активности и экспрессии Pgp. Часть данных фактов подтверждена клиническими исследованиями. Это создает предпосылки для межлекарственных взаимодействий, многие из которых являются нежелательными и могут привести к серьезным осложнениям фармакотерапии, что особенно актуально в связи с комплексным подходом к лечению инсульта.

Под нейропротекцией обычно понимают терапевтическую стратегию, при которой основной целью является защита клеток головного мозга от гибели в результате ишемии [191]. В отечественных рекомендациях некоторые препараты с нейропротекторной активностью показаны для терапии последствий острого нарушения мозгового кровообращения и являются особенно перспективной группой в связи с возможностью применения уже на догоспитальном этапе. Среди препаратов рекомендованы магния сульфат, глицин, метионил-глутамил-гистидил-фенилаланил-пролил-глицил-пролин, цитофлавин, кортексин, церебролизин [33]. Также медикаментозная терапия в восстановительном периоде инсульта включает использование церебропротекторных (церебролизин, кортексин, актовегин, метионил-глутамил-гистидил-фенилаланил-пролил-глицил-пролин, этилметилгидроксипиридина сукцинат, цитофлавин, тиоктовая кислота), вазоактивных (винпоцетин) и ноотропных (пирацетам, фенилоксопирролидинацетамид) средств на усмотрение врача общей практики. Однако согласно международным клиническим рекомендациям и результатам большинства крупных

рандомизированных исследований на сегодняшний день не существует нейропротективной программы, продемонстрировавшей достоверное улучшение исхода инсульта [198].

Цели нейропротекторной терапии ишемического инсульта включают воздействие на церебральное воспаление, оксидативный стресс, структурные и функциональные нарушения ГЭБ, эксайтотоксичность, апоптоз в зоне «пенумбры» и аутофагию [265].

В настоящее время накоплен серьезный опыт применения нейропротекторов с различными механизмами действия. Более 70 потенциальных нейропротективных агентов (магния сульфат [301], агонисты каннабиноидного рецептора CB1 [141], стероидные гормональные средства – прогестерон и аллопрегнанолаон [196], гинсенозиды [375], антибиотик широкого спектра действия миноциклин, антиглутаматергические вещества пре- и постсинаптического типа действия, антиоксиданты и антигипоксанты, блокаторы кальциевых каналов, ноотропы, нейропептиды, нейротрофические вещества, антагонисты провоспалительных цитокинов и пр.) были оценены в доклинических и в рандомизированных контролируемых клинических исследованиях. Несмотря на то, что часть из них продемонстрировали обнадеживающие результаты (актовегин – [195]; церебролизин – [247]), современные зарубежные организации не рекомендуют ни один из фармакологических или нефармакологических методов нейропротекции [7, 198, 301].

Однако отечественные клинические исследования продемонстрировали эффективность ряда препаратов. Так, эффективность и безопасность длительной терапии мексидолом по сравнению с плацебо была доказана в клиническом исследовании на 150 пациентах в остром и раннем восстановительном периодах ишемического инсульта [74].

Положительные результаты на ранних стадиях клинических испытаний могут быть объяснены в первую очередь небольшим числом пациентов, включенных в анализ, а также низким качеством рандомизации [272].

На сегодняшний день дискуссии о вероятных причинах подобных негативных результатов клинического использования препаратов с предполагаемой нейропротективной активностью продолжаются.

Одной из возможных причин является многостадийность и комплексность патогенеза ишемического инсульта. Так, первые 3 часа после манифестации патологии характеризуются прогрессированием энергетического дефицита нейронов, в течение последующих 3 часов (так называемой «второй волны») наблюдается повреждение ткани мозга в результате реакций эксайтотоксичности, нарушения функций транспорта ионов через мембрану и развития нейрометаболических нарушений (лактацидоза). Отдаленные во времени последствия ишемии, такие как оксидативный стресс, нейровоспаление и развитие реакций апоптоза достигают своего максимума через 12–36 часов и в конечном итоге формируют такие осложнения, как прогрессирование явлений атерогенеза и развитие энцефалопатии и/или сосудистой деменции. Подобное разнообразие фармакологических мишеней делает невозможным реализацию полноценной стратегии нейропротекции в рамках монотерапии [7].

Одной из ведущих причин неэффективности препаратов с нейропротекторной активностью в исследованиях на людях, несмотря на положительные результаты на доклиническом этапе, является отсутствие адекватных экспериментальных моделей инсульта [191, 194]. В первую очередь, у человека ишемический инсульт является в значительной степени более гетерогенной патологией, чем воспроизведенные в стандартизированных лабораторных условиях. Кроме того, в экспериментах часто используются препараты в высоких дозах и вне соответствующего «временного окна». Также в доклинических исследованиях зачастую используются молодые здоровых животные, в то время как абсолютное большинство пациентов с инсультом

являются пожилыми людьми с соответствующим полиморбидным фоном (артериальная гипертензия, инфаркт миокарда, сахарный диабет и пр.), которые могут изменять структуру ГЭБ, коллатеральное кровообращение или нейроиммунную систему [76].

В 2000 г. были предложены рекомендации по доклинической разработке нейропротективных средств, направленные на устранение вышеназванных недостатков (критерии STAIR – от Stroke Therapy Academic Industry Roundtable) [194], однако до сих пор значительного улучшения качества подобных исследований не наблюдается [76].

По нашему мнению, одной из вероятных причин неэффективности лекарственных средств с нейропротекторной активностью при коррекции последствий ишемических поражений мозга является их недостаточное проникновение через ГЭБ за счет эффлюкса Pgp, активность которого, как было показано выше, преимущественно повышается на фоне дефицита кислорода, который неизбежно имеет место при подобных нозологиях. В пользу данного предположения говорит принадлежность ряда нейропротекторов к числу субстратов транспортера. Например, при пероральном введении крысам блокатора кальциевых каналов нимодипина совместно с ингибитором Pgp правастатином относительная биодоступность первого возрастала в 1,12–1,31 раза относительно контрольного опыта, что свидетельствует об участии данного транспортера в контроле его энтеральной абсорбции [255].

Цилнидепин – препарат с антигипертензивной и нейропротективной активностью – показал свою принадлежность к субстратам Pgp на культуре эпителиальных клеток почек свиньи (LLC-GA5-COL150 cells), гиперэкспрессирующих белок-транспортер, и на мышях, нокаутированных по гену Pgp [359].

Кроме того, большое число веществ с выявленной нейропротективной активностью (статины [198, 292], ряд флавоноидов [363], антихолинэстеразное средство ривастигмин [274], берберин [245]) не применяются в этом качестве в

связи с тем, что в терапевтической дозе за счет эффлюкса из головного мозга Pgp не достигают нейропротективной концентрации, а при повышении их дозы оказывают выраженные системные побочные эффекты.

Поскольку в большинстве исследований установлено повышение проницаемости ГЭБ примерно через 6 ч ишемии, независимо от изменения экспрессии Pgp, фармакологическая модуляция активности белка-транспортера, скорее всего, может повлиять на эффективность фармакотерапии лишь в ранние сроки нарушения мозгового кровообращения. Однако данное предположение требует уточнения.

Анализ приведенных выше данных обуславливает целесообразность дальнейшего исследования роли Pgp в патогенезе нарушений мозгового кровообращения, а также оценки функционирования белка-транспортера при проведении комбинированной фармакотерапии данной патологии, что позволит повысить ее эффективность и безопасность.

1.7. Способы исследования лекарственных веществ на принадлежность к субстратам и модуляторам активности гликопротеина-P

В связи со значительной ролью Pgp в патогенезе нарушений мозгового кровообращения, а также его участием в фармакокинетике лекарственных средств, используемых в том числе для фармакотерапии причин и последствий церебральной ишемии, целесообразно проанализировать принадлежность отечественных нейропротекторных лекарственных средств к числу субстратов и модуляторов активности данного транспортера *in vivo*.

Прогнозирование влияния лекарственных веществ на функционирование Pgp и оценка участия транспортера в их фармакокинетике возможна с точностью порядка 70–80% при помощи некоторых компьютерных программ, основанных на структурном сходстве лигандов белка-транспортера: QSAR-исследования (Quantitative Structure-Property Relationship), изучение фармакофоров,

автоматическая оценка свойств и стыковки в гомологии моделей [176] и ряд других алгоритмов и методик [235, 342].

Из-за сходства в механизмах индукции микросомальных ферментов печени изоформ *CYP3A* и *Pgp*, по данным об индукции *CYP3A* под действием изучаемого лекарственного вещества можно косвенно охарактеризовать его влияние на *Pgp*.

В связи с широкой субстратной специфичностью и вариабельностью функциональной активности *Pgp*, а также его важной ролью в фармакокинетике лекарственных препаратов ряд зарубежных организаций (U.S. Department of Health and Human Services, Food and Drug Administration и Center for Drug Evaluation and Research (CDER)), а также отечественные ученые [47] разработали рекомендации по тестированию межлекарственных взаимодействий с участием данного белка-транспортера (Drug Interaction Studies – Study Design, Data Analysis, Implications for Dosing, and Labeling Recommendations).

Целесообразно комплексно проанализировать указанные рекомендации и выявить наиболее информативную и трансляционную методику подобных анализов.

В соответствии с документами, все новые лекарственные средства подвергаются тестированию на принадлежность к субстратам и ингибиторам *Pgp* в моделях *in vitro*, а в случае положительных результатов *in vitro* в дальнейшем проводят опыты *in vivo*. Индуцирующее влияние лекарственных веществ на белок-транспортер не оценивается в связи с отсутствием одобренных для данных целей систем *in vitro*.

Анализ ингибирующей активности лекарственных веществ по отношению к *Pgp in vitro* оценивается на линии клеток опухоли толстого кишечника *Caco-2* или других клеточных линиях, гиперэкспрессирующих ген белка-транспортера [199], по изменению транспорта клеточным монослоем маркерного субстрата *Pgp*. При этом замедление транспорта субстрата свидетельствует об ингибировании активности *Pgp* под действием изучаемого вещества [213].

Следует отметить, что ряд препаратов, например, гормоны, могут приводить к метаболическим сдвигам в организме, которые также способны отразиться на функционировании Pgp. Однако подобная опосредованная модуляция функциональной активности транспортера не детектируется *in vitro* [109], что является существенным недостатком описанной методики.

При оценке принадлежности вещества к субстратам Pgp *in vivo* изучается изменение его фармакокинетики при введении в комбинации с сильными и максимально селективными индукторами и ингибиторами белка-транспортера.

Анализ действия лекарственных веществ на Pgp *in vivo* может проводиться на таких биологических тест-системах, как крысы, мыши и кролики. Электронные ресурсы UniProt и ClustalW приводят информацию о высокой консервативности аминокислотной последовательности Pgp у различных видов животных, но наибольшая гомология характерна для транспортеров человека и кролика – порядка 86% [129]. Кроме того, выявлена 95%-я идентичность аминокислотной последовательности нуклеотидсвязывающего и 82%-е сходство лигандсвязывающего доменов транскрипционного фактора PXR кролика и человека, который ответственен за стимуляцию экспрессии гена Pgp [270]. Профиль активации PXR у кролика и человека также аналогичен [251].

Кролики в качестве тест-системы для анализа функциональной активности Pgp обладают еще одним преимуществом: возможностью многократного взятия образцов крови. Это позволяет построить полноценную фармакокинетическую кривую маркерного субстрата транспортера одного и того же животного до и после курсового введения тестируемых лекарственных средств, а также после их отмены, используя, таким образом, связанные выборки животных при статистической обработке результатов. Использование кроликов устраняет влияние индивидуальных особенностей животных на фармакокинетику маркерных субстратов Pgp и позволяет применять повторные и перекрестные методики анализа – аналогичные для клинических исследований. При использовании крыс и мышей можно построить только усредненную

фармакокинетическую кривую, что связано с небольшими размерами животных и объемом крови, достаточным для анализа только в одной временной точки. Ограничение до необходимого минимума количества животных для выполнения эксперимента также согласуется с современными биоэтическими нормами.

Маркерный субстрат Pgp (дабигатрана этексилат, дигоксин, фексофенадин, домперидон, талинолол и ряд других по рекомендациям зарубежных организаций [161]) должен обладать рядом характеристик: отсутствие метаболизма в организме, зависимость его фармакокинетики исключительно или в большей степени от функционирования данного транспортера, но не от других белков-переносчиков.

Рассмотрим характеристики фексофенадина, который часто используется как маркерный субстрат Pgp. Фексофенадин является гистаминолитиком 3-го поколения. Он практически не подвергается биотрансформации цитохромом P-450 [275], а его фармакокинетика контролируется Pgp.

Препарат быстро всасывается в ЖКТ вне зависимости от приема пищи с биодоступностью около 33%, достигает пика концентрации в плазме (699 нг/мл при приеме 120 мг) приблизительно через 2 часа [275], а устойчивой плазменной концентрации – через 3 дня ежедневного приема. Кажущийся объем распределения вещества равен $6,67 \pm 4,09$ л/кг, связь с белками плазмы крови составляет около 60–70% [275, 311].

Фексофенадин экскретируется в неизменном виде преимущественно с желчью и частично с мочой (около 9,5%). Почечный клиренс составляет $55,6 \pm 21,8$ мл/мин [275, 311]. Выведение фексофенадина носит двухфазный характер из-за явления энтерогепатической рециркуляции. Период полувыведения препарата по разным данным равен от 3 до 17 часов, что позволяет применять его 1 раз в день [243, 311].

Основными показаниями для приема фексофенадина являются: сезонный аллергический ринит и хроническая идиопатическая крапивница. Препарат не оказывает угнетающего влияния на когнитивные и психомоторные функции, не

потенцирует действие алкоголя на ЦНС в терапевтических дозах [293], его снотворный эффект сопоставим с плацебо [170]. Препарат в отличие от терфенадина не блокирует K^+ -каналы кардиомиоцитов и не удлиняют интервал QT на кардиограмме [313]. LD₅₀ фексофенадина на грызунах не был установлен в связи с крайне низкой токсичностью препарата. Признаки токсичности не наблюдались при энтеральном введении фексофенадина в дозе 2000 мг/кг массы [268].

Противопоказания к применению фексофенадина включают гиперчувствительность к компонентам его лекарственной формы, возраст до 12 лет (для таблеток 120 мг и 180 мг), беременность и период лактации. С осторожностью препарат следует назначать пациентам с печеночной и почечной недостаточностью.

Особенности фармакокинетики фексофенадина, такие как отсутствие метаболизма и выведение преимущественно с желчью с помощью Pgp, позволяют использовать его в качестве маркера функциональной активности данного белка-транспортера. Таким образом, возможно оценивать интенсивность функционирования транспортера по изменению основных фармакокинетических параметров фексофенадина. При возрастании максимальной плазменной концентрации, площади под фармакокинетической кривой вещества и снижении значений параметров, характеризующих его экскрецию (клиренс и константа элиминация), можно судить об угнетении функциональной активности транспортера, и наоборот. Изолированное изменение параметров, описывающих, например, энтеральную абсорбцию фексофенадина может свидетельствовать о тканеспецифичном изменении активности Pgp в тонком кишечнике.

Исследование динамики функциональной активности Pgp *in vivo* на фоне введения тестируемого лекарственного средства проводится на 6–10 животных в соответствии с несколькими дизайнами: параллельным, повторным и перекрестным.

При параллельном дизайне первой серии животных соответствующим курсом (оптимальная продолжительность введения составляет 14 дней [16]) вводится тестируемое вещество, а второй – плацебо (дистиллированная вода или изотонический раствор), после чего обеим группам вводится маркерный субстрат Pgp, и анализируется его фармакокинетика. При этом последнюю дозу изучаемого вещества целесообразно вводить утром непосредственно перед введением маркерного субстрата для выявления прямого влияния на молекулу Pgp, которое реализуется только при одновременном присутствии обоих веществ в организме. Интервал между последним введением маркерного субстрата и тестируемого вещества выбирается с учетом периода полувыведения и скорости энтеральной абсорбции обоих препаратов, что исключает фармакокинетические взаимодействия между ними на этапе всасывания. Далее проводится межгрупповое сравнение фармакокинетических параметров маркерного субстрата.

Повторный дизайн подразумевает исследование на одной группе животных, у которых функциональная активность Pgp определяется по фармакокинетике маркерного субстрата транспортера до курсового введения тестируемого лекарственного вещества. Далее после нескольких дней перерыва (необходимых для восстановления животных) экспериментальные животные в течение необходимого курса получают тестируемый препарат и повторно однократно маркерный субстрат для анализа его фармакокинетики. При этом сравниваются фармакокинетические параметры до и после введения изучаемого вещества. Таким образом, данный дизайн предполагает применение меньшего количества животных и меньшую продолжительность исследования по сравнению с перекрестным дизайном, меньший разброс данных из-за использования одних и тех же животных.

Клинические исследования целесообразно проводить с использованием перекрестного дизайна: первой группе добровольцев вводится маркерный субстрат после курсового введения плацебо, а второй – после курсового введения

тестируемого препарата. После отмывочного периода (не менее 5 дней [311, 369]), необходимого для экскреции маркерного субстрата и для восстановления активности/количества Pgp, добровольцев меняют местами: первой курсом вводят тестируемое средство, второй – плацебо и – повторно маркерный субстрат для оценки его фармакокинетики. В дальнейшем проводится сравнение параметров фармакокинетики маркерного субстрата на фоне изучаемого препарата по отношению к группе, получающей плацебо.

На кроликах породы Шиншилла выявлены различия функциональной активности и относительного количества Pgp на клеточных мембранах у самцов и самок [114], и продемонстрирована целесообразность оценивать влияние лекарственных веществ на функционирование Pgp на самцах [16].

Экспериментальное исследование, аналогично клиническому, рационально проводить в условиях «ослепления» для минимизации влияния фактора субъективности на результаты анализа.

Для оценки фармакокинетики маркерного субстрата Pgp модельнонезависимым методом рассчитываются следующие фармакокинетические параметры:

C_{\max} – максимальная концентрация маркерного субстрата;

AUC_{0-t} – площадь под фармакокинетической кривой концентрация-время, где t – время последнего забора крови.

T_{\max} – время достижения максимальной концентрации;

Кроме того, такие параметры, как период полувыведения, константа элиминации и коэффициенты абсорбции (C_{\max}/AUC_{0-t} , $AUC_{0-t}/T_{1/2}$) позволяют выявить органоспецифичность изменения функциональной активности Pgp (экскреторные органы или тонкий кишечник).

Таким образом, для оценки влияния лекарственных препаратов на активность Pgp в экспериментах *in vivo* оптимальными условиями являются:

1) Тест-система – кролики-самцы породы Шиншилла;

- 2) Последовательный дизайн исследования для экспериментов на животных, перекрестный – для клинических исследований;
- 3) Маркерный субстрат – фексофенадин.

1.8. Фармакологическая характеристика нейропротекторных лекарственных средств как потенциальных субстратов гликопротеина-R и модуляторов его функционирования

1.8.1. Фармакологическая характеристика этилметилгидроксипиридина сукцината

Этилметилгидроксипиридина сукцинат (мексидол) синтезирован в начале 80-х годов XX века в ГУ НИИ Фармакологии РАМН (директор – академик РАМН А.В. Вальдман) Л.Д. Смирновым и В.И. Кузьминым. Затем был установлен спектр фармакологических эффектов и механизм действия мексидола (под руководством Т.А. Ворониной, С.Б. Середенина, А.В. Вальдман, Л.Д. Лукьяновой), и проведено изучение его безопасности (Б.И. Любимов) и фармакокинетики (А.К. Сариев, В.П. Жердев) [11]. Препарат зарегистрирован в России 31 декабря 1996 года после успешного проведения клинических испытаний (Г.Г. Незнамов, Е.С. Телешова, С.А. Сюняков, А.И. Федин, З.А. Суслина).

Этилметилгидроксипиридина сукцинат является оригинальным препаратом с многокомпонентным спектром фармакологических эффектов, таких как антиоксидантный, антигипоксанта́нный, мембранотропный, нейропротекторный и др., а также многогранным механизмом действия, охватывающим нейрональный и сосудистый уровни. Наиболее выраженный терапевтический эффект этилметилгидроксипиридина сукцинат оказывает при сосудистых и нейродегенеративных патологиях головного мозга, прежде всего острых и хронических нарушениях мозгового кровообращения. Имея универсальный механизм действия, препарат может применяться при всех нозологиях, сопровождающихся ишемией и гипоксией, но в первую очередь при ишемии наиболее энергозатратных органов и систем организма – нервной и сердечно-

сосудистой. Основные показания для применения этилметилгидроксипиридина сукцината: последствия острых нарушений мозгового кровообращения, в том числе после транзиторных ишемических атак, в фазе субкомпенсации в качестве профилактических курсов; легкая черепно-мозговая травма, последствия черепно-мозговых травм; синдром вегетативной дистонии; легкие когнитивные расстройства атеросклеротического генеза; тревожные расстройства при невротических и невротоподобных состояниях и пр. [18, 317].

Этилметилгидроксипиридина сукцинат включен в Стандарт скорой медицинской помощи при остром нарушении мозгового кровообращения (Цереброваскулярные болезни: коды по МКБ-10 I63 инфаркт мозга; I64 инсульт, не уточненный как кровоизлияние или инфаркт; G45 преходящие транзиторные ишемические атаки) (Приказ Министерства здравоохранения РФ от 5 июля 2016 г. № 466н «Об утверждении стандарта скорой медицинской помощи при остром нарушении мозгового кровообращения») и характеризуется как «Прочие препараты для лечения заболеваний нервной системы» по анатомо-терапевтическо-химической классификации. Препарат также входит в Перечень жизненно необходимых и важнейших лекарственных препаратов для медицинского применения на 2021 год.

Этилметилгидроксипиридина сукцинат также включен в «Клинические рекомендации по диагностике и тактике при инсульте в условиях общей практики, включая первичную и вторичную профилактику» (утверждены на IV Всероссийском съезде врачей общей практики (семейных врачей) Российской Федерации 15 ноября 2013 года, г. Казань).

Молекула этилметилгидроксипиридина сукцината включает два компонента. Первый – 2-этил-6-метил-3-гидроксипиридин, обладающий прямой антиоксидантной активностью за счет наличия в его молекуле фенольного гидроксила. Второй компонент – остаток янтарной кислоты с антигипоксическими свойствами, связанными с поддержанием в условиях гипоксии активности сукцинатоксидазного звена – ФАД-зависимого звена

дыхательной цепи, которое в условиях гипоксии угнетается позже НАД-зависимых оксидаз, что позволяет определенное время поддерживать внутриклеточную продукцию энергии при условии наличия в митохондриях субстрата окисления в данном звене – сукцината [11, 25].

В последующем у этилметилгидроксипиридина сукцината была обнаружена способность модулировать рецепторные комплексы мембран мозга, такие как бензодиазепиновый, ГАМК, ацетилхолиновый, усиливая их способность к связыванию со специфическими лигандами [66]. Также препарат обладает липидрегулирующими свойствами [24], способен модулировать активность мембраносвязанных ферментов: кальцийнезависимой фосфодиэстеразы, аденилатциклазы, альдоредуктазы, ацетилхолинэстеразы, достоверно подавляет как аскорбатзависимое — неферментативное, так и НАДФН₂-зависимое — ферментативное железоиндуцируемое ПОЛ в гомогенатах мозга, не влияет на активность 1-изофермента глутатион-SH-трансферазы и каталазы, однако значительно повышает активность Se-зависимой глутатионпероксидазы. Препарат не влияет на активность нейрональной, но умеренно подавляет активность индуцибельной изоформы NO-синтазы [93].

На кроликах породы Шиншилла продемонстрировано, что этилметилгидроксипиридина сукцинат при пероральном введении в дозе 100 мг/кг массы быстро абсорбируется из желудочно-кишечного тракта. Максимальная концентрация достигается в среднем через 30 мин, период полувыведения составляет 2,3 ч, а среднее время удерживания – 3,2 ч. Через 5 ч после перорального введения препарат в плазме крови экспериментальных животных не детектируется [98].

При изучении фармакокинетики этилметилгидроксипиридина сукцината у крыс вистар получены похожие результаты: при внутрижелудочном введении в дозе 200 мг/кг массы максимальная плазменная концентрация достигается в среднем через 1 ч, а через 5 ч его концентрация находится ниже предела детектирования [94].

При внутримышечном введении этилметилгидроксипиридина сукцината в дозе 400–500 мг его C_{\max} в плазме крови людей составляет 3,5–4,0 мкг/мл и достигается в среднем через 0,58 ч. Среднее время удерживания препарата составляет 0,7–1,3 ч. Через 4 ч этилметилгидроксипиридина сукцинат в плазме крови добровольцев не регистрируется. Оптимальный терапевтический эффект препарата достигается при его назначении не менее трех раз в сутки [97].

Этилметилгидроксипиридина сукцинат быстро распределяется в органы и ткани, проникает через ГЭБ. Пик его концентрации в коре больших полушарий и продолговатом мозге крыс отмечается через 1–1,5 ч после перорального введения препарата (200 мг/кг массы), в мозжечке и таламусе – через 30 мин, затем его уровень постепенно снижается к 4-му ч. Причем наблюдается прямая корреляция между содержанием вещества в отделах мозга и плазме крови животных. Максимальная концентрация этилметилгидроксипиридина сукцината определяется в коре больших полушарий головного мозга. Препарат также способен проникать внутрь митохондрий, где реализуется его антигипоксическое действие, с максимальной концентрацией через 1,5 ч после перорального введения препарата [93].

Среди метаболитов этилметилгидроксипиридина сукцината у крыс выделяют: фосфат-3-оксипиридина (в печени животных), 2-метил-6-метил-3-оксипиридин (образующийся в больших количествах, обладает психотропной активностью, близкой к исходному веществу), 6-метил-3-оксипиридин, глюкуроноконъюгат с 2-этил-6-метил-3-оксипиридином и глюкуроноконъюгат с фосфатом 2-этил-6-метил-3-оксипиридина. Этилметилгидроксипиридина сукцинат экскретируется преимущественно почками в виде глюкуроноконъюгата. Через 12 ч после его перорального приема у людей с мочой экскретируется $0,31 \pm 0,03\%$ неизмененного препарата и $49,6 \pm 4,65\%$ его глюкуроноконъюгата. Наиболее интенсивно экскреция осуществляется в течение первых 4 ч [65].

В связи с тем, что этилметилгидроксипиридина сукцинат метаболизируется в печени, а выводится почками, острые почечная и печеночная недостаточность

являются противопоказаниями для назначения препарата.

Показано индуцирующее влияние этилметилгидроксипиридина сукцината по отношению к цитохрому P450 изоформы 3A4 [3].

В научной литературе не обнаружено работ по изучению принадлежности этилметилгидроксипиридина сукцината к числу субстратов Pgp. Однако в связи с широким спектром заболеваний, при которых назначается данный препарат, и преимущественно пожилым контингентом пациентов высока вероятность одновременного назначения этилметилгидроксипиридина сукцината совместно с другими лекарственными средствами. При этом возможны межлекарственные взаимодействия на уровне Pgp, которые, в случае, если вещество является его субстратом, могут значительно изменить его фармакокинетику, что потребует корректировки его дозы. Кроме того, локализуясь в мембране эндотелиальных клеток ГЭБ, Pgp обеспечивает защиту головного мозга от ксенобиотиков (в том числе и от лекарственных препаратов) и ряда биобиотиков, препятствуя их проникновению через данный барьер. Если этилметилгидроксипиридина сукцинат является субстратом Pgp, то его проникновение в головной мозг будет зависеть от функционирования данного белка-транспортера.

Влияние этилметилгидроксипиридина сукцината на функционирование Pgp в настоящий момент не изучено. Наличие у препарата способности ингибировать функциональную активность данного белка-транспортера может вызвать повышение в плазме крови концентрации веществ-субстратов Pgp, и привести к развитию побочных эффектов фармакотерапии. В случае наличия у этилметилгидроксипиридина сукцината способности индуцировать функциональную активность Pgp возможно снижение в плазме крови концентрации веществ-субстратов Pgp, а, следовательно, – и снижение эффективности фармакотерапии. Химическая структура его молекулы позволяет предполагать принадлежность препарата к субстратам, а, значит, и к ингибиторам Pgp, так как в его молекуле имеется ароматическая структура и функциональные группы, способные образовывать водородные связи с молекулой транспортера.

Для повышения эффективности и безопасности комбинированной фармакотерапии с использованием этилметилгидроксипиридина сукцината актуальна оценка его влияния на функциональную активность Pgp и принадлежности к субстратам данного белка-транспортера.

1.8.2. Фармакологическая характеристика омберацетама

Омберацетам (этиловый эфир N-фенилацетил-L-пролилглицина, ноопепт) по химической структуре является дипептидом, имитирующим непептидный ноотроп с вероятным пептидэргическим механизмом действия – пирацетам [58].

Омберацетам, в связи с наличием в молекуле всего 2 аминокислот, обладает большей устойчивостью к действию ферментов и высокой биодоступностью, активен в 1000 раз меньших дозах, чем пирацетам. Препарат проникает в системный кровоток в неизменном виде, а в ткани головного мозга обнаруживается преимущественно его активный метаболит (циклопролилглицин). Фармакологический эффект омберацетама реализуется через холинэргические и глутаматэргические медиаторные системы мозга [13].

Омберацетам обладает выраженными ноотропными и нейропротективными свойствами в дозах на несколько порядков ниже, чем пирацетам, но характеризуется значительно более многообразной фармакодинамикой. Известно, что различные повреждающие воздействия вызывают комплекс метаболических сдвигов, включающих субстратный дефицит и снижение мембранного потенциала, приводящих к накоплению глутамата (за счет усиленного высвобождения и угнетения обратного захвата), возрастание внутриклеточного содержания ионов кальция и уровня свободных радикалов, активации кальций-зависимых протеаз, усилению липолиза и протеолиза и, как следствие, – повреждению липидных и протеиновых мембран. В ряде исследований продемонстрировано воздействие препарата на все перечисленные звенья патологического метаболического каскада [53, 55].

Показано наличие у омберцетама противовоспалительного, антикоагулянтного, фибринолитического, холино-сенсibiliзирующего эффектов, также принимающих участие в реализации нейропротективного действия препарата [55].

Установлено, что омберцетам (10 мкМ) увеличивает ДНК-связывающую активность HIF-1 и не влияет на активность CREB, NFAT, NF-κB, p53, STAT1, GAS, VDR и HSF1. В условиях стабилизации HIF-1, вызванной индуктором гипоксии CoCl₂, омберцетам обеспечивает дополнительное повышение ДНК-связывающей активности данного транскрипционного фактора [8].

Омберцетам имеет низкую токсичность и высокий терапевтический индекс — 10000 (у пирарцетама не превышает 40), метаболизируется до эндогенных веществ, что обосновывает возможность его длительного применения. Препарат лишен аллергенных, мутагенных свойств, репродуктивной токсичности. Из побочных эффектов зарегистрированы отдельные эпизоды повышения артериального давления у пациентов с уже имеющейся артериальной гипертензией II–III степени, которые купируются стандартными гипотензивными средствами. Противопоказаниями являются беременность и кормление грудью, возраст до 18 лет, тяжелая почечная и печеночная недостаточность, индивидуальная повышенная чувствительность к препарату [102].

В организме образуется 6 метаболитов омберцетама: 3 фенилсодержащих и 3 дезфенильных. Один из них — циклопролилглицин является циклическим дипептидом, аналогичным эндогенному метаболиту с антиамнестической активностью [53, 58].

На этапе доклинических исследований фармакокинетики омберцетама при пероральном введении крысам и кроликам показано, что значение абсолютной биодоступности достигает 7,1% и 9,33% соответственно, что значительно выше, чем для многих других пептидных веществ [26].

В эксперименте на кроликах продемонстрировано, что максимальная концентрация омберцетама при введении в дозе 50 мг/кг в форме таблеток без

нарушения целостности оболочки составляла $0,93 \pm 0,05$ мкг/мл и достигалась через $0,3 \pm 0,03$ ч. Причем вспомогательные вещества таблеток не оказывают существенного влияния на фармакокинетику омберацетама [4]. Вероятная причина более длительного нахождения вещества в плазме крови в отличие от природных нейропептидов, предположительно, обусловлена химической защитой молекулы омберацетама путем введения в его структуру фенилацетильного и эфирного заместителей в концевые положения пролилглицина [4]. Эта же модификация молекулы обеспечивает устойчивость препарата к протеолитическим ферментам желудочно-кишечного тракта [54].

В мозге концентрация омберацетама в 2 раза выше, чем в плазме крови, что подтверждает тропность вещества к тканям мозга и достаточно высокую специфическую биодоступность [54].

Продемонстрированы существенные различия в фармакокинетике омберацетама у людей, крыс и кроликов, проявляющиеся в ускоренном метаболизме как при внутривенном, так и при пероральном введении у крыс с выраженным эффектом «первого прохождения» через печень и появлением в плазме гидроксированного по фенильному кольцу метаболита при введении внутрь, в то время как установленные ранее при внутривенном введении N-феналацетил-L-пролин, фенилуксусная кислота и циклопролилглицин не регистрировались. Метаболизм омберацетама у кроликов протекает более длительно, причем в плазме крови не обнаружены метаболиты, выявленные у крыс. У людей его метаболизм наиболее длителен и в плазме отсутствуют его метаболиты (по мнению авторов в связи с низкой дозой – 20 мг и незначительными их концентрациями). Ученые связывают это с разной активностью протеолитических ферментов у различных видов животных [5].

В научной литературе исследований по оценке принадлежности омберацетама к числу субстратов, индукторов и ингибиторов P_{gr} обнаружено не было. Однако возможно предположить участие P_{gr} в его фармакокинетике или наличие у омберацетама возможности модулировать функционирование

транспортера, поскольку среди его модуляторов обнаружены вещества пептидной структуры [45], а одним из механизмов изменения функциональной активности P_{gr} является непосредственное взаимодействие с частями его молекулы с вероятным изменением его пространственной структуры [149, 356].

1.8.3. Фармакологическая характеристика фабомотизола

Фабомотизол (5-этокси-2-[2-(морфолино)-этилтио]бензимидазола дигидрохлорид, афобазол) – оригинальный отечественный селективный анксиолитик с нейропротекторной активностью, предотвращающий стресс-индуцированное падение связывания в бензодиазепиновом участке ГАМК_A-рецепторного комплекса, одобренный для клинического применения в РФ в 2005 году. Препарат не обладает характерными для бензодиазепинов гипноседативным, амнестическим и миорелаксантным эффектами, однако по анксиолитическим свойствам не уступает им [1, 319].

Препарат разработан в ФБГНУ «НИИ фармакологии имени В.В. Закусова» Российской академии наук (Москва), на базе концепции о генетической взаимосвязи анксиолитического эффекта и эмоционально-стрессовой реакции [60]. В России препарат прошел клинические исследования и зарегистрирован для практического применения, входит в состав реестров Всемирной организации здравоохранения, а также в анатомо-терапевтическо-химическую классификацию ВОЗ в группу анксиолитических средств под собственным кодом N05BX04 [77].

По физико-химическим свойствам фабомотизол представляет собой белый кристаллический порошок, хорошо растворимый в воде, умеренно – в спирте [69].

В связи с высокой скоростью элиминации и неспособностью к кумуляции фабомотизол рекомендовано применять через короткие промежутки времени и длительным курсом [6].

На 15 здоровых добровольцах по анализу фармакокинетики маркерного субстрата фермента – лидокаина продемонстрировано отсутствие влияния препарата фабомотизол на активность цитохрома P450 *CYP3A4* при 14-дневном

приеме в терапевтической дозе (30 мг в сутки) [17]. По фармакокинетике лозартана на крысах выявлено индуцирующее влияние 4-дневного введения фабомотизола (3 раза в сутки через 3 часа) на функциональную активность цитохрома P450 *CYP2C9* с максимальным эффектом при введении препарата в дозе 75 мг/кг, тогда как в терапевтической по анксиолитическому эффекту дозе 5 мг/кг такого влияния не продемонстрировано, причем возрастание дозы приводило к снижению индукции (по мнению авторов, за счет насыщения молекул фермента фабомотизолом) [19].

Выявлено ингибирующее влияние фабомотизола на фермент моноаминоксидазу при его добавлении в культуральную среду с митохондриями в концентрации 1 мМ [336].

Фабомотизол является стимулятором сигма-1 рецепторов эндоплазматического ретикулума, мелатониновых рецепторов MT1 и MT3 типа и регуляторного участка MAO-A. Основным механизмом действия фабомотизола связан с сигма-1 рецепторами, которые оказывают модулирующее влияние на все основные нейромедиаторные системы, такие как ГАМК-эргическая, серотонинергическая, норадренергическая, дофаминергическая, холинергическая системы, и NMDA-зависимые глутаматные эффекты, играющие значимую роль в патогенезе тревоги, депрессии, нарушений памяти и нейродегенеративных заболеваний [231].

Препарат повышает выживаемость нейронов при аппликации пероксида водорода и глутамата при его превентивном добавлении в среду инкубации. При добавлении фабомотизола после внесения глутамата положительного эффекта не выявлено. Нейропротекция наблюдается также при ишемии. Механизм нейропротекторного действия фабомотизола остается невыясненным. Предполагается, что препарат прямо или косвенно ингибирует фермент каспазу-3 в ответ на глутаматную эксайтотоксичность. Еще одной мишенью при нейропротекторном действии фабомотизола является сигма-1 рецептор [164].

Сигма рецептор локализуется на эндоплазматическом ретикулуме и включает 2 подтипа: сигма-1 и сигма-2. Сигма-1 рецептор является внутриклеточным модулятором систем сигнальной трансдукции, которые влияют на ретикулум-митохондриальный транспорт ионов кальция и регулируют биоэнергетику нейрональных клеток в стрессовых ситуациях, в частности при ишемии [189, 303]. Активация сигма-1 рецептора под действием фабомотизола устраняет перегрузку кальцием, вызванную ишемией и ацидозом путем ингибирования ионных каналов, в частности кислотно-чувствительного ионного канала 1a (ASIC1a), что показано на культурах нейрональных клеток, а также в экспериментах на крысах [164]. Однако применение необратимого антагониста сигма рецептора – метафита и селективного блокатора сигма-1 рецептора – BD 1063 не полностью устраняло положительное влияние фабомотизола на внутриклеточный уровень кальция, что свидетельствует о наличии некоторых других мишеней его действия [164]. Показана супрессия фабомотизолом ионотропных глутаматэргических рецепторов и потенциалзависимых кальциевых каналов.

Обнаружено, что фабомотизол также вызывает транслокацию сигма-1 рецептора из тела клетки в аксоны [164].

Нейропротекторная активность фабомотизола подтверждена *in vivo*. Так, его введение крысам с фототромбозом сосудов префронтальной коры мозга через 1 час после моделирования патологии, а также в течение 8 последующих дней сокращало зону некроза на 50%. На ряде моделей геморрагического инсульта фабомотизол также повышал выживаемость животных [164].

Фабомотизол не связывается напрямую с ГАМК_A-бензодиазепиновым рецепторным комплексом. Механизм его анксиолитического действия основан на способности предотвращать стресс-индуцированное снижение связывания в бензодиазепиновом участке ГАМК_A-рецептора и восстанавливать его чувствительность к действию ГАМК. Кроме анксиолитического действия фабомотизол обладает также антидепрессивным эффектом: устраняет тревогу, эмоциональное напряжение, улучшает настроение и сон, не вызывает

характерных для традиционных транквилизаторов – агонистов бензодиазепиновых рецепторов таких побочных эффектов как гипноседативный, миорелаксирующий и амнестический [60].

Фабомотизол обладает антирадикальным, вазопротекторным и кардиопротекторным эффектами, снижает концентрацию малонового диальдегида, церуллоплазмина, активность каталазы, повышает активность супероксиддисмутазы, уровень фермента eNOS и концентрацию суммарных метаболитов NO, увеличивает синтез стресс-белка HSP70 [21, 241].

В доклинических исследованиях продемонстрирована антиаритмическая и противоишемическая активность фабомотизола. Причем по широте терапевтического действия он превосходит такие антиаритмические средства, как новокаинамид, лидокаин, верапамил и этмозин [42, 67, 75].

Применение фабомотизола не сопровождается гипноседативными эффектами (проявляются лишь в дозах, превышающих ED₅₀ для анксиолитического действия более чем в 40 раз). У препарата не выявлены миорелаксантные свойства и отрицательное влияние на показатели внимания и памяти, к нему не формируется лекарственная зависимость и не развивается синдром отмены. Это позволяет отнести фабомотизол к безопасным безрецептурным средствам [1].

Фабомотизол абсорбируется в желудочно-кишечном тракте с высокой скоростью с временем достижения максимальной концентрации менее 1 ч, подвергается эффекту первого прохождения через печень – гидроксилируется по ароматическому фрагменту и окисляется по морфолиновому ядру.

Период полувыведения вещества составляет порядка 0,8 ч, однако продолжительность анксиолитического эффекта превышает данный интервал. Фабомотизол интенсивно транспортируется из плазмы крови в хорошо васкуляризируемые периферические ткани, экскретируется в основном в виде метаболитов и частично в неизменном виде с мочой и калом [71].

Благодаря комплексу исследований известно, что субстраты Pgp – это преимущественно липофильные ароматические соединения с молекулярной

массой в диапазоне 300–500 Д, включающие водородные связи в молекуле, аминогруппу или атом азота, протонированный при физиологических рН [28, 178]. Подобные свойства характерны для фабомотизола и его основного метаболита, что позволяет предполагать его принадлежность к числу субстратов данного белка-транспортера. Одним из вероятных механизмов ингибирования функциональной активности Pgr является непосредственный контакт вещества-ингибитора с местами связывания субстратов на трансмембранном домене транспортера и их вытеснение, что возможно при сходстве химической структуры ингибитора и субстратов [147].

Кроме того, на культурах клеток с множественной лекарственной устойчивостью, которая обусловлена гиперэкспрессией Pgr, показано, что ряд производных бензимидазола (к которым относится и фабомотизол) проникают в них в значительно меньшей степени, чем в нормальные клетки [281]. Это косвенно подтверждает их принадлежность к числу субстратов данного транспортера.

Таким образом, значительная роль белка-транспортера Pgr в ограничении проникновения лекарственных веществ через ГЭБ и его влияние на эффективность и безопасность фармакотерапии подтверждает потенциальную клиническую значимость изменения его функционирования в условиях кислородного дефицита и необходимость комплексной его оценки. Кроме того, направленное фармакологическое ингибирование Pgr в ГЭБ, возможно, является перспективным для повышения проникновения нейропротективных лекарственных средств-субстратов транспортера в ткани мозга.

Это может привести к повышению эффективности нейропротекторной фармакотерапии патологий, сопровождающихся глобальными и фокальными нарушениями мозгового кровообращения. Оценка принадлежности нейропротекторных препаратов к субстратам и модуляторам активности Pgr позволит проводить эффективную и безопасную комбинированную фармакотерапию с их участием, а также дополнительно обоснует необходимость

снижения функциональной активности Pgr для повышения результативности нейропротекторного лечения церебральной ишемии.

ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

2.1. Объект экспериментальных исследований

Работа выполнялась на половозрелых кроликах-самцах породы Шиншилла, массой 3500–4300 г и половозрелых крысах-самцах вистар массой 250–360 г. Крысы были получены из питомника «Столбовая» Московской области, кролики – из питомника ООО «Касимов-Миагро» Рязанской области и имели все необходимые свидетельства. В исследовании использовались животные без внешних признаков заболевания, прошедшие карантинный режим вивария Рязанского государственного медицинского университета в течение 14 дней. В ходе эксперимента животных содержали в условиях стандартной экспериментальной биологически чистой комнаты при температуре 19–22°C, 12-часовом искусственном освещении, на подстилках из опилок деревьев лиственных пород. Кормление осуществляли *ad libitum* в первой половине дня при свободном доступе к воде.

Экспериментальные исследования на первом этапе работы осуществляли в соответствии с правилами лабораторной практики, регламентируемыми Приложением к приказу Министерства здравоохранения и социального развития РФ от 23 августа 2010 года 708н, затем – на основании Приказа Министерства здравоохранения РФ от 1 апреля 2016 года №199н. «Об утверждении Правил надлежащей лабораторной практики». Исследование было одобрено комиссией по контролю за содержанием и использованием лабораторных животных ФГБОУ ВО РязГМУ Минздрава России, протокол №7 (от 03.04.2018). Все оперативные вмешательства на крысах проводились на фоне внутрибрюшинного введения препарата золетил 50 («Virbac», Франция) в дозе 10 мг/кг [341] в условиях операционной вивария РязГМУ. Эвтаназия крыс осуществлялась путем забора крови из брюшной аорты под глубоким наркозом (внутрибрюшинное введение золетила в дозе 30 мг/кг) [27]. Оперативные вмешательства у кроликов проводили

после наркотизации внутримышечным введением препаратов рометар (ксилазина гидрохлорид) в дозе 5,0 мг/кг массы и золетил-50 в дозе 10 мг/кг массы [125].

При валидации ВЭЖХ-методик количественного анализа лекарственных веществ в плазме крови 6 кроликов использовались для забора интактной плазмы крови. Также у крыс производился забор интактной коры головного мозга и плазмы крови для разработки ВЭЖХ-методик количественного анализа фексофенадина в данных тканях. Кроме того, наблюдалась летальность животных при апробации экспериментальных моделей патологии, что учтено в их общем количестве.

2.2. Дизайн экспериментальных исследований

Общая схема экспериментального исследования с перечислением основных серий и расчетом количества животных приведена на рисунках 1–3.



Рисунок 1 – Схема исследования влияния гипоксии различных видов на функционирование Pgr



Рисунок 2 – Схема оценки принадлежности лекарственных средств с нейропротекторной активностью к числу субстратов и модуляторов функционирования Pgp

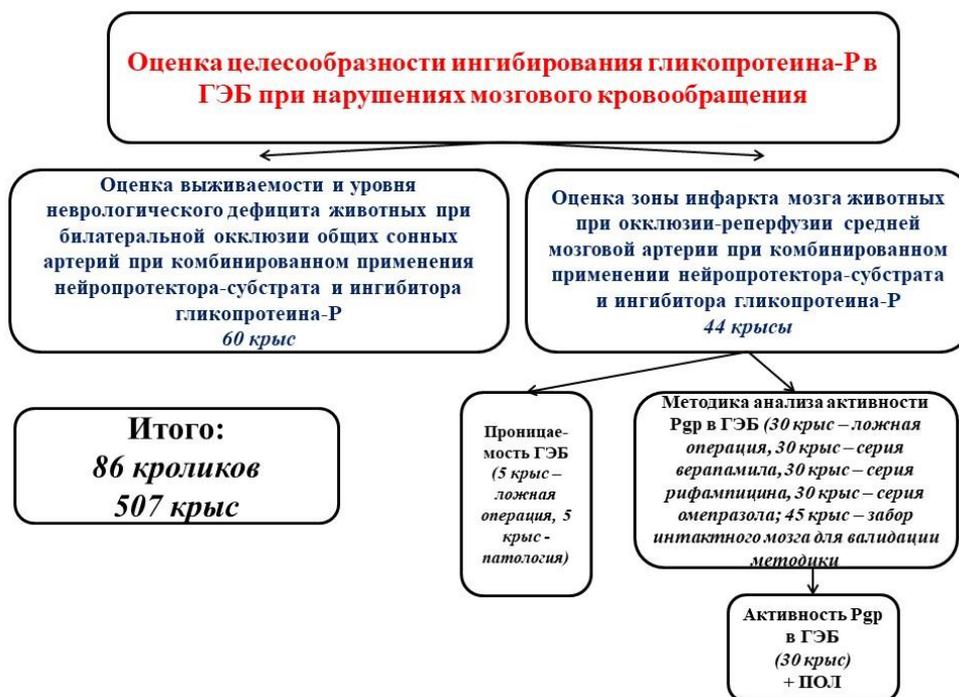


Рисунок 3 – Схема оценки перспективности ингибирования Pgp в ГЭБ для повышения эффективности фармакотерапии нарушений мозгового кровообращения нейропротектором-субстратом транспортера

2.3. Моделирование церебральной ишемии

2.3.1. Моделирование глобальной ишемии мозга

Глобальная церебральная ишемия моделировалась путем билатеральной окклюзии общих сонных артерий крыс. Проводилось вскрытие мягких тканей шеи животных, выделение общих сонных артерий и наложение на них лигатуры (нерассасывающийся шовный материал Surgipro II 4.0 (Covidien, Швейцария) с последующим ушиванием раны и обработкой операционного шва 5%-м спиртовым раствором йода.

2.3.2. Моделирование фокальной ишемии мозга

Фокальная церебральная ишемия воспроизводилось путем эндоваскулярной окклюзии или окклюзии-реперфузии средней мозговой артерии по методу Koizumi [238]. При апробировании экспериментальной методики были подобраны оптимальные параметры окклюдера (диаметр основной полипропиленовой нити – 0,15–0,199 мм, диаметр силиконового наконечника – 0,33 мм и его длина – 5 мм), глубина его введения в общую сонную артерию от места ее бифуркации (18–20 мм до ощущения незначительного сопротивления). Посмертная гистоморфология позволила подтвердить наличие окклюзии средней мозговой артерии, а также восстановление кровотока после удаления окклюдера. В процессе хирургических манипуляций и в течение 2 ч после них животные обогревались лампами для поддержания ректальной температуры на уровне 37°C.

При оценке влияния фокальной церебральной ишемии на абсолютное количество Pgr в коре головного мозга использовалась 30-, 60, 180- и 270-минутная окклюзия средней мозговой артерии без реперфузии, а также окклюзия аналогичной продолжительности с реперфузией в течение 12 и 24 ч. Окклюзия средней мозговой артерии осуществлялась путем введение окклюдера во внутреннюю сонную артерию через общую сонную одновременно с перманентной перевязкой общей и наружной сонных артерий. В дальнейший эксперимент по оценке целесообразности ингибирования Pgr в ГЭБ для повышения эффективности нейропротекторной терапии ишемических патологий

были выбраны модели, которые сопровождались возрастанием количества транспортера в коре мозга. Уровень транскрипционных факторов Nrf2 и HIF-1, а также интенсивность перекисного окисления липидов оценивались только при моделях, приводящих к росту количества транспортера в коре головного мозга крыс. Наличие реперфузии позволило оценить активность Pgp в ГЭБ по степени проникновения его маркерного субстрата – фексофенадина в головной мозг.

Таким образом, оценка эффективности комбинированного применения нейропротектора-субстрата Pgp и ингибитора функциональной активности транспортера для повышения эффективности нейропротекторной терапии фокального нарушения мозгового кровообращения проводилась на фоне 60-минутной окклюзии средней мозговой артерии с 24-часовой реперфузией, что объясняется повышенным уровнем транспортера в ткани коры мозга и формированием зоны церебрального некроза, площадь которой можно контролировать [361]. Последующее объяснение причин неэффективности фармакологического ингибирования транспортера в ГЭБ на фоне фокальной ишемии проводили с использованием 30-минутной окклюзии средней мозговой артерии с последующей 24-часовой реперфузией, т.к. в данном случае некроз мозговой ткани не наблюдается, что позволяет изучать функционирование Pgp.

Для подтверждения развития инфаркта головного мозга у крыс извлекался головной мозг и окрашивался трифенилтетразолия хлоридом по стандартной методике [78, 153]. При окклюзии общих сонных артерий приведенная выше методика неприменима, в связи с отсутствием зоны некроза головного мозга при использовании данной модели [181].

2.3.3. Анализ проницаемости гематоэнцефалического барьера

Для контроля целостности ГЭБ в серии 30-минутной окклюзии средней мозговой артерии с последующей суточной реперфузией (наименьшая длительность окклюзии-реперфузии, при которой наблюдалось возрастание количества Pgp в коре головного мозга) проводился анализ накопления в ткани мозга красителя синего Эванса (Evans blue, Sigma, США) (внутривенное введение

в момент реперфузии в хвостовую вену 2%-го изотонического раствора в объемной дозе 0,4 мл/100 г массы крысы). На фоне глубокой анестезии непосредственно перед декапитацией крысам выполняли транскардиальную перфузию 100 мл изотонического раствора для удаления интраваскулярного красителя. Затем животные выводились из эксперимента, у них извлекалась кора головного мозга (сторона, кровоснабжаемая окклюзированной артерией) и измельчалась ножницами. Затем краситель экстрагировался путем гомогенизации ткани в диметилформамиде (1 мл/100 г ткани) в течение 1 мин при 26000 об./мин и последующего настаивания при 60°C в течение суток. Далее суспензию центрифугировали 5 мин при 1750 g.

Концентрация синего Эванса определялась спектрофотометрически (спектрофотометр Bio-Rad, США) при 620 нм. Количественное определение проводилось методом внешнего стандарта в аналогичном растворителе [223, 343]. В качестве контроля использовались 5 крыс, которым воспроизводилась «ложная операция».

2.4. Фармакокинетические методы исследования

2.4.1. Методика анализа принадлежности лекарственных веществ к субстратам гликопротеина-P *in vivo*

Изучение принадлежности лекарственных препаратов с нейропротекторной активностью (этиметилгидроксипиридина сукцинат и фабомотизол) к числу субстратов Pgp выполнялось на 12 половозрелых кроликах-самцах породы Шиншилла, которые рандомизированно разделялись на две равные группы по 6 животных в каждой. Тестирование омберацетама на принадлежность к субстратам Pgp проводилось на 6 кроликах по причинам, описанным ниже. В данной и последующих экспериментальных сериях использовались только самцы животных в связи с продемонстрированными ранее гендерными различиями функционирования Pgp [114], а также выявленной трансляционностью исследования именно на самцах животных [105].

Исследование заключалось в анализе фармакокинетики тестируемого вещества в норме, т.е. у интактных животных, и после 14-дневного внутрижелудочного введения известных ингибитора и индуктора Pgp, в качестве которых были выбраны соответственно верапамил [149] (таблетки, покрытые оболочкой, Верапамил, 80 мг, «Валента Фармацевтика» ОАО, Россия) (20 мг/кг 3 раза в день в форме суспензии, приготовленной на воде очищенной [39]) и рифампицин [233] (капсулы Рифампицин, 150 мг, РУП «Белмедпрепараты», Республика Беларусь) (20 мг/кг массы 2 раза в день в форме суспензии на крахмальном клейстере [130]). Продолжительность курса введения модуляторов функциональной активности Pgp была выбрана исходя из наших предварительных исследований, показавших отсутствие значимого изменения активности транспортера при применении менее длительных курсов.

Тестируемое лекарственное средство вводилось однократно внутрижелудочно в соответствующей дозе с помощью металлического зонда, после чего у животных производился забор крови из ушной краевой вены в различные временные точки, необходимые для построения полноценной фармакокинетической кривой и расчета фармакокинетических параметров. В случае, если изменение фармакокинетики тестируемого средства при введении ингибитора Pgp свидетельствовало о накоплении вещества в организме, а при введении индуктора наблюдалась обратная динамика, можно сделать вывод о его принадлежности к субстратам транспортера.

Этиметилгидроксипиридина сукцинат (таблетки, покрытые пленочной оболочкой Мексидол, 125 мг, ООО НПК «Фармасофт», Россия) вводился внутрижелудочно кроликам в дозе 100 мг/кг массы [10], после чего кровь забиралась через 15 мин; 30 мин; 1; 1,5; 2; 3; 4 и 5 часов в объеме 2,5 мл; омберацетам (таблетки Ноопепт, 10 мг, ЗАО «ЛЕККО», Россия) – в дозе 50 мг/кг массы [4] внутрижелудочно, и кровь забиралась через 5, 10, 15, 30, 45, 60 и 90 мин в объеме 5 мл; фабомотизол (таблетки Афобазол, 10 мг, ОАО «Фармстандарт-Лексредства», Россия) – в дозе 3,8 мг/кг массы [19, 68, 80], после чего кровь

забиралась через 5, 10, 15, 20, 30, 60, 90, 120 и 240 мин в объеме 5 мл. Дозы веществ для анализа их фармакокинетики были выше таковых при анализе их влияния на активность Pgp, что связано с чувствительностью фармакокинетических методик. Общий объем крови, который забирался у животных, не превышал допустимых значений [48].

В работе по оценке принадлежности омберацетама к субстратам Pgp при его внутрижелудочном введении интактным животным в указанной выше дозе его максимальная концентрация в плазме крови составила менее 50 нг/мл. При этом, в случае принадлежности тестируемого средства к субстратам Pgp, введение рифампицина дополнительно снизило бы его плазменную концентрацию, что не позволило бы детектировать ее применяемым нами способом. В связи с этим ограничением в данной серии вводился только ингибитор белка-транспортера – верапамил, поэтому серия эксперимента выполнена на 6 кроликах.

Следует отметить, что последнее введение верапамила во всех экспериментальных сериях производилось утром – за 1 час до введения тестируемого препарата (время обусловлено T_{max} верапамила: 1–2 ч) для того, чтобы ингибитор Pgp находился в плазме крови и мог влиять на транспортер непосредственно, взаимодействуя с его молекулой, во время анализа его активности. С другой стороны, при этом не возникают фармакокинетическое взаимодействие препаратов на этапе всасывания в желудочно-кишечном тракте (верапамил за это время подвергнется энтеральной абсорбции) [149]. Утреннее введение рифампицина не требуется, в связи с тем, что данный препарат повышает функциональную активность Pgp опосредованно, путем интенсификации его экспрессии [244], т.е. увеличения синтеза транспортера.

Методики экстракции каждого целевого вещества из плазмы крови кроликов и применяемые экстрагенты подробно описаны в разделе 3.2.1.

Описанные выше и последующие исследования на кроликах выполнены «слепым методом», что минимизирует влияние заинтересованности исследователя на результаты эксперимента. «Ослепление» осуществлялось

следующим образом: курсовое введение анализируемого лекарственного средства производилось лаборантом, не знающим цели исследования и названия вводимого вещества; забор крови у лабораторных животных проводился в пробирки с маркировкой пробирок, которая не несла прямой информации о серии эксперимента.

Схема эксперимента представлена в таблице 1.

Таблица 1 – Схема методики анализа принадлежности лекарственных средств к субстратам Pgp

Сутки эксперимента																		
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19
Введение тестируемого препарата в соответствующей дозе и забор крови в указанные временные точки	Восстановление животных			14-дневное введение рифампицина или верапамила в дозах 20 мг/кг массы														Утреннее однократное введение верапамила в дозе 20 мг/кг массы, повторное введение тестируемого препарата и забор крови. В серии рифампицина его утреннее введение не требуется

2.4.2. Методика анализа влияния лекарственных веществ и окклюзии общей сонной артерии на функциональную активность гликопротеина-P на уровне целостного организма

Исследование принадлежности этилметилгидроксипиридина сукцината, омберацетама и фабомотизола к модуляторам функционирования Pgp

осуществлялось на 11 кроликах-самцах в каждой серии (12 – в серии фабомотизола) породы Шиншилла массой 3500–4300 г. На животных изучалась принадлежность тестируемого вещества к индукторам и ингибиторам функциональной активности транспортера (первая группа, n=6; n=7 – для фабомотизола), а также оценивалось его влияние на относительное количество Pgp (вторая группа, n=5). В качестве контроля относительного количества транспортера в органах использовалась отдельная серия из 5 кроликов.

Оценка влияния глобальной ишемии мозга кроликов на функциональную активность Pgp на уровне целостного организма проводилась в отдельной серии на 9 кроликах.

При анализе принадлежности препаратов к индукторам и ингибиторам Pgp проводили исследование фармакокинетики маркерного субстрата белка-транспортера – фексофенадина (таблетки, покрытые пленочной оболочкой Аллегра, Sanofi Aventis, США) (внутрижелудочное введение металлическим зондом в дозе 67,5 мг/кг массы в форме суспензии в 6 мл воды очищенной) до и после 14-дневного внутрижелудочного введения кроликам тестируемого средства в форме водной суспензии трижды в день в следующих дозах: этиметилгидроксипиридина сукцинат – 50 мг/кг [10] с учетом выявленной в эксперименте фармакологической активностью и пересчетом дозы с крыс на кроликов; омберацетам – 10 мг/кг массы с учетом антиоксидантной активности, выявленной в данной дозе [36, 38]; фабомотизол – 3,8 мг/кг массы (пересчет с дозы для крыс с учетом абсолютной биодоступности вещества и эффективности по анксиолитическому эффекту [19, 68, 80], а также учитывая то, что концентрация вещества в плазме крови кроликов аналогична таковой у человека).

Оценку функциональной активности Pgp на фоне односторонней окклюзии общей сонной артерии кроликов проводили за 5 суток до и на 7-е сутки после оперативного вмешательства. Для этого животным в день исследования однократно внутрижелудочно вводили фексофенадин в указанной выше дозе с последующим анализом его фармакокинетики.

Фексофенадин – это H_1 -гистаминолитик III поколения, который не метаболизируется в организме. Его фармакокинетика контролируется Pgr: транспортер препятствует его всасыванию в тонком кишечнике и проникновению в органы, ограниченные гистогематическими барьерами, а также выводит из организма преимущественно с желчью. Накопление фексофенадина в организме и замедление его экскреции после курсового введения тестируемого средства свидетельствует об ингибировании функциональной активности Pgr, и наоборот. Курсовое введение лекарственного средства необходимо использовать для выявления косвенного влияния на экспрессию транспортера (преимущественно за счет стимуляции транскрипционных факторов: NIF1, PXR и др.). Утреннее введение препарата за некоторое время до маркерного субстрата (временной интервал подбирается с учетом скорости всасывания обоих средств для исключения фармакокинетического взаимодействия в желудке и кишечнике: для этиметилгидроксипиридина сукцината – 40 мин; для омберацетама – 20 мин; для фабомотизола – 1 час) необходимо для обнаружения также прямого действия тестируемого лекарственного вещества на молекулу Pgr, которое возможно при одновременном присутствии веществ в плазме крови.

Следует также отметить, что в сериях оценки влияния лекарственных средств на функциональную активность Pgr применялся забор крови у животных на 5-й день отмены препаратов для выявления эффекта их последствие.

Животные второй группы внутрижелудочно получали изучаемые средства курсом в аналогичных дозах, после чего у них извлекались образцы органов (печень, 12-перстная кишка и лобная доля коры головного мозга) для иммуногистохимического исследования относительного количества Pgr. Указанные органы были выбраны из-за их участия в фармакокинетике фексофенадина.

Дизайн исследования отображен в таблице 2.

Таблица 2 – Схема исследования влияния лекарственных веществ на функционирование P_{gr}

Сутки эксперимента																						
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23
Введение фексофенадина в дозе 67,5 мг/кг массы и забор крови	Восстановление животных			Курсовое введение тестируемого лекарственного средства в соответствующей дозе														Утреннее однократное введение тестируемого средства и повторное введение фексофенадина в дозе 67,5 мг/кг массы и забор крови	«Отмывка» от фексофенадина			Введение фексофенадина в дозе 67,5 мг/кг массы и забор крови

2.4.3. Методики количественного анализа фексофенадина,

этилметилгидроксипиридина сукцината, омберацетама и фабомотизола

Оценка функциональной активности P_{gr} проводилась по анализу фармакокинетики маркерного субстрата белка-транспортера – фексофенадина на кроликах-самцах породы Шиншилла. Соответствующая ВЭЖХ методика количественного определения в плазме крови животных разработана и валидирована нами ранее [95]. Кроме того, при оценке функциональной активности P_{gr} в ГЭБ путем анализа степени проникновения фексофенадина в головной мозг были разработаны ВЭЖХ-методики количественного определения фексофенадина в плазме крови и гомогенате коры головного мозга крыс-самцов вистар.

Все перечисленные методики были валидированы: для них были проанализированы селективность, линейность, точность и прецизионность внутри и между циклами, эффект переноса и стабильность, пределы детектирования и количественного определения (см. главу 3). Интактная плазма крови и гомогенат мозга изъяты не менее, чем у 6 различных животных с последующим смешиванием.

В качестве вспомогательного оборудования при подготовке проб применяли деионизатор «Водолей» (Аквилон, Россия), центрифугу «Elmi CM 6M» (Elmi, Латвия), встряхиватель пробирок «Shaker S 3.01» (Elmi, Латвия), встряхиватель лабораторный медицинский «Vortex» (Elmi, Латвия), роторно-вакуумный испаритель «VV – Micro» (Heidolph, Германия).

Концентрации этиметилгидроксипиридина сукцината, омберацетама, фабомотизола и фексофенадина в плазме крови кроликов определяли в изократическом обращенно-фазном режиме методом ВЭЖХ с УФ детектированием по модифицированным литературным методикам. В работе использовали субстанции, предоставленные фирмой-производителем («Фармасофт» – этилметилгидроксипиридина сукцинат), разработчиками фармацевтических субстанций (ФГБНУ НИИ Фармакологии имени В.В. Закусова – омберацетам и фабомотизол) или приобретены самостоятельно («Sigma-Aldrich» – фексофенадин). Для экстракции веществ из плазмы крови и приготовления подвижной фазы применяли следующие реактивы: ацетонитрил «для ВЭЖХ» (Merck, Германия), кислота уксусная ледяная ХЧ (Экос-1, Россия), триэтиламин «для ВЭЖХ» (Lab-Skan, Польша), спирт метиловый «Для ВЭЖХ» (Merck, Германия), эфир диэтиловый, хлороформ, этилацетат ХЧ (Экос-1, Россия).

Для построения калибровочных графиков готовились 6 стандартных растворов анализируемого вещества с различной концентрацией в соответствующей матрице (плазма крови, гомогенат мозга). Причем в границы концентрационного диапазона входили все концентрации целевого вещества, которые были выявлены в ходе дальнейшего исследования. Нижняя концентрация соответствовала пределу количественного определения вещества. Данные растворы анализировались тоекратно. По полученным значениям строились три калибровочных графика зависимости концентрации целевого вещества от площади (или высоты) его пика с расчетом коэффициентов корреляции (r^2), которые должны соответствовать принятым нормам (не менее 0,99). Отклонения концентраций калибровочных образцов, рассчитанные по уравнению линейной

зависимости, от номинальных значений, приведены в соответствующих таблицах главы 3.

Под точностью (правильностью) аналитической методики подразумевалась близость полученных с помощью нее значений к номинальным концентрациям анализируемого вещества. Она выражалась в виде процента отклонения от номинальных значений. За прецизионность (воспроизводимость) аналитической методики принимали степень близости результатов между отдельными повторными измерениями, выражающуюся в виде относительного стандартного отклонения (коэффициента вариации).

Для анализа точности и прецизионности выполнен анализ образцов интактной матрицы с добавлением стандартных растворов целевого вещества до получения 4 концентраций: нижняя соответствовала пределу количественного определения, а верхняя – второй по порядку от максимальной.

Анализ выполняли в рамках трех циклов. В первом цикле оценивали прецизионность и точность внутри цикла, для этого анализировали по 5 образцов для каждой концентрации вещества. Во втором и третьем цикле оценивали прецизионность и точность между циклами. Указанные характеристики приведены в соответствующих таблицах в главе 3.

Для демонстрации селективности примененных методик (т.е. возможности достоверно анализировать пики вещества при отсутствии пиков соэкстрактивных веществ на той же минуте хроматограммы) в главе 3 приведены образцы двух хроматограмм: одна – интактной матрицы, а вторая – матрицы, содержащей целевое вещество (либо с добавленным стандартным раствором, либо взятой у животного после введения данного вещества). Также рассчитывался коэффициент разделения пиков целевого и ближайшего соэкстрактивного вещества как разность времен удерживания указанных пиков, разделенных на сумму их широт на половине высот [103].

В главе 3 представлен рисунок части хроматограммы, которая использовалась для вычисления пределов детектирования и количественного

определения целевого вещества. Данные показатели рассчитывались как концентрации аналита, дающие соответственно пики, превышающие по высоте 3-кратно и 10-кратно высоту пиков шума на расстоянии, 20-кратно большем ширины пика максимальной концентрации на половине его высоты [103]. Предварительно строилась калибровочная зависимость концентрации вещества от высоты пика.

Стабильность аналита в составе стандартных растворов и матрицы оценивалась при хранении, а также после пробоподготовки путем хроматографического исследования после трех циклов замораживания/размораживания. Каждый цикл замораживания длился 24 часа в морозильной камере при -80°C , размораживание проводилось при комнатной температуре не более двух часов. Анализ проводили троекратно.

2.4.4. Расчет фармакокинетических параметров тестируемых веществ в плазме крови кроликов

Фармакокинетические параметры фексофенадина, этиметилгидроксипиридина сукцината, омберацетама и фабомотизола в соответствующих сериях эксперимента рассчитывали модельно-независимым методом [49, 63]. Оценивали следующие показатели:

- C_{\max} – максимальная концентрация (нг/мл);
- T_{\max} – время достижения максимальной концентрации (ч; мин – для омберацетама и фабомотизола);
- $T_{1/2}$ – период полувыведения (ч; мин – для омберацетама и фабомотизола);
- 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);
- MRT – среднее время удержания препарата в системном кровотоке (ч; мин – для омберацетама и фабомотизола);

- C_{\max}/AUC_{0-t} – коэффициент абсорбции;
- K_{el} – константа элиминации (1/ч; 1/мин – для омберацетама и фабомотизола). Данный параметр рассчитывался по спадающей части фармакокинетической кривой.

2.5. Иммуногистохимические методы исследования

Вне зависимости от наличия или отсутствия модулирующего влияния этилметилгидроксипиридина сукцината, омберацетама и фабомотизола на функциональную активность Pgp методом иммуногистохимии было проведено исследование относительного количества белка-транспортера на мембранах клеток печени, 12-перстной кишки и коры головного мозга кроликов на фоне введения препаратов. Подобная необходимость продиктована возможностью разнонаправленного воздействия лекарственных веществ на эффлюксную активность и синтез транспортера [278].

Животных выводили из исследования, извлекали указанные органы, и часть их фиксировали в 10%-ном растворе нейтрального формалина. Гистологический материал обрабатывали по стандартной методике: обезвоживали в растворах спирта этилового возрастающей концентрации, просветляли ксилолом и помещали в парафин. Перед реакцией иммунного окрашивания производили демаскировку антигенов тканей посредством нагревания на водяной бане в 10 мМ цитратном буфере (pH 6,0), блокировали эндогенную пероксидазу 3%-м раствором H_2O_2 . Затем инкубировали срезы с первичными антителами к Pgp (ABCВ1 antibody-middle region, Aviva Systems Biology, США) в разведении 1:100 по стандартной методике. Для иммунного окрашивания использовали полимерную систему детекции с пероксидазной меткой (вторичные антитела к чужеродному белку крыс) («Ventana», США). Ядра клеток окрашивали гематоксилином.

Микропрепарат фотографировали с помощью цифровой камеры «ЛОМО ТС-500» (Россия) при увеличении в 400 раз. В каждом гистологическом препарате

оценивали 10 репрезентативных участков (10 фотографий). В дальнейшем изображения подвергали анализу с применением медицинской программы для анализа и обработки цифровых изображений ImageJ (США). С помощью плагина Colour Deconvolution, имеющего встроенную схему для анализа окраски «гематоксилин+диаминобензидин», изображение разделяли на синий и коричневый цвета. Интенсивность окраски «диаминобензидина» на фотографиях кишечника оценивали с использованием модуля «гистограмма» в диапазоне от 0 (черное) до 255 (белое), а затем переводили полученные значения в «+»: где 255 – «+», а 0 – «+++» [51, 266]. В печени и коре головного мозга определяли относительную площадь мембран, экспрессирующих Pgr, которую рассчитывали как площадь мембран, экспрессирующих Pgr (pix²), деленную на общую площадь поля зрения (pix²) [101].

Следует отметить, что в связи с межиндивидуальной вариабельностью экспрессии Pgr в серии анализа влияния фабомотизола на относительное количество транспортера 5 интактных кроликов использовались отдельно (т.к. исследование проводилось на другой партии животных).

2.6. Иммуноферментные методы исследования

При оценке абсолютного количества Pgr в коре головного мозга на фоне билатеральной окклюзии общих сонных артерий крыс, а также окклюзии и окклюзии-реперфузии средней мозговой артерии выполнялся метод гетерогенного иммуноферментного анализа (ГИФА). Исследование проведено с использованием готового диагностического набора ElisaKits BlueGene (КНР) в соответствии с инструкцией производителя. Пробоподготовка коры головного мозга заключалась в измельчении образца ткани ножницами и гомогенизации в фосфатном буфере (pH=7,2–7,4) в течение 1 мин при 24000 об./мин с последующей трехкратной заморозкой (-80°C) и размораживанием при комнатной температуре. Перед анализом пробы центрифугировали при 1750 g и 100 мкл супернатанта вносили в лунку 96-луночного планшета. Калибровка

осуществлялась с использованием стандартных растворов Pgr (концентрации 0, 25, 50, 100, 250 и 500 нг/мл), входящих в комплект набора.

Для выявления зависимости количества Pgr от интенсивности окислительного стресса кроме оценки уровня последнего с помощью биохимических методов (см. ниже) также с помощью гИФА было изучено абсолютное количество транскрипционных факторов Nrf2 и HIF-1 (непосредственно оценивался уровень кислородчувствительной субъединицы HIF-1 α) в гомогенате коры головного мозга крыс. Nrf2 является внутриклеточным сенсором активных форм кислорода и прооксидантов и активатором экспрессии различных генов, в том числе *MDR1*, кодирующего Pgr [216], а HIF-1 – это детектор тканевого дефицита кислорода [162]. Животные в сериях двусторонней окклюзии общих сонных артерий, а также окклюзии-реперфузии средней мозговой артерии выводились из эксперимента, у них извлекалась кора головного мозга, гомогенизировалась в фосфатном буфере (1:1 по массе) на холоде. Затем суспензия подвергалась трехкратному циклу заморозки-разморозки и центрифугировалась при 1750 g. В супернатанте транскрипционные факторы количественно анализировались методом гИФА с помощью наборов ElisaKits Cloud-Clone (КНР) (Nrf2) и ElisaKits BlueGene (КНР) (субъединица HIF-1 α). Калибровка осуществлялась с использованием стандартных растворов целевого вещества (концентрации 1; 2,5; 5,0; 10,0 и 25,5 нг/мл – Nrf2; 0,156; 0,312; 0,625; 1,25; 2,5; 5,0 и 10 нг/мл – HIF-1 α), входящих в комплект набора.

Абсолютное количество Pgr и транскрипционных факторов в ткани мозга соотносили с общим количеством белка, которое определяли по методу Бредфорд [144].

2.7. Биохимические методы исследования

Для оценки выраженности патологических изменений при окклюзии одной (кролики) или обеих (крысы) общих сонных артерий и окклюзии-реперфузии средней мозговой артерии у крыс проведено исследование свободнорадикального

статуса в гомогенате лобной доли коры головного мозга (крысы) или гемолизате (кролики). Измерение экстинкции выполняли на биохимическом анализаторе Humalaizer 2000 и спектрофотометре Shimadzu UV-150-02.

2.7.1. Подготовка биологического материала для оценки свободнорадикального статуса

Немедленно после забора кора головного мозга гомогенизировалась в фосфатном буфере с рН 7,4 (1:10) на холоде с использованием роторного высокоскоростного гомогенизатора DІAX 900 (насадка 6G) со скоростью 24000 об./мин в течение 1 мин. Гомогенат центрифугировали при 1750 g 10 минут на холоде. Часть полученного супернатанта, также как и гемолизата кроликов, замораживали, другую часть подвергали биохимическим исследованиям в день забора материала. Замороженные пробы до момента определения активности ферментов хранили при -80°C в течение не более трех недель.

2.7.2. Определение концентрации малонового диальдегида [73]

Для анализа использовался набор «ТБК-АГАТ» (ООО «АГАТ-МЕД», Россия).

Метод основан на способности ряда конечных продуктов ПОЛ в кислой среде реагировать с 2-тиобарбитуровой кислотой (ТБК) с образованием эквимольного количества окрашенного комплекса с максимумами поглощения при 535 нм и 570 нм [9, 14]. Определение концентрации малонового диальдегида характеризует интенсивность ПОЛ в анализируемой ткани.

В пробирки вносили реактивы по следующей схеме: 0,25 мл гемолизата или гомогената мозга, 3,0 мл 1,4%-й ортофосфорной кислоты, 1,0 мл раствора ТБК (150 мг – 31 мл дистиллированной воды). Затем помещали пробирки на 45 мин на водяную баню при 100°C , охлаждали в холодной воде 3–5 мин. После этого добавляли в реакционную смесь 4,0 мл н-бутанола. Интенсивно встряхивали пробирки до образования однородной белой суспензии с розовым оттенком, центрифугировали при 1750 g 10 минут, и в 3 мл органической фазы определяли оптическую плотность на спектрофотометре Shimadzu UV-150-02 при двух

длинах волн против холостой пробы (0,25 мл дистиллированной воды вместо гемолизата или гомогената мозга). Полученные результаты выражали в нмоль/мг белка.

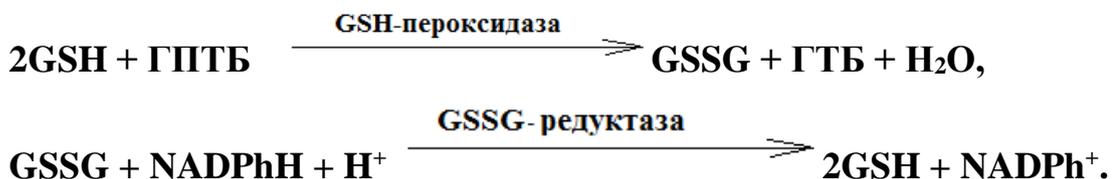
2.7.3. Определение уровня общих сульфгидрильных (тиоловых) групп

Метод основан на способности тиоловых групп восстанавливать растворенный в абсолютном этаноле дисульфид 5,5-дитиобис-2-нитробензоат (ДТНБ) (реагент Элмана) [179] с образованием эквивалентного количества окрашенных в желтый цвет анионов 2-нитро-5-тиобензоата (при pH=7,4 и температуре 22–25°C). Количество образующегося вещества определяется по приросту светопоглощения раствора на спектрофотометре Shimadzu UV-150-02 при длине волны 412 нм [179]. Для оценки уровня SH-групп к 100 мкл образцов прибавляли 100 мкл 0,2 М раствора этилендиаминтетраацетата в реактиве Элмана. Спектрофотометрировали реакцию смесь через 30 минут инкубации.

Расчет содержания общих сульфгидрильных групп в образцах проводили с учетом коэффициента молярной экстинкции $0,0136 \text{ см}^{-1} \cdot \text{нмоль}^{-1}$. Полученные результаты выражали в мкмоль/мг белка.

2.7.4. Определение активности глутатионпероксидазы (G-per) [285]

Кинетическое спектрофотометрическое определение активности фермента глутатионпероксидазы основано на регистрации снижения оптической плотности опытного образца при 340 нм (лампа D₃) и температуре 37°C в результате протекания следующих реакций:



НАДФН₂ является донором редуцирующих эквивалентов для реакции ферментативного восстановления глутатиона, который предварительно окисляется гидроперекисью трет-бутила – специфическим субстратом для действия Se-зависимой глутатионпероксидазы. Интенсивность окисления

НАДФН₂ тем выше, чем выше активность глутатионпероксидазы, и тем более выражено снижение интенсивности поглощения света [44, 285].

Реакционная смесь содержала 1,2 мл 0,05 М изотонического фосфатного буфера с рН 7,4, 0,1 мл 1 мМ этилендиаминтетраацетата, 0,1 мл 0,12 мМ НАДФН, 0,2 мл 1,85 мМ раствора восстановленного глутатиона, 0,5 ЕД глутатионредуктазы, 0,2 мл 0,2 мМ гидроперекиси трет-бутила и 0,1 мл тестируемого образца. Реакцию начинали добавлением гидроперекиси трет-бутила, затем реакционную смесь в течение 3 мин инкубировали при температуре 37°C. Оптическую плотность регистрировали на биохимическом анализаторе Humalaizer 2000 при длине волны 340 нм. За единицу активности принимали количество фермента, необходимое для окисления 1 мкМ восстановленного глутатиона в минуту в условиях определения. Результаты активности выражали в нмоль НАДФН₂/мин*мг белка.

2.8. Методика оценки эффективности комбинированного применения нейропротектора-субстрата и ингибитора гликопротеина-Р при глобальной и фокальной ишемии мозга

2.8.1. Оценка выживаемости и уровня неврологического дефицита животных при билатеральной окклюзии общих сонных артерий при комбинированном применении нейропротектора-субстрата и ингибитора гликопротеина-Р

Экспериментальное исследование выполнено на 60 половозрелых крысах-самцах вистар. Животные были разделены на 5 серий: 1-я (n=6) – ложнооперированные животные (наложение лигатур под общие сонные артерии без дальнейшего их затягивания), 2-я (n=14) – контроль патологии, крысы, которым моделировали глобальную ишемию головного мозга путем билатеральной перманентной окклюзии общих сонных артерий с введением физиологического раствора в хвостовую вену за 30 мин до моделируемой патологии; 3-я (n=13) – животные с аналогичной патологией, которым за 30 мин до окклюзии артерий внутривенно вводили блокатор кальциевых каналов L-типа

с нейропротективной активностью, принадлежащий к числу субстратов P_gr, нимодипин (раствор для инфузий Нимотоп, Bayer, Германия) в дозе 0,4 мг/кг [156, 344, 367]; 4-я (n=11) – крысы, которым аналогичным способом до моделируемой патологии внутривенно вводили ингибитор функциональной активности P_gr – омепразол (порошок для инфузий Омез, Dr. Reddy's, Индия) в дозе 17,6 мг/кг массы [124, 291, 360]; 5-я (n=16) – животные с ишемией, которым профилактически внутривенно вводили нимодипин в комбинации с инъекцией омепразола (последовательные инъекции в разных шприцах). Для стандартизации животных перед моделированием патологии у них производилось измерение уровня артериального давления непрямым методом на хвосте (tail-cuff method), ректальная температура во время операции поддерживалась на уровне 37±0,5°C путем согревания лампой, крысы восстанавливались после анестезии при температуре 37°C в течение 2 ч.

О динамике церебропротекторной активности нимодипина при его комбинировании с ингибитором активности P_gr судили по увеличению времени жизни, уменьшению процента гибели животных в группе и выраженности неврологического дефицита [354] через 6, 12, 24, 48 и 72 ч после дебюта патологии. В целях регистрации случаев ранней гибели животных в первые 3 часа постоперационного периода визуальное наблюдение за животными вели непрерывно.

Неврологический статус крыс после окклюзии общих сонных артерий оценивали по шкале stroke-index McGraw в модификации И.В. Ганнушкиной [15] (таблица 3).

Таблица 3 – Шкала оценки неврологического дефицита по McGraw в модификации И.В. Ганнушкиной

Симптомы	Index (баллы)
1. Вялость	0,5
2. Тремор	1,0
3. Односторонний полуптоз	1,0
4. Двусторонний полуптоз	1,5
5. Слабость конечности	1,5
6. Односторонний птоз	1,5

Продолжение таблицы 3	
7. Двусторонний птоз	1,5
8. Манежные движения	2,0
9. Парез 1–4 конечности	2,0–5,0
10. Паралич 1–4 конечности	3,0–6,0
11. Кома	7,0
12. Летальный исход	10,0

Оценивалось количество крыс в сериях с признаками неврологического дефицита легкой (0,5–2,5), средней (2,5–5,5) и тяжелой (5,5–10) степени. При наличии у животного нескольких признаков неврологического дефицита баллы суммировались.

2.8.2. Оценка зоны инфаркта мозга животных при окклюзии-реперфузии средней мозговой артерии при комбинированном применении нейропротектора-субстрата и ингибитора гликопротеина-Р

Исследование выполнено на 33 половозрелых крысах-самцах вистар. Животные были разделены на 4 серии по 7 крыс в каждой: 1-я серия – животные с 60-минутной ишемией средней мозговой артерии с последующей 24-часовой реперфузией без лечения; 2-я – крысы с ишемией-реперфузией с внутривенным введением в момент реперфузии субстрата Pgr – нимодипина в дозе 0,4 мг/кг массы [344]; 3-я серия – крысы с ишемией-реперфузией с внутривенным введением в момент реперфузии ингибитора Pgr – омепразола в дозе 17,6 мг/кг массы [291, 360]; 4-я – животные с ишемией-реперфузией с последующим введением нимодипина в комбинации с внутривенной инъекцией омепразола в момент реканализации (последовательное введение в разных шприцах). Дополнительно 5 животных подвергались «ложной» операции.

Ишемия-реперфузия головного мозга моделировалась путем 60-минутной эндоваскулярной окклюзии с последующей реканализацией средней мозговой артерии полипропиленовой нитью совместно с перманентной перевязкой общей и наружной сонных артерий. Данная модель патологии выбрана в связи с выявленным возрастанием абсолютного количества Pgr в коре головного мозга и с возможностью анализировать ее последствия и эффективность лечения путем оценки величины зоны церебрального некроза. Через 24 ч после реперфузии

животные выводились из эксперимента [232]. Крысы с летальным исходом в исследование не включались. Летальность составила 30%.

Для оценки зоны некроза головного мозга у животных всех серий извлекался головной мозг, промывался в изотоническом растворе натрия хлорида с последующей заморозкой и нарезкой во фронтальной плоскости на срезы толщиной 2 мм. Далее срезы помещали в чашку Петри, добавляли к ним фосфатный буфер с рН 7,4 объемом 10 мл, затем 2 мл 2%-го раствора трифенилтетразолия хлорида (ТТХ) и 2 мл 2%-го раствора сукцината натрия. ТТХ является индикатором лактатдегидрогеназной активности ткани: вещество восстанавливается ферментами живых клеток в формазан, имеющий ярко-красный цвет, что позволяет определить его количественное содержание спектрофотометрически или визуальное. Срезы головного мозга выдерживали в указанной выше смеси в термостате при 38°C в течение 1 ч, затем при комнатной температуре в 10%-м нейтральном формалине также в течение 1 ч. В дальнейшем фотографировали срезы цифровой фотокамерой Canon Power Shot G5. Оценивали процентное отношение суммы площадей ТТХ-негативных зон к сумме общей площади коры головного мозга [78, 351].

2.9. Анализ функциональной активности гликопротеина-P в гематоэнцефалическом барьере

Анализ функциональной активности Pgp в ГЭБ выполнен на 150 крысах-самцах вистар. Животные были рандомизированы на 4 равные группы (n=30). Первой (контрольной) группе в хвостовую вену вводили физиологический раствор (660 мкл/кг), а через 30 мин – фексофенадин в дозе 10 мг/кг [215].

Второй группе животных 14-дневным курсом через зонд в желудок вводили индуктор Pgp – рифампицин в дозе 20 мг/кг два раза в день [203, 289] (с учетом токсичности препарата для крыс и его индуцирующей способности по отношению к транспортеру), затем на 15-й день внутривенно вводили фексофенадин в дозе 10 мг/кг.

Третья группа животных за 30 мин до введения фексофенадина внутривенно получала ингибитор P_{gr} – верапамил в дозе 1,65 мг/кг (660 мкл раствора верапамила с концентрацией 2,5 мг/мл на кг массы животного, Биосинтез, Россия) [184].

Четвертой группе крыс за 30 мин до введения фексофенадина в хвостовую вену вводили еще один ингибитор P_{gr} – омепразол в дозе 17,6 мг/кг [360].

Животные выводились из эксперимента через 5, 10, 15, 30, 45 и 60 мин после введения фексофенадина. После этого для анализа у них забиралась кровь из брюшной аорты в гепаринизированные пробирки в объеме 4 мл и кора больших полушарий головного мозга. Кровь центрифугировалась при 1750 g 10 мин для получения плазмы. Образцы тканей и плазмы замораживались при -80°C до последующего анализа.

Лекарственная форма фексофенадина для парентерального введения отсутствует, в связи с чем производилась экстракция лекарственного вещества из таблеток (Аллегра, 180 мг, Sanofi-Aventis, США): 1 таблетка измельчалась и суспендировалась в 20 мл ацетонитрила категории «Для ВЭЖХ», 15 мин взбалтывалась на приборе Shaker с последующим центрифугированием 15 мин при 1750 g. Надосадочный слой упаривался на роторно-вакуумном испарителе и сухой остаток растворялся в 10 мл воды для инъекций, полученный раствор фильтровался через бактериальный фильтр с диаметром пор 0,22 мкм (Corning, США). Концентрацию полученного раствора определяли методом ВЭЖХ. Для исследования раствор вводился в хвостовую вену животных в объеме 2 мл/кг [48].

Экстракция фексофенадина из плазмы крови и из ткани коры больших полушарий головного мозга проводилась ацетонитрилом категории «Для ВЭЖХ» по методике, описанной в разделах 3.4.1 и 3.4.2.

Количественное определение фексофенадина в плазме крови крыс и в гомогенате головного мозга производили методом ВЭЖХ на хроматографической системе «Stayer» с УФ-спектрофотометрическим детектированием при длине

волны 220 нм. Подробное описание хроматографических методик и их валидационные характеристики приводятся в разделах 3.4.1 и 3.4.2.

Общее количество фексофенадина в системном кровотоке и в коре больших полушарий оценивали по площади под кривой концентрация фексофенадина (в крови или ткани коры больших полушарий головного мозга)-время ($AUC_{0-t(\text{плазма})}$ или $AUC_{0-t(\text{мозг})}$), которые рассчитывали методом трапеций [30]:

$$AUC_{0-t} = \frac{1}{2} \sum_{i=1}^{i=n} [(C_i + C_{i-1}) \times (t_i - t_{i-1})]$$

Для оценки функциональной активности Pgr в ГЭБ был рассчитан показатель $AUC_{0-t(\text{мозг})} / AUC_{0-t(\text{плазма})}$.

Для объяснения причин неэффективности ингибирования Pgr в ГЭБ при нейропротекторной терапии фокального нарушения мозгового кровообращения оценивалась функциональная активность транспортера локально в барьере на фоне данной патологии на 30 крысах по степени проникновения фексофенадина в ткань коры головного мозга. Фексофенадин вводился животным внутривенно в дозе 10 мг/кг в момент реперфузии, после чего анализировалась динамика его концентраций в плазме крови и гомогенате коры головного мозга (см. выше).

2.10. Математико-статистические методы исследования

Для статистической обработки данных применяли офисный пакет «Microsoft Office XP» и программу Statistica 7.0. Характер распределения данных оценивали по критерию Шапиро-Уилка.

Наличие достоверных различий между значениями T_{\max} фексофенадина оценивали с помощью критерия Вилкоксона, а полученные результаты представлены в виде медианы, нижнего и верхнего квартилей. Статистическую значимость различий между фармакокинетическими параметрами, за исключением T_{\max} , оценивали исходя из представления о лог-нормальном распределении данных. Сравнение изучаемых фармакокинетических параметров проводили с применением дисперсионного анализа повторных измерений

(ANOVA) после их логарифмирования. Статистически значимыми принимали различия при значении $p < 0,05$. Кроме того, рассчитывался двусторонний 90%-й доверительный интервал (ДИ) отношения геометрических средних значений фармакокинетических параметров на фоне введения тестируемого вещества или примененной патологии к параметрам интактных животных. Согласно рекомендациям U.S. Food and Drug Administration, Center for Drug Evaluation and Research клинически значимыми можно считать различия между фармакокинетическими параметрами, если двусторонний 90%-й доверительный интервал их отношения находится вне диапазона 0,8–1,25 (80–125%).

Результаты иммуногистохимического окрашивания срезов органов, а также данные о площади некроза коры головного мозга при его окраске ТТХ обрабатывали тестом ANOVA (при нормальном распределении данных) или Крускала-Уоллиса (при распределении данных, отличном от нормального). Межгрупповые различия определяли по критерию Ньюмена-Кейлса. Аналогично анализировались результаты при разработке методики анализа функциональной активности Pgp в ГЭБ, а также при оценке влияния ишемии-реперфузии средней мозговой артерии на активность транспортера в ГЭБ. Зависимость количества Pgp в ткани мозга от изучаемых биохимических показателей и уровня транскрипционных факторов, а также зависимость плазменной концентрации анализируемых веществ от площадей хроматографических пиков оценивали по коэффициенту корреляции Пирсона (r).

Выживаемость животных в послеоперационном периоде оценивали методом построения кривых выживаемости Каплана-Майера с последующим использованием F-теста Кокса.

Для расчета метрологических характеристик используемых хроматографических методик, а также их основных валидационных параметров (точность, прецизионность и пр.) использовалось руководство Guidance for Industry. Bioanalytical Method Validation (2018) [197].

ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

3.1. Функционирование гликопротеина-R на фоне нарушений мозгового кровообращения

3.1.1. Функционирование гликопротеина-R на фоне глобальной ишемии мозга

3.1.1.1. Абсолютное количество гликопротеина-R и показатели липопероксидации в коре головного мозга крыс на фоне билатеральной окклюзии общих сонных артерий

Методом иммуноферментного анализа установлено, что у ложнооперированных животных абсолютное количество Pgp в коре головного мозга составило 0,22 (0,16; 0,25) нг/мг белка. Билатеральная окклюзия общих сонных артерий приводила к заметному, однако недостоверному, снижению уровня Pgp, затем его количество начинало расти, и к 4-му часу ишемии было выше уровня ложнооперированных животных в 3,55 раза ($p=0,028$). Через 24 ч после окклюзии артерий количество транспортера было статистически значимо выше исходных значений в 3,27 раза ($p=0,047$). Через 72 ч после моделирования патологии его содержание в коре снижалось до значений, не отличающихся от контрольного уровня ($p>0,05$) (рисунок 4, таблица 4).

Двусторонняя окклюзия общих сонных артерий крыс также приводила к активации продукции свободных радикалов и развитию окислительного стресса (таблица 4). Концентрация ТБК-реактивных продуктов в коре головного мозга достоверно повышалась через 2 и 4 часа после экспериментального воздействия в 2,78 ($p=0,007$) и в 1,84 раза ($p=0,042$) соответственно, затем плавно снижалась до исходных значений.



Рисунок 4 – Динамика уровня Pgr в коре головного мозга крыс на фоне билатеральной окклюзии общих сонных артерий (* – достоверные различия по сравнению с показателями ложнооперированных животных ($p < 0,05$); данные представлены в виде медианы).

Уровень SH-групп по сравнению с контрольными значениями имел тенденцию к снижению через 30 минут после окклюзии в 1,97 раза ($p = 0,088$), в остальные сроки показатель от контрольных значений не отличался. При этом активность G-pgr снижалась через 30 мин на 21,5% ($p < 0,05$) и через 4 часа – на 24,9% ($p < 0,05$) по сравнению с исходными значениями.

Таблица 4 – Количество Pgr и выраженность окислительного стресса в коре больших полушарий при билатеральной окклюзии общих сонных артерий

Изучаемый показатель	Серии эксперимента					
	Ложная операция, (n=5)	Ишемия				
		30 мин (n=5)	2 ч (n=5)	4 ч (n=5)	24 ч (n=5)	72 ч (n=5)
Количество Pgr, нг/мг белка	0,22 (0,16; 0,25)	0,14 (0,064; 0,15)	0,38 (0,21; 0,42)	0,78 (0,40; 0,82)*	0,72 (0,62; 2,08)*	0,22 (0,11; 0,22)
ТБК-реактивные продукты, нмоль/мг белка	24,69 (11,21; 33,12)	31,36 (29,41; 40,17)*	68,61 (59,12; 82,54)*	45,46 (24,17; 79,72)*	47,22 (18,48; 69,09)	34,31 (31,10; 38,71)
SH-группы, мкмоль/мг белка	48,92 (41,41; 64,01)	24,77 (20,04; 43,31)	55,55 (44,96; 72,67)	42,11 (40,07; 53,31)	31,93 (17,28; 68,08)	40,37 (30,38; 41,49)

Продолжение таблицы 4						
Активность G-per, нмоль НАДФН/мг белка*мин	20,48 (18,6; 22,76)	16,1 (12,7; 19,3)*	20,9 (19,2; 27,4)	15,4 (14,3; 18,0)*	17,04 (16,83; 17,14)	20,71 (19,77; 20,98)

Примечание: * – достоверные различия по сравнению с показателями ложнооперированных животных ($p < 0,05$). Данные представлены в виде среднего арифметического \pm стандартное отклонение при нормальном распределении данных, или в виде медианы, нижнего и верхнего квартилей – при распределении данных, отличном от нормального. Здесь и далее в таблицах показатели, достоверно отличающиеся от контроля, выделены цветом.

Следует отметить, что между уровнем Pgr и содержанием ТБК-реактивных продуктов в коре головного мозга крыс при билатеральной окклюзии общих сонных артерий была выявлена прямая корреляционная зависимость (уровень тенденции, $p = 0,066$) (рисунок 5).

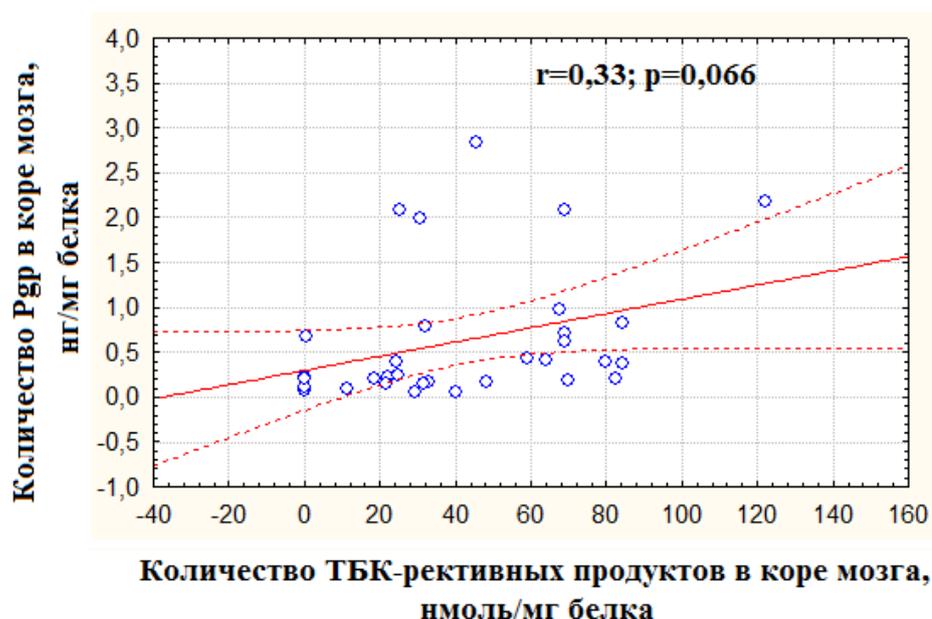


Рисунок 5 – Корреляционная зависимость между уровнем Pgr и ТБК-реактивных продуктов в коре головного мозга крыс на фоне билатеральной окклюзии общих сонных артерий

Таким образом, гипоперфузия головного мозга крыс, вызванная двусторонней окклюзией общих сонных артерий, приводит к интенсификации синтеза Pgr в коре головного мозга крыс. При этом выявленные изменения коррелируют с уровнем липопероксидации.

Полученные результаты опубликованы в статье с соавторами:

Черных, И.В. Экспрессия гликопротеина-Р в гематоэнцефалическом барьере при двухсторонней окклюзии общих сонных артерий [Текст] / **И.В. Черных, Е.Н. Якушева, А.В. Щулькин, И.Ю. Виноградов, Д.С. Титов** // *Научные ведомости Белгородского государственного университета.* – 2015. – Т.29, №4(201). – С.91–95.

3.1.1.2. Количество транскрипционных факторов Nrf2 и HIF-1 в коре головного мозга крыс на фоне билатеральной окклюзии общих сонных артерий

ГИФА показал, что у ложнооперированных крыс содержание транскрипционного фактора Nrf2 в коре головного мозга составило 0,021 (0,013; 0,031) нг/мг белка. Моделирование билатеральной окклюзии общих сонных артерий приводило к увеличению количества Nrf2 уже через 2 ч в 3,83 раза ($p=0,0472$), к 4-му часу ишемии его уровень возрастал в 4,05 раза ($p=0,047$). На более поздних сроках ишемии содержание данного фактора снижалось, однако оставалось выше контрольных значений в 1,29 раза на уровне тенденции ($p=0,076$) через сутки. Через 3 суток уровень Nrf2 достигал исходного показателя (рисунок 6, таблица 5).

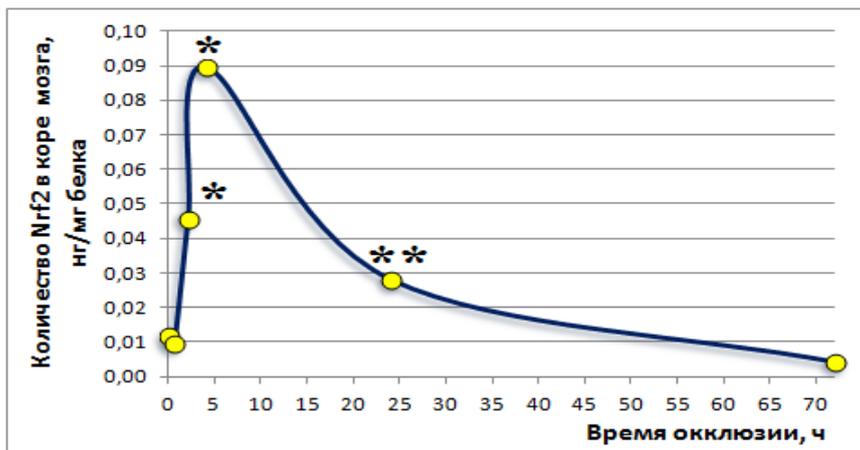


Рисунок 6 – Динамика уровня Nrf2 в коре головного мозга крыс при билатеральной окклюзии общих сонных артерий (* – достоверные различия по сравнению с показателями ложнооперированных животных ($p<0,05$); ** – различия по сравнению с показателями ложнооперированных животных на уровне тенденции ($0,05<p<0,1$))

Показано, что у ложнооперированных крыс уровень кислородчувствительной субъединицы транскрипционного фактора HIF-1 – HIF-1 α в коре головного мозга составлял лишь 0,001 (0,000; 0,0105) нг/мг белка. Двусторонняя окклюзия общих сонных артерий приводила к увеличению количества HIF-1 α на уровне тенденции в 32,12 раза ($p=0,083$) через 24 ч после моделирования патологии, и в 17,21 раза через 72 часа после воздействия ($p=0,0196$). Несмотря на заметное возрастание количества фактора в остальные временные точки, различия с показателями ложнооперированных животных были статистически не значимы ($p>0,05$) (рисунок 7, таблица 5), возможно, из-за межиндивидуальных различий в его количестве.

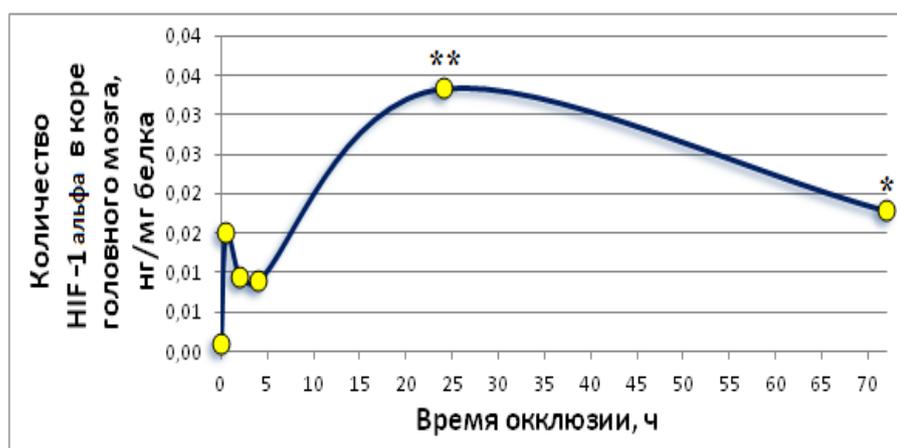


Рисунок 7 – Динамика уровня субъединицы HIF-1 α в коре головного мозга крыс при билатеральной окклюзии общих сонных артерий (* – достоверные различия по сравнению с показателями ложнооперированных животных ($p<0,05$); ** – различия по сравнению с показателями ложнооперированных животных на уровне тенденции ($0,05<p<0,1$))

Таблица 5 – Количество транскрипционных факторов Nrf2 и субъединицы HIF-1 α транскрипционного фактора HIF-1 в коре головного мозга крыс при билатеральной окклюзии общих сонных артерий

Изучаемый показатель	Серии эксперимента					
	Ложная операция, n=5	Ишемия				
		30 мин, n=5	2 ч, n=5	4 ч, n=5	24 ч, n=5	72 ч, n=5
Количество Nrf2, нг/мг белка	0,021 (0,013; 0,031)	0,011 (0,0052; 0,014)	0,038* (0,028; 0,044)	0,085* (0,015; 0,122)	0,027** (0,023; 0,031)	0,003 (0,0021; 0,0062)

Продолжение таблицы 5						
Количество HIF-1 α , нг/мг белка	0,00104 (0,000; 0,0105)	0,0151 (0,0118; 0,0286)	0,0095 (0,0052; 0,0225)	0,00896 (0,000; 0,0363)	0,0334** (0,0115; 0,0455)	0,0179* (0,0133; 0,0482)

Примечания: * – достоверные различия по сравнению с показателями ложнооперированных животных ($p < 0,05$); ** – различия по сравнению с показателями ложнооперированных животных на уровне тенденции ($0,05 < p < 0,1$)

Следует отметить, что между уровнем Pgr и количеством транскрипционного фактора Nrf2 в коре головного мозга крыс была выявлена прямая корреляционная зависимость (рисунок 8). Корреляционная связь с HIF-1 не наблюдалась.

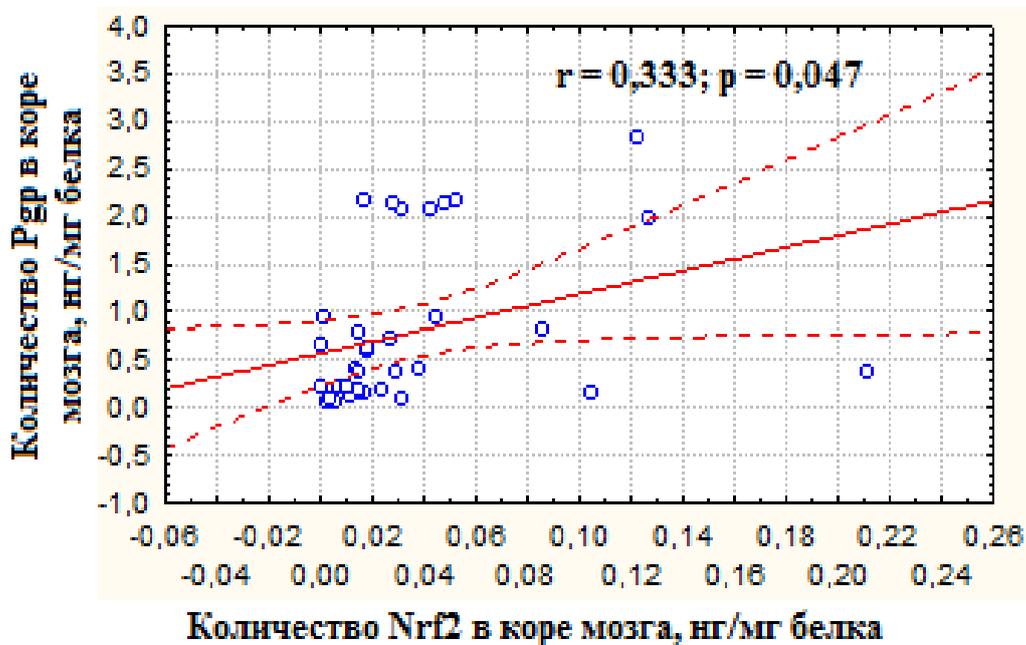


Рисунок 8. Корреляционная зависимость между уровнем Pgr и количеством транскрипционного фактора Nrf2 в коре головного мозга крыс

Таким образом, на фоне билатеральной окклюзии общих сонных артерий функционирование Pgr регулируется транскрипционными факторами Nrf2 и HIF-1, причем на ранних этапах ишемии Nrf2 играет преобладающую роль, а на более поздних сроках активируется кислородчувствительный фактор.

3.1.2. Функционирование гликопротеина-R на фоне фокальной ишемии мозга

3.1.2.1. Абсолютное количество гликопротеина-R и показатели липопероксидации в коре головного мозга крыс на фоне окклюзии и окклюзии-реперфузии средней мозговой артерии

Иммуноферментная оценка количества Pgr в коре головного мозга крыс на фоне 30-, 60- и 180-минутной окклюзии средней мозговой артерии без реперфузии показала отсутствие статистически значимых различий по сравнению с ложноперирированными крысами ($p>0,05$). Увеличение длительности окклюзии до 270 мин вызывало снижение количества Pgr в коре головного мозга на 35,7% ($p=0,003$) по сравнению с контролем.

12-часовая реперфузия не приводила к достоверному изменению количества Pgr в коре головного мозга животных ($p>0,05$), за исключением 4,5-часовой окклюзии, при которой уровень транспортера был ниже контроля на 40,1% (уровень тенденции: $p=0,088$).

30-минутная окклюзия-реперфузия средней мозговой артерии (образцы мозга забирали через 24 после реперфузии) показала, что уровень транспортера возрастал в 9,26 раза по сравнению с ложноперирированными животными ($p=0,011$), которые служили контролем.

Уровень Pgr на фоне 60-минутной окклюзии средней мозговой артерии с реперфузией в течение 24 ч возрастал на 74,5% ($p=0,018$) по сравнению с контролем.

180- и 270-минутная окклюзия средней мозговой артерии с 24-часовой реперфузией вызывала снижение количества Pgr в коре мозга на 41,1% ($p=0,0002$) и 43,7% ($p=0,021$) по сравнению с контрольными значениями соответственно.

Влияние примененных моделей на количество Pgr в коре головного мозга крыс представлено на рисунке 9.

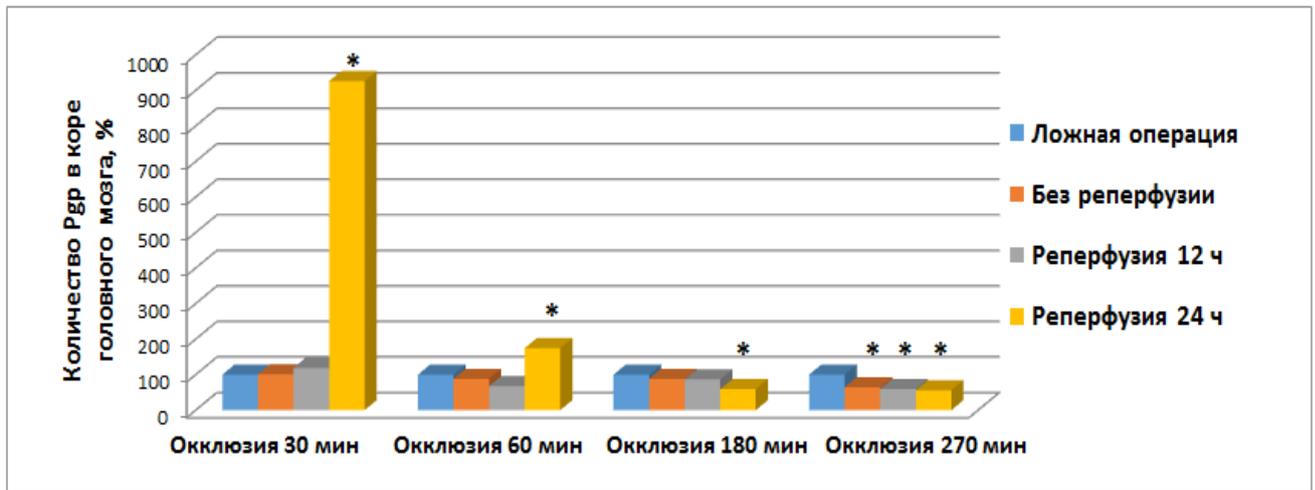


Рисунок 9. Количество Pgr в коре головного мозга крыс на фоне фокальной церебральной ишемии различного вида (* – достоверные различия по сравнению с ложнооперированными животными)

Измерение интенсивности ПОЛ проводилось только на фоне патологий, при которых происходило возрастание уровня Pgr в мозге – на фоне 30- и 60-минутной окклюзии средней мозговой артерии и суточной реперфузии. Так, 30-минутная окклюзия-реперфузия приводила к увеличению концентрации ТБК-реактивных продуктов в гомогенате коры головного мозга в 1,70 раза ($p=0,042$), при часовой окклюзии показатель увеличивался в 3,17 раза ($p=0,009$).

Уровень SH-групп по сравнению с контрольными значениями снижался в 1,91 раза ($p=0,011$) при 30-минутной окклюзии-реперфузии и в 2,55 раза ($p=0,023$) при 60-минутной окклюзии-реперфузии. Активность G-рег достоверно увеличивалась в 1,58 ($p=0,044$) при 30-минутной окклюзии, а при 60-минутной от контроля не отличалась ($p>0,05$) (таблица 6).

Таблица 6 – Количество Pgr и выраженность окислительного стресса в коре головного мозга при окклюзии-реперфузии средней мозговой артерии

Исследуемый показатель	Ложная операция, n=5	30-мин окклюзия-24-ч реперфузия средней мозговой артерии, n=5	60-мин окклюзия-24-ч реперфузия средней мозговой артерии, n=5
Количество Pgr, нг/мг белка	0,23±0,12	2,13±0,07*	0,37±0,2*

Продолжение таблицы 6			
ТБК-реактивные продукты, нмоль/мг белка	24,69 (11,21; 33,12)	42,09 (31,89; 90,41)*	95,11 (78,36; 145,84)*
SH-группы, мкмоль/мг белка	48,92 (41,41; 64,01)	25,66 (18,74; 32,91)*	14,13 (9,82; 23,60)*
Активность G-рег, НАДФН/мг белка*мин	20,16±5,09	31,89±11,02*	24,72±9,09

Примечание: * – достоверные различия по сравнению с показателями ложнооперированных животных ($p < 0,05$). Данные представлены в виде среднего арифметического \pm стандартное отклонение при нормальном распределении данных, или в виде медианы, нижнего и верхнего квартилей – при распределении данных, отличном от нормального.

Таким образом, только 30- и 60-минутная окклюзия средней мозговой артерии с 24-часовой реперфузией приводит к возрастанию количества Pgr в коре головного мозга. Более продолжительная окклюзия вызывает снижение уровня транспортера, что связано, вероятно, с повреждением клеточных мембран.

3.1.2.2. Количество транскрипционных факторов Nrf2 и HIF-1 в коре головного мозга крыс на фоне окклюзии-реперфузии средней мозговой артерии

Уровень транскрипционных факторов Nrf2 и HIF-1 в коре головного мозга крыс оценивалось только на фоне ишемических патологий, сопровождающихся возрастанием абсолютного количества Pgr.

Методом гИФА было выявлено, что уровень транскрипционного фактора Nrf2 в коре головного мозга на фоне 30-минутной окклюзии с последующей 24-часовой реперфузией средней мозговой артерии крыс достоверно возрастал в 1,81 раза (с 0,021 нг/мг белка (0,013; 0,031) до 0,038 (0,017; 0,052) нг/мг белка) ($p=0,029$) по сравнению со значением ложнооперированных животных. Часовая окклюзия с суточной реперфузией не приводила к достоверному росту уровня Nrf2 ($p=0,403$).

Количество кислородчувствительной субъединицы NIF-1 α транскрипционного фактора NIF-1 достоверно не различалось между сериями ложной операции (0,00104 нг/мг белка (0,000; 0,0105)) и серией окклюзии-реперфузии средней мозговой артерии (0,0198 нг/мг белка (0,000; 0,0587) ($p=0,346$) – 30 минутная окклюзия; 0,0033 нг/мг белка (0,0011; 0,005) ($p=0,946$) – 60-минутная окклюзия) вне зависимости от продолжительности окклюзии. Вероятно, это связано со значительной индивидуальной вариабельностью значений у животных, а также недостаточной степенью кислородного дефицита через сутки после восстановления кровотока.

Корреляционная зависимость между уровнем Pgr в коре головного мозга и количеством транскрипционных факторов Nrf2 и NIF-1, а также интенсивностью липопероксидации анализировалась при тех сроках окклюзии-реперфузии средней мозговой артерии, при которых наблюдалось возрастание количества белка-транспортера. Была обнаружена прямая корреляционная зависимость между количеством Pgr и уровнем МДА и транскрипционного фактора Nrf2 в коре мозга на уровне тенденции (рисунки 10, 11).

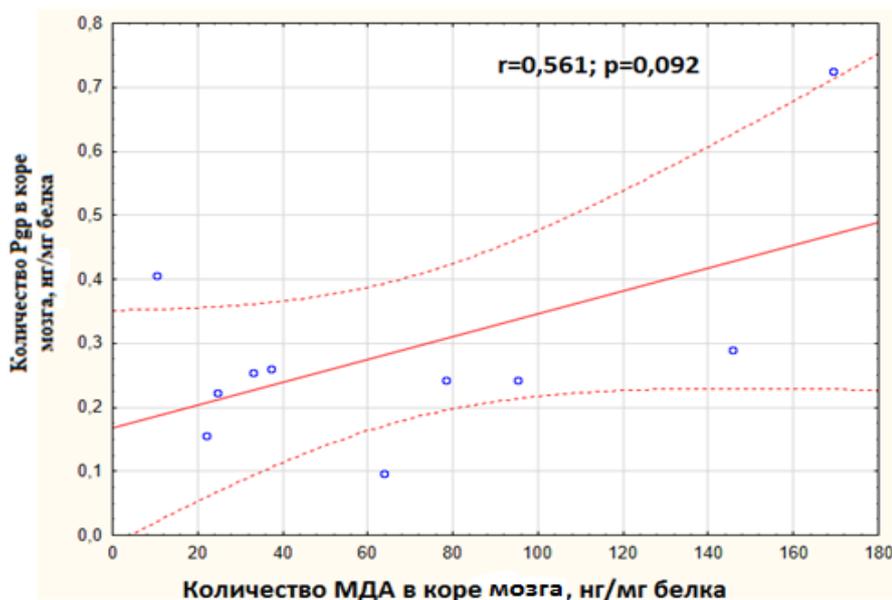


Рисунок 10. Корреляционная зависимость между уровнем Pgr и количеством МДА в коре головного мозга крыс

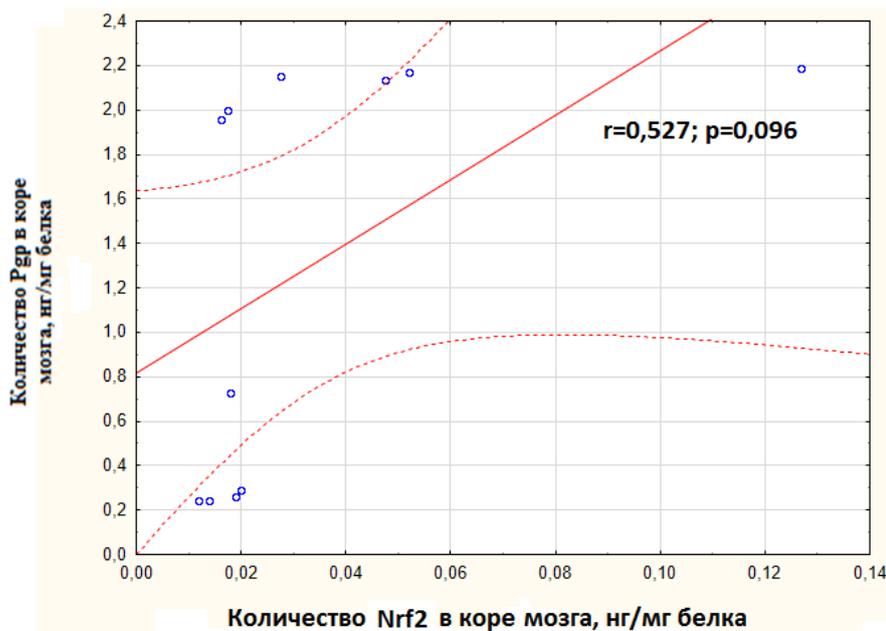


Рисунок 11. Корреляционная зависимость между уровнем Pgr и количеством транскрипционного фактора Nrf2 в коре головного мозга крыс

Таким образом, в регуляции синтеза Pgr в коре головного мозга на фоне окклюзии-реперфузии средней мозговой артерии важная роль принадлежит сенсору окислительного стресса – транскрипционному фактору Nrf2.

3.2. Оценка принадлежности нейропротекторных лекарственных средств к субстратам и модуляторам активности гликопротеина-P

3.2.1. ВЭЖХ-методики количественного определения нейропротекторов в плазме крови кроликов

3.2.1.1. ВЭЖХ-методика количественного определения этилметилгидроксипиридина сукцината в плазме крови кроликов

Анализ проводили на высокоэффективном жидкостном хроматографе «Beckman Coulter» (США), оснащенный автосамплером «Rheodyne» (США), УФ спектрофотометрическим детектором и хроматографической колонкой Суано 4,6x250 мм (зернение 5 мкм) (Beckman Coulter, США), при длине волны 296 нм в изократическом режиме. Температура разделения – 28°C. Скорость потока – 0,5 мл/мин.

Подвижная фаза состояла из ацетонитрила и воды деионизированной в объемном отношении 20:80 с добавлением триэтиламина до объемной доли 0,05% и кислоты ортофосфорной до рН 4,5. Время удерживания этилметилгидроксипиридина сукцината в данных условиях составило $18,02 \pm 1,23$ мин.

Для экстракции этилметилгидроксипиридина сукцината к 1 мл плазмы крови кроликов добавляли 3 мл этилацетата, встряхивали на приборе Vortex и помещали на встряхиватель для пробирок на 10 мин, затем центрифугировали при 1750 g в течение 10 мин. Органический слой упаривали на роторно-вакуумном испарителе при 40°C. Далее сухой остаток растворяли в 300 мкл подвижной фазы и 100 мкл раствора вводили в хроматограф. Коэффициент экстракции целевого вещества составил 86,6%.

Для построения калибровочных графиков готовили 6 стандартных растворов этилметилгидроксипиридина сукцината в плазме крови кроликов следующих концентраций: 25, 100, 200, 400, 600 и 800 нг/мл. Указанные растворы анализировались троекратно с построением трех калибровочных графиков зависимости плазменной концентрации этилметилгидроксипиридина сукцината от высоты его хроматографического пика. Графики представлены на рисунках 12–14.

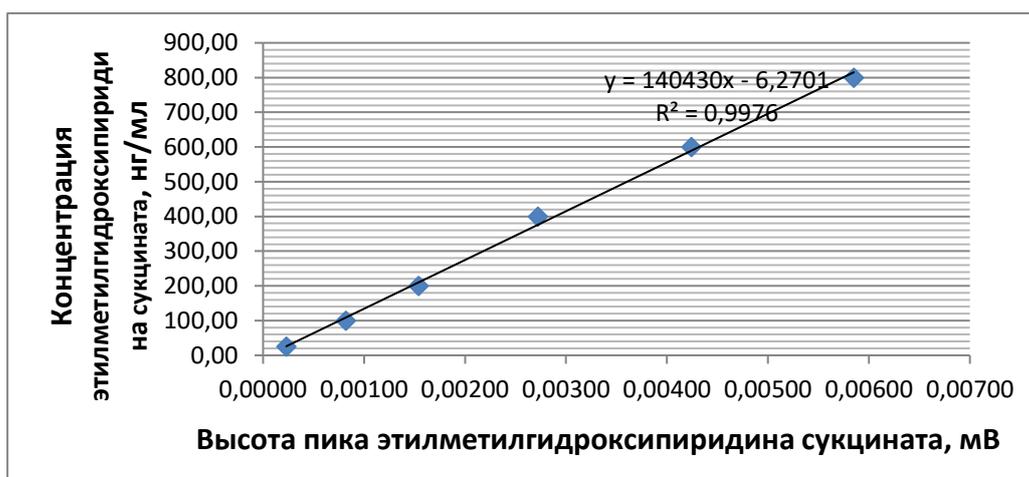


Рисунок 12 – Калибровочный график №1 зависимости концентрации этилметилгидроксипиридина сукцината в плазме крови кроликов от высоты его хроматографического пика

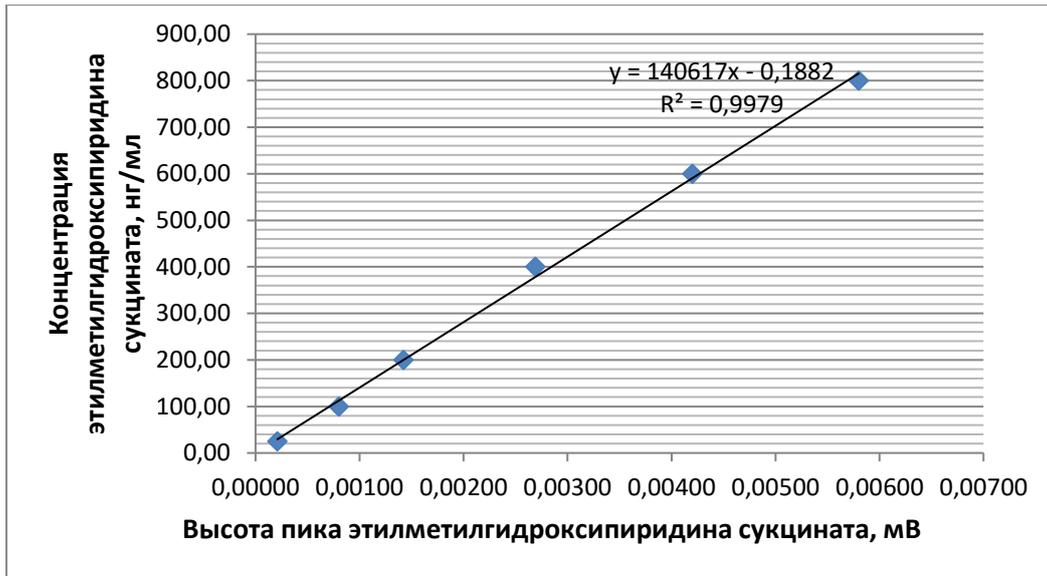


Рисунок 13 – Калибровочный график №2 зависимости концентрации этилметилгидроксипиридина сукцината в плазме крови кроликов от высоты его хроматографического пика

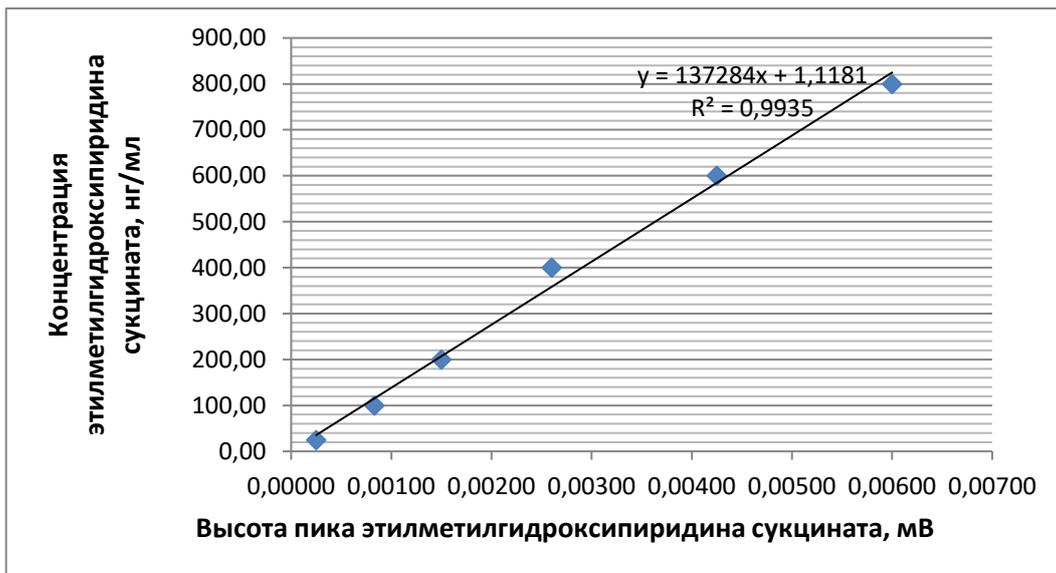


Рисунок 14 – Калибровочный график №3 зависимости концентрации этилметилгидроксипиридина сукцината в плазме крови кроликов от высоты его хроматографического пика

Коэффициенты корреляции между концентрацией целевого вещества и высотой его пиков составляли не менее 0,99. Отклонения концентраций калибровочных образцов, рассчитанные по уравнению линейной регрессии, от номинальных значений приведены в таблице 7.

Таблица 7 – Отклонения концентраций калибровочных образцов, рассчитанные по уравнениям линейных зависимостей, от номинальных значений

Концентрация номинальная, нг/мл	График 1		График 2		График 3	
	Концентрация рассчитанная, нг/мл	Точность, %	Концентрация рассчитанная, нг/мл	Точность, %	Концентрация рассчитанная, нг/мл	Точность, %
25	25,96	3,85	28,64	14,58	29,95	19,79
100	106,13	6,13	111,29	11,29	110,95	10,95
200	210,67	5,33	198,13	0,93	196,06	1,97
400	382,00	4,50	376,03	5,99	370,41	7,40
600	602,69	0,45	587,54	2,08	577,71	3,71
800	803,06	0,38	811,66	1,46	797,37	0,33

Для анализа точности и прецизионности проводился анализ образцов интактной плазмы крови кроликов с добавлением стандартных растворов этилметилгидроксипиридина сукцината до концентраций 25, 100, 400 и 600 нг/мл.

Полученные величины прецизионности (относительного стандартного отклонения) и точности (относительной погрешности) соответствовали принятым нормам (не более 20% для нижнего предела количественного определения и не более 15% – для остальных точек) (таблицы 8, 9).

Таблица 8 – Точность и прецизионность методики количественного определения этилметилгидроксипиридина сукцината в плазме крови кроликов внутри цикла

Концентрация номинальная, нг/мл	Концентрация рассчитанная, нг/мл	Точность, %	Среднее, нг/мл	Средняя точность, %	SD	Прецизионность, %
25	25,96	3,85	26,52	6,09	0,77	2,89
	27,36	9,46				
	25,96	3,85				
	27,36	9,46				
	25,96	3,85				
100	107,25	7,25	107,53	7,53	1,83	1,70
	105,84	5,84				
	110,05	10,05				
	108,65	8,65				
	105,84	5,84				

Продолжение таблицы 8						
400	370,71	7,32	374,36	6,41	13,17	3,52
	358,10	10,47				
	376,32	5,92				
	394,54	1,37				
	372,12	6,97				
600	582,33	2,94	594,94	3,16	22,38	3,76
	589,34	1,78				
	568,32	5,28				
	610,36	1,73				
	624,37	4,06				

Таблица 9 – Точность и прецизионность методики количественного определения этилметилгидроксипиридина сукцината в плазме крови кроликов между циклами

Концентрация номинальная, нг/мл	Концентрация рассчитанная, нг/мл	Точность, %	Среднее, нг/мл	Средняя точность, %	SD	Прецизионность, %
25	29,95	19,79	27,28	14,01	3,62	13,26
	23,16	7,36				
	28,72	14,89				
100	110,95	10,95	109,49	9,49	3,18	2,90
	105,84	5,84				
	111,69	11,69				
400	378,65	5,34	381,22	4,69	4,05	1,06
	379,12	5,22				
	385,89	3,53				
600	591,44	1,43	597,21	0,89	6,25	1,05
	596,34	0,61				
	603,84	0,64				

На рисунке 15 представлен образец хроматограммы интактной плазмы крови кролика, на рисунке 16 – хроматограмма плазмы крови с добавлением стандартного раствора целевого вещества до концентрации 400 нг/мл и проведением пробоподготовочных процедур. Пики этилметилгидроксипиридина сукцината отделены от пиков сопутствующих эндогенных веществ, что позволяет достоверно определить анализируемое соединение.

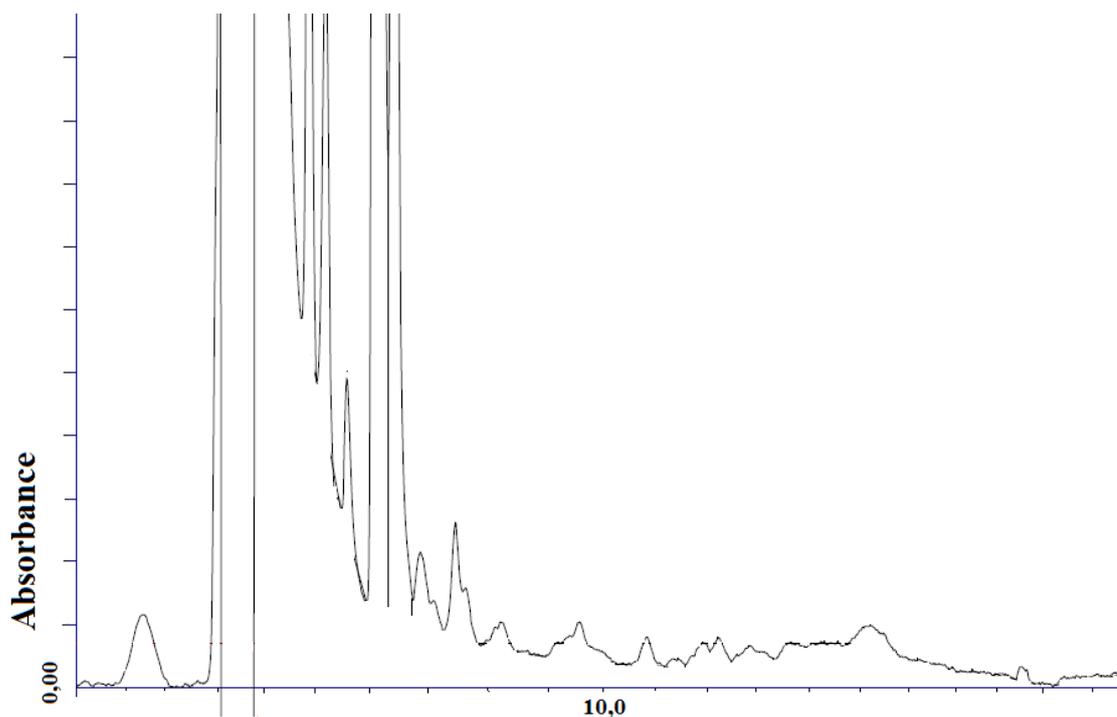


Рисунок 15. Хроматограмма пробы интактной плазмы крови кроликов

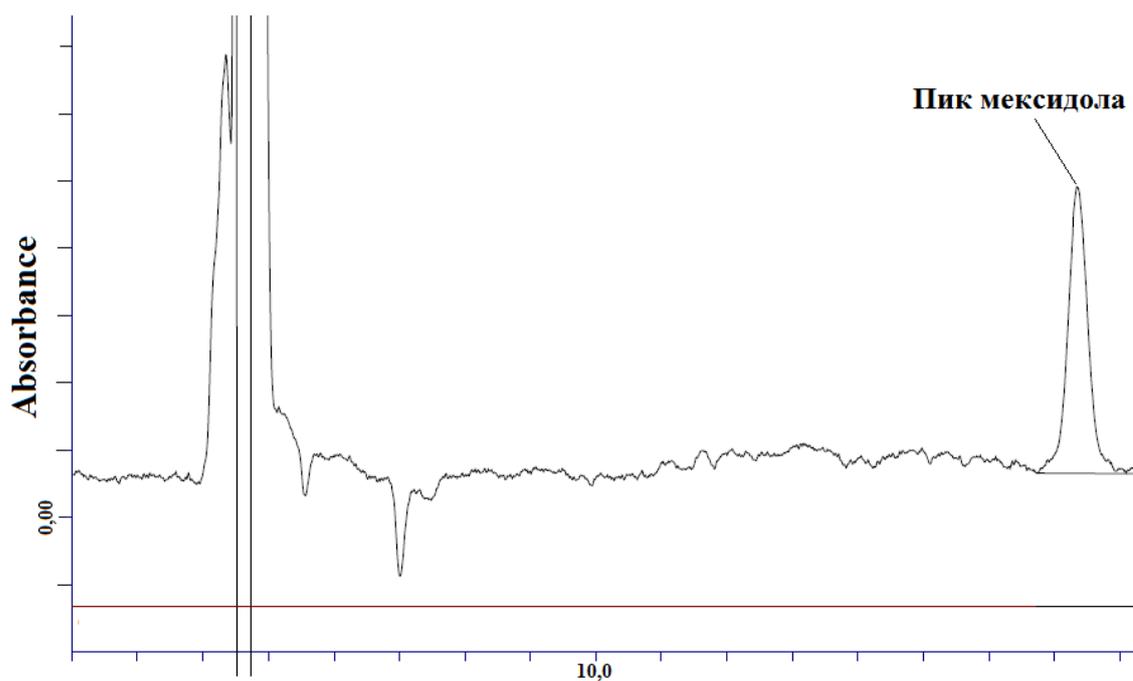


Рисунок 16. Хроматограмма пробы плазмы крови кроликов с добавлением
этилметилгидроксипиридина сукцината до концентрации 400 нг/мл

Коэффициент разделения (разрешения) пика этилметилгидроксипиридина сукцината и ближайшего пика соэкстрактивных веществ вычислялся как разность времен удерживания указанных пиков, разделенных на сумму их широт на половине высот. Данный параметр составил более 2.

На рисунке 17 представлен участок хроматограммы, демонстрирующий пределы обнаружения и количественного определения этилметилгидроксипиридина сукцината, которые вычислялись как концентрации аналита, дающие соответственно пики с высотами 3-кратно и 10-кратно превышающими высоту пиков шума на расстоянии, 20-кратно превышающем ширину пика на половине его высоты. Ширина пика пробы с концентрацией 600 нг/мл на половине его высоты составляла 0,5 мин, что соответствует 10-минутному участку хроматограммы [103]. Самый высокий пик на указанном участке составлял 0,05 мВ. Методика характеризовалась пределами количественного определения и детектирования соответственно 25 и 21 нг/мл.

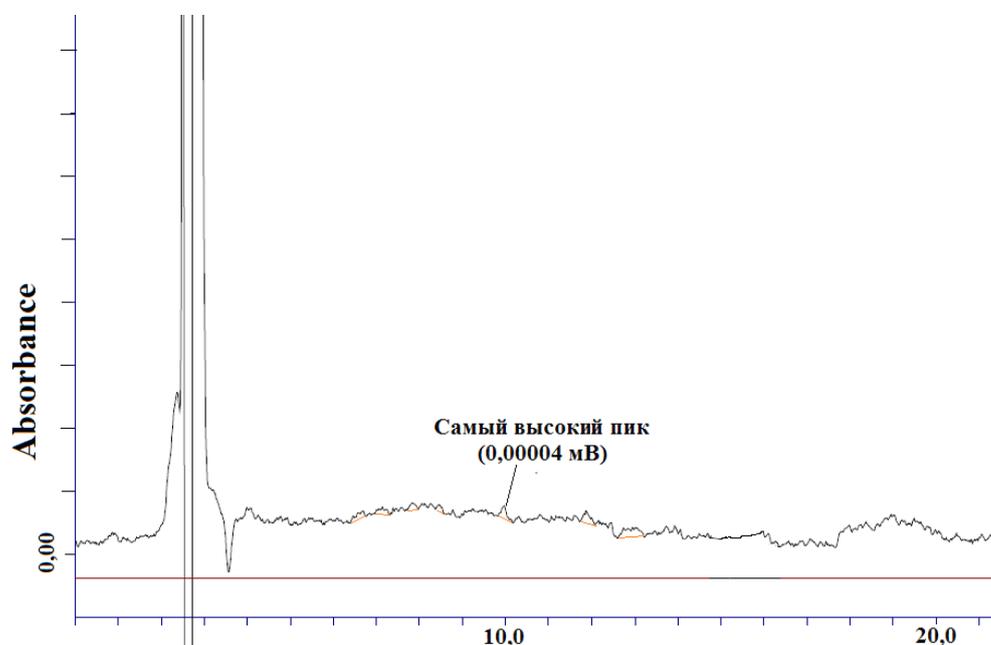


Рисунок 17. Участок хроматограммы после инъекции чистой подвижной фазы

Стабильность стандартных растворов этилметилгидроксипиридина сукцината оценивали путем их хроматографического исследования после трех циклов замораживания/размораживания и разведения до концентрации 600 нг/мл. Каждый цикл замораживания длился 24 часа в морозильной камере при -80°C , размораживания при комнатной температуре не более двух часов. Анализ проводили троекратно. Результаты представлены в таблице 10.

Для оценки стабильности этилметилгидроксипиридина сукцината в составе плазмы крови кроликов при хранении в замороженном состоянии готовили

образцы с концентрацией 800 нг/мл. Пробы анализировали после хранения в замороженном состоянии в течение 60 дней. Исследовали по 3 независимых образца. Результаты представлены в таблице 11.

Таблица 10 – Стабильность стандартного раствора этилметилгидроксипиридина сукцината

Концентрация номинальная, нг/мл	Концентрация рассчитанная, нг/мл	Точность, %	Среднее, нг/мл	Средняя точность, %
600	554,30	7,62	601,02	5,25
	638,39	6,40		
	610,36	1,73		

Таблица 11 – Стабильность раствора этилметилгидроксипиридина сукцината в составе плазмы крови кролика

Концентрация номинальная, нг/мл	Концентрация рассчитанная, нг/мл	Точность, %	Среднее, нг/мл	Средняя точность, %
800	750,50	6,19	717,80	10,27
	694,44	13,19		
	708,46	11,44		

При последовательном анализе пробы плазмы крови с концентрацией этилметилгидроксипиридина сукцината 800 нг/мл и образца экстракта интактной плазмы крови на последней хроматограмме отсутствовали пики, соответствующие по времени удерживания пикам этилметилгидроксипиридина сукцината, таким образом, перенос пробы отсутствовал.

Таким образом, модифицирована и валидирована ВЭЖХ-методика количественного определения этилметилгидроксипиридина сукцината в плазме крови кроликов, которая позволяет анализировать фармакокинетику вещества для оценки его принадлежности к субстратам белка-транспортера Pgp.

Полученные результаты опубликованы в статье с соавторами:

Черных, И.В. Разработка ВЭЖХ методики количественного определения этилметилгидроксипиридина сукцината в плазме крови крыс и кроликов [Текст] / **И.В. Черных, А.В. Щулькин, М.В. Гацанога, П.В. Мыльников** // *Российский медико-биологический вестник им. акад. И.П. Павлова.* – 2015. – Т.23, №1. – С.62–66.

3.2.1.2. ВЭЖХ-методика количественного определения омберацетама в плазме крови кроликов

Определение концентрации омберацетама (этиловый эфир N-фенилацетил-L-пропилглицина, ноопепта) в плазме крови кроликов проводили методом абсолютной калибровки по площади пиков. Калибровочные растворы готовили путем добавления к интактной плазме крови одинаковых объемов водного раствора стандарта вещества в различных концентрациях.

Анализ проводили на высокоэффективном жидкостном хроматографе «Stayer» (Россия), оснащенный автосамплером «Rheodyne» (США) и УФ спектрофотометрическим детектором при длине волны 206 нм в изократическом режиме. Использовалась хроматографическая колонка Phenomenex Synergi 4u Polar-RP 80A (250x4,6) с зернением 4 мкм. Температура разделения – 35°C. Скорость потока – 1,0 мл/мин.

Состав подвижной фазы: вода деионизированная – ацетонитрил – ледяная уксусная кислота (50 – 50 – 0,1), pH=5,5. Время удерживания омберацетама составило $9,3 \pm 0,34$ мин.

Экстракция омберацетама из плазмы крови кроликов осуществлялась хлороформом (1,5 мл плазмы крови и 6 мл экстрагента) путем встряхивания на приборе Shaker при 400 об./мин в течение 10 мин, центрифугирования при 1750 g 10 мин и упаривания надосадочного слоя при 40°C. Коэффициент экстракции омберацетама составил 68%.

Для построения калибровочных графиков готовили 6 стандартных растворов омберацетама в плазме крови кроликов следующих концентраций: 5, 15, 25, 50, 100, 200 нг/мл, каждый из которых анализировался трижды с построением трех калибровочных графиков зависимости плазменной концентрации вещества от площади его хроматографического пика. Графики представлены на рисунках 18–20.

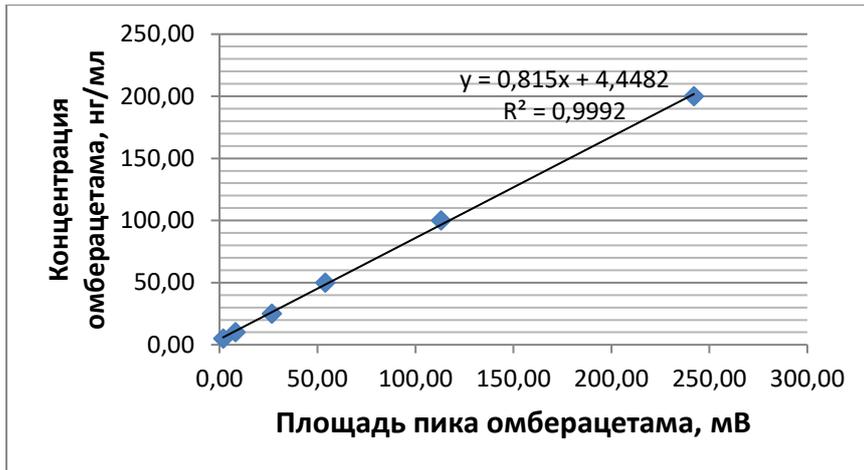


Рисунок 18. Калибровочный график №1 зависимости концентрации омберацетама в плазме крови кроликов от площади его хроматографического пика

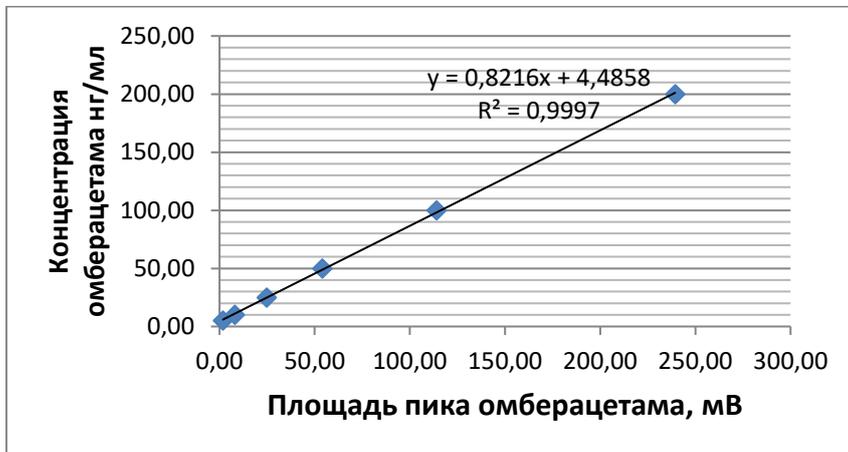


Рисунок 19. Калибровочный график №2 зависимости концентрации омберацетама в плазме крови кроликов от площади его хроматографического пика

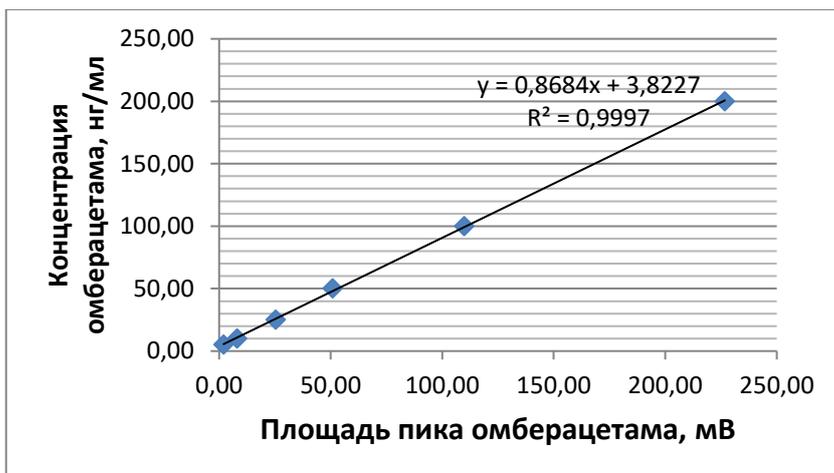


Рисунок 20. Калибровочный график №3 зависимости концентрации омберацетама в плазме крови кроликов от площади его хроматографического пика

Коэффициенты корреляции концентрация-площадь пика омберцетама превышали значение 0,99. Отклонения концентраций калибровочных образцов, рассчитанные по уравнению линейной зависимости, от номинальных значений приведены в таблице 12.

Таблица 12 – Отклонения концентраций калибровочных образцов омберцетама, рассчитанные по уравнениям линейных зависимостей, от номинальных значений

Концентрация номинальная, нг/мл	График 1		График 2		График 3	
	Концентрация рассчитанная, нг/мл	Точность, %	Концентрация рассчитанная, нг/мл	Точность, %	Концентрация рассчитанная, нг/мл	Точность, %
5	5,96	19,12	5,94	18,77	5,54	10,84
10	11,03	10,25	11,01	10,09	10,82	8,22
25	26,24	4,97	24,82	0,71	25,78	3,10
50	48,46	3,08	48,82	2,36	47,93	4,14
100	96,54	3,46	98,13	1,87	99,19	0,81
200	201,78	0,89	201,13	0,57	200,72	0,36

Для анализа точности и прецизионности проводился анализ образцов интактной плазмы крови кроликов с добавлением стандартных растворов омберцетама до получения концентраций 5, 10, 25 и 100 нг/мл.

Полученные величины прецизионности (относительного стандартного отклонения) и точности (относительной погрешности) соответствовали принятым нормам (не более 20% для нижнего предела количественного определения и не более 15% – для остальных точек) (таблицы 13, 14).

Таблица 13 – Точность и прецизионность методики количественного определения омберцетама в плазме крови кроликов внутри цикла

Концентрация номинальная, нг/мл	Концентрация рассчитанная, нг/мл	Точность, %	Среднее, нг/мл	Средняя точность, %	SD	Прецизионность, %
5	5,92	18,30	5,97	19,31	0,03	0,57
	5,96	19,28				
	6,00	19,93				
	5,96	19,12				
	6,00	19,93				

Продолжение таблицы 13						
10	11,03	10,25	11,00	10,02	0,04	0,37
	10,96	9,60				
	10,96	9,60				
	11,02	10,17				
	11,05	10,50				
25	24,66	1,36	25,38	2,50	0,79	3,11
	26,24	4,97				
	25,05	0,21				
	24,72	1,13				
	26,21	4,83				
100	89,66	10,34	90,36	4,62	10,36	5,11
	85,13	14,87				
	93,95	6,05				
	92,71	7,29				
	86,76	13,24				

Таблица 14 – Точность и прецизионность методики количественного определения омберацетама в плазме крови кроликов между циклами

Концентрация номинальная, нг/мл	Концентрация рассчитанная, нг/мл	Точность, %	Среднее, нг/мл	Средняя точность, %	SD	Прецизионность, %
5	5,97	19,45	5,80	15,99	0,31	5,27
	5,98	19,59				
	5,45	8,93				
10	11,03	10,33	10,99	9,85	0,13	1,17
	11,08	10,83				
	10,84	8,39				
25	27,27	9,08	26,78	7,14	0,43	1,60
	26,45	5,81				
	26,63	6,52				
100	93,44	6,56	90,42	9,58	2,64	2,92
	88,56	11,44				
	89,25	10,75				

Образцы полученных хроматограмм представлены на рисунках 21–22. Пики омберацетама отделены от пиков соэкстрактивных эндогенных соединений, что позволяет достоверно определить исследуемое вещество.

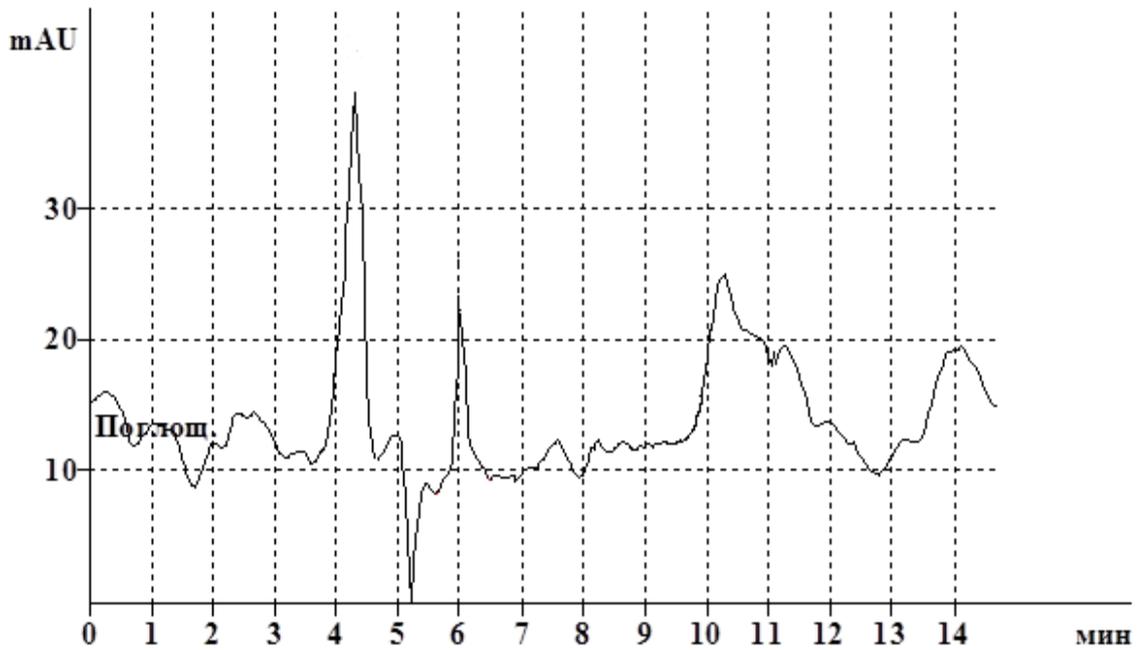


Рисунок 21 – Хроматограмма пробы интактной плазмы крови кроликов



Рисунок 22 – Хроматограмма пробы плазмы крови кроликов с добавлением стандарта омберацетама до концентрации 100 нг/мл

Коэффициент разделения (разрешения) пика омберацетама и ближайшего пика соэкстрактивных веществ вычислялся как разность времен удерживания указанных пиков, разделенных на сумму их широт на половине высот. Параметр составил более 1,5.

На рисунке 23 представлен участок хроматограммы, демонстрирующий пределы обнаружения и количественного определения омберацетама, которые вычислялись как концентрации аналита, дающие соответственно пики с высотами 3-кратно и 10-кратно превышающими высоту максимального пика шума на расстоянии, 20-кратно превышающем ширину пика на половине его высоты. Ширина пика пробы с концентрацией 200 нг/мл на половине его высоты составляла 0,4 мин, что соответствует 8-минутному участку хроматограммы [103]. Самый высокий пик на указанном участке составлял 0,05 мВ.

Таким образом, предел обнаружения и предел количественного определения составили соответственно 3 и 5 нг/мл.

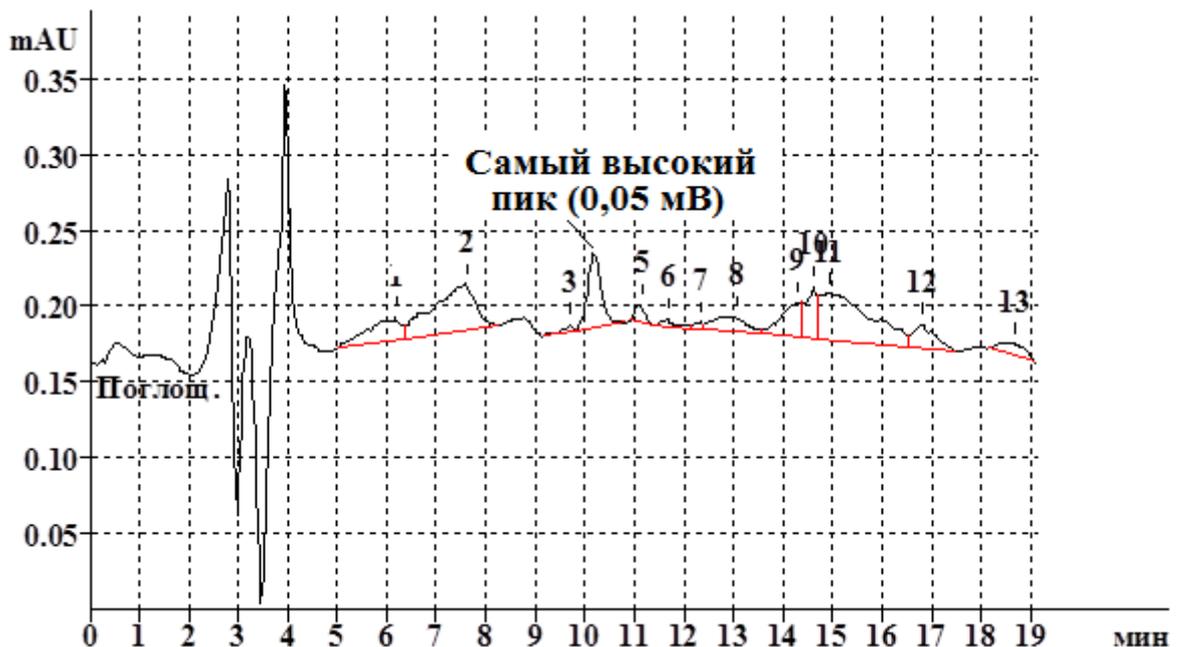


Рисунок 23 – Участок хроматограммы после инъекции чистой подвижной фазы

Стабильность стандартных растворов омберацетама оценивали путем их хроматографического исследования после трех циклов замораживания/размораживания и разведения до концентрации 100 нг/мл. Каждый цикл замораживания длился 24 часа в морозильной камере при -80°C .

Размораживание осуществлялось при комнатной температуре не более двух часов. Анализ проводили троекратно. Результаты представлены в таблице 15.

Для оценки стабильности омберцетама в составе плазмы крови кроликов при хранении в замороженном состоянии готовили образцы в концентрации 200 нг/мл, которые анализировали после хранения в замороженном состоянии в течение 60 дней. Исследовали по 3 независимых образца. Результаты представлены в таблице 16.

Таблица 15 – Стабильность стандартного раствора омберцетама

Концентрация номинальная, нг/мл	Концентрация рассчитанная, нг/мл	Точность, %	Среднее, нг/мл	Средняя точность, %
100	94,10	5,90	91,24	8,76
	90,51	9,49		
	89,11	10,89		

Таблица 16 – Стабильность раствора омберцетама в составе плазмы крови кролика

Концентрация номинальная, нг/мл	Концентрация рассчитанная, нг/мл	Точность, %	Среднее, нг/мл	Средняя точность, %
200	191,90	4,05	193,59	3,20
	197,52	1,24		
	191,36	4,32		

При последовательном анализе пробы плазмы крови кролика с концентрацией омберцетама 200 нг/мл и экстракта чистой плазмы на хроматограмме интактной плазмы крови отсутствовали пики, соответствующие по времени удерживания пикам омберцетама.

Таким образом, модифицирована и валидирована ВЭЖХ-методика количественного определения омберцетама в плазме крови кроликов, которая характеризуется достаточной точностью и прецизионностью и позволяет анализировать фармакокинетику вещества для оценки его принадлежности к субстратам белка-транспортера Pgp.

3.2.1.3. ВЭЖХ-методика количественного определения фабомотизола в плазме крови кроликов

Для количественного определения фабомотизола (афобазола) в плазме крови кроликов с помощью ВЭЖХ использовалась хроматографическая система «Stayer» с УФ-спектрофотометрическим детектором UVV 104, петлевым краном-дозатором РЕЕК с петлей ввода на 100 мкл, аналитическим ручным инжектором для ввода пробы модели 7725i (Rheodyne, США) при длине волны 302 нм. Использовали обращенно-фазную хроматографическую колонку: Phenomenex Synergi 4u Polar-RP 80A (250x4,6) с зернением 4 мкм с термостатированием при 35°C. Ввод проб в петлю хроматографа производили с помощью шприца «Microsyringes» (Германия).

Исследование выполнялось в изократическом режиме. В качестве подвижной фазы применялась смесь ацетонитрил–вода–метанол–кислота уксусная ледяная–триэтиламин в соотношении 100 – 240 – 100 – 0,3 – 0,25 с рН 6,10. Время удерживания фабомотизола составило 10,00±0,11 мин.

Экстракция фабомотизола из плазмы крови осуществлялась эфиром диэтиловым (1,5 мл плазмы и 6 мл органического растворителя) путем встряхивания на приборе Shaker при 400 об./мин в течение 10 мин, центрифугирования при 1750 g 10 мин и упаривания супернатанта при 40°C. Коэффициент экстракции составил 87%.

Определение концентрации фабомотизола в плазме крови выполняли методом абсолютной калибровки по площади пиков. Калибровочные растворы готовили путем добавления к интактной плазме крови кроликов равных объемов растворов стандарта вещества с различными концентрациями.

Для построения калибровочных графиков готовили 6 стандартных растворов фабомотизола в плазме крови кроликов следующих концентраций: 10, 50, 100, 200, 400 и 600 нг/мл, каждый из которых анализировался трижды с построением трех калибровочных графиков зависимости плазменной концентрации

фабомотизола от площади его хроматографического пика. Графики представлены на рисунках 24–26.

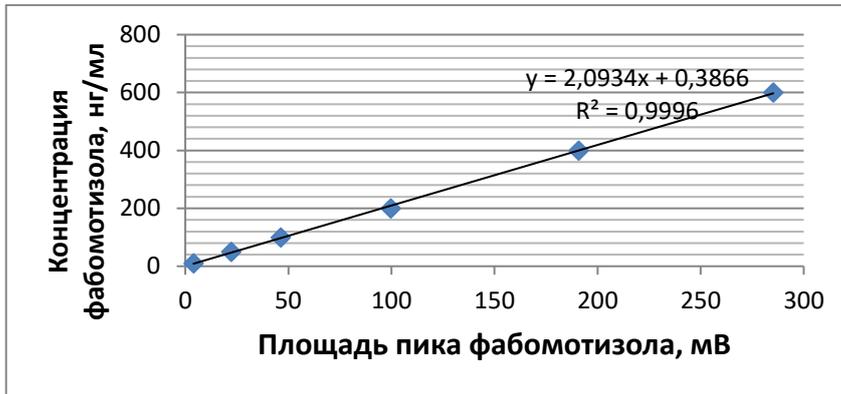


Рисунок 24 – Калибровочный график №1 зависимости концентрации фабомотизола в плазме крови кроликов от площади его хроматографического пика

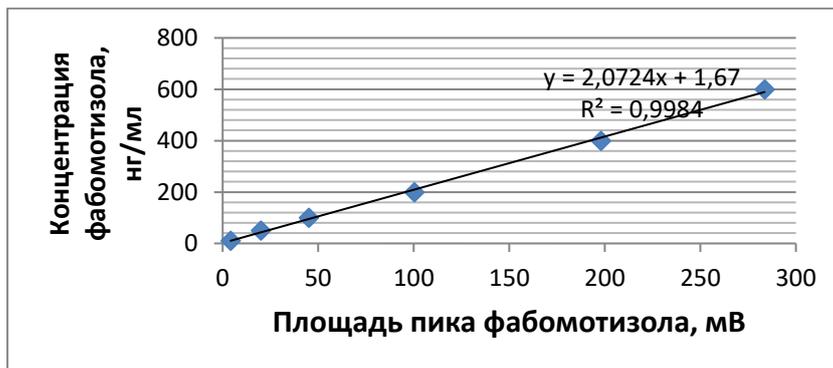


Рисунок 25 – Калибровочный график №2 зависимости концентрации фабомотизола в плазме крови кроликов от площади его хроматографического пика

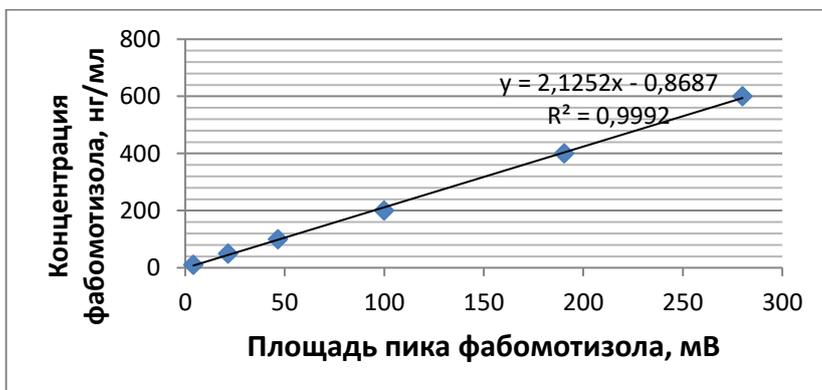


Рисунок 26 – Калибровочный график №3 зависимости концентрации фабомотизола в плазме крови кроликов от площади его хроматографического пика

Коэффициенты корреляции составляли более 0,99, что достаточно для проведения количественного анализа целевого вещества. Отклонения концентраций калибровочных образцов, рассчитанные по уравнениям линейной зависимости, от номинальных значений приведены в таблице 17.

Таблица 17 – Отклонения концентраций калибровочных образцов фабомотизола, рассчитанные по уравнениям линейных зависимостей, от номинальных значений

Концентрация номинальная, нг/мл	График 1		График 2		График 3	
	Концентрация рассчитанная, нг/мл	Точность, %	Концентрация рассчитанная, нг/мл	Точность, %	Концентрация рассчитанная, нг/мл	Точность, %
10,00	8,76	12,40	10,38	3,81	8,02	19,84
50,00	47,17	5,65	43,30	13,41	44,85	10,29
100,00	97,42	2,58	95,29	4,71	98,30	1,70
200,00	209,22	4,61	209,88	4,94	211,58	5,79
400,00	399,97	0,01	412,38	3,10	403,64	0,91
600,00	597,45	0,43	589,84	1,69	594,12	0,98

Для анализа точности и прецизионности проводился анализ образцов интактной плазмы крови кроликов с добавлением стандартных растворов фабомотизола до получения концентраций 10, 50, 100 и 400 нг/мл.

Полученные величины прецизионности и точности соответствовали принятым нормам: не более 20% для нижнего предела количественного определения и не более 15% – для остальных точек (таблицы 18, 19).

Таблица 18 – Точность и прецизионность методики количественного определения фабомотизола в плазме крови кроликов внутри цикла

Концентрация номинальная, нг/мл	Концентрация рассчитанная, нг/мл	Точность, %	Среднее, нг/мл	Средняя точность, %	SD	Прецизионность, %
10	8,99	10,10	9,27	7,88	0,17	1,88
	9,24	7,58				
	9,03	9,68				
	9,39	6,12				
	9,41	5,91				

Продолжение таблицы 18						
50	45,00	10,01	45,47	9,24	0,48	1,05
	44,91	10,17				
	45,27	9,46				
	45,71	8,58				
	46,00	8,00				
100	97,42	2,58	95,33	4,67	3,22	3,38
	94,88	5,12				
	97,94	2,06				
	89,96	10,04				
	96,45	3,55				
400	399,97	0,01	406,44	2,19	11,93	2,93
	414,94	3,74				
	398,82	0,29				
	395,43	1,14				
	423,04	5,76				

Таблица 19 – Точность и прецизионность методики количественного определения фабомотизола в плазме крови кроликов между циклами

Концентрация номинальная, нг/мл	Концентрация рассчитанная, нг/мл	Точность, %	Среднее, нг/мл	Средняя точность, %	SD	Прецизионность, %
10	9,18	8,21	9,26	9,91	1,08	11,65
	10,38	3,81				
	8,23	17,72				
50	46,44	7,12	46,59	6,81	0,64	1,38
	47,30	5,40				
	46,04	7,91				
100	96,05	3,95	96,30	3,70	0,21	0,22
	96,45	3,55				
	96,39	3,61				
400	406,51	1,63	407,32	1,83	3,77	0,93
	404,03	1,01				
	411,44	2,86				

Образцы полученных хроматограмм представлены на рисунках 27–28. Пики фабомотизола отделены от пиков эндогенных соединений, что позволяет достоверно идентифицировать и количественно определить целевое вещество.

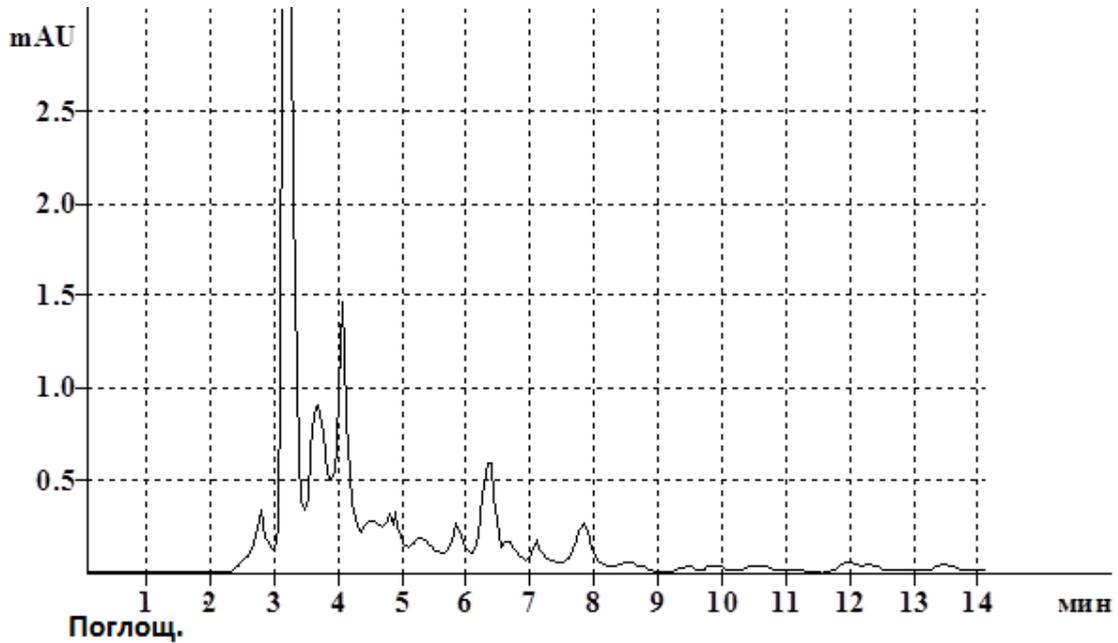


Рисунок 27 – Хроматограмма пробы интактной плазмы крови кроликов

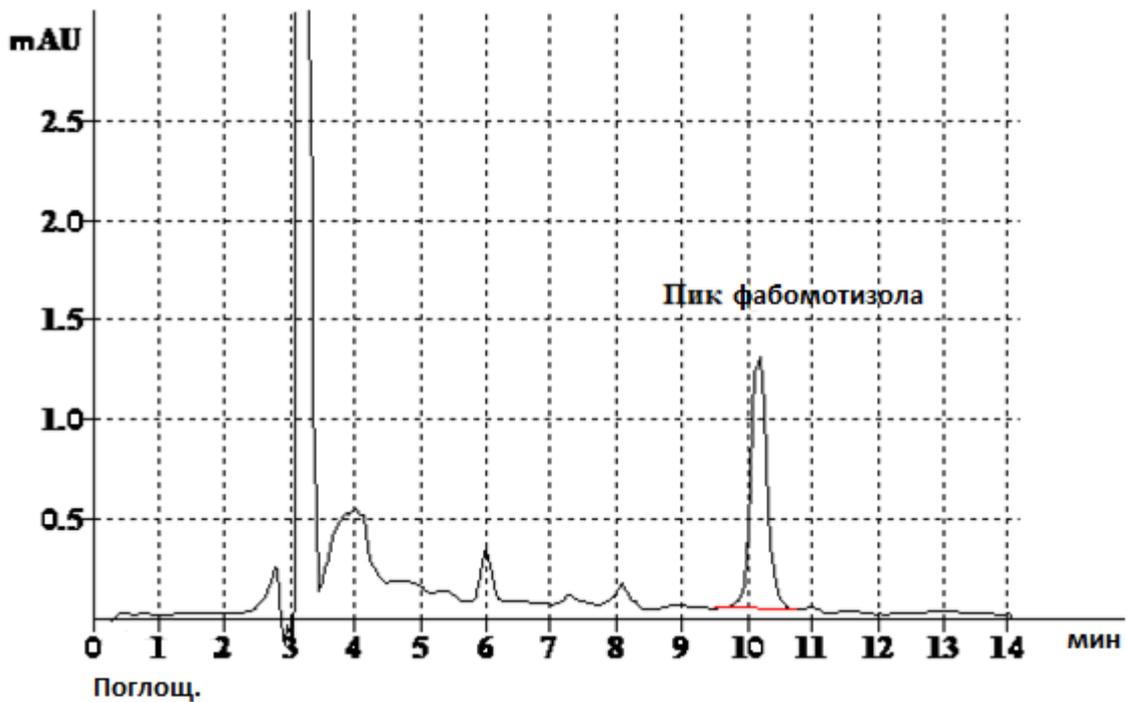


Рисунок 28 – Хроматограмма пробы плазмы крови кроликов с добавлением стандарта фабомотизола до концентрации 50 нг/мл

Коэффициент разделения (разрешения) пика фабомотизола и ближайшего пика соэкстрактивных веществ вычислялся как разность времен удерживания

указанных пиков, разделенных на сумму их широт на половине высот. Данный параметр составил более 2.

На рисунке 29 представлен участок хроматограммы для нахождения пределов обнаружения и количественного определения фабомотизола, которые вычислялись как концентрации аналита, дающие соответственно пики с высотами 3-кратно и 10-кратно превышающими высоту максимального пика шума на расстоянии, 20-кратно превышающем ширину пика на половине его высоты. Ширина пика пробы с концентрацией 600 нг/мл на половине его высоты составляла 0,8 мин, что соответствует 16-минутному участку хроматограммы [103]. Самый высокий пик на указанном участке составлял 0,02 мВ. Таким образом, пределы обнаружения и количественного определения составили соответственно 4,0 и 10,0 нг/мл.

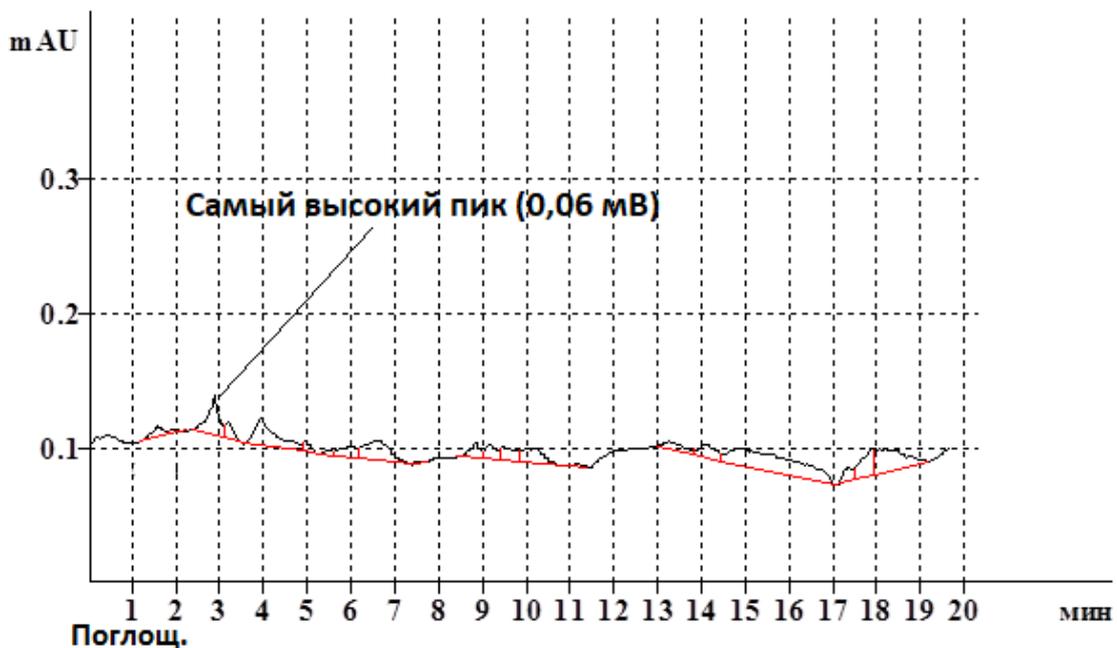


Рисунок 29 – Участок хроматограммы после инъекции чистой подвижной фазы

Стабильность стандартных растворов фабомотизола оценивали путем их хроматографического исследования после трех циклов замораживания/размораживания и разведения до концентрации 400 нг/мл. Каждый цикл замораживания длился 24 часа в морозильной камере при -80°C , размораживание при комнатной температуре проводилось не более двух часов. Анализ осуществляли троекратно (таблица 20).

Для оценки стабильности фабомотизола в составе плазмы крови кроликов при хранении в замороженном состоянии готовили образцы в концентрации 600 нг/мл, которые анализировали после хранения в замороженном состоянии в течение 60 дней. Исследовали по 3 независимых образца. Результаты представлены в таблице 21.

Таблица 20 – Стабильность стандартного раствора фабомотизола

Концентрация номинальная, нг/мл	Концентрация рассчитанная, нг/мл	Точность, %	Среднее, нг/мл	Средняя точность, %
400	412,79	3,20	402,11	1,60
	398,13	0,47		
	395,41	1,15		

Таблица 21 – Стабильность раствора фабомотизола в составе плазмы крови кролика

Концентрация номинальная, нг/мл	Концентрация рассчитанная, нг/мл	Точность, %	Среднее, нг/мл	Средняя точность, %
600	607,47	1,25	603,47	0,58
	602,03	0,34		
	600,92	0,15		

При последовательном анализе пробы плазмы крови кролика с концентрацией фабомотизола 600 нг/мл и образца чистой плазмы крови на хроматограмме последней отсутствовали пики, соответствующие по времени удерживания пикам фабомотизола.

Таким образом, модифицирована и валидирована точная и прецизионная ВЭЖХ-методика количественного анализа фабомотизола в плазме крови кроликов, которая позволяет анализировать его фармакокинетику для оценки принадлежности к субстратам P_{gp}.

Полученные результаты опубликованы в статье с соавторами:

Якушева, Е.Н. Разработка ВЭЖХ-методики количественного анализа фабомотизола (афобазола) в плазме крови кроликов [Текст] / Е.Н. Якушева, И.В. Черных, А.В. Шулькин, М.В. Гацанога // Вестник РУДН. Серия: Медицина. – 2017. – Т.21, №4. – С.432–439.

3.2.1.4. Принадлежность нейропротекторов к субстратам гликопротеина-P и модуляторам его функционирования

3.2.1.4.1. Принадлежность этилметилгидроксипиридина сукцината к субстратам гликопротеина-P и модуляторам его функционирования

Принадлежность этилметилгидроксипиридина сукцината (а в последующих сериях – омберацетама и фабомотизола) к числу субстратов Pgp оценивалась путем анализа фармакокинетики вещества в норме и на фоне введения известных индуктора и ингибитора транспортера. Влияние вещества на функциональную активность транспортера анализировалось по фармакокинетики известного субстрата транспортера – фексофенадина.

Фармакокинетические параметры этилметилгидроксипиридина сукцината до и после введения индуктора Pgp – рифампицина представлены в таблице 22, до и после введения ингибитора транспортера – верапамила – в таблице 23.

Таблица 22 – Фармакокинетические параметры этилметилгидроксипиридина сукцината (100 мг/кг внутривенно) после его однократного введения до и после курсового введения рифампицина (20 мг/кг 2 раза в день внутривенно)

Изучаемый показатель	Интактные кролики, n=6	Рифампицин 14 дней, n=6	p
C_{max} , нг/мл	89,51 (37,91; 211,31)	84,76 (33,91; 211,86)	0,922
T_{max} , ч	0,5 (0,5; 1,0)	0,5 (0,5; 0,5)	0,465
$T_{1/2}$, ч	1,39 (1,00; 1,92)	1,18 (0,94; 1,47)	0,363
AUC_{0-t} , (нг/мл)*ч	669,15 (369,59; 1211,50)	480,15 (219,95; 1048,13)	0,143
$AUC_{0-\infty}$, (нг/мл)*ч	694,11 (381,46; 1263,00)	494,45 (229,76; 1064,06)	0,125
C_{max}/AUC_{0-t} , 1/ч	0,134 (0,065; 0,274)	0,177 (0,138; 0,226)	0,463
MRT, ч	2,00 (1,44; 2,77)	1,70 (1,36; 2,12)	0,363
K_{el} , 1/ч	0,500 (0,360; 0,694)	0,589 (0,471; 0,737)	0,363

Примечание: данные представлены в виде среднего геометрического и его 95%-го доверительного интервала. Значения T_{max} представлены в виде медианы, нижнего и верхнего квартилей.

Таблица 23 – Фармакокинетические параметры этилметилгидроксипиридина сукцината (100 мг/кг внутривенно) после его однократного введения до и после курсового введения верапамила (20 мг/кг 3 раза в день внутривенно)

Исследуемый показатель	Интактные кролики, n=6	Верапамил 14 дней, n=6	p
C_{max} , нг/мл	124,69 (36,50; 425,96)	166,41 (115,72; 239,31)	0,499
T_{max} , ч	0,5 (0,5; 1,0)	0,5 (0,25; 0,5)	0,068
$T_{1/2}$, ч	1,25 (0,85; 1,83)	1,07 (0,60; 1,90)	0,698
AUC_{0-t} , (нг/мл)*ч	350,46 (37,34; 3289,72)	952,66 (601,63; 1508,50)	0,698
$AUC_{0-\infty}$, (нг/мл)*ч	361,11 (38,10; 3423,06)	980,78 (613,87; 1567,01)	0,737
C_{max}/AUC_{0-t} , 1/ч	0,21 (0,08; 0,55)	0,17 (0,11; 0,28)	0,511
MRT, ч	1,71 (1,23; 2,37)	1,54 (0,86; 2,74)	0,673
K_{el} , 1/ч	0,72 (0,42; 1,24)	0,65 (0,37; 1,16)	0,737

Примечание: данные представлены в виде среднего геометрического и его 95%-го доверительного интервала. Значения T_{max} представлены в виде медианы, нижнего и верхнего квартилей.

Усредненные фармакокинетические кривые этилметилгидроксипиридина сукцината интактных животных и кроликов после курсового введения индуктора и ингибитора Pgp представлены соответственно на рисунках 30 и 31.

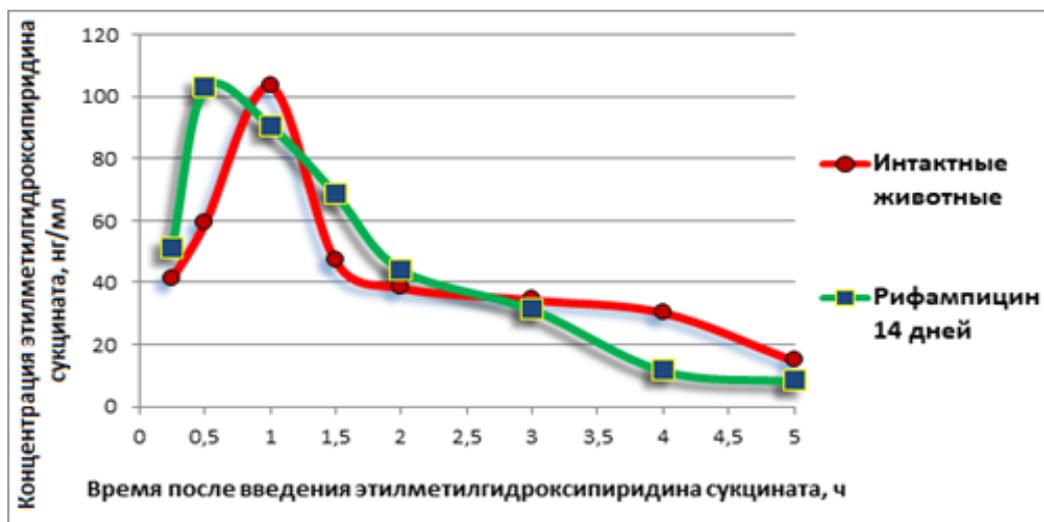


Рисунок 30 – Усредненные фармакокинетические кривые этилметилгидроксипиридина сукцината (100 мг/кг внутривенно) в норме и на фоне 14-дневного введения рифампицина (20 мг/кг 2 раза в день внутривенно).

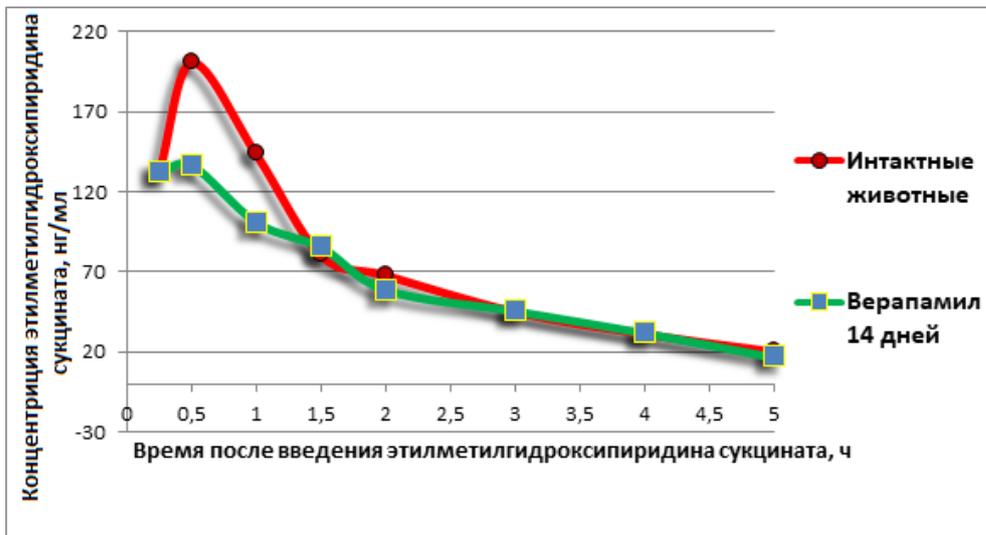


Рисунок 31 – Усредненные фармакокинетические кривые этилметилгидроксипиридина сукцината (100 мг/кг внутривенно) в норме и на фоне 14-дневного введения верапамила (20 мг/кг 3 раза в день внутривенно)

Отсутствие динамики фармакокинетических параметров этилметилгидроксипиридина сукцината, в том числе его C_{max} и AUC – основных показателей, характеризующих содержание вещества в системном кровотоке, в норме и на фоне курсового введения животным модуляторов активности Pgp свидетельствует о том, что тестируемое вещество, вероятнее всего, не является субстратом данного белка-транспортера.

Динамика фармакокинетических параметров фексофенадина при курсовом введении этилметилгидроксипиридина сукцината и на 5-й день его отмены представлена в таблице 24.

Таблица 24 – Фармакокинетические параметры фексофенадина (67,5 мг/кг внутривенно) до и после 14-дневного введения этилметилгидроксипиридина сукцината (50 мг/кг 1 раз в день внутривенно), а также на 5-й день его отмены

Изучаемый показатель	Интактные кролики, n=6	Этилметилгидроксипиридина сукцинат 14 дней, n=6	Этилметилгидроксипиридина сукцинат 5-й день отмены, n=6	p (1-2; 1-3; 2-3)
C_{max} , нг/мл	211,33 (184,21; 243,11)	307,62 (250,56; 379,85)*	215,06 (164,14; 281,77)	0,002; 0,839; 0,001

Продолжение таблицы 24				
T_{max} , ч	2,0 (1,0; 2,0)	4,0 (2,0; 5,0)	2,00 (1,00; 3,00)	0,132; 1,000; 0,273
$T_{1/2}$, ч	10,05 (6,20; 17,90)	16,91 (7,93; 42,35)	11,25 (5,50; 23,02)	0,277; 0,850; 0,181
AUC_{0-t} , (нг/мл)*ч	1864,86 (1242,20; 2848,32)	3638,18 (3301,05; 4013,26)*	1724,99 (1196,04; 2487,86)	0,001; 0,551; 0,001
$AUC_{0-\infty}$, (нг/мл)*ч	2514,17 (1365,15; 4809,28)	6948,02 (3651,39; 13700,14)*	2411,24 (1328,36; 4376,90)	0,011; 0,855; 0,020
C_{max}/AUC_{0-t} , 1/ч	0,11 (0,08; 0,15)	0,09 (0,07; 0,11)	0,125 (0,102; 0,153)	0,248; 0,191; 0,764
MRT, ч	14,60 (8,94; 25,84)	24,61 (11,45; 61,11)	16,24 (7,94; 33,22)	0,277; 0,850; 0,181
K_{el} , 1/ч	0,068 (0,112; 0,039)	0,041 (0,016; 0,087)	0,062 (0,030; 0,126)	0,277; 0,850; 0,181

Примечание: * – достоверные различия с показателями интактных животных. Данные представлены в виде среднего геометрического и его 95%-го доверительного интервала. Значения T_{max} представлены в виде медианы, нижнего и верхнего квартилей.

Усредненные фармакокинетические кривые фексофенадина интактных животных, кроликов после курсового введения этилметилгидроксипиридина сукцината и на 5-й день отмены препарата представлены на рисунке 32.

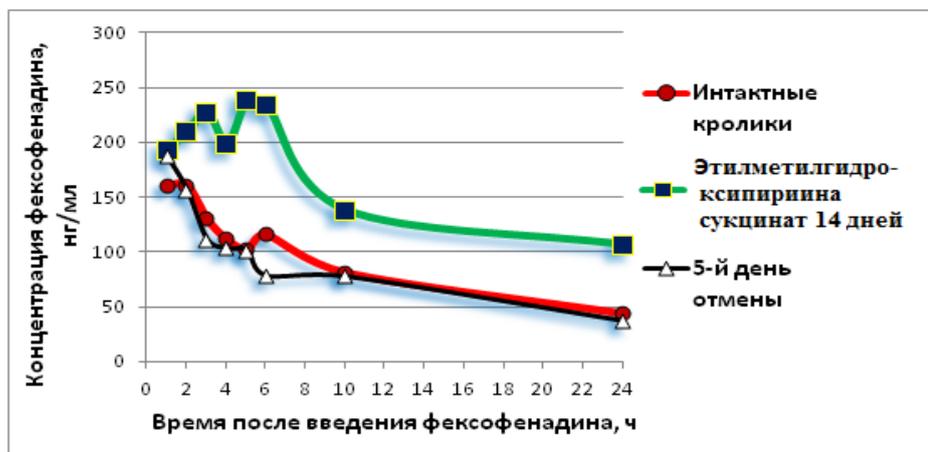


Рисунок 32 – Усредненные фармакокинетические кривые фексофенадина (67,5 мг/кг внутривенно) в норме, на фоне 14-дневного введения этилметилгидроксипиридина сукцината (50 мг/кг 1 раз в день внутривенно) и на 5-й день его отмены

14-дневное введение этилметилгидроксипиридина сукцината кроликам вызывало достоверное увеличение C_{max} фексофенадина в 1,46 раза (90%-й ДИ 1,23–1,73; $p=0,0018$), AUC_{0-24} – в 1,95 раза (90%-й ДИ 1,35–2,78; $p=0,0010$), $AUC_{0-\infty}$ – в 2,76 раза (90%-й ДИ 1,19–6,39; $p=0,0010$). Данные изменения фармакокинетики фексофенадина свидетельствуют о его накоплении в организме кроликов после курсового введения этилметилгидроксипиридина сукцината, что является следствием ингибирования функциональной активности Pgp.

На 5-й день отмены этилметилгидроксипиридина сукцината ни один из фармакокинетических параметров фексофенадина статистически значимо не отличался от значений интактных животных, что демонстрирует возвращение функциональной активности Pgp до первоначального уровня.

Курсовое введение кроликам этилметилгидроксипиридина сукцината не вызывало изменения относительного количества Pgp в печени, 12-перстной кишке и головном мозге по сравнению с показателями интактных животных (таблица 25). На рисунке 33 представлены фотографии образцов печени, 12-перстной кишки и коры головного мозга кроликов после иммуногистохимической обработки в норме и на фоне 14-дневного введения этилметилгидроксипиридина сукцината.

Таблица 25 – Относительное количество Pgp в органах (медиана, верхний и нижний квартиль) в норме и на фоне 14-дневного введения этилметилгидроксипиридина сукцината (50 мг/кг 1 раз в день внутрижелудочно)

Изучаемый показатель	Интактные кролики, n=5	Этилметилгидроксипиридина сукцинат, 14 дней, n=5	p
Печень (относительная площадь мембран гепатоцитов, содержащих Pgp, %)	20,47 (17,62; 21,52)	14,57 (14,10; 16,29)	0,068
Тонкая кишка (интенсивность окраски мембран энтероцитов в условных единицах)	192,16 (184,94; 196,97)	192,07 (89,95; 181,41)	0,100
Кора головного мозга (относительная площадь ГЭБ, содержащего Pgp, %)	0,58 (0,55; 0,87)	0,84 (0,56; 0,89)	0,754

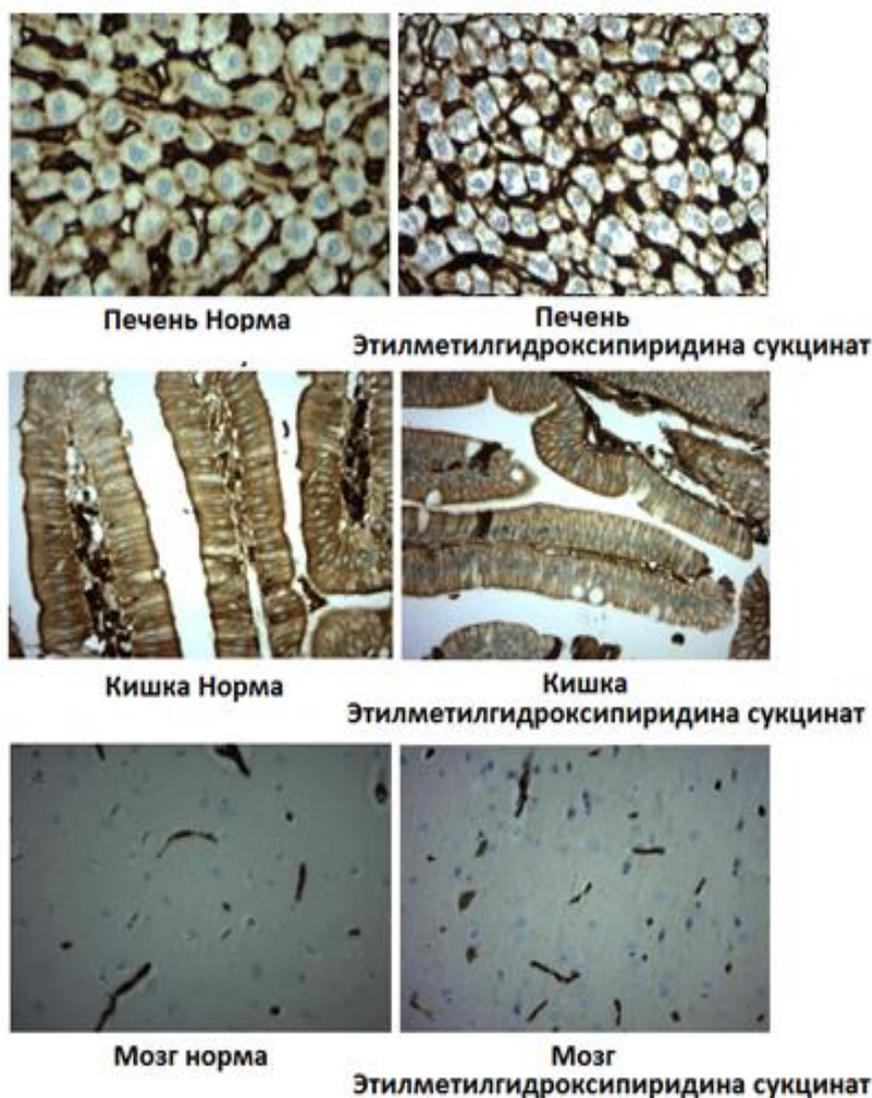


Рисунок 33 – Срезы печени, 12-перстной кишки и коры головного мозга интактных кроликов и на фоне курсового введения этилметилгидроксипиридина сукцината (50 мг/кг 1 раз в день внутривенно), обработанные иммуногистохимически (увеличение в 400 раз)

Таким образом, этилметилгидроксипиридина сукцинат не является субстратом Pgp. С другой стороны, внутривенное введение кроликам данного вещества в дозе 50 мг/кг массы в течение 14 дней приводит к снижению функциональной активности транспортера, что подтверждается соответствующей динамикой фармакокинетических параметров его маркерного субстрата – фексофенадина. Относительное количество транспортера в коре головного мозга, 12-перстной кишке и печени при этом не изменяется.

Полученные результаты опубликованы в статьях с соавторами:

Якушева, Е.Н. Методика определения принадлежности лекарственных средств к числу субстратов гликопротеина-Р [Текст] / Е.Н. Якушева, И.В. Черных, А.В. Шулькин, М.В. Гацанога // Российский медико-биологический вестник им. акад. И.П. Павлова. – 2015, №3. – С.49–53.

Якушева, Е.Н. Оценка принадлежности мексидола к субстратам, ингибиторам или индукторам гликопротеина-Р [Текст] / Е.Н. Якушева, А.В. Шулькин, И.В. Черных // Экспериментальная и клиническая фармакология. – 2015. – Т.78, №5. – С.19–23.

Якушева, Е.Н. Оценка принадлежности лекарственных препаратов к ингибиторам и индукторам белка-транспортера гликопротеина-Р в эксперименте *in vivo* [Текст] / Е.Н. Якушева, Д.А. Сычев, А.В. Шулькин, И.В. Черных, М.В. Гацанога // Экспериментальная и клиническая фармакология. – 2018. – Т.81, №1. – С.17–23.

3.2.1.4.2. Принадлежность омберацетама к субстратам гликопротеина-Р и модуляторам его функционирования

В данной серии эксперимента курсовое введение рифампицина в качестве индуктора Р_{gp} не использовалось в связи с тем, что применяемая ВЭЖХ методика не позволяла анализировать более низкие концентрации омберацетама, чем они наблюдались у интактных животных, в случае его принадлежности к субстратам транспортера. 14-дневное введение кроликам-самцам ингибитора Р_{gp} – верапамила не приводило к достоверному изменению фармакокинетики омберацетама по сравнению с параметрами интактных животных (таблица 26).

Таблица 26 – Фармакокинетические параметры омберацетама (50 мг/кг внутривенно) до и после введения верапамила (20 мг/кг 3 раза в день внутривенно)

Исследуемый показатель	Исходные значения, n=6	Верапамил 14 дней, n=6	p
C _{max} , нг/мл	49,75 (26,65; 86,37)	29,93 (13,47; 66,52)	0,107
T _{max} , мин	30,0 (15,0; 30,0)	22,5 (15,0; 30,0)	0,354

Продолжение таблицы 26			
$T_{1/2}$, мин	13,33 (10,27; 17,30)	12,50 (8,46; 18,45)	0,745
AUC_{0-t} , (нг/мл)*ч	1390,61 (857,68; 2794,44)	1110,77 (505,03; 2612,68)	0,271
$AUC_{0-\infty}$, (нг/мл)*ч	1485,32 (935,52; 2880,16)	1247,60 (639,12; 2616,24)	0,275
C_{max}/AUC_{0-t} , 1/мин	0,036 (0,031; 0,041)	0,027 (0,022; 0,034)	0,051
MRT, мин	19,23 (14,82; 24,96)	18,03 (12,21; 26,63)	0,745
K_{el} , 1/мин	0,052 (0,040; 0,067)	0,055 (0,038; 0,082)	0,745

Примечание: данные представлены в виде среднего геометрического и его 95%-го доверительного интервала. Значения T_{max} представлены в виде медианы, нижнего и верхнего квартилей.

Усредненные фармакокинетические кривые омберацетама интактных животных и кроликов после курсового введения ингибитора Pgp (верапамила) представлены на рисунке 34.

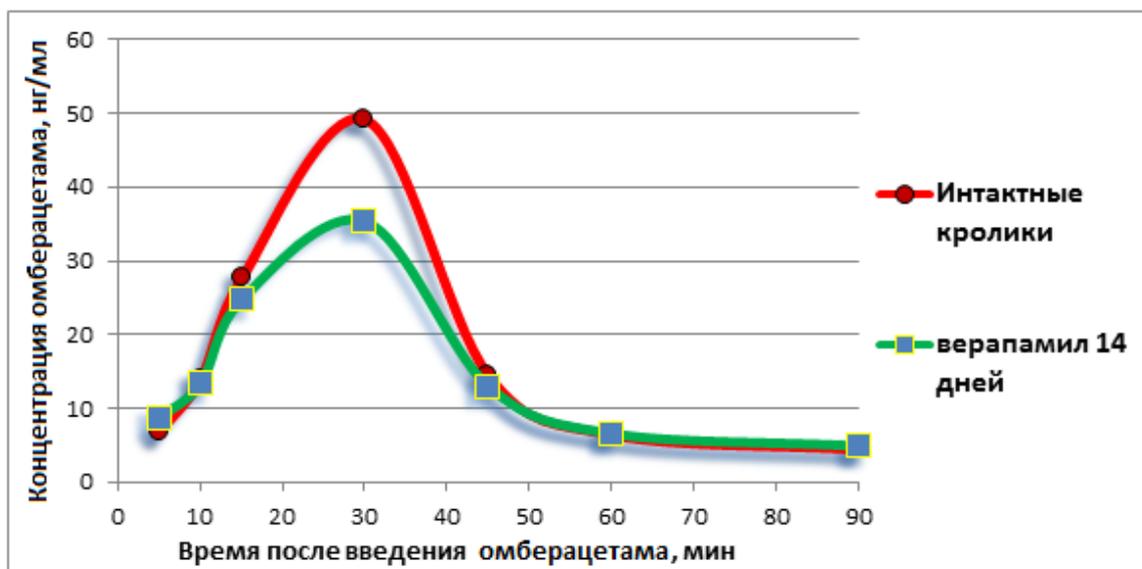


Рисунок 34 – Усредненные фармакокинетические кривые омберацетама (50 мг/кг внутрижелудочно) в норме и на фоне 14-дневного введения верапамила (20 мг/кг 3 раза в день внутрижелудочно)

Отсутствие влияния верапамила на фармакокинетику омберацетама (только коэффициент абсорбции C_{max}/AUC_{0-t} , характеризующий интенсивность всасывания вещества в кишечнике, имел тенденцию к снижению в 0,75 раза (90%-й ДИ 0,60–0,94; $p=0,0512$), что, однако не имеет клинической значимости из-за пересечения ДИ диапазона 0,8–1,25) и отвергает нашу гипотезу о принадлежности данного лекарственного средства к числу субстратов Pgp.

14-дневное введение кроликам-самцам омберацетама не вызвало статистически значимых изменений ни одного из исследованных фармакокинетических параметров фексофенадина (таблица 27).

Таблица 27 – Фармакокинетические параметры фексфенадина (67,5 мг/кг внутрижелудочно) до и после 14-дневного введения омберацетама (10 мг/кг 1 раз в день внутрижелудочно), а также на 5-й день его отмены

Исследуемый показатель	Исходные значения, n=6	Омберацетам, 14 дней, n=6	5-й день отмены омберацетама, n=6	p (1-2; 1-3; 2-3)
C_{max} , нг/мл	241,31 (138,24; 421,25)	360,73 (171,77; 757,54)	331,24 (209,05; 524,87)	0,305; 0,247; 0,747
T_{max} , ч	7,0 (2,0; 10,0)	3,5 (3,0; 6,0)	1,5 (1,0; 3,0)	0,695; 0,265; 0,236
$T_{1/2}$, ч	12,36 (4,90; 31,16)	12,23 (5,52; 27,10)	12,75 (6,24; 26,05)	0,985; 0,955; 0,997
AUC_{0-t} , (нг/мл)*ч	2520,36 (1012,94; 6271,05)	3023,88 (5433,92; 1682,74)	2799,49 (2318,13; 3380,80)	0,805; 0,722; 0,794
$AUC_{0-\infty}$, (нг/мл)*ч	4218,57 (1274,52; 13963,16)	4795,54 (10433,97; 2204,08)	4225,20 (2985,21; 5980,27)	0,957; 0,997; 0,785
C_{max}/AUC_{0-t} , 1/ч	0,10 (0,15; 0,06)	0,12 (0,21; 0,07)	0,12 (0,20; 0,07)	0,697; 0,446; 0,976
MRT, ч	17,83 (7,07; 44,96)	17,65 (7,97; 39,11)	18,40 (9,00; 37,60)	0,985; 0,955; 0,997
K_{el} , 1/ч	0,06 (0,13; 0,03)	0,06 (0,13; 0,03)	0,05 (0,11; 0,03)	1,000; 0,994; 0,917

Примечание: данные представлены в виде среднего геометрического и его 95%-го доверительного интервала. Значения T_{max} представлены в виде медианы, нижнего и верхнего квартилей.

Усредненные фармакокинетические кривые фексофенадина интактных животных, кроликов после курсового введения омберацетама и на 5-й день отмены препарата представлены на рисунке 35.

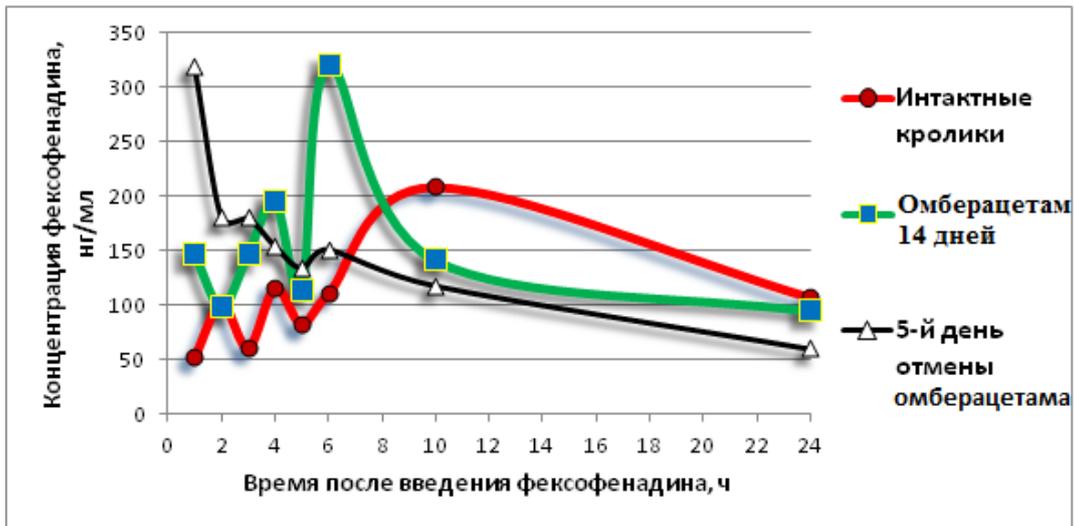


Рисунок 35 – Усредненные фармакокинетические кривые фексофенадина (67,5 мг/кг внутрижелудочно) в норме, на фоне 14-дневного введения омберацетама (10 мг/кг 1 раз в день внутрижелудочно) и на 5-й день его отмены

Отсутствие изменений фармакокинетики фексофенадина (прежде всего наиболее показательных параметров – максимальной концентрации и площади под фармакокинетической кривой концентрация-время) после курсового введения кроликам омберацетама свидетельствует о том, что скорость абсорбции маркерного субстрата в кишечнике и интенсивность его экскреции не изменялись, что демонстрирует сохранение функциональной активности Pgp на исходном уровне.

Курсовое введение кроликам омберацетама также не вызывало изменения относительного количества Pgp в печени, 12-перстной кишке и коре головного мозга по сравнению с показателями интактных животных (таблица 28). На рисунке 36 представлены фотографии образцов печени, 12-перстной кишки и коры головного мозга кроликов после иммуногистохимической обработки в норме и на фоне 14-дневного введения омберацетама.

Таблица 28 – Относительное количество Pgr в органах (медиана, верхний и нижний квартиль) в норме и на фоне 14-дневного введения омберацетама (10 мг/кг 1 раз в день внутрижелудочно)

Исследуемый показатель	Интактные кролики, n=5	Омберацетам, 14 дней, n=5	p
Печень (относительная площадь мембран гепатоцитов, содержащих Pgr, %)	20,47 (17,62; 21,52)	20,48 (18,50; 21,96)	0,465
Тонкая кишка (интенсивность окраски мембран энтероцитов в условных единицах)	192,16 (184,94; 196,97)	177,61 (174,82; 182,78)	0,100
Кора головного мозга (относительная площадь ГЭБ, содержащего Pgr, %)	0,58 (0,55; 0,87)	0,67 (0,54; 0,91)	0,917

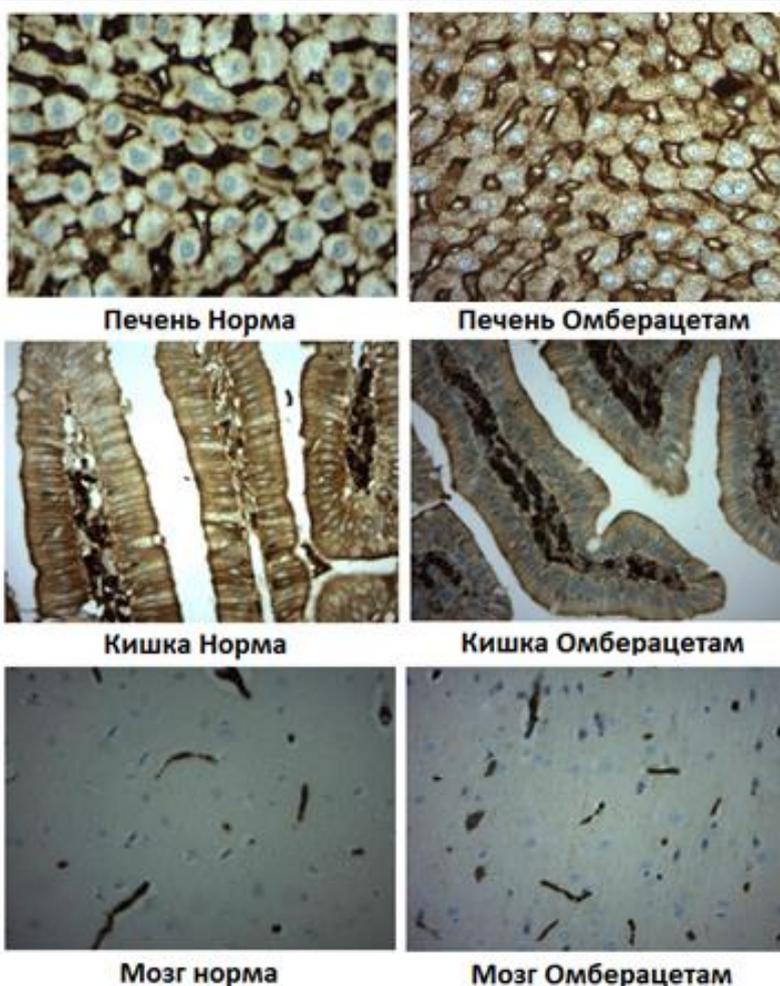


Рисунок 36 – Срезы печени, 12-перстной кишки и коры головного мозга интактных кроликов и на фоне курсового введения омберацетама (10 мг/кг 1 раз в день внутрижелудочно), обработанные иммуногистохимически (увеличение в 400 раз)

Таким образом, омберацетам не является субстратом Pgp, а также не изменяет активность транспортера. Это делает препарат безопасным с точки зрения фармакокинетических межлекарственных взаимодействий на уровне Pgp и подтверждает незначимое участие транспортера в регуляции проникновения омберацетама через ГЭБ в головной мозг.

Полученные результаты опубликованы в статьях с соавторами:

Якушева, Е.Н. Методика определения принадлежности лекарственных средств к числу субстратов гликопротеина-P [Текст] / Е.Н. Якушева, И.В. Черных, А.В. Шулькин, М.В. Гацанога // Российский медико-биологический вестник им. акад. И.П. Павлова. – 2015, №3. – С.49–53.

Черных, И.В. Анализ принадлежности препарата ноопепт к субстратам и модуляторам функциональной активности ABCB1-белка в эксперименте in vivo [Текст] / И.В. Черных, А.В. Шулькин, Е.Н. Якушева, М.В. Гацанога // Российский медико-биологический вестник им. академика И.П. Павлова. – 2017. – Т.25, №1. – С.30–41.

Якушева, Е.Н. Оценка принадлежности лекарственных препаратов к ингибиторам и индукторам белка-транспортера гликопротеина-P в эксперименте in vivo [Текст] / Е.Н. Якушева, Д.А. Сычев, А.В. Шулькин, И.В. Черных, М.В. Гацанога // Экспериментальная и клиническая фармакология. – 2018. – Т.81, №1. – С.17–23.

3.2.1.4.3. Принадлежность фабомотизола к субстратам гликопротеина-P и модуляторам его функционирования

В таблицах 29 и 30 представлены фармакокинетические параметры фабомотизола в норме и на фоне курсового внутрижелудочного введения кроликам индуктора и ингибитора Pgp – рифампицина и верапамила соответственно.

Таблица 29 – Фармакокинетические параметры фабомотизола (3,8 мг/кг внутрижелудочно) до и после курсового введения рифампицина (20 мг/кг 2 раза в день внутрижелудочно)

Исследуемый показатель	Интактные кролики, n=6	Рифампицин 14 дней, n=6	p
C_{max} , нг/мл	381,81 (203,00; 718,11)	235,26 (158,13; 350,01)	0,174
T_{max} , мин	5,0 (5,0; 10,0)	5,0 (5,0; 5,0)	1,000
$T_{1/2}$, мин	88,26 (27,49; 283,38)	72,32 (47,35; 110,44)	0,596
AUC_{0-t} , (нг/мл)*ч	11568,47 (6037,34; 22166,98)	9005,91 (5979,30; 13564,52)	0,335
$AUC_{0-\infty}$, (нг/мл)*ч	15768,75 (10440,89; 23815,35)	10625,97 (7556,48; 14942,30)	0,106
C_{max}/AUC_{0-t} , 1/мин	0,033 (0,027; 0,040)	0,026 (0,019; 0,035)*	0,043
MRT, мин	127,35 (39,66; 408,92)	104,35 (68,33; 159,36)	0,596
K_{el} , 1/мин	0,008 (0,002; 0,025)	0,010 (0,006; 0,015)	0,596

Примечание: * – достоверные различия с показателями интактных животных. Данные представлены в виде среднего геометрического и его 95%-го доверительного интервала. Значения T_{max} представлены в виде медианы, нижнего и верхнего квартилей.

Таблица 30 – Фармакокинетические параметры фабомотизола (3,8 мг/кг внутрижелудочно) до и после курсового введения верапамила (20 мг/кг 3 раза в день внутрижелудочно)

Исследуемый показатель	Интактные кролики, n=6	Верапамил 14 дней, n=6	p
C_{max} , нг/мл	410,57 (346,87; 485,96)	286,82 (211,01; 389,88)	0,056
T_{max} , мин	5,0 (5,0; 5,0)	15,0 (5,0; 15,0)	0,068
$T_{1/2}$, мин	58,31 (32,59; 104,31)	75,64 (41,77; 136,97)	0,411
AUC_{0-t} , (нг/мл)*мин	11095,76 (9729,99; 12653,23)	9996,52 (7040,49; 14193,66)	0,402
$AUC_{0-\infty}$, (нг/мл)*мин	12412,08 (11626,79; 13250,42)	13430,32 (9758,40; 18483,91)	0,501
C_{max}/AUC_{0-t} , 1/ч	0,037 (0,031; 0,045)	0,028 (0,022; 0,035)	0,061
MRT, мин	84,14 (47,03; 150,52)	109,14 (60,27; 197,65)	0,411
K_{el} , 1/мин	0,012 (0,007; 0,021)	0,009 (0,005; 0,017)	0,411

Примечание: данные представлены в виде среднего геометрического и его 95%-го доверительного интервала. Значения T_{max} представлены в виде медианы, нижнего и верхнего квартилей.

Усредненные фармакокинетические кривые фабомотизола intactных животных и кроликов после курсового введения индуктора и ингибитора P_{gp} представлены соответственно на рисунках 37 и 38.



Рисунок 37 – Усредненные фармакокинетические кривые фабомотизола (3,8 мг/кг внутрижелудочно) в норме и на фоне 14-дневного введения рифампицина (20 мг/кг 2 раза в день внутрижелудочно)

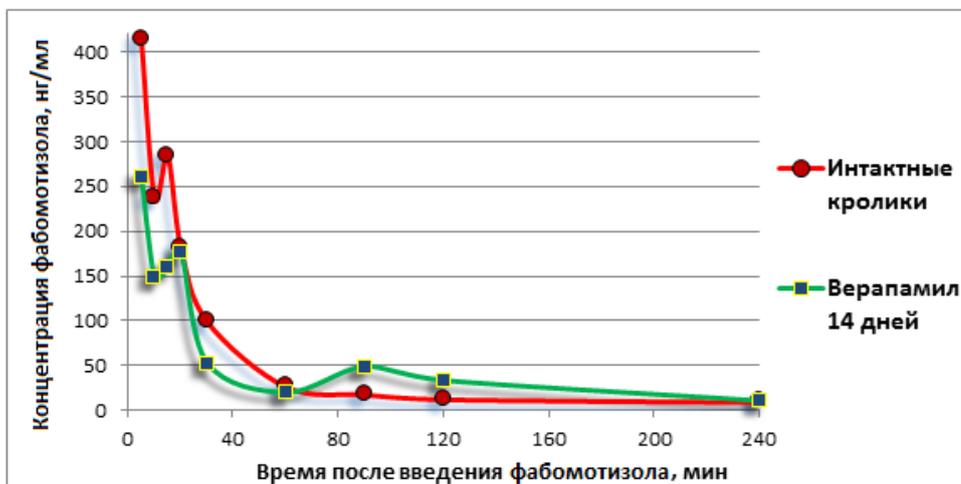


Рисунок 38 – Усредненные фармакокинетические кривые фабомотизола (3,8 мг/кг внутрижелудочно) в норме и на фоне 14-дневного введения верапамила (20 мг/кг 3 раза в день внутрижелудочно)

Из приведенных таблиц видно, что лишь коэффициент абсорбции фабомотизола (C_{\max}/AUC_{0-t}) на фоне применения рифампицина достоверно снижался в 1,27 раза по сравнению с аналогичным параметром intactных животных (90%-й ДИ 0,66–0,94; $p=0,043$). Однако это изменение не имело

клинической значимости, т.к. 90%-й доверительный интервал значительно перекрывал диапазон 0,80–1,25. Слабовыраженная тенденция к снижению площади под фармакокинетической кривой ($AUC_{0-\infty}$) в данной серии, вероятно, связано с индукцией микросомальных ферментов печени под действием рифампицина и интенсификацией метаболизма фабомотизола. В серии верапамила ни один из фармакокинетических параметров фабомотизола статистически значимо от контрольных значений не отличался.

Введение кроликам-самцам фабомотизола курсом 14 дней, а также «отмывка» от препарата в течение 3 дней приводили к следующей динамике основных фармакокинетических параметров фексофенадина (таблица 31):

Таблица 31 – Фармакокинетические параметры фексофенадина (67,5 мг/кг внутрижелудочно) до и после курсового введения животным фабомотизола (3,8 мг/кг 1 раз в день внутрижелудочно), а также на 5-й день его отмены

Изучаемый показатель	Интактные кролики, n=6	Фабомотизол, 14 дней, n=6	5-й день отмены фабомотизола, n=6	p (1-2; 1-3; 2-3)
C_{max} , нг/мл	138,30 (66,01; 289,76)	273,28 (146,46; 509,93)	241,94 (65,67; 891,28)	0,152; 0,335; 0,317
T_{max} , ч	5,0 (3,0; 10,0)	4,0 (1,0; 6,0)	1,0 (1,0; 2,0)	0,554; 0,068; 0,297
$T_{1/2}$, ч	6,81 (4,83; 9,61)	8,62 (4,37; 17,00)	13,19 (4,25; 40,91)	0,621; 0,641; 0,692
AUC_{0-t} , (нг/мл)*ч	993,91 (553,34; 1785,26)	2038,46 (873,14; 4759,05)	1657,67 (622,73; 4412,64)	0,054; 0,469; 0,074
$AUC_{0-\infty}$, (нг/мл)*ч	1174,34 (599,08; 2302,00)	2720,92 (1126,62; 6571,34)*	241687 (823,64; 7091,99)	0,040; 0,284; 0,101
C_{max}/AUC_{0-t} , 1/ч	0,14 (0,23; 0,09)	0,13 (0,02; 0,09)	0,15 (0,29; 0,07)	0,482; 0,7456; 0,5548
MRT, ч	9,83 (6,97; 13,87)	12,44 (6,31; 24,53)	19,03 (6,14; 59,03)	0,621; 0,641; 0,692
K_{el} , 1/ч	0,100 (0,072; 0,144)	0,080 (0,041; 0,159)	0,053 (0,017; 0,163)	0,621; 0,641; 0,692

Примечание: * – достоверные различия с показателями интактных животных. Данные представлены в виде среднего геометрического и его 95%-го доверительного интервала. Значения T_{max} представлены в виде медианы, нижнего и верхнего квартилей.

Усредненные фармакокинетические кривые фексофенадина интактных животных, кроликов после курсового введения фабомотизола и на 5-й день отмены препарата представлены на рисунке 39.

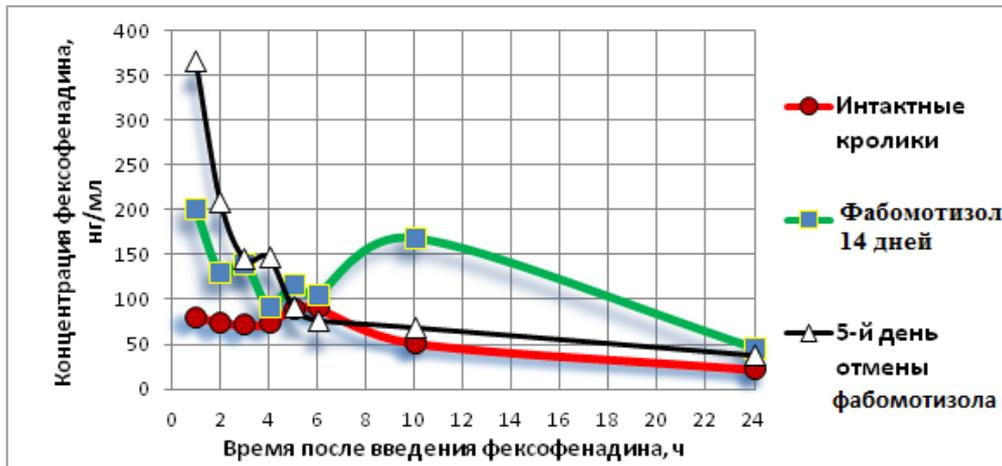


Рисунок 39 – Усредненные фармакокинетические кривые фексофенадина (67,5 мг/кг внутрижелудочно) в норме, на фоне 14-дневного введения фабомотизола (3,8 мг/мг 1 раз в день внутрижелудочно) и на 5-й день его отмены

В исследовании было выявлено, что на фоне курсового введения животным фабомотизола происходило увеличение $AUC_{0-\infty}$ фексофенадина в 2,32 раза (90%-й ДИ 1,35–3,98, $p=0,040$). Остальные фармакокинетические параметры от показателей интактных животных не отличались. Однако имелась выраженная тенденция к возрастанию AUC_{0-t} в 2,051 раза (90%-й ДИ 1,23–3,41, $p=0,054$).

На 5-й день отмены фабомотизола параметры фармакокинетики маркерного субстрата P_{gr} достоверно от значений интактных животных не отличались ($p>0,05$).

Следует отметить, что результаты о влиянии фабомотизола на функциональную активность P_{gr} *in vivo* были в дальнейшем подтверждены нами в исследовании на добровольцах [105].

Курсовое введение кроликам фабомотизола приводило к снижению относительного количества P_{gr} в мембранах гепатоцитов в 1,31 раза ($p=0,032$) по сравнению с показателями интактных животных. В 12-перстной кишке и коре головного мозга относительное количество транспортера достоверно не изменялось (таблица 32). На рисунке 40 представлены фотографии образцов

печени, 12-перстной кишки и коры головного мозга кроликов после иммуногистохимической обработки в норме и на фоне 14-дневного введения фабомотизола.

Таблица 32 – Относительное количество Pgr в органах (медиана, верхний и нижний квартиль) в норме и на фоне 14-дневного введения фабомотизола (3,8 мг/кг 1 раз в день внутрижелудочно)

Изучаемый показатель	Интактные кролики, n=5	14 дней введения фабомотизола, n=5	p
Печень (относительная площадь мембран гепатоцитов, содержащих Pgr, %)	20,47 (17,62; 21,52)	15,6 (14,3; 19,6)	0,032
Тонкая кишка (интенсивность окраски мембран энтероцитов в условных единицах)	192,16 (184,94; 196,97)	190,56 (184,94; 197,76)	0,841
Кора головного мозга (относительная площадь ГЭБ, содержащего Pgr, %)	0,58 (0,55; 0,87)	0,58 (0,58; 1,17)	0,601

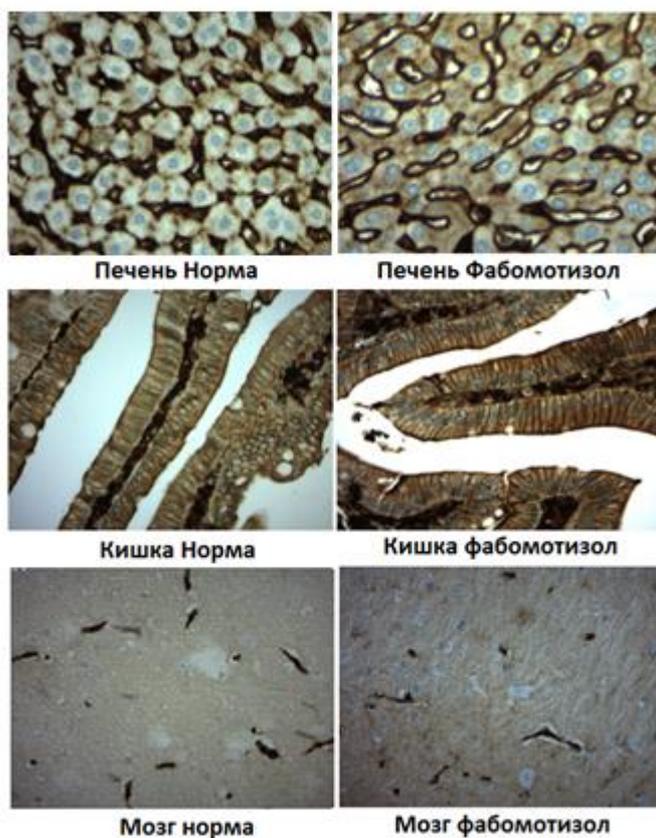


Рисунок 40 – Срезы печени, тонкого кишечника и коры головного мозга интактных кроликов и на фоне курсового введения фабомотизола (3,8 мг/кг 1 раз в день внутрижелудочно), обработанные иммуногистохимически (увеличение в 400 раз)

Таким образом, фабомотизол не является субстратом Pgp. С другой стороны протестированное вещество снижает функциональную активность белка-транспортера, вероятно, опосредованно, изменяя также его относительного количество на мембранах гепатоцитов.

Полученные результаты опубликованы в статьях с соавторами:

*Якушева, Е.Н. Методика определения принадлежности лекарственных средств к числу субстратов гликопротеина-P [Текст] / Е.Н. Якушева, **И.В. Черных**, А.В. Шулькин, М.В. Гацанога // Российский медико-биологический вестник им. акад. И.П. Павлова. – 2015, №3. – С.49–53.*

***Черных, И.В.** Изучение принадлежности фабомотизола к субстратам гликопротеина-P [Текст] / **И.В. Черных**, А.В. Шулькин, Е.Н. Якушева, М.В. Гацанога, Н.М. Попова // Российский медико-биологический вестник имени академика И.П. Павлова. – 2017. – Т.25, №4. – С.538–550.*

*Якушева, Е.Н. Влияние афобазола на функциональную активность и экспрессию гликопротеина-P [Текст] / Е.Н. Якушева, **И.В. Черных**, А.В. Шулькин, М.В. Гацанога // Экспериментальная и клиническая фармакология. – 2017. – Т.80, №9. – С.69–72.*

*Якушева, Е.Н. Оценка принадлежности лекарственных препаратов к ингибиторам и индукторам белка-транспортера гликопротеина-P в эксперименте *in vivo* [Текст] / Е.Н. Якушева, Д.А. Сычев, А.В. Шулькин, **И.В. Черных**, М.В. Гацанога // Экспериментальная и клиническая фармакология. – 2018. – Т.81, №1. – С.17–23.*

*Якушева, Е.Н. Влияние афобазола на функциональную активность ABCB1-белка у добровольцев с низкой тревожностью [Текст] / Е.Н. Якушева, **И.В. Черных**, А.В. Шулькин, М.В. Гацанога, А.А. Никифоров // Экспериментальная и клиническая фармакология. – 2019. – Т.82, №3. – С.17–21.*

*Патент на изобретение №2649134. Средство для снижения функциональной активности и экспрессии гликопротеина-P. Авторы: Якушева Е.Н., Середенин С.Б., Яркова М.А., **Черных И.В.**, Шулькин А.В., Гацанога М.В. Дата*

государственной регистрации в Государственном реестре изобретений Российской Федерации 29 марта 2018 г.

3.3. Функциональная активность гликопротеина-R на уровне целостного организма на фоне глобальной ишемии мозга

В предварительных исследованиях нами было продемонстрировано, что ни введение дистиллированной воды, ни экспериментальные манипуляции с кроликами не приводят к изменению функциональной активности Pgr на уровне целостного организма [117]. Это позволяет анализировать функционирование данного белка-транспортера, используя последовательный дизайн. Кроме того, нами выявлены половые различия функционирования Pgr у кроликов породы Шиншилла [114] и показана целесообразность изучения функциональной активности Pgr на самцах [16], что используется в данном исследовании.

Односторонняя окклюзия общей сонной артерии у кроликов по данным научной литературы вызывает ишемию на фоне снижения артериального давления, которое возникает в связи с анестезией комбинацией ксилазина (обладает выраженным симпатолитическим эффектом) и золетила [40]. В связи с тем, что активация перекисного окисления липидов является типичным следствием церебральной ишемии для косвенного подтверждения ее развития у животных оценивалась интенсивность липопероксидации в гемолизате.

Уровень липопероксидации в гемолизате кроликов в норме и на 7-е сутки после моделирования патологии представлен в таблице 33.

Таблица 33 – Выраженность окислительного стресса в гемолизате кроликов на 7-й день односторонней окклюзии общей сонной артерии

Номер животного	Исследуемый показатель					
	ТБК-реактивные продукты, нмоль/мг белка		SH-группы, мкмоль/мг белка		Активность G-per, нмоль НАДФН/мг белка*мин	
	Норма	7 дней ишемии	Норма	7 дней ишемии	Норма	7 дней ишемии
Кролик 1	3,96	3,12	17,86	15,74	6,70	9,10

Продолжение таблицы 33						
Кролик 2	4,14	4,17	26,67	20,54	5,60	6,16
Кролик 3	3,25	4,04	17,52	17,93	6,09	5,33
Кролик 4	3,75	3,23	18,53	16,68	4,64	6,19
Кролик 5	3,26	3,21	21,91	15,56	4,45	8,43
Кролик 6	3,03	3,37	23,36	17,72	4,74	5,80
Кролик 7	2,88	3,10	26,21	19,34	5,48	4,84
Кролик 8	4,00	3,38	21,16	16,35	6,97	10,41
Кролик 9	4,35	4,01	22,87	17,95	7,25	5,38

Примечание: цветом выделены показатели, изменение которых свидетельствует о развитии окислительного стресса.

В дальнейшем фармакокинетические параметры фексофенадина рассчитывались для 4 животных (кролики 2, 3, 6 и 7) в связи с возрастанием уровня ТБК-реактивных продуктов – основного показателя активации липопероксидации. У кроликов 1, 4, 5 и 8 данный показатель снижался на фоне одновременного снижения уровня свободных сульфгидрильных групп и возрастания активности антиоксидантного фермента глутатионпероксидазы, что может являться доказательством компенсированного окислительного стресса. Поэтому указанные животные также использовались в дальнейшем эксперименте. В итоге анализу подверглось 8 кроликов.

Окклюзия общей сонной артерии кроликов не вызывала изменений параметров фармакокинетики маркерного субстрата Pgr – фексофенадина (таблица 34), что свидетельствует о сохранении функциональной активности транспортера на исходном уровне.

Таблица 34 – Фармакокинетические параметры фексофенадина до и после односторонней окклюзии общей сонной артерии

Изучаемый показатель	Интактные кролики, n=8	Ишемия, n=8	p
C _{max} , нг/мл	150,14 (126,85; 177,69)	177,98 (132,72; 238,66)	0,389
T _{max} , ч	4,0 (2,5; 10,0)	7,5 (4,0; 10,0)	0,109

Продолжение таблицы 34			
$T_{1/2}$, ч	43,12 (15,85; 117,33)	13,91 (5,54; 34,92)	0,279
AUC_{0-t} , (нг/мл)*ч	2224,55 (1689,08; 2929,77)	2324,72 (1664,45; 3246,91)	0,580
$AUC_{0-\infty}$, (нг/мл)*ч	8582,99 (2894,28; 25452,83)	4332,57 (2399,28; 7823,66)	0,368
C_{max}/AUC_{0-t} , 1/ч	0,067 (0,082; 0,055)	0,078 (0,096; 0,064)	0,475
MRT, ч	62,22 (22,87; 169,30)	20,08 (8,00; 50,38)	0,279
K_{el} , 1/ч	0,016 (0,044; 0,006)	0,050 (0,124; 0,020)	0,281

Примечание: данные представлены в виде медианы, нижнего и верхнего квартилей

Усредненные фармакокинетические кривые фексофенадина интактных кроликов и животных на фоне ишемии представлены на рисунке 41.

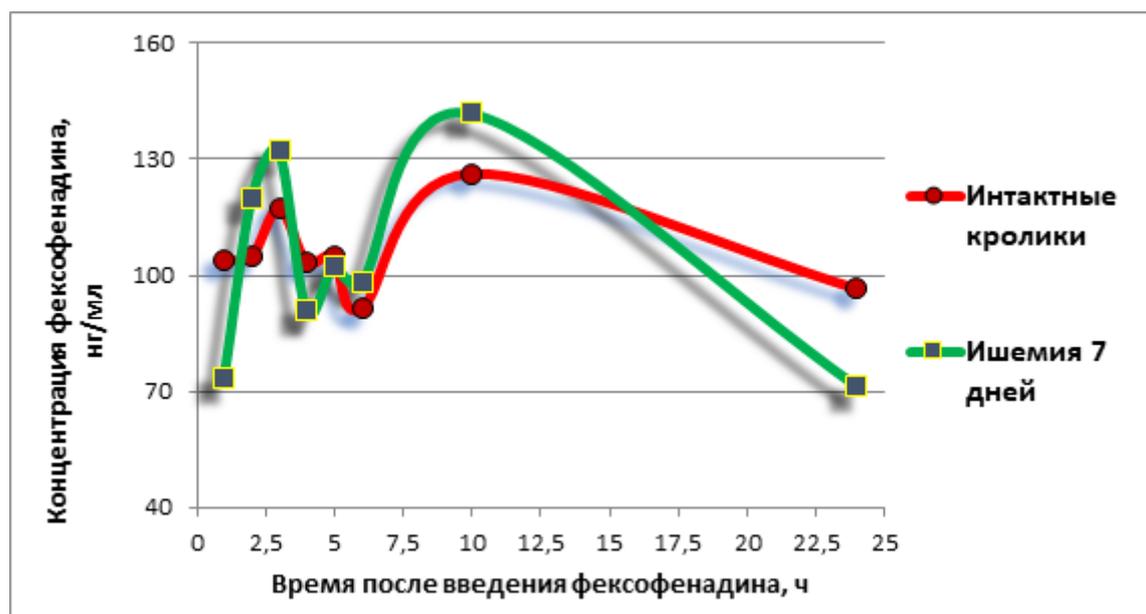


Рисунок 41 – Усредненные фармакокинетические кривые фексофенадина интактных кроликов и животных на фоне ишемии головного мозга, вызванной односторонней окклюзией общей сонной артерии

Таким образом, активность Pgp на уровне целостного организма не изменяется на фоне ишемии мозга. Это позволяет использовать такой показатель, как содержание маркерных субстратов белка-транспортера в головном мозге

животных в качестве характеристики его функциональной активности в ГЭБ при моделировании ишемических патологий.

Полученные результаты опубликованы в статьях с соавторами:

Якушева, Е.Н. Функциональная активность и экспрессия гликопротеина-Р при экспериментальных манипуляциях / Е.Н. Якушева, А.В. Шулькин, И.В. Черных, Д.С. Титов // Российский медико-биологический вестник им. акад. И.П. Павлова. – 2014. – Т.22, №2. – С.75–78.

Якушева, Е.Н. Половые различия функциональной активности и экспрессии гликопротеина-Р у кроликов / Е.Н. Якушева, И.В. Черных, А.В. Шулькин, А.А. Котлярова, А.А. Никифоров // Российский физиологический журнал им. И.М. Сеченова. – 2014. – Т.100, №8. – С.944–952.

Гацанога, М.В. Можно ли оценивать принадлежность лекарственных веществ к субстратам гликопротеина-Р на самках кроликов породы шиншилла / М.В. Гацанога, И.В. Черных, А.В. Шулькин, Е.Н. Якушева, Н.М. Попова // Наука молодых – Eruditio Juvenium. – 2016, №3. – С.5–10.

Черных, И.В. Функциональная активность гликопротеина-Р на фоне ишемии головного мозга [Текст] / И.В. Черных, А.В. Шулькин, М.В. Гацанога, Н.М. Попова, А.С. Есенина, М.М. Градинарь, Е.Н. Якушева // Наука молодых (Eruditio Juvenium). – 2019. – Т.7, №1. – С.46–52.

3.4. Методика оценки функциональной активности гликопротеина-Р в гематоэнцефалическом барьере коры больших полушарий головного мозга

3.4.1. Валидация методики количественного определения фексофенадина в плазме крови крыс

Для анализа активности Рgp в ГЭБ по степени проникновения фексофенадина (маркерного субстрата транспортера) в ткань коры головного мозга необходимо было разработать ВЭЖХ методики определения данного вещества в гомогенате коры головного мозга и в плазме крови крыс.

При анализе концентрации фексофенадина в плазме крови и гомогенате мозга у крыс вистар использовался высокоэффективный жидкостный хроматограф «Stayer» (Россия) с инжектором «Rheodyne» (США) и УФ-спектрофотометрическим детектором при длине волны 220 нм в изократическом режиме. Применялась хроматографическая колонка Phenomenex Synergi 4u Polar-RP 80A (250x4,6) с зернением 4 мкм. Температура разделения – 45°C. Скорость потока подвижной фазы – 1,0 мл/мин. Состав подвижной фазы: вода деионизированная – ацетонитрил – ледяная уксусная кислота (50 – 50 – 0,1), рН=5,5. Время удерживания фексофенадина в указанных условиях в обеих тканях составило $14,91 \pm 0,25$ мин. Значение рН подвижной фазы являлось критическим параметром для времени удерживания целевого вещества.

У крыс в соответствующий временной срок после внутривенного введения фексофенадина под глубоким наркозом из брюшной аорты забиралась кровь в объеме 4 мл в гепаринизированные пробирки. После центрифугирования в течение 10 мин при 1750 g отбиралась плазма крови и хранилась при -80°C до последующего анализа.

Для выделения фексофенадина к 1,5 мл плазмы крови крыс прибавляли 4 мл ацетонитрила, встряхивали на приборе Shaker при 400 об./мин 15 мин, центрифугировали при 1750 g 15 мин и упаривали супернатант при 50°C. Коэффициент извлечения фексофенадина составил 83,6%.

Для построения калибровочных графиков готовили 6 стандартных растворов фексофенадина в плазме крови крыс следующих концентраций: 100, 400, 800, 2000, 10000 и 17000 нг/мл. Данные растворы были проанализированы в течение эксперимента троекратно. По полученным значениям были построены три калибровочных графика зависимости концентрации фексофенадина в плазме крови от площади его хроматографического пика. Графики представлены на рисунках 42–44.

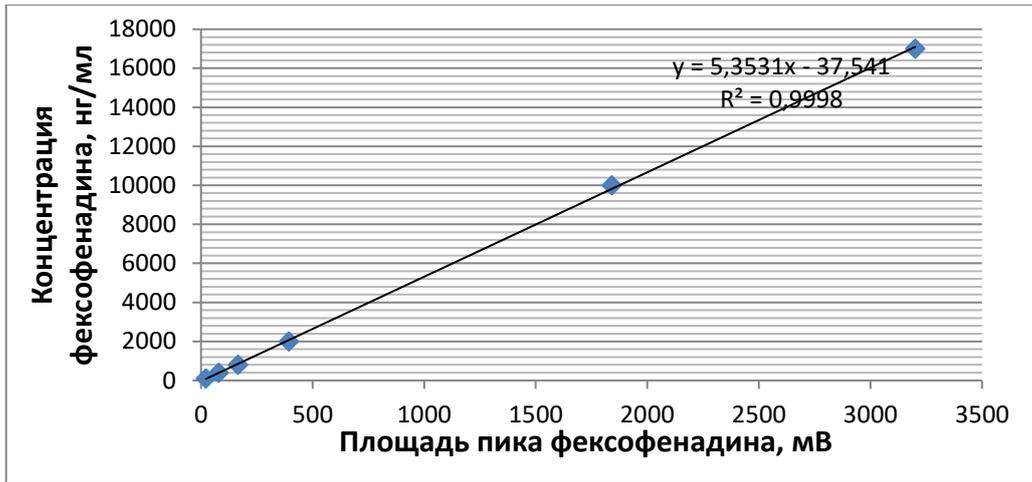


Рисунок 42 – Калибровочный график №1 зависимости концентрации фексофенадина в плазме крови крыс от площади его хроматографического пика

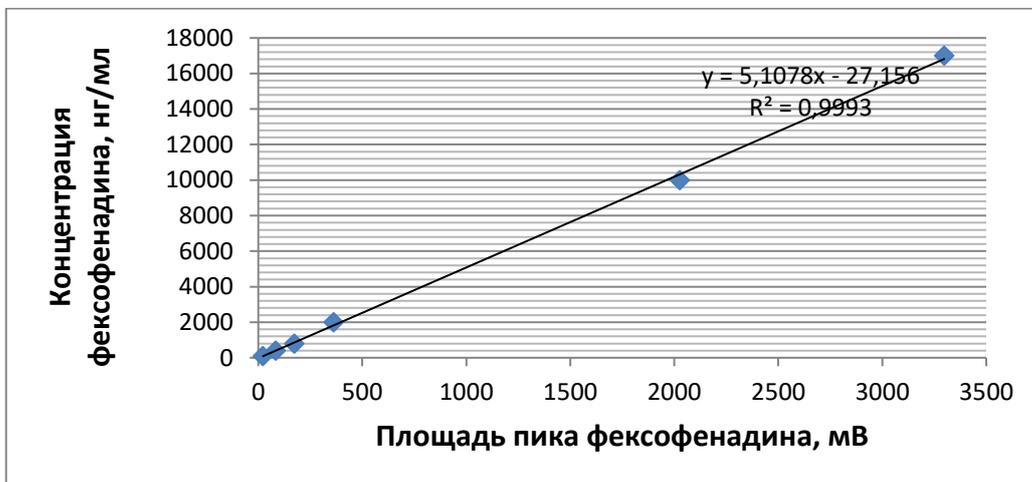


Рисунок 43 – Калибровочный график №2 зависимости концентрации фексофенадина в плазме крови крыс от площади его хроматографического пика

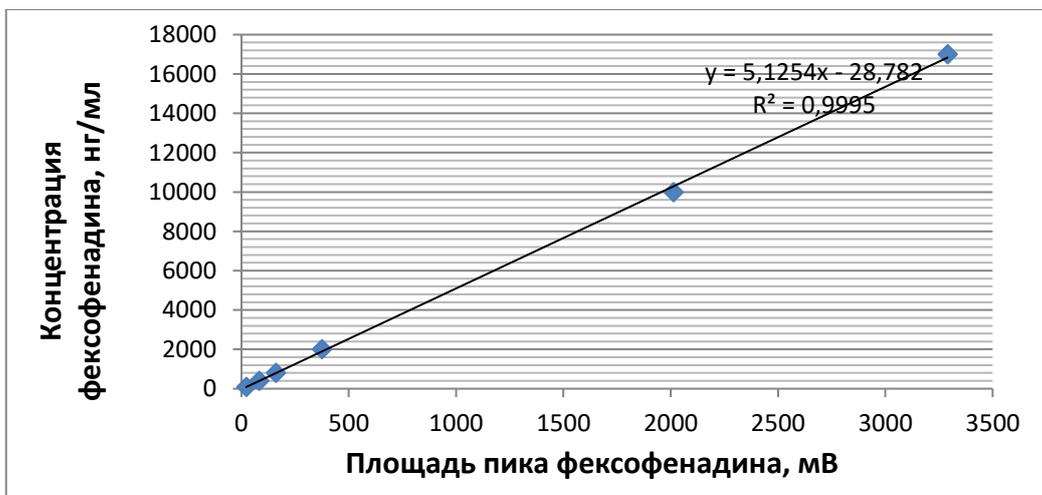


Рисунок 44 – Калибровочный график №3 зависимости концентрации фексофенадина в плазме крови крыс от площади его хроматографического пика

Рассчитанные коэффициенты корреляции составили более 0,99. Отклонения концентраций калибровочных образцов, рассчитанные по уравнениям линейных зависимостей, от номинальных значений приведены в таблице 35.

Таблица 35 – Отклонения концентраций калибровочных растворов, рассчитанные по уравнениям линейных зависимостей, от номинальных значений

Концентрация номинальная, нг/мл	График 1		График 2		График 3	
	Концентрация рассчитанная, нг/мл	Точность, %	Концентрация рассчитанная, нг/мл	Точность, %	Концентрация рассчитанная, нг/мл	Точность, %
100	80,07	19,93	86,24	13,76	85,16	14,84
400	385,94	3,51	396,13	0,97	397,45	0,64
800	853,43	6,68	858,49	7,31	795,13	0,61
2000	2066,98	3,35	1817,32	9,13	1896,98	5,15
10000	9821,21	1,79	10323,44	3,23	10291,67	2,92
17000	17092,38	0,54	16818,37	1,07	16833,78	0,98

Для анализа точности и прецизионности выполняли анализ образцов интактной плазмы крови крыс с добавлением стандартных растворов фексофенадина до получения концентраций 100, 800, 2000 и 10000 нг/мл.

Полученные величины прецизионности (относительного стандартного отклонения) и точности (относительной погрешности) соответствовали принятым нормам (не более 20% для нижнего предела количественного определения и не более 15% – для остальных точек) (таблицы 36, 37).

Таблица 36 – Точность и прецизионность методики количественного определения фексофенадина в плазме крови крыс внутри цикла

Концентрация номинальная, нг/мл	Концентрация рассчитанная, нг/мл	Точность, %	Среднее, нг/мл	Средняя точность, %	SD	Прецизионность, %
100	85,06	14,94	85,50	14,59	2,12	2,48
	86,24	13,76				
	86,39	13,61				
	87,00	12,99				
	82,35	17,64				

Продолжение таблицы 36						
400	376,92	5,77	391,48	2,15	9,62	2,46
	396,13	0,97				
	397,61	0,60				
	400,16	0,041				
	386,58	3,36				
2000	1980,92	0,95	1924,91	3,75	70,44	3,66
	1982,71	0,86				
	1891,99	5,40				
	1951,61	2,42				
	1817,32	9,13				
10000	9379,83	6,20	10238,99	4,87	518,37	5,06
	10323,44	3,23				
	10257,86	2,58				
	10764,45	7,64				
	10469,37	4,69				

Таблица 37 – Точность и прецизионность методики количественного определения фексофенадина в плазме крови крыс между циклами

Концентрация номинальная, нг/мл	Концентрация рассчитанная, нг/мл	Точность, %	Среднее, нг/мл	Средняя точность, %	SD	Прецизионность, %
100	85,06	14,94	82,98	17,016	2,60	3,13
	80,07	19,93				
	83,82	16,18				
400	376,92	5,77	379,85	5,037	5,28	1,39
	385,94	3,51				
	376,69	5,83				
2000	1980,92	0,95	2011,37	1,66	48,23	2,40
	2066,98	3,35				
	1986,22	0,69				
10000	9379,83	6,20	9537,22	4,63	246,42	2,58
	9821,21	1,79				
	9410,62	5,89				

На рисунке 45 представлен образец хроматограммы интактной плазмы крови крысы, на рисунке 46 – хроматограмма плазмы крови крысы через 30 мин после внутривенного введения фексофенадина в дозе 10 мг/кг массы и проведения пробоподготовочных манипуляций. Как видно, пики фексофенадина отделены от

пиков соэкстрактивных эндогенных веществ, что позволяет достоверно определить анализируемое соединение.

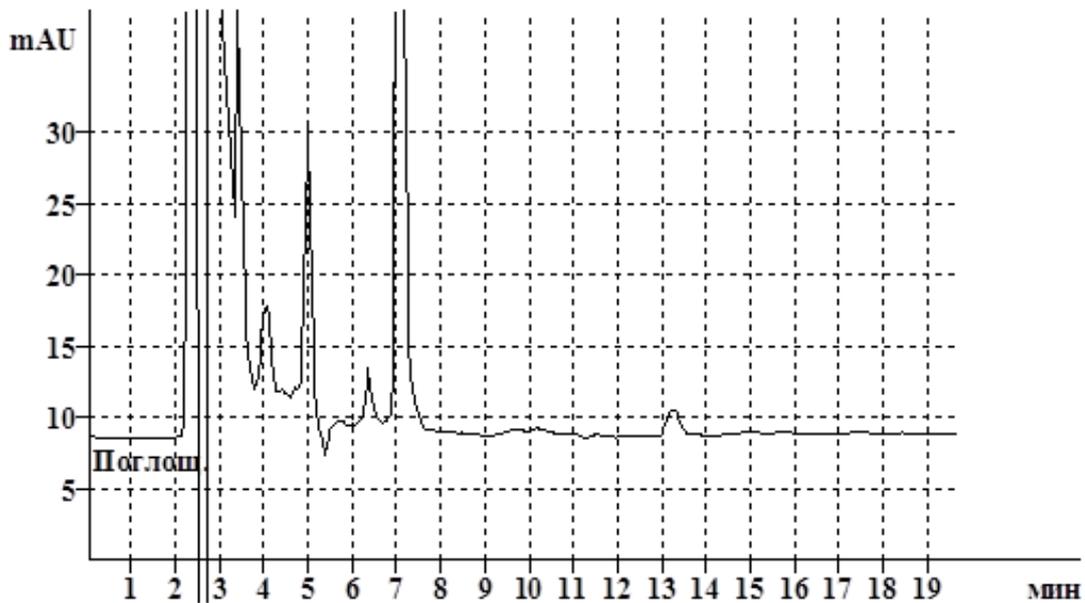


Рисунок 45 – Хроматограмма интактной плазмы крови крысы

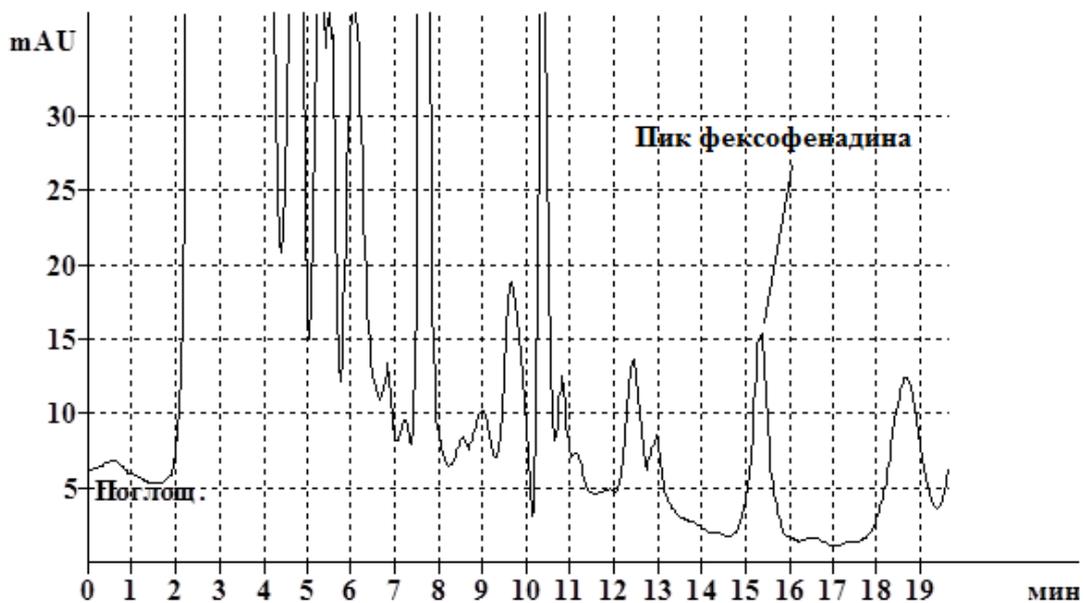


Рисунок 46 – Хроматограмма плазмы крови крысы через 30 мин после внутривенного введения фексофенадина в дозе 10 мг/кг массы

Коэффициент разрешения (разделения) пика целевого вещества и ближайшего пика соэкстрактивных веществ составил более 2.

На рисунке 47 представлена часть хроматограммы, которая использовалась для вычисления пределов детектирования и количественного определения фексофенадина как для плазмы, так и для гомогената мозга животных, что связано со сходными характеристиками применяемых методик хроматографирования. Данные показатели рассчитывались как концентрации аналита, дающие соответственно пики, которые по высоте 3-кратно и 10-кратно превышали максимальную высоту пика шума на расстоянии, 20-кратно превышающем ширину пика на половине его высоты. Ширина пика пробы с концентрацией 17000 нг/мл на половине его высоты составляла 0,5 мин, что соответствовало участку хроматограммы продолжительностью 10 мин [103]. Предварительно была построена калибровочная зависимость концентрации фексофенадина в плазме крови крыс от высоты пика.

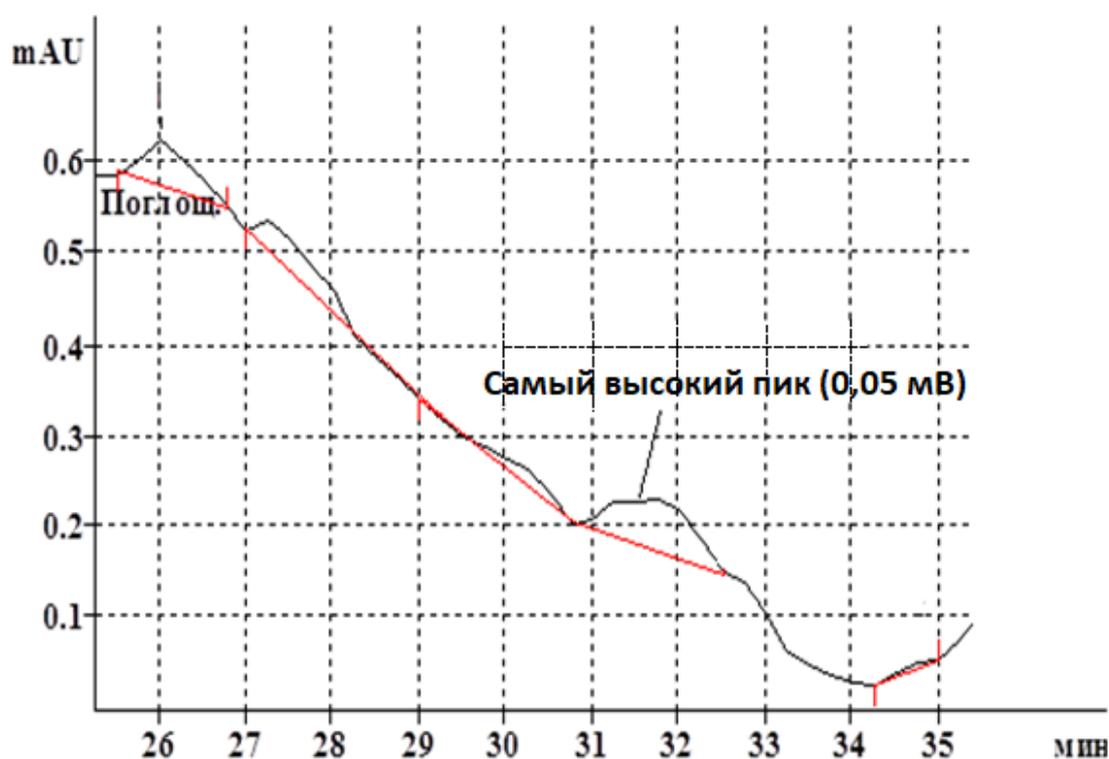


Рисунок 47 – Участок хроматограммы после инъекции чистой подвижной фазы

Предел обнаружения фексофенадина в плазме крови при помощи используемой аналитической методики составил 12 нг/мл, при этом соотношение сигнала к шуму (базовой линии) равнялось 3. Предел количественного определения целевого вещества составил 100 нг/мл. При этом отношение сигнала

к шуму составило более 10, а точность и прецизионность определения внутри и между циклами не превышали 20%.

Стабильность стандартных растворов фексофенадина оценивали путем их хроматографического исследования после трех циклов замораживания/размораживания. Каждый цикл замораживания длился 24 часа в морозильной камере при -80°C , а размораживание проводилось при комнатной температуре не более двух часов. Подобная схема объясняется возможным частым размораживанием и замораживанием стандартных образцов в процессе исследования. Анализ проводили троекратно.

Для оценки стабильности фексофенадина в составе плазмы крови при хранении в замороженном состоянии готовили образцы с концентрацией 17000 нг/мл. Образцы анализировали после хранения в замороженном состоянии в течение 60 дней. Исследовали по 3 независимых пробы. Результаты представлены в таблицах 38, 39.

Таблица 38 – Стабильность стандартного раствора фексофенадина

Концентрация номинальная, нг/мл	Концентрация рассчитанная, нг/мл	Точность, %	Среднее, нг/мл	Средняя точность, %
10000 нг/мл	9818,077	1,82	10172,73	2,94
	10296,17	2,96		
	10403,94	4,039		

Таблица 39 – Стабильность раствора фексофенадина в составе плазмы крови крысы

Концентрация номинальная, нг/мл	Концентрация рассчитанная, нг/мл	Точность, %	Среднее, нг/мл	Средняя точность, %
17000	16143,63	5,037	15960,6	6,11
	15812,13	6,99		
	15926,04	6,32		

При последовательном анализе пробы с концентрацией фексофенадина 17000 нг/мл и образца чистой плазмы крови крыс на хроматограмме интактной плазмы

отсутствовали пики, соответствующие по времени удерживания пикам фексофенадина, что свидетельствует об отсутствии эффекта переноса пробы.

Таким образом, разработана и валидирована методика количественного определения маркерного субстрата Pgp – фексофенадина в плазме крови крыс, которая позволяет анализировать его фармакокинетику с целью определения функциональной активности данного белка-транспортера на уровне целостного организма, а также локально в ГЭБ по дополнительной оценке накопления фексофенадина в головном мозге.

3.4.2. Валидация методики количественного определения фексофенадина в коре головного мозга крыс

У крыс в соответствующий временной срок после внутривенного введения фексофенадина под наркозом после забора крови извлекалась кора лобной доли головного мозга (либо вся – при разработке методики оценки функциональной активности Pgp в ГЭБ, либо только область, кровоснабжаемая перевязываемой артерией – при анализе влияния эндovasкулярной окклюзии-реперфузии средней мозговой артерии на функционирование Pgp). При необходимости хроматографирования интактного мозга образцы ткани массой 0,5 г гомогенизировали в 500 мкл воды деионизированной в течение 1 мин, после чего осаждали белок 4 мл ацетонитрила путем встряхивания на приборе Vortex в течение 15 мин с последующим центрифугированием 15 мин при 1750 g и забором надосадочного слоя для анализа. Степень извлечения целевого вещества составляла 81,3%.

При калибровке к аналогичной навеске ткани добавлялась деионизированная вода, часть которой замещалась стандартным раствором фексофенадина с концентрацией 10 мкг/мл в подвижной фазе в необходимом объеме для получения серии калибровочных растворов (концентрации в нг/г мозга представлены в таблице 40).

Для построения калибровочных графиков готовили 6 стандартных растворов фексофенадина в гомогенате коры мозга крыс следующих концентраций: 50, 250, 500, 750, 1000 и 2000 нг/мл. Данные растворы были проанализированы троекратно в процессе эксперимента. По полученным значениям были построены три калибровочных графика зависимости концентрации фексофенадина в гомогенате мозга крыс от площади его пика. Графики представлены на рисунках 48–50.

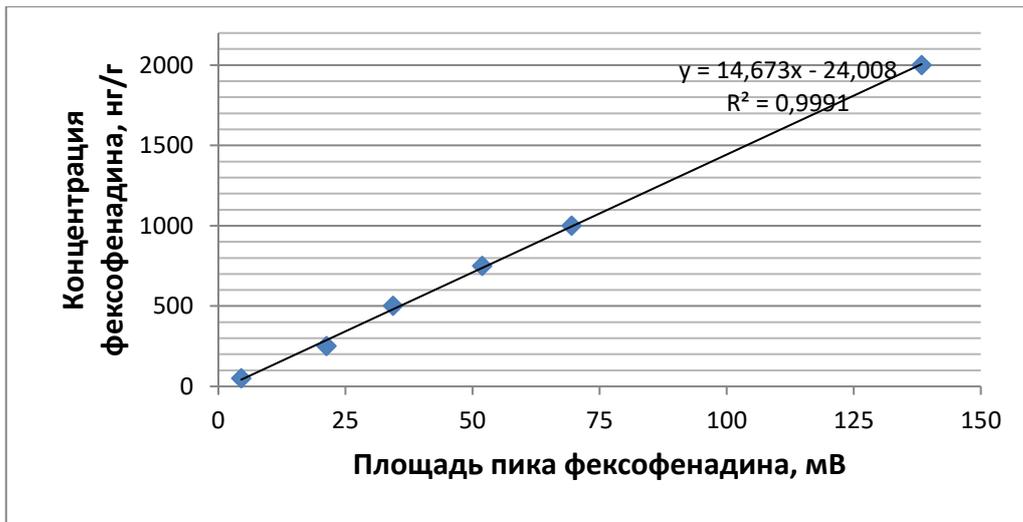


Рисунок 48 – Калибровочный график №1 зависимости концентрации фексофенадина в гомогенате коры головного мозга крыс от площади его хроматографического пика

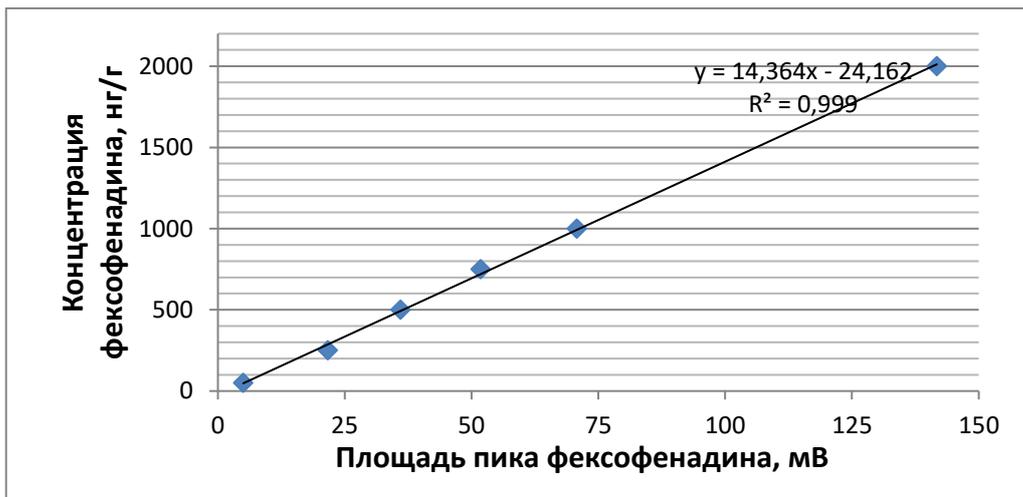


Рисунок 49 – Калибровочный график №2 зависимости концентрации фексофенадина в гомогенате коры головного мозга крыс от площади его хроматографического пика

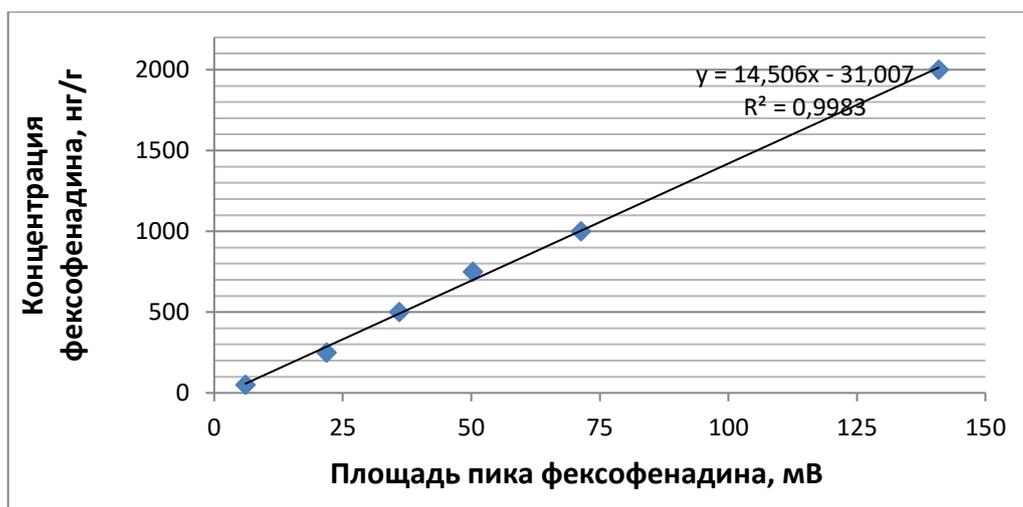


Рисунок 50 – Калибровочный график №3 зависимости концентрации фексофенадина в гомогенате коры головного мозга крыс от площади его хроматографического пика

Рассчитанные коэффициенты корреляции соответствовали принятым нормам (не менее 0,99). Отклонения концентраций калибровочных образцов от номинальных значений, рассчитанные по уравнениям линейных зависимостей, приведены в таблице 40.

Таблица 40 – Отклонения концентраций калибровочных образцов, рассчитанных по уравнениям линейных зависимостей, от номинальных значений

Концентрация номинальная, нг/г	График 1		График 2		График 3	
	Концентрация рассчитанная, нг/г	Точность, %	Концентрация рассчитанная, нг/г	Точность, %	Концентрация рассчитанная, нг/г	Точность, %
50	40,30	19,41	47,66	4,68	57,48	14,96
250	286,47	14,59	286,96	14,78	286,094	14,44
500	479,17	4,16	492,37	1,53	490,92	1,82
750	736,95	1,74	719,86	4,018	698,79	6,83
1000	994,87	0,51	991,66	0,83	1004,14	0,41
2000	2006,29	0,31	2011,65	0,58	2012,60	0,63

Анализ образцов интактного гомогената мозга крыс с добавлением стандартных растворов фексофенадина до получения концентраций 50, 500, 750 и 1000 нг/мл анализировали в рамках трех циклов.

Полученные величины прецизионности (относительного стандартного отклонения) и точности (относительной погрешности) соответствовали принятым нормам (не более 20% для нижнего предела количественного определения и не более 15% – для более высоких концентраций) (таблицы 41, 42).

Таблица 41 – Точность и прецизионность методики количественного определения фексофенадина в гомогенате коры головного мозга внутри цикла

Концентрация номинальная, нг/г	Концентрация рассчитанная, нг/г	Точность, %	Среднее, нг/г	Средняя точность, %	SD	Прецизионность, %
50	47,33	5,35	43,87	12,25	3,41	7,77
	47,47	5,06				
	43,12	13,76				
	41,52	16,95				
	39,93	20,15				
500	467,71	6,46	391,48	5,40	9,62	3,92
	490,63	1,87				
	490,92	1,82				
	446,53	10,69				
	469,30	6,14				
750	722,29	3,69	1924,91	5,02	70,44	4,39
	694,29	7,43				
	698,79	6,83				
	774,08	3,21				
	720,37	3,95				
1000	977,01	2,30	10238,99	2,91	518,37	4,35
	994,86	0,51				
	1004,14	0,41				
	988,04	1,20				
	898,97	10,10				

Таблица 42 – Точность и прецизионность методики количественного определения фексофенадина в гомогенате коры головного мозга между циклами

Концентрация номинальная, нг/г	Концентрация рассчитанная, нг/г	Точность, %	Среднее, нг/г	Средняя точность, %	SD	Прецизионность, %
50	49,36	16,95	41,34	17,32	0,79	1,91
	47,66	19,05				
	41,52	15,96				
500	490,63	1,87	495,54	1,38	7,06	1,42
	492,37	1,53				
	503,63	0,73				
750	720,37	3,95	725,42	3,28	9,19	1,27
	719,86	4,02				
	736,02	1,86				
1000	994,86	0,51	1000,06	0,90	11,89	1,19
	991,66	0,83				
	1013,67	1,37				

На рисунке 51 представлен образец хроматограммы интактного гомогената мозга крысы, на рисунке 52 – хроматограмма гомогената мозга крысы с концентрацией фексофенадина 500 нг/г. Пик фексофенадина отделен от пиков соэкстрактивных веществ, что позволяет достоверно определить целевое вещество.

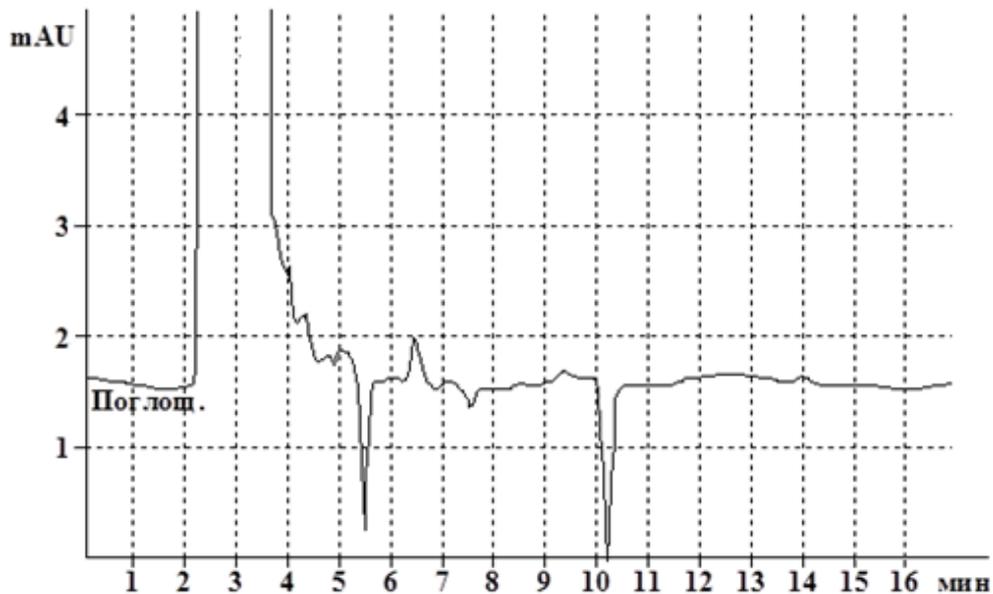


Рисунок 51 – Хроматограмма интактного гомогената коры головного мозга крысы

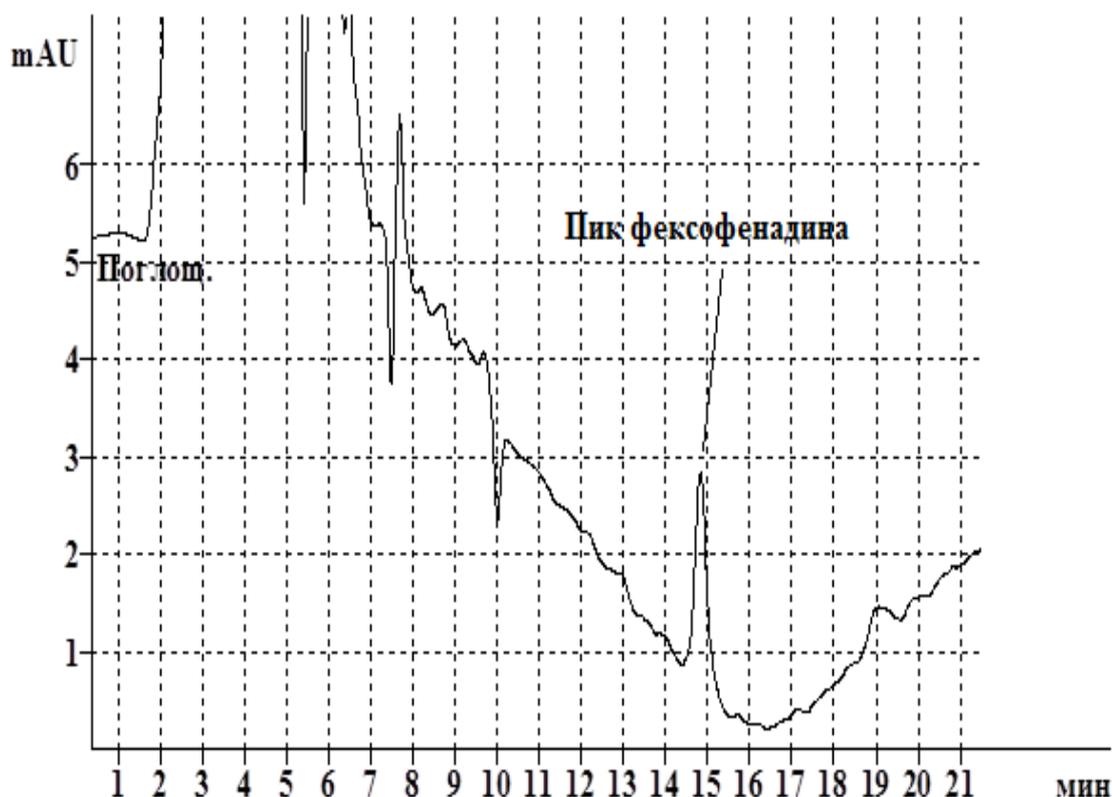


Рисунок 52 – Хроматограмма гомогената коры головного мозга крысы с концентрацией фексофенадина 500 нг/г

Коэффициент разрешения (разделения) пика целевого вещества и ближайшего пика соэкстрактивных веществ составил более 2.

В гомогенате мозга предел обнаружения фексофенадина составил 35 нг/г, при этом соотношение сигнала к шуму базовой линии равнялось 3. Предел количественного определения целевого вещества соответствовал 50 нг/г.

Стабильность фексофенадина в составе стандартных растворов (в концентрации 1000 нг/г) и в гомогенате мозга (в концентрации 2000 нг/г) оценивали после замораживания-размораживания, как указано выше (таблицы 43, 44).

Таблица 43 – Стабильность стандартного раствора фексофенадина

Концентрация номинальная, нг/г	Концентрация рассчитанная, нг/г	Точность, %	Среднее, нг/г	Средняя точность, %
1000	1136,44	13,64	1045,10	5,55
	1014,44	1,44		
	984,41	1,56		

Таблица 44 – Стабильность раствора фексофенадина в составе гомогената коры головного мозга мозга крысы

Концентрация номинальная, нг/г	Концентрация рассчитанная, нг/г	Точность, %	Среднее, нг/г	Средняя точность, %
2000	2159,40	7,97	2008,44	4,89
	1896,84	5,16		
	1969,08	1,55		

При последовательном анализе пробы с концентрацией фексофенадина 2000 нг/г и образца чистого гомогената мозга на хроматограмме интактного гомогената мозга крысы отсутствовали пики, соответствующие по времени удерживания пикам фексофенадина.

Таким образом, разработана и валидирована методика количественного определения маркерного субстрата Pgp – фексофенадина в коре головного мозга крыс, что позволяет (в совокупности с оценкой его фармакокинетики в плазме крови животных) анализировать функциональную активность данного белка-транспортера локально в ГЭБ.

3.4.3. Функциональная активность гликопротеина-P в гематоэнцефалическом барьере в норме и на фоне введения классических индуктора и ингибиторов транспортера

Функциональная активность Pgp в ГЭБ оценивалась по степени проникновения его маркерного субстрата – фексофенадина в ткань коры головного мозга после его однократного внутривенного введения крысам-самцам.

Для апробации методики активность Pgp в ГЭБ анализировали у интактных животных, а также после введения известных индуктора (рифампицин) и ингибиторов (верапамил и омепразол) транспортера.

Динамика концентраций фексофенадина в плазме крови крыс представлена на рисунке 53.

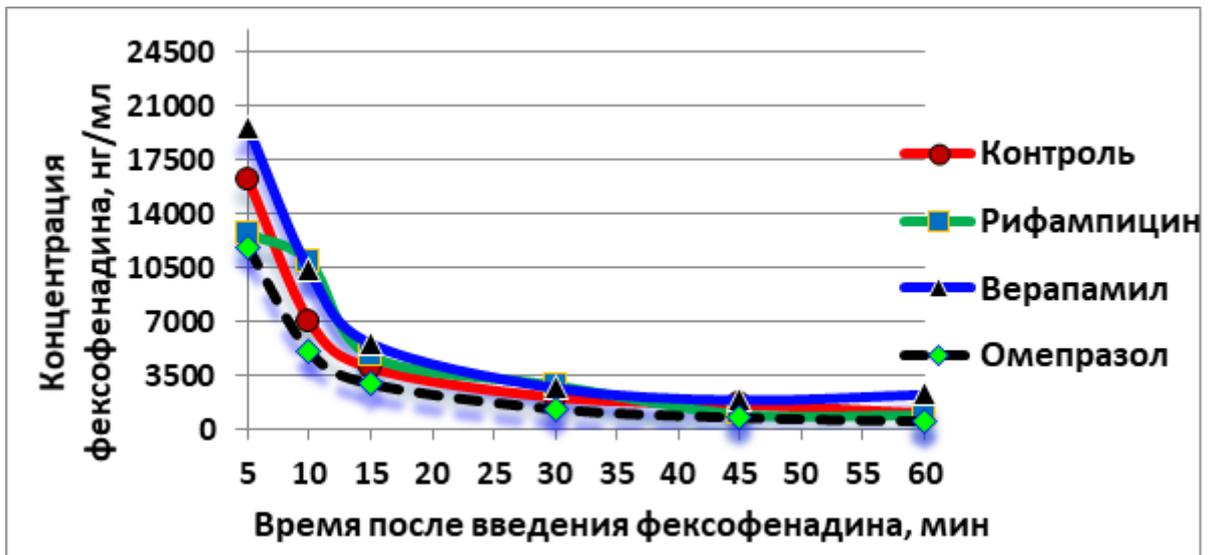


Рисунок 53 – Динамика концентраций фексофенадина в плазме крови после его внутривенного введения в дозе 10 мг/кг массы контрольным крысам и животным на фоне предварительного введения рифампицина (20 мг/кг внутривенно 2 раза в день в течение 14 дней), верапамила (1,65 мг/кг внутривенно однократно) и омепразола (17,6 мг/кг внутривенно однократно)

Концентрация фексофенадина в плазме крови крыс через 5 мин после его внутривенного введения в дозе 10 мг/кг массы (контроль) составила более $16,2 \pm 4,3$ мкг/мл, затем постепенно снижалась и достигала значения $1,0 \pm 0,4$ мкг/мл к 60 мин исследования. Введение рифампицина (20 мг/кг массы 2 раза в день внутривенно в течение 14 дней) и омепразола (17,6 мг/кг внутривенно однократно за 30 мин до фексофенадина) существенно не влияло на концентрацию фексофенадина в плазме крови крыс ни в одну из анализируемых временных точек. Площадь под фармакокинетической кривой концентрация-время ($AUC_{0-t(плазма)}$) фексофенадина также не различалась между сериями контроля и введения рифампицина или омепразола. Введение верапамила (1,65 мг/кг внутривенно однократно за 30 мин до фексофенадина) также достоверно не изменяло концентрацию фексофенадина в плазме крови, однако параметр $AUC_{0-t(плазма)}$ в данной серии по сравнению с контролем был выше на 56,49% ($p=0,0185$), что свидетельствует о снижении функциональной активности Pgp в печени и незначительно в почках животных (фексофенадин выводится преимущественно

печенью и лишь на 10% – почками) (таблица 45). Следует отметить, что внутривенное введение животным маркерного субстрата Pgp не позволяет выявить изменение активности транспортера в слизистой оболочке тонкого кишечника.

Динамика концентраций фексофенадина в гомогенате головного мозга крыс после его внутривенного введения представлена на рисунке 54.

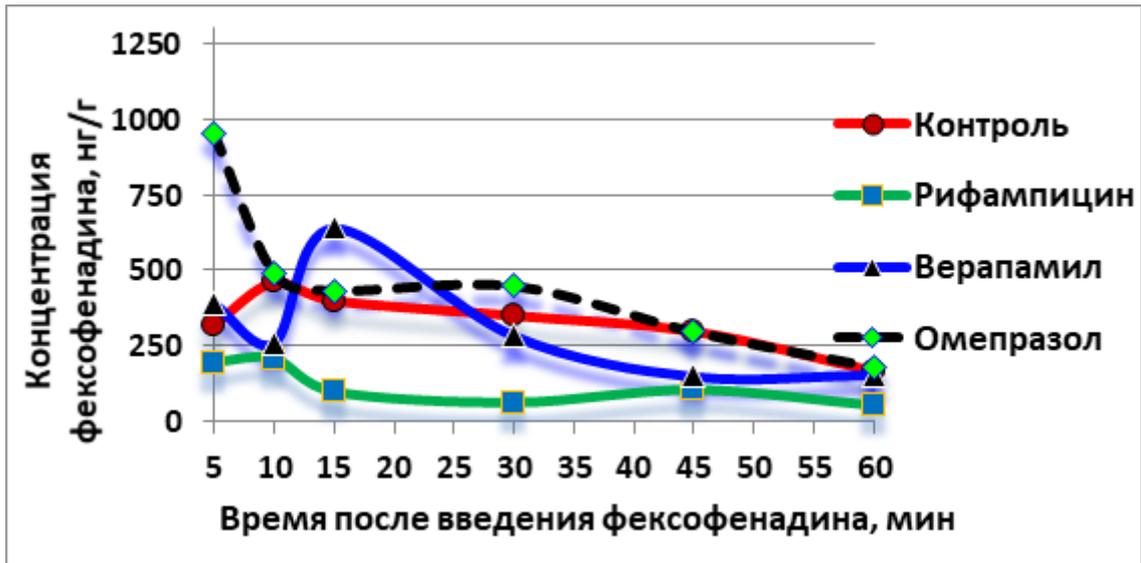


Рисунок 54 – Динамика концентраций фексофенадина в гомогенате коры головного мозга крыс после его внутривенного введения в дозе 10 мг/кг массы контрольным крысам и животным на фоне введения рифампицина (20 мг/кг внутривенно 2 раза в день в течение 14 дней), верапамила (1,65 мг/кг внутривенно однократно) и омепразола (17,6 мг/кг внутривенно однократно)

Таблица 45 – Усредненные значения площадей под фармакокинетическими кривыми фексофенадина в гомогенате головного мозга и плазме крови крыс, а также соотношение указанных параметров в контроле, на фоне введения рифампицина (20 мг/кг внутривенно 2 раза в день в течение 14 дней), верапамила (1,65 мг/кг внутривенно однократно) и омепразола (17,6 мг/кг внутривенно однократно)

Серия эксперимента	Параметр		
	AUC_{0-t} (плазма), мкг/(мл*ч)	AUC_{0-t} (мозг), мкг/(г*мин)	AUC_{0-t} (мозг)/ AUC_{0-t} (плазма)
Контроль, n=30	186,82±66,41	16,20±3,73	0,087±0,046

Продолжение таблицы 45			
Рифампицин, n=30	229,30±41,11	5,91±1,61*	0,026±0,005*
Омепразол, n=30	162,29±53,12	24,11±4,26*	0,149±0,039*
Верапамил, n=30	292,35±29,45*	17,34±5,55	0,059±0,018

Примечание: * – достоверные различия с группой контроля; данные представлены в виде среднего арифметического±стандартное отклонение

Фексофенадин в коре больших полушарий головного мозга контрольных крыс детектировался уже через 5 мин после его внутривенного введения в дозе 10 мг/кг массы: его концентрация составляла 320,93±140,01 нг/г, достигала своего максимума через 15 мин – 399,9±156,5 нг/г и постепенно снижалась к 60 мин исследования до 166,2±31,7 нг/г.

Применение рифампицина приводило к снижению концентрации фексофенадина в коре головного мозга крыс через 15 мин более чем в 4 раза ($p=0,009$), через 30 мин – более чем в 5,6 раза ($p=0,012$) и через 45 мин – в 2,85 раза ($p=0,042$) по сравнению с показателями контрольных животных. Введение верапамила не оказало существенного влияния на концентрацию фексофенадина в коре больших полушарий головного мозга ни в одну из временных точек, а омепразол повышал концентрацию фексофенадина в коре больших полушарий через 5 мин после введения последнего в 2,96 раза ($p=0,009$) по сравнению с показателями крыс, которым вводили только фексофенадин.

Дополнительно была рассчитана площадь под кривой концентрация фексофенадина в коре больших полушарий-время ($AUC_{0-t(\text{мозг})}$), которая характеризует общее количество фексофенадина, поступившее в кору. Установлено, что введение рифампицина приводило к снижению $AUC_{0-t(\text{мозг})}$ фексофенадина в 2,74 раза ($p=0,005$), а применение омепразола увеличивало данный показатель в 1,49 раза ($p=0,012$). Верапамил на данный параметр влияния не оказал ($p>0,05$).

В связи с тем, что возрастание параметра $AUC_{0-t(\text{мозг})}$ может быть следствием как снижения функциональной активности P_gр локально в ГЭБ, так и проявляться

благодаря увеличению плазменной концентрации маркерного субстрата транспортера целесообразно было оценить отношение $AUC_{0-t(\text{мозг})}/AUC_{0-t(\text{плазма})}$, изменение которого характеризует только активность Pgp в ГЭБ.

Указанный показатель достоверно снижался при применении индуктора Pgp – рифампицина в 3,36 раза ($p=0,003$), а при использовании ингибитора активности транспортера – омепразола возрастал в 1,71 раза ($p=0,003$).

Таким образом, на фоне введения крысам модуляторов функциональной активности Pgp проницаемость ГЭБ для маркерного субстрата транспортера – фексофенадина соответствующим образом меняется: индуктор Pgp (рифампицин) вызывает снижение интенсивности проникновения фексофенадина в кору головного мозга, а ингибитор (омепразол) приводит к противоположной динамике. Полученные результаты позволяют использовать указанные препараты, дозы и схемы их введения для моделирования состояний повышенной или пониженной функциональной активности Pgp в ГЭБ.

Полученные результаты опубликованы в статьях с соавторами:

Черных, И.В. Метод анализа функциональной активности гликопротеина-P в гематоэнцефалическом барьере [Текст] / **И.В. Черных, А.В. Шулькин, П.Ю. Мыльников, М.В. Гацанога, Н.М. Попова, Е.Н. Якушева** // *Нейрохимия*. – 2019. – Т.36, №1. – С.84–88.

Патент на изобретение №2677286. Способ оценки функциональной активности гликопротеина-P в гематоэнцефалическом барьере. Авторы: Якушева Е.Н., Черных И.В., Шулькин А.В., Попова Н.М., Мыльников П.Ю. Дата государственной регистрации в Государственном реестре изобретений Российской Федерации 16 января 2019 г.

3.5. Оценка целесообразности ингибирования гликопротеина-P в гематоэнцефалическом барьере при нарушениях мозгового кровообращения

3.5.1. Оценка выживаемости и уровня неврологического дефицита животных при билатеральной окклюзии общих сонных артерий при комбинированном применении нейропротектора-субстрата и ингибитора гликопротеина-P

В связи с тем, что ни одно из протестированных нами лекарственных веществ с нейропротективной активностью не показало свою принадлежность к числу субстратов Pgp, а также из-за способности этилметилгидроксипиридина сукцината и фабомотизола самостоятельно снижать активность транспортера в качестве субстрата Pgp был выбран нейропротектор с вазоактивными свойствами, блокатор медленных кальциевых каналов – нимодипин, фармакокинетика которого по данным научной литературы зависит от активности изучаемого белка-транспортера [156, 367].

График кумулятивной доли выживших крыс (Каплан-Майер) после билатеральной окклюзии общих сонных артерий животных приведен на рисунке 55. За весь срок наблюдения не погибла ни одна крыса, подвергнутая ложной операции. В контрольной группе животных первая гибель наблюдалась через 4 часа после операции, через 24 ч погибла половина крыс, что согласуется с литературными данными [185].

Внутривенное введение нимодипина – субстрата Pgp до моделирования патологии приводило к сокращению летальности животных по сравнению с контролем патологии лишь на уровне тенденции ($p=0,098$). Ингибитор Pgp омепразол не вызывал достоверных изменений количества погибших крыс по сравнению с контролем патологии. Однако комбинация нимодипина и омепразола привела к снижению летальности по сравнению с контролем патологии ($p=0,0006$), а также по сравнению с серией введения нимодипина ($p=0,046$).

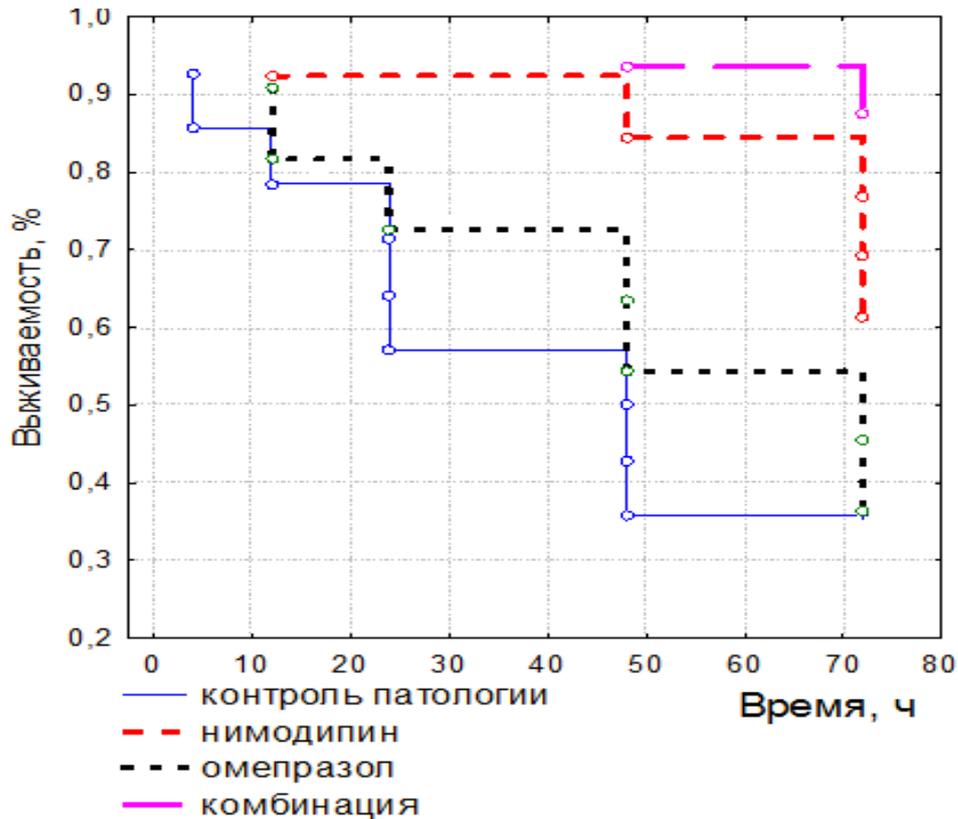


Рисунок 55 – График кумулятивной доли выживших животных по Каплану-Майеру на фоне билатеральной окклюзии общих сонных артерий контрольных крыс и животных на фоне внутривенного введения нимодипина (0,4 мг/кг), омепразола (17,6 мг/кг) и их комбинации

Тяжесть клинических проявлений глобальной ишемии мозга оценивалась по уровню неврологического дефицита по шкале McGrow, модифицированной И.В. Ганнушкиной (таблица 46). У ложнооперированных животных признаков неврологического дефицита не было выявлено, за исключением незначительных изменений через 4 ч, которые были вызваны, возможно, «выходом» из наркоза. Балл неврологического дефицита в группе контроля патологии увеличивался до конца первых суток наблюдения, затем плавно снижался, но во все сроки, за исключением 4 ч, относился к тяжелой степени. У крыс данной серии наблюдались вялость, односторонний и двусторонние блефароптозы, тремор, манежные движения, парезы одной или нескольких конечностей.

Таким образом, необратимая билатеральная окклюзия общих сонных артерий крыс сопровождается их высокой летальностью и формированием выраженного

психоневрологического дефицита, что согласуется с литературными данными [46].

Таблица 46 – Степень неврологического дефицита по McGrow в модификации И.В. Ганнушкиной на фоне билатеральной окклюзии общих сонных артерий контрольных крыс и животных на фоне внутривенного введения нимодипина (0,4 мг/кг), омегапразола (17,6 мг/кг) и их комбинации

Серия эксперимента	Время после окклюзии общих сонных артерий, ч				
	4	12	24	48	72
Ложная операция, n=6	0,5±0,11	0	0	0	0
Контроль патологии, n=14	4,5 (2,0; 5,5)	5,0 (2,0; 10,0)	8,5 (1, 5; 10,0)	7,5 (1,5; 10,0)	7,0 (2,0; 10,0)
Нимодипин, n=13	2,5 (2,5; 2,5)*	3,0 (1,0; 4,0)	1,0 (1,0; 2,5)*#	3,0 (2,0; 3,0)#	1,5 (1,0; 2,0)*#
Омегапразол, n=11	2,5 (2,5; 3,5)	3,5 (2,0; 5,0)	3,5 (3,0; 10,0)"	10,0 (3,5; 10,0)"	10,0 (4,5; 10,0)"
Нимодипин + омегапразол, n=16	1,0 (0,0; 1,0)*#"	2,0 (1,0; 5,0)*	1,0 (1,0; 3,0)*#	1,0 (0,0; 3,0)*#"	1,0 (1,0; 3,0)*#

Примечание: * – достоверные различия с группой контроля патологии ($p < 0,05$); # – достоверные различия с группой введения омегапразола ($p < 0,05$); " – достоверные различия с группой введения нимодипина ($p < 0,05$). Данные представлены в виде медианы, нижнего и верхнего квартилей.

Введение омегапразола до моделирования патологии не приводило к сокращению уровня неврологического дефицита по сравнению с контролем патологии ни в один из экспериментальных сроков ($p > 0,05$). Крысы, получавшие нимодипин, имели более низкий балл неврологического дефицита по сравнению с контрольными животными. Так, через 24 ч он был ниже на 88,2% ($p = 0,049$), а через 4 и 72 ч – на 44,4% и 16,0% соответственно на уровне тенденции ($p = 0,075$ и $p = 0,075$). Введение нимодипина привело к снижению уровня неврологического дефицита также по сравнению с серией омегапразола: через 24 ч – на 71,4% ($p = 0,014$), через 48 ч – на 70,0% ($p = 0,035$) и через 72 ч – на 85% ($p = 0,012$).

Комбинация нейропротектора-субстрата Pgr – нимодипина и ингибитора транспортера – омегапразола приводила к более низким баллам неврологического дефицита по сравнению со всеми экспериментальными сериями. По сравнению с

контролем патологии уровень неврологического дефицита был ниже через 4, 12, 24, 48 и 72 ч на 87,5% ($p=0,003$), 80,0% (уровень тенденции, $p=0,050$), 88,2% ($p=0,002$), 86,7% ($p=0,030$) и 85,7% ($p=0,025$) соответственно; по сравнению с группой введения омепразола – через 4, 24, 48 и 72 ч ниже на 60,0% ($p=0,043$), 71,4% ($p=0,003$), 90,0% ($p=0,002$) и 90,5% ($p=0,005$) соответственно. По сравнению с введением нимодипина через 4 ч уровень неврологического дефицита был ниже на 60,0% ($p=0,043$), а через 48 ч – на 66,7% ($p=0,049$).

Таким образом, фармакологическое ингибирование функциональной активности P_{grp} в ГЭБ на фоне билатеральной окклюзии общих сонных артерий является целесообразным для повышения эффективности нейропротекторной терапии последствий глобальной ишемии мозга, видимо, за счет интенсификации доставки в ткани мозга нейропротекторных средств-субстратов транспортера.

Полученные результаты опубликованы в статье с соавторами:

Черных, И.В. Ингибирование активности ABCB1-белка при нарушении мозгового кровообращения может повысить эффективность фармакотерапии / **И.В. Черных, А.В. Шулькин, С.К. Правкин, М.В. Гацанога, Е.Н. Якушева** // *Анналы клинической и экспериментальной неврологии.* – 2021. – Т.15, №1. – С.65–70.

3.5.2. Оценка зоны инфаркта мозга животных при окклюзии-реперфузии средней мозговой артерии при комбинированном применении нейропротектора-субстрата и ингибитора гликопротеина-P

Летальность животных после моделирования 60-минутной окклюзии с последующей 24-часовой реперфузией средней мозговой артерии составила 20–30% и в экспериментальных группах (контрольные крысы и животные на фоне внутривенного введения нимодипина (0,4 мг/кг), омепразола (17,6 мг/кг) и их комбинации) не отличалась ($p>0,05$). В группе ложнооперированных животных смертность отсутствовала.

На рисунке 56 представлены образцы срезов головного мозга экспериментальных животных различных серий.



Рисунок 56 – Образцы срезов головного мозга крыс после окклюзии-реперфузии средней мозговой артерии контрольных животных и на фоне внутривенного введения нимодипина (0,4 мг/кг), омепразола (17,6 мг/кг) и их комбинации. Размеры очага некроза в % в экспериментальных сериях отражены в таблице 47 (среднее арифметическое \pm стандартное отклонение).

Таблица 47 – Размеры очага некроза головного мозга крыс в % после окклюзии-реперфузии средней мозговой артерии ложнооперированных животных и на фоне внутривенного введения нимодипина (0,4 мг/кг), омепразола (17,6 мг/кг) и их комбинации

Серия эксперимента	Очаг некроза, %
Ложная операция, n=7	0
Контроль патологии, n=7	32,2 \pm 7,1
Омепразол, n=7	34,4 \pm 7,6
Нимодипин, n=7	23,3 \pm 4,7*#
Нимодипин+омепразол, n=7	23,0 \pm 2,8*#

Примечание: * – достоверные различия с показателем серии контроля патологии; # – достоверные различия с серией введения омепразола.

60-минутная окклюзия средней мозговой артерии с последующей реканализацией в течение 24 ч привела к формированию очага некроза в головном мозге контрольных крыс с относительной площадью $32,2 \pm 7,1\%$.

Изолированное введение животным нейропротектора с вазоактивным потенциалом – блокатора кальциевых каналов L-типа нимодипина в момент реперфузии средней мозговой артерии приводило к достоверному снижению размера некротического очага на 27,7% по сравнению с группой контроля патологии ($p=0,002$).

Изолированное введение животным ингибитора Pgp – омепразола не вызвало статистически значимого изменения площади очага некроза ($p>0,05$).

Комбинированное введение крысам нимодипина и омепразола вызвало снижение площади некроза по сравнению с контролем на 28,8% ($p=0,009$), а по сравнению с группой омепразола – на 33,2% ($p=0,003$), однако по сравнению с серией изолированного введения нимодипина статистически значимых различий выявлено не было ($p>0,05$).

Таким образом, направленное снижение активности Pgp в ГЭБ омепразолом не уменьшает зону некроза в головном мозге при использовании для нейропротекторной терапии последствий фокальной церебральной ишемии нимодипина – субстрата данного белка-транспортера.

3.5.2.1. Функциональная активность гликопротеина-P в гематоэнцефалическом барьере на фоне окклюзии-реперфузии средней мозговой артерии

Функциональную активность Pgp в ГЭБ на фоне 30-минутной окклюзии средней мозговой артерии с последующей 24-часовой реперфузией оценивали по степени проникновения в мозг маркерного субстрата транспортера – фексофенадина после его однократного введения крысам в хвостовую вену. Контролем в эксперименте служили ложнооперированные крысы. Данный этап исследования выполнялся как попытка объяснить неэффективность ингибирования транспортера в ГЭБ при изучаемой патологии с целью повышения

фармакологической активности вещества-субстрата Pgp, обладающего нейропротекторным и вазоактивным потенциалом.

Концентрация фексофенадина в плазме крови ложнооперированных крыс через 5 мин после его внутривенного введения в дозе 10 мг/кг массы (контроль) составила $13,5 \pm 1,0$ мкг/мл. Затем уровень вещества постепенно снижался и достигал значения $1,3 \pm 0,23$ мкг/мл к первому часу исследования. Моделирование окклюзии-реперфузии средней мозговой артерии статистически значимо не изменяло содержание фексофенадина в плазме крови: его концентрация в исследуемые временные точки и площадь под фармакокинетической кривой концентрация-время ($AUC_{0-t(\text{плазма})}$) достоверно не отличались от показателей контрольных животных (рисунок 57).

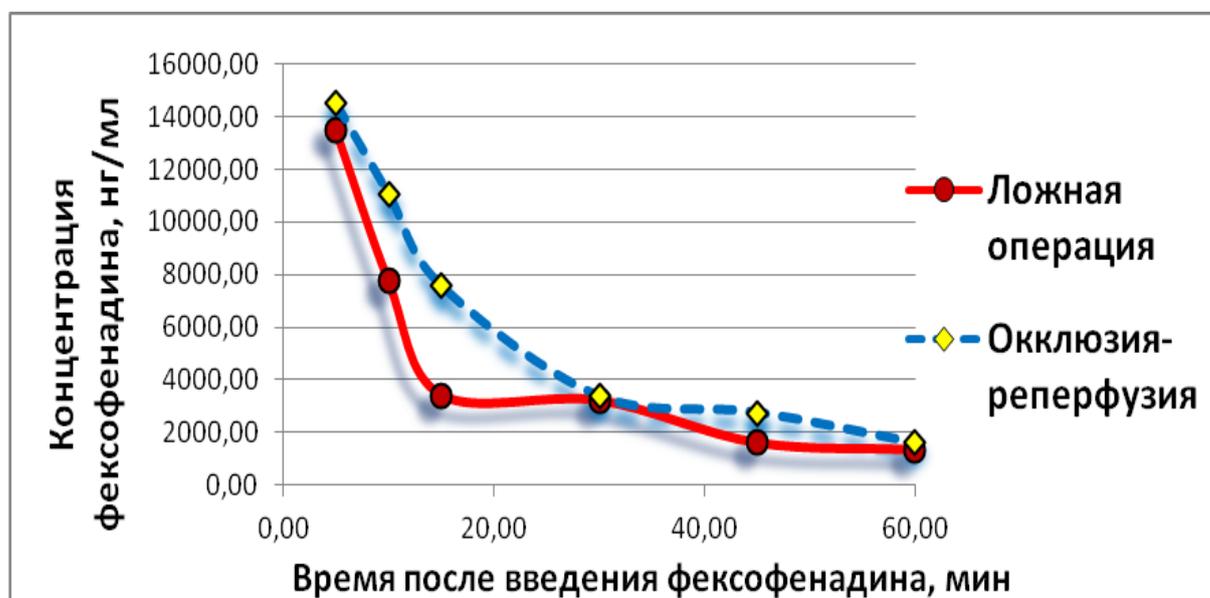


Рисунок 57 – Динамика концентраций фексофенадина в плазме крови крыс после его однократного внутривенного введения в дозе 10 мг/кг массы у ложнооперированных животных и на фоне 30-минутной окклюзии средней мозговой артерии с 24-часовой реперфузией

Изменение концентраций фексофенадина в гомогенате коры больших полушарий головного мозга крыс в сериях «ложной» операции и окклюзии-реперфузии средней мозговой артерии отражено в таблице 48.

У ложнооперированных животных уровень фексофенадина в коре больших полушарий головного мозга постепенно возрастал после его внутривенного

введения, достигая максимума (789,9 нг/г) через 15 мин, и постепенно снижался к 1-му часу эксперимента.

Моделирование окклюзии-реперфузии средней мозговой артерии вызывало возрастание концентрации фексофенадина в коре ишемизированного полушария головного мозга крыс через 5 мин после его введения в 4,97 раза ($p=0,027$), через 10 мин – в 1,97 раза ($p=0,049$), через 30 мин – в 3,03 раза ($p=0,027$), через 45 мин – в 6,17 раза ($p=0,027$) и через 60 мин – в 17,84 раза ($p=0,027$) по сравнению с показателями контроля. Площадь под кривой «концентрация фексофенадина в коре головного мозга – время» ($AUC_{0-t(\text{мозг})}$), отражающая общее содержание маркерного субстрата в коре, в ишемизированном полушарии превышала аналогичный показатель контрольных животных в 3,19 раза ($p=0,027$) (таблица 48).

Таблица 48 – Динамика концентраций фексофенадина в гомогенате коры головного мозга крыс после его однократного внутривенного введения в дозе 10 мг/кг массы у ложнооперированных животных и на фоне 30-минутной окклюзии средней мозговой артерии с 24-часовой реперфузией

Группы эксперимента	Сроки эксперимента					
	5 мин (n=5)	10 мин (n=5)	15 мин (n=5)	30 мин (n=5)	45 мин (n=5)	60 мин (n=5)
«Ложная» операция, n=5	322,77 (251,20; 406,41)	442,12 (421,63; 472,86)	789,91 (702,81; 790,21)	364,06 (330,61; 395,10)	150,99 (147,82; 172,23)	58,01 (35,86; 68,56)
Окклюзия-реперфузия СМА, n=5	978,85 (874,38; 1244,70)*	678,98 (627,75; 1292,04)*	1083,21 (934,02; 1236,41)	1037,25 (1010,37; 1171,99)*	1005,98 (864,58; 1204,76)*	735,87 (567,97; 1056,33)*

Примечание: * – достоверные различия с данными ложнооперированных животных ($p<0,05$). Данные представлены в виде медианы, нижнего и верхнего квартилей.

Отношение $AUC_{0-t(\text{мозг})}/AUC_{0-t(\text{плазма})}$ (характеризует проницаемость ГЭБ и активность Pgp в нем) в ишемизированном полушарии животных с окклюзией-реперфузией средней мозговой артерии превышало показатель ложнооперированных животных в 2,52 раза ($p=0,0271$) (таблица 49).

Таблица 49 – Усредненные значения площадей под фармакокинетическими кривыми фексофенадина в гомогенате коры головного мозга и плазме крови крыс, а также соотношение указанных параметров в сериях «ложной» операции и окклюзии-реперфузии средней мозговой артерии

Серия эксперимента	Параметр		
	AUC _{0-t} (плазма), нг/(мл*ч)	AUC _{0-t} (мозг), нг/(г*мин)	AUC _{0-t} (мозг)/AUC _{0-t} (плазма)
Кора ложнооперированных животных, n=5	222,68±23,25	19,92±1,64	0,090±0,011
Кора на стороне окклюзии средней мозговой артерии, n=5	307,23±105,49	63,62±16,04*	0,227±0,103*

Примечание: * – достоверные различия с данными контрольных животных (p<0,05). Данные представлены в виде среднего арифметического±стандартное отклонение.

Таким образом, проницаемость ГЭБ для фексофенадина – маркерного субстрата Pgp на фоне окклюзии-реперфузии средней мозговой артерии крыс повышается, что может свидетельствовать, с одной стороны, о снижении функциональной активности белка-транспортера в ГЭБ, а, с другой – быть следствием нарушения структуры и проницаемости барьера.

Полученные результаты опубликованы в статье с соавторами:

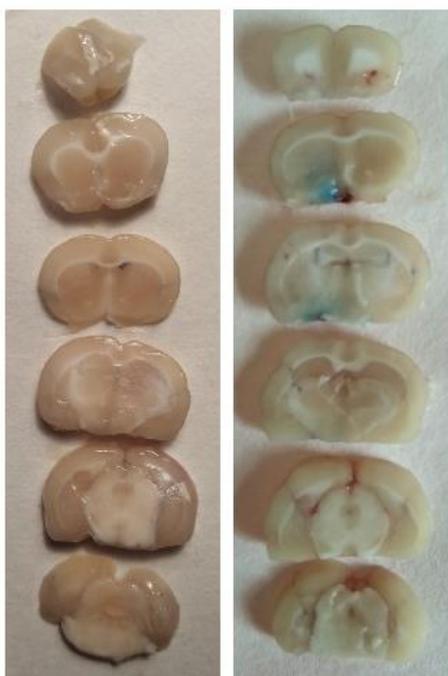
Черных, И.В. Функциональная активность гликопротеина-P в гематоэнцефалическом барьере на фоне ишемии-реперфузии головного мозга / **И.В. Черных, А.В. Щулькин, Е.Н. Якушева, А.С. Есенина, М.М. Градинарь, П.Ю. Мыльников, М.В. Гацанога** // *Российский физиологический журнал им. И.М. Сеченова.* – 2019. – Т.105, №5. – С.657–664.

3.5.2.2. Проницаемость гематоэнцефалического барьера на фоне окклюзии-реперфузии средней мозговой артерии

Для проверки гипотезы о повышении проницаемости ГЭБ на фоне окклюзии-реперфузии средней мозговой артерии был выполнен эксперимент,

регистрирующий накопление азокрасителя Evans blue в ткани мозга экспериментальных животных.

30-минутная окклюзия средней мозговой артерии крыс с последующей суточной реперфузией приводила к нарушению проницаемости ГЭБ, что подтверждается накоплением в ишемизированной ткани головного мозга животных диазокрасителя Evans blue (рисунок 58), который в норме в ЦНС не проникает, что связано с формированием прочных связей с альбуминами плазмы крови с образованием высокомолекулярных комплексов с массой порядка 68 кДа [223]. Калибровочный график зависимости концентрации Evans blue в ткани мозга от оптической плотности его растворов в диметилформамиде и соответствующее уравнение регрессии представлены на рисунке 59. Уровень красителя в мозге на фоне ишемии-реперфузии превышал аналогичный показатель ложнооперированных животных в 4,83 раза ($p=0,042$) (таблица 50).



Ложная операция **Окклюзия-реперфузия**

Рисунок 58. Накопление красителя Evans blue в головном мозге ложнооперированных крыс и животных на фоне 30-минутной окклюзии средней мозговой артерии с 24-часовой реперфузией

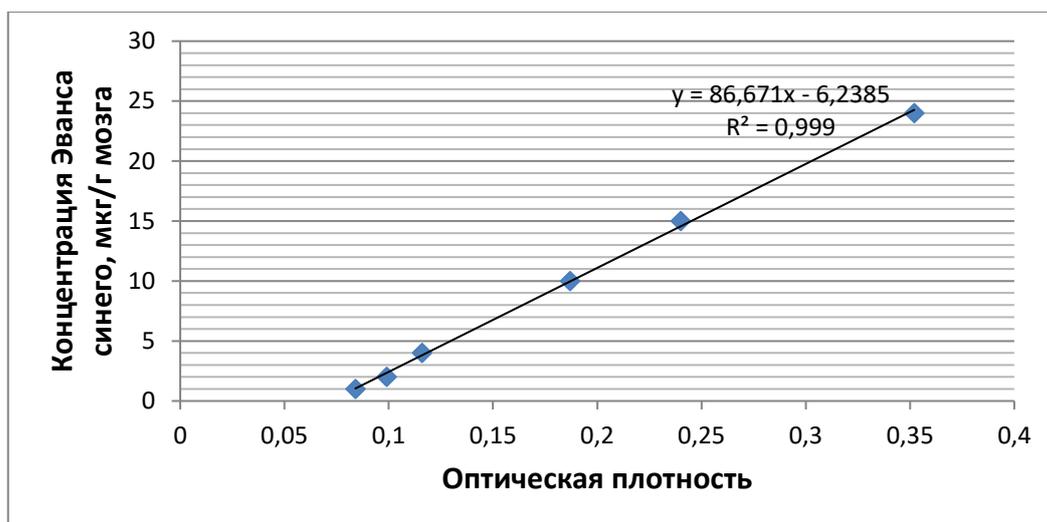


Рисунок 59 – Калибровочный график зависимости концентрации красителя Evans blue в ткани головного мозга от оптической плотности раствора

Таблица 50 – Содержание красителя Evans blue в головном мозге крыс на фоне окклюзии-реперфузии средней мозговой артерии

Серия эксперимента	Уровень красителя, мкг/г мозга
Ложная операция, n=5	2,39±0,85
Окклюзия-реперфузия средней мозговой артерии, n=5	11,55±8,40
p	0,042

Появление красителя в ишемизированном мозге ложнооперированных крыс связано, вероятно, с его адсорбцией на стенке сосудов после процедуры перфузии [91].

Таким образом, в эксперименте с азокрасителем Evans blue доказано повышение проницаемости ГЭБ на стороне ишемии на фоне окклюзии-реперфузии средней мозговой артерии, что объясняет неэффективность стратегии фармакологического ингибирования Pgr в ГЭБ при данной патологии вследствие нарушения структуры барьера.

ГЛАВА 4. ОБСУЖДЕНИЕ ПОЛУЧЕННЫХ РЕЗУЛЬТАТОВ

Гликопротеин-P (Pgp) – это белок-транспортер, который оказывает существенное влияние на фармакокинетику большого числа лекарственных средств: препятствует их энтеральной абсорбции и проникновению в органы, ограниченные от крови гистогематическими барьерами, и способствует их экскреции печенью и почками [43, 248, 353], таким образом, защищая организм от потенциально опасных ксенобиотиков. По приблизительным расчетам спектр субстратов Pgp включает от 35 до 55% современных лекарственных средств [316]. Причем для ряда из них данный транспортер является либо ключевым (фексофенадин, домперидон и пр.), либо клинически значимым (дигоксин, клопидогрел, дабигатрана этексилат и пр. так называемые маркерные субстраты Pgp) регулятором фармакокинетики [96]. Целенаправленное снижение функциональной активности данного транспортера может служить привлекательной целью для повышения эффективности фармакотерапии веществами, являющимися его субстратами. Кроме того, Pgp выполняет некоторые физиологические функции, контролируя транспорт через клеточные мембраны эндогенных веществ-субстратов (стероидные гормоны, некоторые цитокины, билирубин и пр.) [309, 359].

Функциональная активность Pgp может изменяться под влиянием ряда экзогенных и эндогенных факторов, в том числе на фоне гипоксии и приема лекарственных средств, что может повлечь непредсказуемые изменения фармакокинетики препаратов-субстратов транспортера [157, 159, 208]. Причем именно снижение активности Pgp является клинически наиболее важным, в связи с тем, что на его фоне возможна относительная передозировка субстратами с узким «терапевтическим окном» (например, гликозидная интоксикация дигоксином, кровотечения при приеме дабигатрана этексилата) [96]. Это послужило причиной введения зарубежными регулирующими организациями (FDA, EMA) рекомендаций по оценке принадлежности всех вновь

разрабатываемых лекарственных веществ к субстратам и ингибиторам P_{gr} [161]. Аналогичные документы есть и в нашей стране [47].

Гипоксия является одним из экстремальных факторов, занимающих ведущее место в ряду естественных стрессоров, воздействующих на организм человека и животных. На протяжении жизни человек сталкивается с самыми разными вариантами гипоксических влияний в разнообразных сочетаниях по продолжительности, степени выраженности, газовому составу вдыхаемого воздуха и т. д. [92]. Гипоксия различных видов осложняет течение многих патологий, таких как сердечно-сосудистые, легочные заболевания и др.

Несмотря на высокие энергетические потребности головного мозга, он не обладает запасом кислорода или энергетических субстратов, таких как АТФ, глюкоза, гликоген, креатинфосфат и, таким образом, его нормальное функционирование напрямую зависит от интенсивности мозгового кровотока [123]. В связи с этим в современной неврологии заболевания, в патогенезе которых лежит гипоксия того или иного вида являются превалирующими. Ишемическо-гипоксическое поражение головного мозга является важным патогенетическим звеном многих болезней и патологических состояний: инсультов, энцефалопатии (в условиях глобальной гипоперфузии и гипоксии, например, при остановке сердечной деятельности, дыхания и др.), хронической церебральной ишемии, метаболических нарушений, токсических поражений ЦНС и др. [23]. На сегодняшний день в России инсульт встречается с частотой $3,48 \pm 0,21$ случаев на 1000 населения, а смертность от данной патологии является одной из самых высоких в мире (175 на 100000 в год) [35]. Причем ишемическая разновидность инсульта диагностируются в 75–80% случаев [56].

Для лечения инсульта используются следующие фармакологические группы, включающие препараты-субстраты P_{gr} (указаны в скобках): антикоагулянты (ривароксабан и дабигатрана этексилат [242]), антиагреганты (клопидогрел [222]), гиполипидемические средства (аторвастатин [207]), антиаритмические препараты (верапамил, дилтиазем, пропранолол, хинидин [239]), препараты с

нейропротекторной активностью (нимодипин [255], цилнедипин [359]). Неэффективность фармакотерапии последствий острого нарушения мозгового кровообращения с использованием нейропротекторных средств, возможно, является следствием недостаточного проникновения указанных препаратов через ГЭБ для достижения минимальной терапевтической концентрации в ткани головного мозга. Проницаемость ГЭБ контролируется различными протекторными механизмами, среди которых плотные контакты, отсутствие пенетраций мембран эндотелия, функционирование Pgp и ряда других транспортеров [163, 168, 270].

Индукция функциональной активности и синтеза как самого Pgp, так и его иРНК на фоне гипоксии различных типов продемонстрирована в многочисленных исследованиях *in vitro* (преимущественно) и в небольшом числе – *in vivo* (результаты зачастую противоречивы) [134, 162, 174, 175, 188, 279, 298, 323, 349]. Это косвенно подтверждает возможность активного эффлюкса нейропротекторов из головного мозга на фоне ишемического инсульта. Однако результаты *in vitro* не всегда отражают истинного положения вещей в связи со сложным комплексом регуляторных воздействий, которым клетки подвергаются на уровне целостного организма. Кроме того, следует отметить, что интенсивность синтеза Pgp в головном и спинном мозге человека и экспериментальных животных достоверно отличается, поэтому результаты доклинических исследований впоследствии требуют подтверждения в клинике [320].

Несмотря на то, что эффлюксная активность Pgp является клинически наиболее значимым показателем, часто требуется оценить функционирование данного транспортера комплексно, что в научных работах проводится не всегда. Так, например, острая CCl₄-индуцированная печеночная и глицерол-индуцированная почечная недостаточность в исследовании *in vivo* на крысах вызывали снижение функциональной активности Pgp, тогда как количество самого белка оставалось неизменным или даже повышалось. Подобная динамика подтверждает, что амплификация гена *MDR1*, изменение его экспрессии или

увеличение количества белка-транспортера на цитоплазматической мембране часто не коррелирует с модуляцией эффлюксной активности Pgp, что может быть вызвано влиянием на его функционирование различных эндогенных факторов. Среди них можно выделить уровень гормонов, энергообеспеченности и пр. Это требует комплексного подхода к изучению функционирования Pgp различными методами [278]

Фармакологическое ингибирование белка-транспортера локально в ГЭБ с целью интенсификации доставки нейропротекторов в ишемизированный головной мозг может быть перспективным с целью повышения клинической эффективности терапии ишемического инсульта. Ингибирование данного транспортера также актуально для повышения доставки противоопухолевых или противоэпилептических лекарственных средств в головной мозг при его новообразованиях или эпилепсии [337, 252]. Напротив, направленная индукция белка-транспортера в ГЭБ может иметь терапевтическую ценность для снижения поступления токсичных веществ-субстратов Pgp в ткань мозга.

Для подтверждения актуальности ингибирования активности Pgp в ГЭБ с целью более эффективной фармакологической нейропротекции необходимо комплексно оценить функционирование транспортера (изучить его качественные и количественные параметры) *in vivo* на фоне различных видов гипоксического воздействия: глобальной и фокальной церебральной ишемии. Это позволит подобрать экспериментальную патологию с ростом уровня транспортера в мозге.

Для реализации данной цели были учтены некоторые особенности функционирования Pgp. Так, в связи с тем, что экспериментальные воздействия способны косвенно повлиять на работу транспортера, например, изменяя в организме экспериментальных животных гормональный фон или вызывая системные метаболические сдвиги [99, 109], первоначально нами было оценено функционирование Pgp на фоне «ложной» операции и введения дистиллированной воды, и показано сохранение его активности на исходном уровне [117].

Для исследования влияния церебральной ишемии на функциональную активность Pgr на уровне целостного организма в настоящей работе в качестве тест-системы были использованы кролики-самцы породы Шиншилла. Это связано со значительным сходством аминокислотной последовательности молекулы транспортера кролика и человека, а также во многом аналогичным спектром модуляторов его функционирования [129, 251]. Кроме того, возможность многократного забора крови у кроликов и построения полноценной фармакокинетической кривой позволяет анализировать функциональную активность транспортера наиболее информативным методом – путем оценки фармакокинетики его маркерных субстратов. Указанные преимущества делают данную тест-систему трансляционной [113]. Крысы в качестве тест-системы для анализа влияния различных ишемических патологий на абсолютное количество Pgr в коре головного мозга были выбраны в связи с тем, что использованные в работе экспериментальные модели ишемии и ишемии-реперфузии для них широко апробированы, а также в связи с необходимостью применения большого количества животных, что экономически и этически затруднительно при использовании кроликов.

Следует отметить, что во всех экспериментальных исследованиях применялись животные мужского пола, так как исходный уровень активности транспортера у самцов позволяет в эксперименте получить как его индукцию, так и ингибирование [114]. Тогда как изначально высокий уровень функциональной активности Pgr у самок не дает значимый стимулирующий ответ при использовании веществ-индукторов [16]. Учитывалось также, что ишемическим инсультом мужчины страдают на 41% чаще, чем женщины. Это связано с вазо- и нейропротективными эффектами эстрадиола и прогестерона [126].

Следует также отметить, что в исследовании использовались животные одной возрастной группы, в связи с доказанным снижением функциональной активности Pgr и изменением его чувствительности к регуляторному влиянию лекарственных средств с возрастом [131, 180].

В качестве маркерного субстрата Pgp был выбран фексофенадин в связи с наличием у него ряда существенных преимуществ, таких как отсутствие биотрансформации и контроль фармакокинетики преимущественно со стороны Pgp, низкая токсичность и отсутствие кумуляции (это позволяет применять его также для анализа функциональной активности транспортера в клинике) [113].

В работе с кроликами применялся повторный дизайн исследования на одной группе животных, у которых первоначально определялась функциональная активность Pgp до экспериментального воздействия после однократного внутрижелудочного введения маркерного субстрата, а затем после такого воздействия (с перерывом в 3–4 дня для восстановления животных после забора крови).

В нашем предварительном исследовании было выявлено повышение функциональной активности Pgp на уровне целостного организма уже через 4 часа после моделирования гипобарической гипоксической гипоксии средней тяжести («подъем животных на высоту» 6000 м над уровнем моря). Результаты подтверждены значимым изменением фармакокинетики фексофенадина, свидетельствующим о замедлении абсорбции вещества в кишечнике и ускорении его экскреции [110]. Полученные результаты, вероятно, могут объясняться активацией транскрипционных факторов (в первую очередь NF- κ B и ядерного фактора κ B) на фоне дефицита кислорода или индукцией ряда иных сигнальных механизмов (сенсор активации перекисного окисления Nrf2, транскрипционный фактор sp1 и пр.) [174, 323, 349, 357], которые, в свою очередь, взаимодействуют с промотором гена *MDR1*, кодирующего Pgp, и интенсифицируют его экспрессию. Кроме того, *in vitro* обнаружена стабилизация Pgp и возрастание его периода полужизни в стрессовых для клеток условиях (недостаток аминокислот, кислорода и пр.) [369].

Несмотря на то, что гипоксическая гипоксия в целом не является клинически показательной и значимой экспериментальной патологией, она имеет с другими ее разновидностями общий комплекс приспособительно-компенсаторных реакций

и патогенез, который проявляется абсолютной или относительной недостаточностью процессов биологического окисления в клетках и внеклеточных структурах организма, ведущей к нарушению в них энергетического и пластического обмена [22, 347]. Полученные нами результаты, с одной стороны, частично подтверждают выдвигаемую нами гипотезу о необходимости ингибировать транспортер для улучшения результатов терапии инсульта, а с другой – говорят о том, что фармакотерапия заболеваний, в патогенезе которых лежит гипоксия, в клинике должна проводиться с учетом возможного изменения фармакокинетики лекарственных веществ-субстратов Pgp и может потребовать корректировки их доз для повышения эффективности проводимой лекарственной терапии.

Учитывая изложенное, для исследования был выбран анализ влияния двух типов церебральной ишемии – глобальной (модель церебральной гипоперфузии) и фокальной (модель ишемического инсульта, как наиболее релевантная патологии человека) церебральной ишемии на функционирование Pgp крыс. Выбор тест-системы в данном случае продиктован удобством моделирования патологии и высоким процентом выживаемости животных.

В связи с тем, что признаком большинства заболеваний ЦНС, в том числе и ишемии, является активация ПОЛ [314] была проведена оценка его уровня в ткани мозга. Также анализировалось количество транскрипционных факторов – Nrf1 и Nrf2 – сенсоров кислородного дефицита и уровня липопероксидации соответственно для выяснения механизмов регуляции транспортера на фоне моделируемых патологий. Кроме того, для выявления возможного влияния ишемии мозга на системную активность Pgp применялась односторонняя окклюзия общей сонной артерии у кроликов, т.к. методически данный эксперимент корректно воспроизводим на указанной тест-системе.

Для оценки влияния глобальной церебральной ишемии на количество Pgp в головном мозге была выбрана модель, заключающаяся в двусторонней перманентной окклюзии общих сонных артерий крыс-самцов. Данная патология

рассматривается в качестве модели хронической церебральной гипоперфузии [181, 368]. Фокальная ишемия мозга моделировалась путем эндоваскулярной окклюзии и окклюзии-реперфузии средней мозговой артерии разной продолжительности.

Односторонняя окклюзия общей сонной артерии у кроликов по литературным данным вызывает ишемию на фоне снижения артериального давления, возникающего при общей анестезии комбинацией ксилазина и золетила с выраженным симпатолитическим эффектом [40]. Окрашивание срезов головного мозга трифенилтетразолия хлоридом на данном этапе не применялось в связи с тем, что зона некроза при описанных моделях не возникает.

В ходе исследования установлено, что развитие глобальной ишемии головного мозга вследствие билатеральной окклюзии общих сонных артерий приводит к плавному повышению количества Pgr в головном мозге крыс к 4-му часу наблюдения. Через сутки уровень транспортера оставался повышенным, но снижался к 72-му часу ишемии до значений, достоверно от контроля не отличающихся. Большая длительность ишемии не оценивалась с одной стороны в связи с низкой выживаемостью животных, что согласуется с литературными данными [46], а с другой – из-за частичного восстановления кровоснабжения мозга за счет неоангиогенеза у выживших крыс [148], что приводило бы к неверной трактовке результатов. Следует отметить, что оценка функциональной активности Pgr в ГЭБ на фоне билатеральной окклюзии общих сонных артерий невозможна из-за отсутствия проникновения маркерного субстрата транспортера в головной мозг.

Фокальная ишемия мозга крыс вызывала неоднозначное изменение уровня Pgr в коре мозга. Лишь две модели (30- и 60-минутная окклюзия средней мозговой артерии с 24-часовой реперфузией) вызывали возрастание количества транспортера в коре головного мозга. При этом наблюдалось увеличение интенсивности перекисного окисления липидов и уровня транскрипционного фактора Nrf2.

Похожие исследования в научной литературе немногочисленны, и их результаты противоречивы. 20-минутная окклюзия вертебральных и сонных артерий приводила к значительному увеличению накопления в головном мозге крыс субстрата Pgr – доксорубицина. Данный эффект авторы связывают с истощением количества АТФ в мозговой ткани, а, значит, и снижением функциональной активности Pgr. Через 30 минут рециркуляции количество АТФ возрастало, и уровень вещества в мозге возвращался к уровню интактных животных [282].

Различия в представленных в научной литературе и наших результатах могут быть вызваны рядом причин, например, разным объемом ишемизированного мозга, продолжительностью и методикой моделирования ишемии, выраженностью окислительного стресса, областью головного мозга, подвергавшейся анализу (транспортер экспрессируется в различных отделах коры мозга с разной интенсивностью [140]). Кроме того, подобные флуктуации результатов связаны с различным влиянием регуляторных факторов, выделяемых в кровь на разных этапах ишемии (интерлейкин 6, интерлейкин 1 β , фактор некроза опухолей α), на функционирование Pgr [168], а также различными аналитическими методиками (типы антител, методы фиксации образцов) и пр. [334].

В регуляции функционирования Pgr на фоне гипоксии различной степени немаловажная роль отводится активации ПОЛ. Нами показано, что двусторонняя окклюзия общих сонных артерий крыс приводит к развитию окислительного стресса в коре больших полушарий, что подтверждается повышенным уровнем ТБК-реактивных продуктов, снижением концентрации сульфгидрильных групп и уменьшением активности антиоксидантного фермента – глутатионпероксидазы в данной ткани. Нами установлена прямая пропорциональная связь между количеством изучаемого белка-транспортера в ГЭБ и концентрацией ТБК-реактивных продуктов, что, служит доказательством прямой зависимости синтеза Pgr от степени липопероксидации.

Окисление сульфгидрильных групп в клетках приводит к изменению экспрессии некоторых транскрипционных факторов, например, редокс-чувствительного Nrf2 (NF-E2-related factor 2) [29], который активирует функционирование ряда ферментов детоксикации и экспорта из клеток ксенобиотиков и токсичных продуктов метаболизма, в том числе Pgp [297]. В нашем исследовании было выявлено возрастание уровня Nrf2 в ткани коры головного мозга, начиная уже со 2-го часа после билатеральной окклюзии общих сонных артерий, и возвращение его количества до исходных значений к 3-м суткам наблюдения. Установлена корреляционная зависимость между количеством Pgp и данного транскрипционного фактора.

Кроме того, глобальная церебральная ишемия вызывала увеличение количества кислородчувствительной субъединицы транскрипционного фактора NIF-1 через 24 и 72 ч. Это с одной стороны подтверждает развитие ишемии мозга, а с другой – свидетельствует об участии данного транскрипционного фактора в регуляции работы изучаемого транспортера в мозге. Причем активация Nrf2 происходила быстро, но его уровень возвращался к исходным значениям уже к 72-му часу наблюдения, что сопровождалось также увеличенной концентрацией ТБК-реактивных продуктов в мозге. Из научной литературы известно, что после синтеза Nrf2 быстро деградирует посредством 26S протеосомы в цитоплазме клеток и его период полужизни составляет 15–20 мин [224]. Синтез же NIF-1 α отличался более выраженным латентным периодом, однако и большей продолжительностью функционирования из-за сохранения дефицита кислорода.

Взаимосвязь гипоксии, липопероксидации, кислородчувствительного транскрипционного фактора и Pgp показана ранее на модели окклюзии общей сонной артерии [167]. Продемонстрировано, что через 5 дней на фоне гиперкапнии, развивающейся при перманентной односторонней окклюзии общей сонной артерии крыс вистар, ипсилатеральный кровоток составлял 63% от аналогичного на неокклюзированной стороне. Авторы считают, что дефицит кислорода сохраняется достаточно длительно и вызывает накопление NIF-1,

однако, вероятно, его недостаточно для активации экспрессии гена *MDR1*, т.к. интенсивность липопероксидации падает и Nrf2 перестает функционировать совместно с HIF-1. Повышение уровня транспортера после продолжительной ишемии также возможно за счет образования новых эндотелиальных клеток из-за активации VEGF [299, 355].

Анализ данных аналогичных исследований показал, что результаты экспериментов по оценке влияния ПОЛ на функционирование Pgp часто противоречивы. Несмотря на это, ученые сходятся во мнении, что транскрипционные факторы Nrf2 и HIF-1 оказывают индуцирующее действие на белок-транспортер [174, 323, 345, 346, 347, 349]. Подробная характеристика HIF-1 представлена в литературном обзоре данной работы, описание Nrf2 приводится ниже.

Транскрипционный фактор Nrf2 [230, 345] и его репрессор – белок-челнок Keap1 (Kelch-like ECH-associated protein 1) являются ключевым звеном в регуляции адаптации клетки к окислительному стрессу, вызванному накоплением в клетке токсичных ксенобиотиков-электрофилов и оксидантов, действием ионизирующей радиации, облучением ультрафиолетом, воспалительным процессом, а также нормальным протеканием фагоцитоза. В комплексе со вспомогательными белками, данный транскрипционный фактор взаимодействует с последовательностями ARE (antioxidant response element) [284]. Подобное взаимодействие приводит к согласованному усилению транскрипции генов, содержащих в своих промоторных или энхансерных участках указанные регуляторные последовательности. В настоящее время ARE представлены в 5'-фланкирующих участках генов, кодирующих ферменты биосинтеза антиоксидантов (гемоксигеназа 1, каталитическая и регуляторная субъединицы γ -глутамил-цистеин-синтетазы и др.), детоксифицирующих ферментов (НАДФН-хинон оксидоредуктаза, глутатионтрансфераза, глутамат-цистеин-лигаза) и ряда других. Активация Nrf2 в условиях окислительного стресса стимулирует работу ферментативных систем, благодаря которым чужеродные соединения с высокой и

неспецифической химической активностью эффективно обезвреживаются и экскретируются из клетки, а поврежденные молекулы подвергаются репарации или заменяются новыми [253].

В отсутствие оксидантов и электрофильных агентов Nrf2 неактивен и локализован в цитоплазме в комплексе с репрессором Keap1. Keap1 способствует убиквитинированию транскрипционного фактора по остаткам лизина в Neh2 домене посредством Cullin-3-зависимого убиквитин-лигазного комплекса [224]. Окисление сульфгидрильных групп репрессора освобождает Nrf2, который транспортируется в ядро, гетеродимеризуется с другими белками (leucine zipper proteins) и связывается с ARE [345].

Ряд исследований показал, что на ранних этапах ишемии мозга происходит значительная стимуляция экспрессии и функциональной активности Pgr, что коррелирует с интенсификацией ПОЛ [150, 218, 295].

Так, в экспериментах на крысах обнаружено, что 60-минутная печеночная ишемия с последующей реперфузией в течение 12 часов вызывает повышение уровня малонового диальдегида, а также снижение площади под фармакокинетической кривой «концентрация-время» и скорости энтерального всасывания циклоспорина А (субстрата Pgr), что может свидетельствовать об индукции функциональной активности транспортера. Внутривенное введение аналога α -токоферола – тролокса за 5 минут до реперфузии снижало степень оксидативного стресса и угнетало экспрессию Pgr [212].

Выявлено, что воздействие перекиси водорода (200 мкМ) приводило к развитию окислительного стресса и повышению уровня Pgr и транскриптов *mdr1a* и *mdr1b* в культуре эндотелиальных клеток сосудов головного мозга крыс [295].

При инкубировании ряда культур опухолевых клеток (KB31, KBV1, A549 и DMS-53) на гипо- и гипергликемических средах показано развитие окислительного стресса за счет НАДФН-зависимой оксидазы 4 и дестабилизации митохондриальных мембран, активация транскрипционного фактора NIF-1 и повышение его экспрессии, ядерной транслокации р65-субъединицы

транскрипционного фактора NF-κB, а также значительная активация функциональной активности Pgp, приводящая к резистентности к доксорубину (субстрату транспортера) [305].

С другой стороны, встречаются данные об ингибировании Pgp на фоне активации ПОЛ.

Так, уменьшение печеночной экскреции субстрата Pgp – родамина-123 на фоне ишемии-реперфузии кишечника авторы связывают со снижением экспрессии транспортера, вызванным увеличением уровня ПОЛ и повышением уровня иРНК индуцибельной NO-синтазы [328].

Показано, что ряд экспериментальных антиоксидантов – производных 4-арилхинолин-2-карбоксилата оказывал индуцирующее влияние на функциональную активность Pgp в клетках аденокарциномы LS-180 [139].

Обработка культуры клеток HepG2 специфическим ингибитором синтеза восстановленного глутатиона – бутионинсульфоксимином за 12 ч перед воздействием на них гипоксических условий приводила к дозозависимому ингибированию синтеза NF-1α, а повышение внутриклеточного содержания восстановленного глутатиона путем добавления в среду культивирования N-ацетилцистеина частично восстанавливало уровень данного транскрипционного фактора. В свою очередь количество NF-1α коррелировало с уровнем Pgp [347].

Применение среды культивирования, содержащей 1 мкМ перекиси водорода, для выращивания клеток Сасо-2 повышало экспрессию в них Pgp, тогда как концентрация 10 мМ приводила к снижению количества транспортера [326].

Показана прямая корреляционная зависимость средней силы между экспрессией Pgp и фермента глутатионтрансферазы в клетках карциномы гортани ($r=0,426$; $p=0,012$) [372].

Вследствие того, что основные ферменты, участвующие в поддержании редокс-статуса (глутатионтрансфераза, глутатионпероксидаза и др.), являются по сути ферментами детоксикации ксенобиотиков, которые в процессе метаболизма данный параметр гомеостаза могут нарушать, прямая корреляция между их

экспрессией и функционированием Pgr, играющим также протекторную роль, является защитной компенсаторно-приспособительной реакцией организма на умеренный окислительный стресс. Развитие более выраженного, некомпенсированного окислительного стресса приводит к снижению экспрессии и функциональной активности Pgr, свидетельствуя об истощении защитных резервов организма [310].

Для оценки выдвигаемой гипотезы об актуальности ингибирования Pgr с целью повышения доставки нейропротекторных лекарственных средств в головной мозг целесообразно было оценить принадлежность ряда препаратов данной группы к числу субстратов белка-транспортера с целью их дальнейшего использования в эксперименте. Для анализа были выбраны эффективные и безопасные отечественные лекарственные препараты, обладающие нейропротекторной активностью: этилметилгидроксипиридина сукцинат, омберацетам и фабомотизол [33, 53, 55, 164].

В доступной литературе обнаружен ряд ВЭЖХ-методик количественного определения этилметилгидроксипиридина сукцината, омберацетама и фабомотизола в плазме крови. Однако используемые нами методики характеризуются рядом существенных отличий. Так, в отличие от методик наших коллег [3], в данной работе мы применяли не масс-спектрометрический, а более доступный УФ-спектрофотометрический способ детектирования, а также жидкостную экстракцию вместо твердофазной, что позволяет существенно снизить цену исследования. По сравнению с методиками А.К. Сариева и др. (2005) [62] и С.Б. Середенина и соавт. (2005) [65] использована более простая подготовка проб и изменен состав подвижной фазы. Кроме того, ряд методик разработан для анализа фармацевтических субстанций или лекарственных форм [20], что неприемлемо для наших целей в связи с необходимостью минимизировать количество соэкстрактивных веществ плазмы крови. Это, в свою очередь, требует более жестких условий экстракции. Ряд авторов использовал методики, универсальные для нескольких видов животных, однако мы считаем

более корректным для различных видов животных применять или адаптировать отдельные методики.

Принадлежность этилметилгидроксипиридина сукцината, омберацетама и фабомотизола к субстратам Pgp оценивали путем анализа их фармакокинетики на фоне курсового введения классических индуктора и ингибитора белка-транспортера. Фармакокинетические параметры протестированных веществ после курсового введения кроликам ингибитора (верапамила) и индуктора (рифампицина) Pgp достоверно не изменялись, что свидетельствует о том, что изученные вещества не являются субстратами Pgp. Таким образом, роль данного транспортера во всасывании и экскреции протестированных лекарственных средств, а также их распределении, в том числе – в проникновении через ГЭБ незначительна. Тем не менее, говорить о полном отсутствии участия в фармакокинетике изученных нейропротекторов других переносчиков, таких как BCRP и MRP4, необоснованно.

Так, например, в ГЭБ наблюдается синергизм между эффлюксными белками-транспортерами Pgp и BCRP (ABCG2). Последний *in vivo* не оказывает существенного лимитирующего влияния по отношению к проникновению лекарственных веществ в мозг: у нокаутных по его гену мышей церебральная абсорбция его субстратов возрастала не более чем в два раза. Таким образом, данный транспортер в ГЭБ (в отличие от тонкого кишечника) не рассматривается как основа для клинически значимых межлекарственных взаимодействий. Проникновение противоопухолевого средства лапатиниба, которое является субстратом одновременно и Pgp и BCRP, в головной мозг было в 1,3 и 3,8 раз выше у мышей, нокаутированных соответственно по генам Pgp и BCRP. Однако при отсутствии у животных одновременно обоих транспортеров распределение указанного вещества в головной мозг возрастало в 42 раза. Причем специфическое ингибирование транспортеров (циклоспорин для Pgp и эфавиренс – для BCRP) к подобным результатам не приводило [229].

Следующая задача работы заключалась в анализе влияния

этилметилгидроксипиридина сукцината, омберацетама и фабомотизола на функциональную активность Pgp, которую оценивали *in vivo* по фармакокинетике фексофенадина. Актуальность подобного исследования продиктована необходимостью прогнозирования возможных фармакокинетических взаимодействий с участием данных препаратов и лекарственных средств, фармакокинетика которых (в том числе – проникновение в головной мозг) значительно зависит от активности Pgp (дигоксин, лоперамид, дабигатрана этексилат и др.).

Курсовое введение кроликам омберацетама не приводило к изменению фармакокинетики маркерного субстрата Pgp. Таким образом, препарат не является модулятором функционирования данного белка-транспортера. Однако нами выявлено снижение функциональной активности Pgp при курсовом введении кроликам этилметилгидроксипиридина сукцината и фабомотизола, что подтверждено характерными изменениями фармакокинетических параметров фексофенадина. Результаты, полученные с применением фабомотизола, в дальнейшем подтверждены на добровольцах в плацебоконтролируемом клиническом исследовании [105].

Обнаруженные изменения фармакокинетических параметров фексофенадина после курсового введения кроликам фабомотизола свидетельствуют о том, что содержание маркерного субстрата в плазме крови животных повысилось, а его экскреция замедлилась, что является доказательством ингибирования функциональной активности Pgp. Причем невысокая функциональная активность транспортера коррелировала также со снижением его относительного количества в печени животных.

С другой стороны, этилметилгидроксипиридина сукцинат при курсовом введении кроликам не изменял относительное количество транспортера в печени, тонком кишечнике и коре головного мозга животных, что предполагает прямую ингибирующую активность по отношению к Pgp.

Ингибирование функциональной активности Pgp на фоне введения этилметилгидроксипиридина сукцината и фабомотизола позволяет предложить несколько возможных механизмов подобного влияния.

Так, ранее нами показано, что 14-дневное внутрижелудочное введение крысам-самцам этилметилгидроксипиридина сукцината в дозе 100 мг/кг массы три раза в день приводит к снижению количества транскрипционного фактора, участвующего в регуляции синтеза Pgp, – Nrf2 в миокарде животных [108]. Это, вероятно, связано с наличием у этилметилгидроксипиридина сукцината прямой антиоксидантной активности (за счет присутствия в его молекуле гидроксильной группы в гетероцикле с выраженными восстановительными свойствами), что приводит к снижению базального уровня свободных радикалов.

Известно, что омберацетам (10 мкМ) *in vitro* увеличивает ДНК-связывающую активность транскрипционного фактора NIF-1 [8], который повышает синтез Pgp [174]. Кроме того, описанная для омберацетама противовоспалительная активность также предполагает индукцию активности транспортера [345]. Наши результаты не подтверждают подобные гипотезы, вероятно, в связи с тем, что мы применяли омберацетам в норме у интактных животных и изучали функционирование белка-транспортера на уровне целостного организма, где Pgp подвергается воздействию множества факторов (клеточное окружение, гормональный фон и пр.), а не на клеточной культуре, где подобные влияния отсутствуют. Кроме того, период полувыведения тестируемого вещества по данным литературы составляет у кроликов лишь $0,3 \pm 0,03$ ч [5], что минимизирует возможность непосредственно изменять активность транспортера в течение всего периода забора крови у кроликов (см. материалы и методы).

Полученные нами результаты в серии фабомотизола согласуются с данными литературы. На культурах клеток с фенотипом множественной лекарственной устойчивости выявлено, что ряд производных бензимидазола (к которым принадлежит и фабомотизол) проникают внутриклеточно менее интенсивно, чем в нормальные клетки, что косвенно подтверждает их принадлежность к числу

субстратов Pgp [281], а, значит, и возможность их влияния на активность данного транспортера путем взаимодействия с частями его белковой молекулы.

Нокдаун гена, кодирующего $\sigma 1$ -рецептор – мишени действия фабомотизола – приводит к индукции в нейронах гиппокампа гена Nrf2 и p50 изоформы NF- κ B [206]. Указанные транскрипционные факторы интенсифицируют экспрессию гена *MDR1*, кодирующего Pgp [364]. Фабомотизол стимулирует $\sigma 1$ -рецептор, что, вероятно, способно вызывать противоположные изменения.

Кроме того, установлено, что фабомотизол умеренно активирует некоторые изоформы цитохрома P450, например, *CYP2C9* [19]. Данный ферментный комплекс совместно с Pgp функционирует в качестве «транспортно-метаболического альянса» для ограничения проницаемости ГЭБ. Снижение функциональной активности и синтеза Pgp на фоне курсового введения фабомотизола может служить компенсаторным механизмом для поддержания гомеостаза эндогенных и экзогенных веществ, спектр которых часто аналогичен у микросомальных ферментов печени и данного белка-транспортера [135].

Функциональная активность Pgp возвращалась к исходному уровню на 5-й день отмены этилметилгидроксипиридина сукцината, что связано, скорее всего, с коротким периодом полувыведения препарата. Его краткосрочная циркуляция в плазме крови экспериментальных животных не позволяет ему непосредственно взаимодействовать с белком-транспортером и изменять его активность длительное время [97]. При этом период полужизни Pgp составляет порядка 5–17 ч [277] – это может служить причиной отсутствия эффекта последействия также у фабомотизола, который ингибирует активность Pgp косвенно, изменяя его синтез.

Таким образом, комбинированное назначение фабомотизола или этилметилгидроксипиридина сукцината с лекарственными веществами-субстратами Pgp следует проводить осторожно, учитывая вероятные межлекарственные фармакокинетические взаимодействия между ними на уровне данного белка-транспортера. Например, концентрация прямого селективного ингибитора тромбина – дабигатрана этексилата в плазме крови пациентов

возрастала в 1,5 раза при его приеме через час после верапамила и амиодарона – классических ингибиторов белка-транспортера, что увеличивало риск кровотечений [348]. Однако подобное предположение требует клинической проверки.

Кроме того, возможно предположить использование фабомотизола и этилметилгидроксипиридина сукцината в качестве лекарственных средств-ингибиторов данного белка-транспортера совместно с нейропротекторами, принадлежащими к числу его субстратов, с целью интенсификации проникновения последних через ГЭБ и повышения эффективности фармакотерии ишемического инсульта.

Обнаруженное нами незначительное участие Pgp в фармакокинетике протестированных лекарственных средств с нейропротективной активностью свидетельствует о том, что их проникновение через ГЭБ теоретически будет достаточным для достижения минимальной терапевтической концентрации в ткани мозга. Также повышенная функциональная активность данного белка-транспортера не скажется на эффективности проводимой ими фармакотерапии. Это подтверждается результатами многочисленных исследований об эффективности указанных лекарственных средств в качестве нейропротекторов [8, 12, 67, 69].

В дальнейшем задачей исследования была оценка функциональной активности Pgp на уровне целостного организма на фоне ишемии мозга, которую моделировали путем односторонней окклюзии общей сонной артерии у кроликов-самцов породы Шиншилла.

Анализ функциональной активности Pgp проводится путем сравнения соответствующих фармакокинетических параметров фексофенадина, отвечающих за интенсивность его всасывания, распределения и элиминации (AUC_{0-t} , C_{max} , C_{max}/AUC_{0-t} , $t_{1/2}$, K_{el} и пр.). В исследовании на крысах показано, что окклюзия средней мозговой артерии в течение 90 мин с последующей реперфузией приводила к повышению уровня Pgp как в головном мозге, так и в печени [168],

вероятно, за счет выделения ишемизированным мозгом различных регуляторных факторов (интерлейкинов 6 и 1 β , фактора некроза опухолей) в кровь. В нашем исследовании изменений параметров фармакокинетики фексофенадина не было выявлено, что свидетельствуют том, что системная активность транспортера не отличается от уровня интактных животных. Таким образом, изменение содержания субстрата Pgp в мозге, которое мы впоследствии анализировали, на фоне церебральной ишемии-реперфузии животных связано с локальной модуляцией активности белка-транспортера именно в ГЭБ.

Обнаружено, что вопреки выраженному синтезу Pgp в печени, тонком кишечнике и почках, у нокаутированных по гену *MDR1* мышей не выявлено значительного возрастания плазменной концентрации лекарственных средств-субстратов транспортера. Это отражает избыточность экскреторной функции в органах выведения ксенобиотиков за счет наличия большого числа транспортеров. С другой стороны, это не снижает роль Pgp в качестве препятствия для проникновения тех же препаратов в головной мозг [270].

Следует также отметить бимодальные изменения плазменной концентрации фексофенадина в данной экспериментальной серии, связанные, вероятно, с гетерогенностью распределения Pgp в тонком кишечнике [358] или процессом энтерогепатической циркуляции.

Следующей задачей научного исследования была разработка метода анализа функциональной активности Pgp локально в ГЭБ с целью выбора вещества, которое снижает интенсивность работы транспортера в барьере и, таким образом, может быть использовано для оценки перспективности ингибирования Pgp для повышения эффективности нейропротекторной терапии ишемических патологий мозга. Кроме того, подобная методика позволит оценивать функциональную активность транспортера локально в ГЭБ на фоне различных патологий, в том числе – при ишемии головного мозга. Несмотря на то, что протестированные препараты (этилметилгидроксипиридина сукцинат и фабомотизол) являются

ингибиторами транспортера, их использование с этой целью невозможно из-за наличия собственной нейропротекторной активности.

Активность транспортера в ГЭБ оценивали по степени проникновения его маркерного субстрата – фексофенадина в головной мозг крыс в разных сериях животных до и после экспериментального воздействия. Особенностью фармакокинетики фексофенадина является то, что он не метаболизируется микросомальными ферментами печени, а его проникновение в головной мозг через ГЭБ контролируется преимущественно Pgp [283]. Являясь субстратом Pgp, фексофенадин плохо проникает через ГЭБ за счет активного эффлюкса белком-транспортером [370]. Поэтому при внутривенном введении (когда исключено влияние абсорбции на фармакокинетику препарата) концентрация фексофенадина в головном мозге может характеризовать проницаемость ГЭБ и косвенно – активность Pgp в нем. Оценка функциональной активности транспортера по степени проникновения его маркерного субстрата в область ишемии не позволяет анализировать данный параметр на фоне перманентной окклюзии средней мозговой артерии, в связи с тем, что в этом случае фексофенадин не способен с током крови проникнуть в зону ишемии.

Для апробации методики оценки активности Pgp в ГЭБ анализировалось содержание фексофенадина в плазме крови и головном мозге, а также степень проникновения вещества в головной мозг (рассчитывалась как отношение площади под фармакокинетической кривой фексофенадина в мозге к аналогичному показателю в плазме крови) у интактных крыс, а также животных после курсового введения индуктора Pgp – рифампицина и однократного назначения прямого ингибитора транспортера – верапамила. Рифампицин назначался курсом в связи с тем, что он повышает синтез Pgp, действуя опосредовано через транскрипционный фактор PXR [31, 290], на что требуется время.

Верапамил является прямым ингибитором Pgp [149], то есть связывается непосредственно с его молекулой и снижает ее активность. Необходимым

условием для проявления ингибирующего эффекта является наличие верапамила в плазме крови во время эксперимента, т.е. в течение 60 мин, за которые производился забор крови у животных для количественного анализа фексофенадина. Период полувыведения верапамила при его внутривенном введении у крыс составляет $1,59 \pm 0,46$ ч [267], в связи с чем вещество вводилось непосредственно перед инъекцией фексофенадина.

Внутривенное введение фексофенадина было выбрано исходя из вариабельности его фармакокинетики и показателя биодоступности при внутрижелудочном введении.

Максимальная плазменная концентрация фексофенадина наблюдалась через 5 мин после введения и быстро снижалась до минимального значения через 60 мин. Использование индуктора Pgr – рифампицина не повлияло на фармакокинетику фексофенадина после его внутривенного введения: основной фармакокинетический параметр $AUC_{0-t(\text{плазма})}$ статистически значимо не отличался от показателей контроля (изолированное введение фексофенадина). Это может быть связано с тем, что Pgr играет важную роль в фармакокинетике фексофенадина преимущественно на этапе всасывания и на этапе распределения (прохождение через ГЭБ), в то время как на этапе выведения печенью ему принадлежит неосновная роль [322]. Таким образом, при внутривенном введении фексофенадина динамика активности Pgr на фоне препарата-индуктора не привела к изменению фармакокинетики изучаемого субстрата.

При внутривенном введении фексофенадина крысам субстрат проникал через ГЭБ и детектировался в коре больших полушарий уже через 5 мин, максимальная концентрация фиксировалась через 15 мин, а затем его уровень начинал плавно снижаться.

Применение индуктора Pgr – рифампицина приводило к уменьшению концентрации фексофенадина в мозге через 15, 30 и 45 мин, а также его $AUC_{0-t(\text{мозг})}$ (общего содержания фексофенадина в коре мозга) по сравнению с

показателями контрольных животных, что свидетельствует о том, что фексофенадин в меньшей степени проникает через ГЭБ.

Введение верапамила не оказало существенного влияния на содержание фексофенадина в коре больших полушарий головного мозга по сравнению с показателями контрольных крыс. Вероятно, это связано с тем, что при введении верапамила систолическое артериальное давление снижалось со $149,5 \pm 7,4$ до $94,8 \pm 8,7$ мм рт. ст. перед введением фексофенадина (артериальное давление измеряли непрямой метод на хвосте – tail-cuff method), что приводило к гипоперфузии головного мозга.

Данные научной литературы подтверждают, что снижение артериального давления на фоне введения блокатора медленных кальциевых каналов – верапамила может приводить к снижению интенсивности перфузии головного мозга и, как следствие, – к снижению проникновения фексофенадина через ГЭБ, в связи с этим дополнительно был применен еще один прямой ингибитор Pgp – омепразол, не влияющий на системную гемодинамику [350].

С целью поиска эффективного ингибитора Pgp в ГЭБ, не влияющего на системную гемодинамику и церебральный кровоток, в исследовании был апробирован блокатор протонной помпы омепразол. Данная фармакологическая группа (омепразол, пантопразол, лансопразол) показала ингибирующую активность по отношению к Pgp на клеточных культурах Caco-2 и L-MDR1 с концентрацией полуингибирования соответственно 17,7, 17,9 и 62,8 мкМ, что выявлено по степени транслокации субстрата транспортера – дигоксина [360].

Расчет вводимой крысам дозы препарата был проведен следующим образом. При введении крысам внутривенно дозы 3,45 мг/кг максимальная плазменная концентрация составит порядка 3,5 мкМ [291], чтобы получить концентрацию 17,7 мкМ (IC₅₀ по отношению к Pgp для омепразола) надо вводить в 5,1 раз больше, т.е. 17,6 мг/кг. Это подтверждается линейностью фармакокинетики омепразола при его однократном назначении пациентам. Для крыс подобная информация в научной литературе отсутствует [124].

Однократное внутривенное введение омепразола перед введением фексофенадина не изменяло его плазменные концентрации, но приводило к повышению концентрации маркерного субстрата P_{gp} в коре больших полушарий мозга через 5 мин после его введения. Параметр $AUC_{0-t(\text{мозг})}$ по сравнению с показателями контрольных животных также возрастал, что свидетельствует о повышении проникновения фексофенадина через ГЭБ.

Для оценки проницаемости ГЭБ рассчитывался показатель $AUC_{0-t(\text{мозг})} / AUC_{0-t(\text{плазма})}$. Использование рифампицина приводило к снижению данного параметра, а при введении омепразола он статистически значимо возрастал. Это свидетельствует о том, что применение данных препаратов в указанных дозировках в экспериментальных исследованиях можно рекомендовать в качестве моделей соответственно повышенной и сниженной функциональной активности P_{gp} в ГЭБ для поиска веществ аналогичного действия.

С целью проверки гипотезы о целесообразности снижения функциональной активности P_{gp} для повышения эффективности лекарственной терапии последствий ишемического инсульта было решено проанализировать эффективность комбинированного применения нейропротектора-субстрата P_{gp} и вещества-ингибитора функциональной активности транспортера. Так как протестированные нами лекарственные вещества (этилметилгидроксипиридина сукцинат, омберацетам и фабомотизол) не являются субстратами P_{gp}, в качестве нейропротекторного препарата был выбран блокатор кальциевых каналов нимодипин с доказанной принадлежностью к субстратам P_{gp} [344]. Нимодипин является средством коррекции артериальной гипертензии на фоне ишемического инсульта [35], используется для профилактики и терапии церебрального вазоспазма и ишемии мозга (до появления инструментальных или клинических признаков церебрального вазоспазма), а также для нормализации и поддержания стабильной гемодинамики при геморрагическом инсульте: для купирования эпизодов артериальной гипертензии внутривенно с одновременным назначением пероральных гипотензивных препаратов [32]. Кроме того, нимодипин является

препаратом нейропротекторного действия в соответствии с Клиническими рекомендациями по диагностике и лечению пострадавших с острыми нарушениями мозгового кровообращения в чрезвычайных ситуациях [34], а также средством первичной нейропротекции в соответствии с проектом клинического протокола диагностики и лечения инсульта, неуточненного как кровоизлияние или инфаркт (при субарахноидальном кровоизлиянии, а также в комплексной терапии ишемического инсульта в течение первых 12 ч на фоне повышенного артериального давления). В соответствии с зарубежными рекомендациями данный препарат одобрен к применению для предотвращения развития ишемического инсульта у пациентов после недавнего субарахноидального кровоизлияния вследствие разрыва аневризмы сосудов головного мозга [133].

Нейропротекторная активность нимодипина, причем независимая от типа клеток, показана в многочисленных исследованиях как *in vitro*, так и *in vivo*. По последним данным основная роль отводится предотвращению веществом стресс-индуцированного апоптоза за счет снижения активности каспазы-3 и 7, а также активации CREB (транскрипционного фактора – протеина, связывающегося с цАМФ-ответственным элементом) и АКТ (внутриклеточного фермента протеинкиназы В) сигнальных путей [256].

В качестве ингибитора P_gr использовался блокатор протонной помпы – омепразол [360], не обладающий самостоятельной нейропротекторной активностью.

Несмотря на то, что омепразол является селективным ингибитором изоформы CYP2C19 ((K_i 3,1±2,2 мкМ)) [276]) и незначительно снижает активности изоформ 2C9 (K_i 40,1±14,8 мкМ), 3A4 (K_i 84,4±4,0 мкМ), 2D6 (K_i 240,7±102,0 мкМ) *in vitro* [236], его введение крысам в дозе 17,6 мг/кг не может повлиять на интенсивность биотрансформации нимодипина, в связи с тем, что в метаболизм последнего вовлечена изоформа CYP3A4 [262].

Были применены модели 60-минутной ишемии средней мозговой артерии с последующей суточной реперфузией (модель фокальной ишемии) и

билатеральной окклюзии общих сонных артерий (модель глобальной ишемии), чтобы в комплексе оценить все возможные перспективы использования указанной комбинации. Описанная длительность окклюзии-реперфузии выбрана в связи с выявленным возрастанием абсолютного количества P_{grp} в коре головного мозга крыс, а также формирование зоны некроза мозга [261].

Стратегия ингибирования P_{grp} в ГЭБ в экспериментах для повышения эффективности нейротропной фармакотерапии по данным ряда исследователей успешно развивается [165, 329]. Например, на нечеловеческих приматах показана эффективность ингибирования P_{grp} в ГЭБ инфузией элакридара (12 мг/кг/ч) для интенсификации доставки в мозг эрлотиниба или повышения эффективности терапии опухолей головного мозга [329]. Также установлено, что проникновение в головной мозг [(11)C]-N-дезметил-лоперамида ([¹¹C]dLop) – меченного радиоактивного субстрата P_{grp} на фоне внутривенного введения терапевтической дозы (15 мг/кг/ч) циклоспорина (ингибитора транспортера) возрастало [165]. Показана перспектива модуляции P_{grp} в ГЭБ и тонком кишечнике, в особенности с использованием синтетических и природных полимеров, для преодоления фармакорезистентности эпилепсии [210].

В то же время попытки ингибирования транспортера для повышения доставки цитотоксичных агентов в опухолевые клетки не увенчались успехом из-за серьезных системных фармакодинамических и фармакокинетических ограничений [321]. Ингибирование P_{grp} с целью повышения эффективности фармакотерапии последствий острого нарушения мозгового кровообращения, по мнению ряда авторов, остается перспективным [316].

В нашем исследовании не было обнаружено достоверного снижения зоны некроза головного мозга крыс при использовании комбинации нимодипина и омепразола по сравнению с изолированным введением нейропротектора, что, вероятно, является следствием большой зоны повреждения головного мозга на фоне примененной патологии [184, 205], при которой структура ГЭБ нарушается, и его проницаемость возрастает [118]. При этом P_{grp}, скорее всего, уже не

препятствует проникновению нимодипина в ткани мозга, поэтому препарат оказывает свой максимальный терапевтический эффект. Кроме того, маловероятно селективное ингибирование Pgp в ГЭБ без снижения его активности в гематоцереброспинальном барьере, где его функционирование противоположно – он способствует проникновению субстратов в цереброспинальную жидкость [229]. Гематоцереброспинальный барьер находится между кровью и цереброспинальной жидкостью и состоит из сосудистого сплетения, арахноидальной мембраны и перивентрикулярных органов. Эпителий сосудистого сплетения фенестрирован на стороне, обращенной к крови, и вовлечен в транспорт ксенобиотиков между кровью и цереброспинальной жидкостью. На стороне, обращенной к мозгу, присутствуют плотные контакты, ограничивающие парацеллюлярный транспорт. В структуре данного барьера экспрессируется большое число транспортеров [332]. Pgp в данном барьере функционирует, в отличие от ГЭБ, в качестве инфлюксного транспортера: он способствует проникновению субстратов в цереброспинальную жидкость. С другой стороны, MRP4 является эффлюксным в обоих барьерах [229].

Следует отметить, что ряд исследователей рассматривает ингибирование любых транспортеров в ГЭБ как бесперспективную стратегию [229]. Некоторые авторы считают более актуальным для повышения доставки лекарственных веществ в головной мозг ингибирование транспортера органических анионов [119]. Повышение же концентрации вводимых лекарственных средств с целью насыщения Pgp, что показано для транспортера тонкого кишечника, в ГЭБ маловероятно, потому что сопряжено со значительными системными побочными эффектами [246].

Одной из вероятных причин неэффективности ингибиторов Pgp по отношению к транспортеру, локализованному в ГЭБ, является недостаточная системная концентрация данных веществ для достижения ингибирующей концентрации, что показано для практически всех потенциальных ингибиторов данного транспортера (за исключением хинидина, хинина и циклоспорина) [182,

229]. Даже применение пациентами циклоспорина повышает проникновение 11С-верапамила в головной мозг на 88% по сравнению с контролем, что в 11 раз ниже, чем аналогичный эффект, наблюдаемый у нокаутированных по гену Pgp мышей [300].

Однако при двусторонней окклюзии общих сонных артерий – патологии, при которой нами было выявлено возрастание абсолютного количества Pgp в ГЭБ, применение нимодипина совместно с омепразолом приводило к увеличению выживаемости экспериментальных животных и улучшению показателей поведенческих тестов, что свидетельствовало о более высокой эффективности комбинации по сравнению с изолированным введением нейропротектора.

Хроническая ишемия головного мозга, или хроническая цереброваскулярная болезнь (ранее – «дисциркуляторная энцефалопатия»), в соответствии с Международной классификацией болезней и причин смерти 10-го пересмотра (МКБ-10), моделью которой является билатеральная окклюзия общих сонных артерий крыс, представлена в рубрике «другие цереброваскулярные заболевания» и трактуется как полиэтиологическая медленно прогрессирующая недостаточность мозга, проявляющаяся комплексом клинических неврологических и психических отклонений различной степени, обусловленная редукцией церебрального кровотока [79] и не связанная с перенесенным инсультом. Ее отличительными признаками являются постепенное развитие с длительным клинически «скрытым» латентным периодом и диффузность церебрального поражения [41]. Смертность от данной нозологии в России значительно превосходит таковую в США [61]. Ее фармакотерапия подразумевает воздействия, направленные на основное заболевание (артериальная гипертония, атеросклероз, васкулиты и пр.), коррекцию основных синдромов, воздействие на церебральную гемодинамику, а также метаболическую нейропротекторную терапию [59, 90, 287]. При этом эффективность нейропротекторов в условиях клиники часто не соответствует продемонстрированным на доклиническом этапе

[76], что может быть связано с недостаточной степенью проникновению данных веществ через ГЭБ за счет эффлюкса белком-транспортером Pgp.

Таким образом, комплексный анализ результатов нашего исследования свидетельствует о низкой перспективности локального ингибирования Pgp в ГЭБ для повышения эффективности фармакотерапии фокального нарушения мозгового кровообращения (ишемического инсульта), в особенности при проведении реперфузионной терапии. Снижение же активности транспортера на системном уровне, что на практике более легко достижимо, является опасным в связи с изменением фармакокинетики его субстратов и возможностью их относительной передозировки. С другой стороны, можно говорить о целесообразности снижения функциональной активности Pgp при неврологических заболеваниях, патогенез которых включает глобальную церебральную ишемию.

Кроме того, дисциркуляторная энцефалопатия часто служит предиктором ишемического инсульта, а развитие ишемического инсульта запускает каскад реакций, часть которых сохраняется на неопределенный срок и способствует нарастанию признаков хронической недостаточности мозгового кровообращения. Кроме того, указанные патологии имеют пересекающиеся факторы риска. Таким образом, острые и хронические формы недостаточности мозгового кровообращения могут переходить одна в другую [90], поэтому ингибирование Pgp, возможно, является способом профилактики ишемического инсульта.

Отсутствие значимого усиления фармакологического эффекта нейропротектора-субстрата Pgp нимодипина при его комбинировании с ингибитором транспортера на фоне фокальной ишемии мозга крыс, даже несмотря на повышенное количество Pgp в ГЭБ, потребовало объяснения. С этой целью было проведено изучение локальной эффлюксной активности Pgp в ГЭБ на фоне ишемии мозга.

В качестве модели ишемического инсульта для исследования функциональной активности Pgp в ГЭБ была выбрана традиционная схема

эндоваскулярной окклюзии средней мозговой артерии крыс вистар в течение 30 мин с последующей реканализацией в течение 24 ч. При данной патологии некроза мозговой ткани не наблюдается, что позволяет характеризовать именно эффлюксную активность транспортера. 24-часовая реперфузия была выбрана в связи с максимальным повышением уровня Pgp в коре головного мозга, обнаруженным нами ранее.

Моделирование окклюзии-реперфузии не вызывало изменений системной фармакокинетики фексофенадина: динамика его плазменной концентрации и $AUC_{0-t(\text{плазма})}$, отражающая общее содержание вещества в системном кровотоке, статистически значимо не отличались в сериях контроля и ишемии мозга.

При этом показатели $AUC_{0-t(\text{мозг})}$ (отражает общее количество маркерного субстрата транспортера в коре головного мозга) и отношение $AUC_{0-t(\text{мозг})}/AUC_{0-t(\text{плазма})}$ (характеризует проницаемость ГЭБ и активность Pgp в нем) при окклюзии-реперфузии средней мозговой артерии возрастали по сравнению с ложнооперированными крысами, что показывает возрастание проницаемости ГЭБ, что возможно благодаря локальному снижению активности Pgp в нем на фоне моделируемой патологии.

С целью выявления возможных механизмов изменения проницаемости ГЭБ для фексофенадина была оценена целостность барьера на фоне 30-минутной окклюзии с 24-часовой реперфузией средней мозговой артерии. Для этого изучалось накопление в ткани мозга красителя Evans blue. Было показано достоверное повышение уровня красителя на фоне патологии, что свидетельствует о нарушении структуры ГЭБ. Таким образом, даже выявленное нами ранее повышение абсолютного количества Pgp в коре головного мозга уже не может препятствовать проникновению субстратов в мозг.

Сходные результаты получены К. Yano et al. (2014) на крысах со спонтанной гипертензией при одновременной окклюзии дистальной средней мозговой артерии и ипсилатеральной общей сонной артерии с использованием антигипертензивного и нейропротекторного средства силнидепина в качестве

маркерного субстрата. Был показан рост концентрации вещества в клетках пораженного полушария по сравнению с нормальной тканью, что, по мнению авторов, характеризует ингибирование активности Pgp [359].

Также в исследованиях на культурах эндотелиальных клеток ГЭБ показано, что гипоксическая гипоксия и развитие окислительного стресса усиливают синтез Pgp [218]. При локальной ишемии головного мозга также выявлено повышение количества Pgp в эндотелии капилляров [316]. 4-часовая окклюзия средней мозговой артерии у крыс-самцов приводила к стимуляции синтеза Pgp в ГЭБ и нейронах головного мозга, что было выявлено методом Western blotting [172].

Вероятно, при ишемии и ишемии-реперфузии интенсификация синтеза Pgp – это защитно-приспособительный механизм, однако развивающийся при данной патологии окислительный стресс, активация протеолитических ферментов и энергодефицит повреждают белок-транспортёр, и он не способен адекватно выполнять свою транспортную функцию. Кроме того, функционирование Pgp при выраженном дефиците АТФ на фоне примененной патологии, вероятно, затруднительно [299].

Таким образом, проведенное экспериментальное исследование подтверждает нецелесообразность ингибирования Pgp в ГЭБ для повышения эффективности фармакотерапии фокального нарушения мозгового кровообращения, но актуальность такого подхода при глобальной церебральной ишемии.

ВЫВОДЫ

1. Билатеральная окклюзия общих сонных артерий крыс (модель глобальной ишемии мозга) приводит к возрастанию абсолютного количества Pgp в коре головного мозга, начиная с 4-го и до 48-го ч ишемии, что сопровождается увеличением уровня транскрипционных факторов Nrf2 (через 2 и 4 часа) и NIF-1 (через 72 ч) и коррелирует с уровнем окислительного стресса и количеством Nrf2 в ткани коры головного мозга.

2. 30- и 60-минутная окклюзия средней мозговой артерии крыс с последующей реперфузией (модель фокальной ишемии мозга) приводит к возрастанию абсолютного количества Pgp в коре головного мозга через 24 ч после реканализации, что сопровождается увеличением уровня транскрипционного фактора Nrf2 и развитием выраженного окислительного стресса в ткани коры головного мозга. При использовании более продолжительной фокальной ишемии мозга (3 часа окклюзии средней мозговой артерии с суточной реперфузией, 4,5 часа окклюзии без реперфузии и с реперфузией в течение 12 и 24 ч) наблюдается снижение абсолютного количества Pgp в ткани мозга.

3. Модифицированы и валидированы ВЭЖХ-методики количественного определения нейропротекторов этилметилгидроксипиридина сукцината, омберацетама и фабомотизола в плазме крови кроликов, которые отличаются точностью и прецизионностью.

4. Этилметилгидроксипиридина сукцинат, омберацетам и фабомотизол не являются субстратами Pgp. Этилметилгидроксипиридина сукцинат и фабомотизол ингибируют функциональную активность Pgp на уровне целостного организма. Омберацетам не изменяет функционирование Pgp на уровне целостного организма.

5. Односторонняя окклюзия общей сонной артерии кроликов в течение 7 дней не приводит к изменению фармакокинетики маркерного субстрата Pgp – фексофенадина после его однократного внутривенного введения (67,5 мг/кг),

что свидетельствует о сохранении активности белка-транспортера на уровне целостного организма на исходном уровне.

6. Функциональная активность Pgp в ГЭБ коры головного мозга крыс повышается на фоне 14-дневного внутрижелудочного введения крысам классического индуктора Pgp – рифампицина (20 мг/кг 2 раза в день) и снижается на фоне однократного внутривенного введения ингибитора Pgp – омепразола (17,6 мг/кг), что подтверждается динамикой концентрации в коре головного мозга животных маркерного субстрата белка-транспортера – фексофенадина после его однократного внутривенного введения (10 мг/кг).

7. Однократное внутривенное введение крысам комбинации нейропротектора-субстрата Pgp – нимодипина (0,4 мг/кг) совместно с ингибитором транспортера – омепразолом (17,6 мг/кг) за 30 мин до билатеральной окклюзии общих сонных артерий (модель глобальной ишемии мозга) повышает выживаемость и снижает уровень неврологического дефицита животных по сравнению с изолированным введением нимодипина.

8. Однократное внутривенное введение крысам комбинации нейропротектора-субстрата Pgp – нимодипина (0,4 мг/кг) совместно с ингибитором транспортера – омепразолом (17,6 мг/кг) в момент реперфузии при окклюзии-реперфузии средней мозговой артерии (модель фокальной ишемии мозга) не уменьшает величину зоны некроза головного мозга по сравнению с изолированным введением нимодипина, что связано со снижением роли Pgp в функционировании поврежденного ГЭБ, несмотря на повышение его количества в ткани коры головного мозга.

ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

Продемонстрированное нами повышение количества Pgp в головном мозге на фоне билатеральной окклюзии общих сонных артерий крыс создает предпосылки для корректировки доз лекарственных средств-субстратов данного транспортера в сторону увеличения при фармакотерапии заболеваний мозга, в патогенезе которых присутствует дефицит кислорода нервной ткани.

Модифицированные ВЭЖХ-методики количественного анализа этилметилгидроксипиридина сукцината, омберацетама и фабомотизола, а также способы их экстракции из плазмы крови кроликов можно рекомендовать к использованию для исследования фармакокинетики указанных лекарственных средств.

Оценка принадлежности этилметилгидроксипиридина сукцината, омберацетама и фабомотизола к числу субстратов Pgp показала, что их фармакокинетика существенно не зависит от функционирования данного белка-транспортера, что свидетельствует о возможности их безопасного применения в комбинации с веществами, модулирующими его активность, а также на фоне патологий, изменяющих активность транспортера. Полученные результаты об ингибирующем потенциале этилметилгидроксипиридина сукцината и фабомотизола по отношению к Pgp позволяют рекомендовать указанные средства в качестве положительного контроля пониженной функциональной активности белка-транспортера при поиске веществ аналогичного действия в экспериментальных исследованиях, а также для прогнозирования потенциальных субстратов Pgp при изучении лекарственных веществ на этапе доклинических исследований. В случае подтверждения ингибирующей активности этилметилгидроксипиридина сукцината по отношению к Pgp в соответствующих клинических испытаниях целесообразно учитывать возможность фармакокинетических взаимодействий между препаратом и средствами

сопутствующей фармакотерапии, являющимися субстратами данного белка-транспортера в терапевтической практике.

Апробированная методика анализа функциональной активности Pgp в ГЭБ может быть рекомендована в качестве способа оценки локальной активности тестируемых лекарственных веществ по отношению к транспортеру.

Повышение выживаемости экспериментальных животных при двусторонней перманентной окклюзии общих сонных артерий при комбинированном введении нимодипина и омепразола (нейропротектора-субстрата и ингибитора Pgp соответственно) по сравнению с изолированным использованием нимодипина показывает перспективность ингибирования функциональной активности транспортера на фоне глобальной ишемии головного мозга. При этом в качестве ингибитора транспортера целесообразно использовать этилметилгидроксипиридина сукцинат или фабомотизол в связи с наличием у препаратов собственного нейропротекторного потенциала и их высокой безопасностью.

ПЕРСПЕКТИВЫ ДАЛЬНЕЙШЕЙ РАЗРАБОТКИ ТЕМЫ

Целесообразно проведение клинических исследований для доказательства перспективности комбинирования препаратов с нейропротекторной активностью и ингибиторов Pgp для фармакотерапии глобального нарушения мозгового кровообращения. В качестве ингибиторов Pgp в данных исследованиях рекомендуется использование этилметилгидроксипиридина сукцината и фабомотизола, обладающих собственным церебропротекторным потенциалом.

Этилметилгидроксипиридина сукцинат и фабомотитизол с выявленной ингибирующей активностью по отношению к Pgp целесообразно в дальнейшем протестировать в качестве средств повышения проникновения химиопрепаратов-субстратов транспортера в клетки опухоли с целью более эффективной фармакотерапии онкологических заболеваний. Это особенно актуально в связи с доказанной антиоксидантной активностью этилметилгидроксипиридина сукцината. Кроме того, для подтверждения клинической значимости полученных экспериментальных данных об ингибирующем влиянии этилметилгидроксипиридина сукцината на активность Pgp необходимо выполнение аналогичных клинических исследований.

Налаженные и отработанные методики оценки лекарственных веществ на принадлежность к модуляторам активности Pgp *in vivo* могут быть использованы для тестирования оригинальных отечественных препаратов на этапе доклинических исследований.

Перспективной является разработка и стандартизация методики оценки лекарственных веществ на принадлежность к индукторам гликопротеина-P в опытах *in vitro*, что позволит проводить скрининг потенциальных модуляторов и субстратов транспортера. На выполнение данной работы получен грант РФФИ №18-415-623001.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

- ABC – adenosinetriphosphat binding cassette;
- AUC_{0-∞} – площадь под кривой «концентрация-время» от нуля до бесконечности;
- АТФ – аденозинтрифосфат;
- ВЭЖХ – высокоэффективная жидкостная хроматография;
- ГИФА – гетерогенный иммуноферментный анализ;
- ГЭБ – гематоэнцефалический барьер;
- ДИ – доверительный интервал;
- ДНК – дезоксирибонуклеиновая кислота;
- иРНК – информационная рибонуклеиновая кислота;
- MRT – среднее время удержания препарата в системном кровотоке;
- ПОЛ – перекисное окисление липидов;
- ПЦР – полимеразная цепная реакция;
- ТБК – 2-тиобарбитуровая кислота;
- ТТХ – трифенилтетразолия хлорид;
- ЦНС – центральная нервная система;
- AUC_{0-t} – площадь под кривой «концентрация-время» от нуля до последнего забора крови;
- C_{max} – максимальная концентрация при однократном введении;
- G-per – глутатионпероксидаза;
- HIF – hypoxia inducible factor;
- K_{el} – константа элиминации;
- MDR – multidrug-resistance gene;
- Pgp – гликопротеин-P;
- PXR – pregnane-X-receptor (прегнан X рецептор);
- T_{1/2} – период полувыведения;
- T_{max} – время достижения максимальной концентрации.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Аведисова, А.С. Афобазол – безопасный препарат для лечения тревоги в общей практике [Текст] / А.С. Аведисова // Русский медицинский журнал. – 2006. – Т.14, №22. – С.1–3.
2. Аронов, М.С. Эндovasкулярное лечение ишемического инсульта в остром периоде [Текст] / М.С. Аронов, К.А. Попугаев, Ю.Д. Удалов [и др.] // Журнал «Вопросы нейрохирургии» имени Н.Н. Бурденко. – 2018. – Т.82, №4. – С.103–108.
3. Баранов, П.А. Влияние мексидола на соотношение 6-бета-гидрокортизол/свободный кортизол. Возможная индукция СYP 3A4 [Текст] / П.А. Баранов, С.А. Апполонова, Г.М. Родченков [и др.] // Экспериментальная и клиническая фармакология. – 2010. – Т.73, №11. – Р.39–40.
4. Бойко, С.С. Биодоступность ноопепта – нового ноотропного препарата дипептидной структуры [Текст] / С.С. Бойко, В.П. Жердев, Т.А. Гудашева [и др.] // Химико-фармацевтический журнал. – 2004. – Т.38, №12. – С.3–5.
5. Бойко, С.С. Межвидовые различия фармакокинетики ноопепта [Текст] / С.С. Бойко, С.А. Коротков, В.П. Жердев [и др.] // Экспериментальная и клиническая фармакология. – 2004. – Т.67, №1. – С.40–43.
6. Бочков, П.О. Фармакокинетическая оценка пролонгированной лекарственной формы афобазола в сравнении с таблетками препарата, выпускаемыми промышленностью [Текст] / П.О. Бочков, А.А. Литвин, Г.Б. Колыванов [и др.] // Экспериментальная и клиническая фармакология. – 2013. – Т.76, №11. – С.33–35.
7. Бурчинский, С.Г. Возможности комплексной нейропротекции при ишемическом инсульте [Текст] / С.Г. Бурчинский // Международный неврологический журнал. – 2015. – Т.76, №6. – С.98–104.

8. Вахитова, Ю.В. Молекулярный механизм действия Ноопепта – замещенного Pro-Gly-дипептида [Текст] / Ю.В. Вахитова, С.В. Садовников, С.С. Борисевич [и др.] // АСТА NATURAE. – 2016. – Т.8, №1(28). – С.90–98.
9. Владимиров, Ю.А. Свободные радикалы и антиоксиданты [Текст] / Ю.А. Владимиров // Вестн. РАМН. – 1998. – №7. – С.43–51.
10. Воронина, Т.А. Изучение антистрессорного и анальгетического эффектов мексидола, диазепама, парацетамола и их комбинаций [Текст] / Т.А. Воронина, Г.М. Молодавкин, И.И. Бабаев [и др.] // Экспериментальная клиническая фармакология. – 2006. – Т.69, №4. – С.6–9.
11. Воронина, Т.А. Мексидол: основные нейрпсихотропные эффекты и механизм действия [Текст] / Т.А. Воронина // Фарматека. – 2009, №6. – С.28–31.
12. Воронина, Т.А. Ноотропные и нейропротекторные средства [Текст] / Т.А. Воронина, С.Б. Середенин // Экспериментальная и клиническая фармакология. – 2007. – Т.70, №4. – С.44–58.
13. Воронина, Т.А. Роль синаптической передачи в процессах памяти, нейродегенерации и механизме действия нейротропных препаратов [Текст] / Т.А. Воронина // Экспериментальная и клиническая фармакология. – 2003. – Т.66, №2. – С.10–14.
14. Гаврилова, В.Б. Анализ методов определения продуктов ПОЛ [Текст] / В.Б. Гаврилова, А.Р. Гаврилова, Л.М. Мазул // Вопр. мед. химии. – 1987. – №1. – С.118–120.
15. Ганнушкина, И.В. Патоморфологические механизмы нарушения мозгового кровообращения и новые направления в их профилактике и лечении [Текст] / И.В. Ганнушкина // Журнал невропатологии и психиатрии. – 1996, №1. – С.14–18.
16. Гацанога, М.В. Можно ли оценивать принадлежность лекарственных веществ к субстратам гликопротеина-Р на самках кроликов породы Шиншилла [Текст] / М.В. Гацанога, И.В. Черных, А.В. Щулькин [и др.] // Наука и молодые (Eruditio Juvenium). – 2016. – Т.4, №4. – С.5–10.

17. Герасимова, К.В. Влияние афобазола на функциональную активность P-450 CYP3A4 / К.В. Герасимова // Биомедицина. – 2006. – Т.1, №5. – С.895.
18. Государственный реестр лекарственных средств. – URL: <http://grls.rosminzdrav.ru/>
19. Грибакина, О.Г. Фармакокинетическое взаимодействие афобазола с лозартаном - препаратом-субстратом CYP2C9 в эксперименте [Текст] / О.Г. Грибакина, Г.Б. Колыванов, А.А. Литвин [и др.] // Экспериментальная и клиническая фармакология. – 2013. – Т.76, №3. – С.35–37.
20. Грушевская, Л.Н. Фармацевтический анализ и стандартизация таблеток ноопепта [Текст] / Л.Н. Грушевская, Н.И. Авдюнина, Б.М. Пятин [и др.] // Химико-фармацевтический журнал. – 2011. – Т.45, №6. – С.53–56.
21. Гурова, Н.А. Производные бензимидазолов – новый класс кардиопротекторных средств» : дис.... д-ра мед. наук : 14.03.06 / Н.А. Гурова. – Волгоград, 2015. – 277 с.
22. Давыдов, В.В. Патология: учебник: в 2-х томах / под ред. В.А. Черешнева, В.В. Давыдова. – Москва, 2009. – Том 1. – 608 с.
23. Дума, С.Н. Роль антиоксидантов в коррекции психовегетативных, астенических и когнитивных нарушений [Текст] / С.Н. Дума, Ю.И. Рагино // Трудный Пациент. – 2011. – Т.9, №4. – С.28–36.
24. Дюмаев, К.М. Антиоксиданты в профилактике и терапии патологий ЦНС / К.М. Дюмаев, Т.А. Воронина, Л.Д. Смирнов. – Москва, 1995. – 271 с.
25. Зайцев, В.Г. Связь между химическим строением и мишенью действия как основа классификации антиоксидантов прямого действия [Текст] / В.Г. Зайцев, О.В. Островский, В.И. Закревский // Экспериментальная и клиническая фармакология. – 2003. – Т.66, №4. – С.66–70.
26. Иванникова, Е.В. Исследование фармакокинетики и биодоступности в создании новых оригинальных лекарственных средств пептидной структур и их оптимальных лекарственных форм [Текст] / Е.В. Иванникова, В.П. Жердев,

С.С. Бойко [и др.] // Фармакокинетика и фармакодинамика. – 2013. – №2. – С.1–17.

27. Ивашев, М.Н. Особенности кардиогемодинамики при применении золетила у лабораторных животных [Текст] / М.Н. Ивашев, А.В. Арльт, И.А. Савенко [и др.] // Научные ведомости Белгородского государственного университета. – 2012. – Т.123, №4. – С.168–171.

28. Калетина, Н.И. Токсикологическая химия метаболизм и анализ токсикантов / Н.И. Калетина; под ред. Н.И. Калетиной. – Москва: ГЭОТАР-МЕДИА, 2008. – 977 с.

29. Калинина, Е.В. Участие тио-, перокси- и глутаредоксинов в клеточных редокс-зависимых процессах [Текст] / Е.В. Калинина, Н.Н. Чернов, А.Н. Сапрын // Успехи биологической химии. – 2008. – Т.48. – С. 319–358.

30. Каркищенко, Н.Н. Фармакокинетика [Текст] / Н.Н. Каркищенко, В.В. Хоронько, С.А. Сергеева [и др.]. – Ростов-на-Дону: Феникс, 2001. – 384 с.

31. Карпова, С.И. Р-гликопротеин – структура, функции и роль в резистентности лейкозов к химиотерапии [Текст] / С.И. Карпова, Н.Г. Тюрина // Проблемы гематологии и переливания крови. – 1997. – №1. – С.37–46.

32. Клинические рекомендации «Геморрагический инсульт»: утверждены ассоциацией нейрохирургов России, 2020.

33. Клинические рекомендации «Диагностика и тактика при инсульте в условиях общей врачебной практики, включая первичную и вторичную профилактику»: утверждены на IV Всероссийском съезде врачей общей практики (семейных врачей) Российской Федерации 15 ноября 2013 года. – Казань, 2013.

34. Клинические рекомендации по диагностике и лечению пострадавших с острыми нарушениями мозгового кровообращения в чрезвычайных ситуациях. – М., 2014.

35. Клинические рекомендации по проведению тромболитической терапии при ишемическом инсульте. – Москва, 2015.

36. Коваленко, Л.П. Доклиническое изучение токсичности ноопепта [Текст] / Л.П. Коваленко // Экспериментальная и клиническая фармакология. – 2002. – Т.65, №1. – С.62–64.

37. Козьяйкин, В.В. Распространенность артериальной гипертонии как одного из ведущих факторов риска развития инсульта в Московской области на примере малого городского поселения [Текст] / В.В. Козьяйкин, С.В. Котов, Е.В. Исакова [и др.] // Альманах клинической медицины. – 2013, №29. – С.45–51.

38. Колесников, А.В. Влияние ноопепта на нейрохимические изменения в сетчатке при экспериментальном тромбозе ее сосудов [Текст] / А.В. Колесников, А.В. Пискунова, М.В. Баренина [и др.] // Нейрохимия. – 2018, №1. – С.70–76.

39. Колхир, С.В. Клиническое значение изучения активности транспортера лекарственных средств гликопротеина-Р для оптимизации фармакотерапии : автореф. дис. ... канд. мед. наук : 14.03.06 / С.В. Колхир; ГОУ ВПО ММА им. И.М. Сеченова. – Москва, 2007. – 21 с.

40. Корнюшенков, Е.А. Особенности клинической фармакологии препаратов для анестезии и седации мелких домашних животных. Часть 2 [Текст] / Е.А. Корнюшенков // Российский ветеринарный журнал «Мелкие домашние и дикие животные». – 2013. – №1. – С.33–39.

41. Костенко, Е.В. Патофизиологические особенности хронических цереброваскулярных заболеваний и возможности комплексной нейропротекторной терапии [Текст] / Е.В. Комтенко, Л.В. Петрова // Медицинский совет. – 2019. – №1. – С.24–30.

42. Крыжановский, С.А. Кардиопротективные эффекты афобазола у животных с хронической ишемией миокарда [Текст] / С.А. Крыжановский, И.Б. Цорин, А.В. Сорокина [и др.] // Молекулярная медицина. – 2013, №5. – С.37–42.

43. Кукес, В.Г. Метаболизм лекарственных средств. Научные основы персонализированной медицины: руководство для врачей [Текст] / В.Г. Кукес,

С.В. Грачев, Д.А. Сычев, Г.В. Раменская. – Москва: ГЭОТАР-Медиа, 2008. – 304 с.

44. Ланкин, В.З. Ингибирование перекисления липидов и детоксикация липоперекисей защитными ферментативными системами (супероксиддисмутаза, глутатион-пероксидаза, глутатион-редуктаза) при экспериментальном злокачественном росте [Текст] / В.З. Ланкин, С.М. Гуревич // ДАН СССР. – 1976. – Т.226, №3. – С.705–708.

45. Лебедев, В.В. Фармакологическая коррекция множественной лекарственной устойчивости гидрофильными регуляторными пептидами [Текст] / В.В. Лебедев, С.А. Новиков, Е.Ю. Рыбалкина [и др.] // Российский иммунологический журнал. – 2008. – №2–3. – С.310.

46. Мазина, Н.В. Нейропротекторное действие нового производного ГАМК-РГПУ-195 при ишемии головного мозга [Текст] / Н.В. Мазина, Е.В. Волотова, Д.В. Куркин // Фундаментальные исследования. – 2012, №6. – С.1473–1476.

47. Методические рекомендации по изучению биотрансформации и транспортеров новых лекарственных средств: дизайн исследований, анализ данных: руководство по экспертизе лекарственных средств. – Москва: Гриф и К, 2014. – Том 3. – 343 с.

48. Миронов, А.Н. Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств. Часть первая / А.Н. Миронов; под ред. А.Н. Миронова. – Москва: Гриф и К, 2012. – 944 с.

49. Мирошниченко, И.И. Основы фармакокинетики / И.И. Мирошниченко. – Москва: ДМпринт, 2017. – 255 с.

50. Мищенко, Т.С. Патогенетические механизмы атеротромботического инсульта [Текст] / Т.С. Мищенко, Е.В. Песоцкая // Український вісник психоневрології. – 2007. – Т.15, №2 (51). – С.21–23.

51. Ничитайло, М.Е. Ингибирование активированных звездчатых клеток лизиноприлом для предупреждения фиброза поджелудочной железы в модели

хронического алкогольного панкреатита [Текст] / М.Е. Ничитайло, Д.А. Кравченко, Е.Б. Медвецкий [и др.] // Клінічна хірургія. – 2012. – №7. – С.52–56.

52. Новиков, В.Е. Новые направления поиска лекарственных средств с антигипоксической активностью и мишени для их действия [Текст] / В.Е. Новиков, О.С. Левченкова // Экспериментальная и клиническая фармакология. – 2013. – Т.76, №5. – С.37–47.

53. Островская, Р.У. К механизму действия ноопепта: снижение активности стресс-индуцируемых протеинкиназ и активация экспрессии нейротрофинов [Текст] / Р.У. Островская, Ю.В. Вахитова, М.Х. Салимгареева [и др.] // Нейрофармакология. – 2010. – Т.73, №12. – С.2–5.

54. Островская, Р.У. Оригинальный ноотропный и нейропротективный препарата ноопепт [Текст] / Р.У. Островская, Т.А. Гудашева, Т.А. Воронина [и др.] // Экспериментальная и клиническая фармакология. – 2002. – Т.65, №5. – С.66–72.

55. Островская, Р.У. Эволюция проблемы нейропротекции [Текст] / Р.У. Островская // Экспериментальная и клиническая фармакология. – 2003. – Т.66, №2. – С.32–37.

56. Панченко, Е.П. Характеристика и исходы атеротромбоза у амбулаторных больных в Российской Федерации (по материалам международного регистра REACH) [Текст] / Е.П. Панченко, Ю.Н. Беленков // Кардиология. – 2008. – №2. – С.17–24.

57. Попова, Н.М. Роль гликопротеина-P в фармакотерапии беременных [Текст] / Н.М. Попова, А.В. Щулькин, И.В. Черных [и др.] // Акушерство, гинекология и репродукция. – 2019. – Т.13, №2. – С.10–19.

58. Приходько, В.Ю. Новый ноотропный препарат ноопепт в клинической практике [Текст] / В.Ю. Приходько // Украинский вестник психоневрологии. – 2009. – Т.17, №2(59). – С.104–109.

59. Путилина, М.В. Алгоритмы рациональной терапии при хронической ишемии головного мозга [Текст] / М.В. Путилина, Н.В. Теплова // Нервные болезни. – 2019. – №1. – С.10–16.
60. Разумная, Ф.Г. К фармакологии афобазола [Текст] / Ф.Г. Разумная, Ф.Х. Камилов, О.М. Капулер [и др.] // Фундаментальные исследования. – 2014, №7. – С.848–855.
61. Самородская, И.В. Показатели смертности населения старше 50 лет от цереброваскулярных болезней за 15-летний период в России и США [Текст] / И.В. Самородская, Е.М. Андреев, О.В. Заратьянц [и др.] // Неврология, нейропсихиатрия и психосоматика. – 2017. – Т.9, №1. – С.15–24.
62. Сариев, А.К. Кинетика экскреции мексидола и его глюкуроноконъюгированного метаболита у добровольцев популяций казахов и русских [Текст] / А.К. Сариев, Г.Д. Бердимуратова, В.П. Жердев [и др.] // Клиническая фармакокинетика. – 2005, №1(2). – С.23–28.
63. Сергиенко, В.И. Прикладная фармакокинетика: основные положения и клиническое применение [Текст] / В.И. Сергиенко, Р. Джеллифф, И.Б. Бондарева. – Москва: Издательство РАМН, 2003. – 208 с.
64. Серебровская, Т.В. Гипоксия-индуцибельный фактор: роль в патофизиологии дыхания (обзор) [Текст] / Т.В. Серебровская // Український пульмонологічний журнал. – 2005. – №3. – С.77–81.
65. Середенин, С.Б. Биотрансформация мексидола у мышей инбредных линий C57BL/6 И BALB/C [Текст] / С.Б. Середенин, О.Ю. Кравцова, А.К. Сариев [и др.] // Экспериментальная и клиническая фармакология. – 2005. – Т.68, №2. – С. 40–43.
66. Середенин, С.Б. Влияние мембраномодулятора 3-оксипиридина на эмоционально-стрессовую реакцию и связывание НЗ-диазепама в мозге инбредных мышей [Текст] / С.Б. Середенин, Ю.А. Бледнов, М.Л. Гордей [и др.] // Химико-фармац. журн. – 1987, №2. – С.134–137.

67. Середенин, С.Б. К механизму противоишемического действия препарата афобазол [Текст] / С.Б. Середенин, И.Б. Цорин, М.Б. Вититнова [и др.] // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. – 2013. – Т. 155, №6. – С.723–727.
68. Середенин, С.Б. Фармакокинетика афобазола у крыс [Текст] / С.Б. Середенин, А.О. Виглинская, Г.Б. Колыванов [и др.] // Экспериментальная и клиническая фармакология. – 2007. – Т.70, №2. – С.59–64.
69. Середенин, С.Б. Фармакология нового анксиолитика афобазола [Текст] / С.Б. Середенин, М.В. Воронин // Экспериментальная и клиническая фармакология. – 2009. – Т.72, №1. – С.3–11.
70. Скворцова, В.И. Организация помощи пациентам с инсультом в России. Итоги 10 лет реализации Комплекса мероприятий по совершенствованию медицинской помощи пациентам с острыми нарушениями мозгового кровообращения [Текст] / В.И. Скворцова, И.М. Шетова, Е.П. Какорина [и др.] // Анналы неврологии. – 2018. – Т.12, №3. – С.5–12.
71. Смулевич, А.Б. Проспективное рандомизированное сравнительное исследование эффективности и переносимости селективного анксиолитика Афобазола и оксазепам у пациентов с генерализованным тревожным расстройством и расстройством адаптации [Текст] / А.Б. Смулевич, А.В. Андрющенко, Д.В. Романов // Психиатрия и психофармакотерапия. – 2016. – Т.18, №2. – Р.4–10.
72. Спирина, Л.В. Регуляция экспрессии транскрипционных факторов и фактора роста эндотелия протеосомальной системой при метастазировании рака почки [Текст] / Л.В. Спирина, И.В. Кондакова, Е.А. Усынин [и др.] // Вестник РОНЦ им. Н.Н. Блохина РАМН. – 2012. – Т.23, №1. – С.27–31.
73. Стальная, И.Д. Метод определения малонового диальдегида с помощью 2-тиобарбитуровой кислоты [Текст] / И.Д. Стальная // Современные методы в биохимии. – Москва: Б.И., 1977. – С.66–68.

74. Стаховская, Л.В. Результаты рандомизированного двойного слепого мультицентрового плацебо-контролируемого в параллельных группах исследования эффективности и безопасности мексидола при длительной последовательной терапии у пациентов в остром и раннем восстановительном периоде [Текст] / Л.В. Стаховская, Н.А. Шамалов, Д.Р. Хасанова [и др.] // Журнал неврологии и психиатрии им. С.С. Корсакова. Спецвыпуски. – 2017. – Р.117, №3–2. –Р.55–65.

75. Столярук, В.Н. Изучение эффектов афобазола на модели реперфузионных аритмий [Текст] / В.Н. Столярук, М.Б. Вититнова, С.А. Крыжановский // Вестник Российской академии медицинских наук. – 2010. – №4. – С.41–45.

76. Суслина, З.А. Инсульт: оценка проблемы (15 лет спустя) [Текст] / З.А. Суслина, М.А. Пирадов, М.А. Домашенко // Журнал неврологии и психиатрии. – 2014. – №11. – С.5–13.

77. Сюняков, Т.С. Оценка терапевтической эффективности и безопасности селективного анксиолитика афобазола при генерализованном тревожном расстройстве и расстройствах адаптации: результаты многоцентрового рандомизированного сравнительного с диазепамом исследования [Текст] / Т.С. Сюняков, Г.Г. Незнамов // Терапевт. арх. – 2016. – Т.88, №8. – С.73–86.

78. Трофименко, А.И. Визуализация очага ишемии головного мозга у крысы тетразолиевым методом [Текст] / А.И. Трофименко, А.Х. Каде, С.А. Зенин [и др.] // Материалы конференций. Международный журнал прикладных и фундаментальных исследований. – 2013. – №5. – С.99.

79. Федин, А.И. Эффективность кортексина и мемантинола (мемантина) в лечении когнитивных нарушений у больных с хронической ишемией мозга [Текст] / А.И. Федин // Журнал неврологии и психиатрии им. С.С. Корсакова. – 2018. – Т.118, №1. – С.30–36.

80. Хабриев, Р.У. Руководство по экспериментальному (доклиническому) изучению новых фармакологических веществ [Текст] / Р.У. Хабриев; под общ.

ред. чл.-кор. РАМН проф. Р.У. Хабриева. – 2-изд., перераб. и доп. – Москва: Медицина, 2005. – С.48–51.

81. Черных, И.В. Анализ принадлежности препарата ноопепт к субстратам и модуляторам функциональной активности ABCB1-белка в эксперименте *in vivo* [Текст] / И.В. Черных, А.В. Щулькин, Е.Н. Якушева [и др.] // Российский медико-биологический вестник им. академика И.П. Павлова. – 2017. – Т.25, №1. – С.30–41.

82. Черных, И.В. Изучение принадлежности фабомотизола к субстратам гликопротеина-P [Текст] / И.В. Черных, А.В. Щулькин, Е.Н. Якушева [и др.] // Российский медико-биологический вестник имени академика И.П. Павлова. – 2017. – Т.25, №4. – С.538–550.

83. Черных, И.В. Ингибирование активности ABCB1-белка при нарушении мозгового кровообращения может повысить эффективность фармакотерапии [Текст] / И.В. Черных, А.В. Щулькин, С.К. Правкин [и др.] // Анналы клинической и экспериментальной неврологии. – 2021. – Т.15, №1. – С.65–70.

84. Черных, И.В. Метод анализа функциональной активности гликопротеина-P в гематоэнцефалическом барьере [Текст] / И.В. Черных, А.В. Щулькин, П.Ю. Мыльников [и др.] // Нейрохимия. – 2019. – Т.36, №1. – С.84–88.

85. Черных, И.В. Разработка ВЭЖХ методики количественного определения этилметилгидроксипиридина сукцината в плазме крови крыс и кроликов [Текст] / И.В. Черных, А.В. Щулькин, М.В. Гацанога [и др.] // Российский медико-биологический вестник им. акад. И.П. Павлова. – 2015. – Т.23, №1. – С.62–66.

86. Черных, И.В. Роль гликопротеина-P в неврологии [Текст] / И.В. Черных, А.В. Щулькин, Е.Н. Якушева [и др.] // Журнал неврологии и психиатрии С.С. Корсакова. – 2017. – Т.117, №1. – С.67–71.

87. Черных, И.В. Функциональная активность гликопротеина-Р в гематоэнцефалическом барьере на фоне ишемии–реперфузии головного мозга [Текст] / И.В. Черных, А.В. Щулькин, Е.Н. Якушева [и др.] // Российский физиологический журнал им. И.М. Сеченова. – 2019. – Т.105, №5. – С.657–664.

88. Черных, И.В. Функциональная активность гликопротеина-Р на фоне ишемии головного мозга [Текст] / И.В. Черных, А.В. Щулькин, М.В. Гацанога [и др.] // Наука молодых (Eruditio Juvenium). – 2019. – Т.7, №1. – С.46–52.

89. Черных, И.В. Экспрессия гликопротеина-Р в гематоэнцефалическом барьере при двухсторонней окклюзии общих сонных артерий [Текст] / И.В. Черных, Е.Н. Якушева, А.В. Щулькин [и др.] // Научные ведомости Белгородского государственного университета. – 2015. – Т.29, №4(201). – С.91–95.

90. Чуканова, Е.И. Хроническая ишемия мозга (этиология, патогенез, лечение). Профилактика инсульта и сосудистой деменции [Текст] / Е.И. Чуканова, Б.Э. Ходжамжаров, А.С. Чуканова // Русский медицинский журнал. – 2012. – №10. – С.517–521.

91. Шариф, А.Е. Изменения проницаемости гематоэнцефалического барьера под воздействием громкого звука [Текст] / А.Е. Шариф, А.С. Абдурашитов, А.А. Намыкин [и др.] // Известия Саратов. ун-та. – 2019. – Т.19, №3. – С.312–321.

92. Шахматов, И.И. Состояние системы гемостаза при различных видах гипоксического воздействия [Текст] / И.И. Шахматов, В.М. Вдовин, В.И. Киселев // Бюллетень Сибирского отделения Российской академии медицинских наук. – 2010. – Т.30, №2. – С.131–138.

93. Щулькин, А.В. Влияние мексидола на развитие феномена эксайтотоксичности нейронов *in vitro* [Текст] / А.В. Щулькин // Журнал неврологии и психиатрии им. С.С. Корсакова. – 2012. – Т.112, №2. – С.35–39.

94. Щулькин, А.В. Распределение мексидола в структурах головного мозга, его клеточных элементах и субклеточных фракциях [Текст] /

А.В. Щулькин, Е.Н. Якушева, И.В. Черных // Журнал неврологии и психиатрии. – 2014. – №8. – С.69–72.

95. Щулькин, А.В. Регуляция функционирования гликопротеина-Р гормональными лекарственными средствами : дис. ... д-ра мед. наук : 14.03.06 / А.В. Щулькин; ФГБОУ ВО РязГМУ Минздрава России. – Рязань, 2019. – 284 с.

96. Щулькин, А.В. Роль гликопротеина-Р в рациональной фармакотерапии в кардиологии [Текст] / А.В. Щулькин, Е.Н. Якушева, Н.М. Попова // Рациональная фармакотерапия в кардиологии. – 2013. – Т.9, №6. – С.701–707.

97. Щулькин, А.В. Современные представления об антигипоксическом и антиоксидантном эффектах мексидола [Текст] / А.В. Щулькин // Журнал неврологии и психиатрии им. С.С. Корсакова. – 2018. – Т.118, №12. – С.97–93.

98. Щулькин, А.В. Сравнение фармакокинетических параметров препаратов мексидол и мексиприм [Текст] / А.В. Щулькин, Е.Н. Якушева, И.В. Черных // Журнал неврологии и психиатрии им. С.С. Корсакова. – 2014. – Вып.2, №11. – С.46–49.

99. Щулькин, А.В. Экспрессия гликопротеина-Р при экспериментальной дисфункции щитовидной железы [Текст] / А.В. Щулькин, Е.Н. Якушева, И.В. Черных [и др.] // Клиническая и экспериментальная тиреоидология. – 2015. – Т.11, №3. – С.11–16.

100. Электронный режим доступа: <http://www.eso-stroke.org/recommendations>.

101. Электронный режим доступа: <https://imagej.nih.gov>

102. Электронный режим доступа: <https://www.vidal.ru/drugs/nooperpt>

103. Эпштейн, Н.А. Оценка пригодности (валидация) ВЭЖХ методик в фармацевтическом анализе (обзор) [Текст] / Н.А. Эпштейн // Химико-фармацевтический журнал. – 2004. – Т.38, №4. – С.40–56.

104. Якушева Е.Н. Оценка принадлежности мексидола к субстратам, ингибиторам или индукторам гликопротеина-Р [Текст] / Е.Н. Якушева,

А.В. Шулькин, И.В. Черных // Экспериментальная и клиническая фармакология. – 2015. – Т.78, №5. – С.19–23.

105. Якушева, Е.Н. Влияние афобазола на функциональную активность ABCB1-белка у добровольцев с низкой тревожностью [Текст] / Е.Н. Якушева, И.В. Черных, А.В. Шулькин [и др.] // Экспериментальная и клиническая фармакология. – 2019. – Т.82, №3. – С.26–30.

106. Якушева, Е.Н. Влияние афобазола на функциональную активность и экспрессию гликопротеина-Р [Текст] / Е.Н. Якушева, И.В. Черных, А.В. Шулькин [и др.] // Экспериментальная и клиническая фармакология. – 2017. – Т.80, №9. – С.69–72.

107. Якушева, Е.Н. Влияние гипоксии различных видов на функциональную активность и экспрессию гликопротеина Р [Текст] / Е.Н. Якушева, И.В. Черных, А.В. Шулькин [и др.] // Обзоры по клинической фармакологии и лекарственной терапии. – 2016. – Т.14, №1. – С.71–77.

108. Якушева, Е.Н. Влияние мексидола на экспрессию транскрипционного фактора Nrf2 в коре больших полушарий головного мозга при экспериментальной ишемии [Текст] / Е.Н. Якушева, П.Ю. Мыльников, И.В. Черных [и др.] // Журнал неврологии и психиатрии им. С.С. Корсакова. – 2018. – №5. – С.63–67.

109. Якушева, Е.Н. Влияние тиамазола на функциональную активность гликопротеина-Р [Текст] / Е.Н. Якушева, А.С. Бирюкова, А.В. Шулькин // Вестник Белгородского государственного университета. – 2012. – Т.129, №10. – С. 133–138.

110. Якушева, Е.Н. Влияние экспериментальной подострой гипобарической гипоксической гипоксии на функциональную активность гликопротеина-Р / Е.Н. Якушева, И.В. Черных [Текст] // Российский медико-биологический вестник им. акад. И.П. Павлова. – 2013. – №1. – С.60–64.

111. Якушева, Е.Н. Гликопротеин-Р: структура, физиологическая роль и молекулярные механизмы модуляции функциональной активности [Текст] /

Е.Н. Якушева, И.В. Черных, А.В. Щулькин [и др.] // Успехи физиологических наук. – 2014. – Т.45, №4. – С.90–99.

112. Якушева, Е.Н. Методика определения принадлежности лекарственных средств к числу субстратов гликопротеина-Р [Текст] / Е.Н. Якушева, И.В. Черных, А.В. Щулькин [и др.] // Российский медико-биологический вестник им. акад. И.П. Павлова. – 2015, №3. – С.49–53.

113. Якушева, Е.Н. Оценка принадлежности лекарственных препаратов к ингибиторам и индукторам белка-транспортера гликопротеина-Р в эксперименте *in vivo* [Текст] / Е.Н. Якушева, Д.А. Сычев, А.В. Щулькин [и др.] // Экспериментальная и клиническая фармакология. – 2018. – Т.81, №1. – С.17–23.

114. Якушева, Е.Н. Половые различия функциональной активности и экспрессии гликопротеина-Р у кроликов [Текст] / Е.Н. Якушева, И.В. Черных, А.В. Щулькин [и др.] // Российский физиологический журнал им. И.М. Сеченова. – 2014. – Т.100, №8. – С.944–952.

115. Якушева, Е.Н. Разработка ВЭЖХ-методики количественного анализа фабомотизола (афобазола) в плазме крови кроликов [Текст] / Е.Н. Якушева, И.В. Черных, А.В. Щулькин [и др.] // Вестник РУДН. Серия: Медицина. – 2017. – Т.21, №4. – С.432–439.

116. Якушева, Е.Н. Структура, функции гликопротеина-Р и его значение для рациональной фармакотерапии [Текст] / Е.Н. Якушева, А.В. Щулькин, Н.М. Попова [и др.] // Обзоры по клинической фармакологии и лекарственной терапии. – 2014. – Т.12, №2. – С.3–11.

117. Якушева, Е.Н. Функциональная активность и экспрессия гликопротеина-Р при экспериментальных манипуляциях [Текст] / Е.Н. Якушева, А.В. Щулькин, И.В. Черных [и др.] // Российский медико-биологический вестник им. акад. И.П. Павлова. – 2014, №2. – С.75–78.

118. Abdullahi, W. Blood-brain barrier dysfunction in ischemic stroke: targeting tight junctions and transporters for vascular protection [Text] / W. Abdullahi,

D. Tripathi, P.T. Ronaldson // *Am. J. Physiol. Cell. Physiol.* – 2018. – V.315, №3. – P.343–356.

119. Abdullahi, W. Functional Expression of P-glycoprotein and Organic Anion Transporting Polypeptides at the Blood-Brain Barrier: Understanding Transport Mechanisms for Improved CNS Drug Delivery? [Text] / W. Abdullahi, T.P. Davis, P.T. Ronaldson // *AAPS J.* – 2017. – V.19, №4. – P.931–939.

120. Agani, F.H. The role of mitochondria in the regulation of hypoxia-inducible factor 1 expression during hypoxia [Text] / F.H. Agani, P. Pichinle, J.C. Chavez [et al.] // *Journal of Biological Chemistry.* – 2000. – V.275, №46. – P.35863–35867.

121. Al-Akra, L. Tumor stressors induce two mechanisms of intracellular P-glycoprotein-mediated resistance that are overcome by lysosomal-targeted thiosemicarbazones [Text] / L. Al-Akra, D.H. Bae, S. Sahni [et al.] // *Biol. Chem.* – 2018. – V.293, №10. – P.3562–3587.

122. Alcantara, L.M. Chemosensitization potential of P-glycoprotein inhibitors in malaria parasites [Text] / L.M. Alcantara, J. Kim, C.B. Moraes [et al.] // *Exp. Parasitol.* – 2013. – V.134, №2. – P.235–243.

123. Alfieri, A. Targeting the Nrf2–Keap1 antioxidant defence pathway for neurovascular protection in stroke [Text] / A. Alfieri, S. Srivastava, R.C. Siow [et al.] // *J. Physiol.* – 2011. – V.589, №17. – P.4125–4136.

124. Andersson, T. The Pharmacokinetics of Single and Repeated Once-Daily Doses of 10, 20 and 40 mg Omeprazole as Enteric-Coated Granules [Text] / T. Andersson, C. Cederberg, Asger Heggelund [et al.] // *Drug Investigation.* – 1991. – V.3, №1. – P.45–52.

125. Apanasevich, V. Morphological Characteristics of the Osteoplastic Potential of Synthetic CaSiO₃/HAp Powder Biocomposite [Text] / V. Apanasevich, E. Papynov, N. Plekhova [et al.] // *J. Funct. Biomater.* – 2020. – V.11, №4. – P.1–12.

126. Appelros, P. Sex differences in stroke epidemiology: a systematic review [Text] / P. Appelros, B. Stegmayr, A. Terent // *Stroke*. – 2009. – V.40, №4. – P.1082–1090.
127. Avan, A. Socioeconomic status and stroke incidence, prevalence, mortality, and worldwide burden: an ecological analysis from the Global Burden of Disease Study 2017 [Text] / A. Avan, H. Digaleh, M. Di Napoli [et al.] // *BMC Med*. – 2019. – V.17. – P.191.
128. Badowska-Kozakiewicz, A.M. Expression of multidrug resistance protein P-glycoprotein in correlation with markers of hypoxia (HIF-1 α , EPO, EPO-R) in invasive breast cancer with metastasis to lymph nodes [Text] / A.M. Badowska-Kozakiewicz, M. Sobol, J. Patera // *Arch. Med. Sci.* – 2017. – V.13, №6. – P.1303–1314.
129. Ballent, M. P-glycoprotein in sheep liver and small intestine: gene expression and transport efflux activity [Text] / M. Ballent, M.R. Wilkens, L. Mate [et al.] // *J. Vet. Pharmacol. Ther.* – 2013. – V.36, №6. – P.576–582.
130. Bamberger, D.M. Efficacies of various antimicrobial agents in treatment of *Staphylococcus aureus* abscesses and correlation with in vitro tests of antimicrobial activity and neutrophil killing [Text] / D.M. Bamberger, M.T. Fields, B.L. Herndon // *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. – 1991. – V.35, №11. – P.2335–2339.
131. Bauer, M. Effect of P-glycoprotein inhibition at the blood-brain barrier on brain distribution of (R)-[11C]verapamil in elderly vs. young subjects [Text] / M. Bauer, B. Wulkersdorfer, R. Karch [et al.] // *Br. J. Clin. Pharmacol.* – 2017. – V.83, №9. – P.1991–1999.
132. Bayat, M. Neuroprotective properties of *Melissa officinalis* after hypoxic-ischemic injury both in vitro and in vivo [Text] / M. Bayat, T. Azamimeh, A. Hossein [et al.] // *Daru*. – 2012. – V.20, №1. – P.42.
133. Bederson, J.B. Guidelines for the management of aneurysmal subarachnoid hemorrhage: a statement for healthcare professionals from a special writing group of the Stroke Council, American Heart Association [published correction appears in *Stroke*

[Text] / J.B. Bederson, E.S. Connolly Jr, H.H. Batjer [et al.] // *Stroke*. – 2009. – V.40. – P.994–1025.

134. Belayev, L. Quantitative evaluation of blood-brain barrier permeability following middle cerebral artery occlusion in rats [Text] / L. Belayev, W.R. Busto, W. Zhao [et al.] // *Brain Research*. – 1996. – V.739, №1–2. – P.88–96.

135. Benet, L.Z. The Drug Transporter-Metabolism Alliance: Uncovering and Defining the Interplay [Text] / L.Z. Benet // *Mol. Pharm.* – 2009. – V.6, №6. – P.1631–1643.

136. Bernstein, H.-G. Vascular and extravascular distribution of the ATP-binding cassette transporters ABCB1 and ABCC1 in aged human brain and pituitary [Text] / H.-G. Bernstein, G. Hözl, H. Dobrowolny [et al.] // *Mechanisms of Ageing and Development*. – 2014. – V.141–142. – P.12–21.

137. Bertram, L. The genetic epidemiology of neurodegenerative disease [Text] / L. Bertram, R.E. Tanzi // *The Journal of Clinical Investigation*. – 2005. – V.115, №6. – P.1449–1457.

138. Bezombes, C. Restoration of TNF- α -induced ceramide generation and apoptosis in resistant human leukemia KG1a cells by the P-glycoprotein blocker [Text] / C. Bezombes, N. Maestre, G. Laurent [et al.] // *FASEB J.* – 1998, №12. – P.101–109.

139. Bharate, J.B. Synthesis, and the antioxidant, neuroprotective and P-glycoprotein induction activity of 4-arylquinoline-2-carboxylates [Text] / J.B. Bharate, A. Wani, S. Sharma [et al.] // *Org. Biomol. Chem.* – 2014. – V.12, №32. – P.6267–6277.

140. Billington, S. Interindividual and regional variability in drug transporter abundance at the human blood-brain barrier measured by quantitative targeted proteomics [Text] / S. Billington, L. Salphati, C. Hop [et al.] // *Clin. Pharmacol. Ther.* – 2019. – V.106. – P.228–237.

141. Blazquez, C. The CB₁ cannabinoid receptor signals striatal neuroprotection via a PI3K/Akt/mTORC1/BDNF pathway [Text] /

C. Blazquez, A. Chiarlone, L. Bellocchio [et al.] // *Cell Death and Differentiation*. – 2015. – V.22. – P.1618–1629.

142. Bocci, G. New insights in the in vitro characterisation and molecular modelling of the P-glycoprotein inhibitory promiscuity [Text] / G. Bocci, A. Moreau, P. Vayer [et al.] // *Eur. J. Pharm. Sci.* – 2018. – V.121. – P.85–94.

143. Boekhorst, P.A. Multidrug resistant cells with high proliferative capacity determine response to therapy in acute myeloid leukemia [Text] / P.A. Boekhorst, B. Lowenberg, J. van Kapel [et al.] // *Leukemia*. – 1995. – V.9, №6. – P.1025–1031.

144. Bradford, M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding [Text] / M.M. Bradford // *Analytical Biochemistry*. – 1976. – V.72, №1–2. – P.248–254

145. Brenn, A. St. John's Wort reduces beta-amyloid accumulation in a double transgenic Alzheimer's disease mouse model-role of P-glycoprotein [Text] / A. Brenn, M. Grube, G. Jedlitschky [et al.] // *Brain Pathol.* – 2014. – V.24, №1. – P.18–24.

146. Burk, O. The impact of thyroid disease on the regulation, expression, and function of ABCB1 (MDR1/P Glycoprotein) and consequences for the disposition of digoxin [Text] / O. Burk, S.S. Brenner, U. Hofmann [et al.] // *Clin. Pharmacol. Ther.* – 2010. – V.88, №5. – P.685–694.

147. Callaghan, R. Interaction of tamoxifen with the multidrug resistance P-glycoprotein [Text] / R. Callaghan, C.F. Higgins // *Br. J. Cancer*. – 1995. – №71. – P.294–299.

148. Cao, D. Common Carotid Arteries Occlusion Surgery in Adult Rats as a Model of Chronic Cerebral Hypoperfusion [Text] / D. Cao, Y. Bai, L. Li // *Bio-protocol*. – 2018. – V.8, №2. – e2704

149. Carrigos, M. Competitive and Non-Competitive Inhibition of the Multidrug-Resistance-Associated P-glycoprotein ATPase [Text] / M. Carrigos, L.M. Mir, S. Orlowski // *Eur. J. Biochem.* – 1997. – V.244, №2. – P.664–673.

150. Cen, J. Alteration in P-glycoprotein at the blood–brain barrier in the early period of MCAO in rats [Text] / J. Cen, L. Liu, M.S. Li [et al.] // *Journal of Pharmacy and Pharmacology*. – 2013. – V.65. – P.665–672.

151. Chan, P.S. In vitro transport assays of rufinamide, pregabalin, and zonisamide by human P-glycoprotein [Text] / P.S. Chan, C. Zhang, Z. Zuo [et al.] // *Epilepsy Res.* – 2014. – V.108, №3. – P.359–366.

152. Chaudhary, P.M. Expression and activity of P-glycoprotein, a multidrug efflux pump, in human hematopoietic stem cells [Text] / P.M. Chaudhary, I.B. Roninson // *Cell*. – 1991. – V.66, №1. – P.85–94.

153. Chehrazi, B.B. Evaluation of recombinant tissue plasminogen activator in embolic stroke [Text] / B.B. Chehrazi, J.A. Seibert, P. Kissel [et al.] // *Neurosurgery*. – 1989. – V.24, №3. – P.355–360.

154. Chen, S. Efficacy and Safety of Adding Clopidogrel to Aspirin on Stroke Prevention among High Vascular Risk Patients: A Meta-Analysis of Randomized Controlled Trials [Text] / S. Chen, Q. Shen, Y. Tang [et al.] // *PLoS One*. – 2014. – V.9, №8. – P.1–10.

155. Chiney, M.S. Clinical evaluation of P-glycoprotein inhibition by venetoclax: a drug interaction study with digoxin [Text] / M.S. Chiney, R.M. Menon, O.F. Bueno [et al.] // *Xenobiotica*. – 2018. – V.48, №9. – P.904–910.

156. Cho, Y. Effects of the antioxidant baicalein on the pharmacokinetics of nimodipine in rats: a possible role of P-glycoprotein and CYP3A4 inhibition by baicalein [Text] / Y. Cho, J. Choi, J. Burm // *Pharmacological Reports*. – 2011. – V.63. – P.1066–1073.

157. Choo, E.F. Differential in vivo sensitivity to inhibition of P-glycoprotein located in lymphocytes, testes, and the blood-brain barrier [Text] / E.F. Choo, D. Kurnik, M. Muszkat [et al.] // *J. Pharmacol. Exp. Ther.* – 2006. – V.317. – P.1012–1018.

158. Chufan, E.E. Drug–protein hydrogen bonds govern the inhibition of the ATP hydrolysis of the multidrug transporter P-glycoprotein [Text] / E.E. Chufan, K. Kapoor, S.V. Ambudkar // *Biochemical Pharmacology*. – 2016. – V.101, №1. – P.40–53.

159. Chufan, E.E. Molecular Basis of the Polyspecificity of P-Glycoprotein (ABCB1): Recent Biochemical and Structural Studies [Text] / E.E. Chufan, H. Sim, S.V. Ambudkar // *Advances in Cancer Research*. – 2015. – V.125. – P.71–96.

160. Chung, J.W. Effects of lovastatin on the pharmacokinetics of nicardipine in rat [Text] / J.W. Chung, S.H. Yang, J.S. Choi // *Biopharm. Drug Dispos.* – 2010. – V.31, №7. – P.436–341.

161. Clinical Drug Interaction Studies — Cytochrome P450 Enzyme- and Transporter-Mediated Drug Interactions Guidance for Industry / U.S. Department of Health and Human Services Food and Drug Administration Center for Drug Evaluation and Research (CDER) // *Clinical Pharmacology*. – 2020. – January. – 24 p.

162. Comerford, K.M. Hypoxia-inducible Factor-1-dependent Regulation of the Multidrug Resistance (MDR1) Gene [Text] / K.M. Comerford, T.J. Wallace, J. Karhausen [et al.] // *Cancer Res.* – 2002. – Vol. 62. – P.3387.

163. Cordon-Cardo, C. Expression of the multidrug resistance gene product (P-glycoprotein) in human normal and tumor tissues [Text] / C. Cordon-Cardo, J.P. O'Brein, J. Boccia [et al.] // *J. Histochem. Cytochem.* – 1990. – V.38, №9. – P.1277–1287.

164. Cuevas, J. Afobazole Modulates Neuronal Response to Ischemia and Acidosis via Activation of σ -1 Receptors [Text] / J. Cuevas, A. Behensky, W. Deng [et al.] // *J. of pharmacology and experimental therapeutics*. – 2011. – V.339, №1. – P.152–160.

165. Damont, A. Imaging the impact of cyclosporin A and dipyridamole on P-glycoprotein (ABCB1) function at the blood-brain barrier: A [(11)C]-N-desmethyl-loperamide PET study in nonhuman primates [Text] / A. Damont, S. Goutal, S. Auvity [et al.] // *Eur. J. Pharm. Sci.* – 2016. – V.91. – P.98–104.

166. De Lange, E.C.M. P-glycoprotein protein expression versus functionality at the blood-brain barrier using immunohistochemistry, microdialysis and mathematical modeling Author links open overlay panel [Text] / E.C.M. De Lange, D.J. vd Berg, F. Bellanti [et al.] // *European Journal of Pharmaceutical Sciences*. – 2018. – V.124, №1. – P.61–70.

167. De Ley, G. Hemispheric blood flow in the rat after unilateral common carotid occlusion: Evolution with time [Text] / G. De Ley, J.-B. Nishimyumuremyi, I. Leusen // *Stroke*. – 1985. – V.16. – P.69–73.

168. DeMars, K.M. Spatiotemporal Changes in P-glycoprotein Levels in Brain and Peripheral Tissues Following Ischemic Stroke in Rats [Text] / K.M. DeMars, C. Yang, K. E. Hawkins [et al.] // *J. Exp. Neurosci.* – 2017. – V.11. – P.1–9.

169. Deo, A.K. Activity of P-Glycoprotein, a β -Amyloid Transporter at the Blood-Brain Barrier, Is Compromised in Patients with Mild Alzheimer Disease [Text] / A.K. Deo, S. Borson, J.M. Link [et al.] // *J. Nucl. Med.* – 2014. – V.55, №7. – P.1106–1111.

170. Devillier, P. Clinical pharmacokinetics and pharmacodynamics of desloratadine, fexofenadine and levocetirizine: a comparative review [Text] / P. Devillier, N. Roche, C. Faisy // *Clin. Pharmacokinet.* – 2008. – V.47, №4. – P.217–230.

171. Dewanjee, S. Natural Products as Alternative Choices for P-Glycoprotein (P-gp) Inhibition [Text] / S. Dewanjee, T.K. Dua, N. Bhattacharjee [et al.] // *Molecules*. – 2017. – V.22, №6. – P.871.

172. Dickens, D. ABCB1 single nucleotide polymorphisms (1236C>T, 2677G>T, and 3435C>T) do not affect transport activity of human P-glycoprotein [Text] / D. Dickens, A. Owen, A. Alfirevic, M. Pirmohamed // *Pharmacogenet. Genomics*. – 2013. – V.23, №6. – P.314–323.

173. Ding, Y. Potential Regulation Mechanisms of P-gp in the Blood-Brain Barrier in Hypoxia [Text] / Y. Ding, R. Wang, J. Zhang [et al.] // *Curr. Pharm. Des.* – 2019. – V.25, №10. – P.1041–1051.

174. Ding, Z.J. Expression and significance of hypoxia-inducible factor-1 alpha and MDR1/P-glycoprotein in human colon carcinoma tissue and cells [Text] / Z.J. Ding, D. Li, X. Chen [et al.] // *Cancer Res. Clin. Oncol.* – 2010. – V.136, №11. – P.1697–1707.

175. Dopp, J.M. Influence of Intermittent Hypoxia on Myocardial and Hepatic P-glycoprotein Expression [Text] / J.M. Dopp, J.J. Moran, N.J. Abel [et al.] // *Pharmacotherapy.* – 2009. – V.29, №4. – P.365–372.

176. Ecker, G.F. Computational models for prediction of interactions with ABC-transporters [Text] / G.F. Ecker, T. Stockner, P. Chiba // *Drug Discov Today.* – 2008. – V.13, №7-8. – P.311–317.

177. Efferth, T. Medicinal plants and phytochemicals against multidrug-resistant tumor cells expressing ABCB1, ABCG2, or ABCB5: a synopsis of 2 decades [Text] / T. Efferth, O. Kadioglu, M.E.M. Saeed [et al.] // *Phytochemistry Reviews.* – 2021. – V.20. – P.7–53.

178. El-Ela, A.A. Identification of P-glycoprotein substrates and inhibitors among psychoactive compounds-implications for pharmacokinetics of selected substrates [Text] / A.A. El-Ela, S. Hartter, U. Schmitt [et al.] // *J. Pharm. Pharmacol.* – 2004. – V.56, №8. – P.967–975.

179. Ellman, G.L. Tissue sulfhydryl groups [Text] / G.L. Ellman // *Archives of biochemistry and biophysics.* – 1959. – V.82, №1. – P.70–77.

180. Erdo, F. Age-Related Functional and Expressional Changes in Efflux Pathways at the Blood-Brain Barrier [Text] / F. Erdo, P. Krajcsi // *Front Aging Neurosci.* – 2019. – V.11. – P.1–8.

181. Eszter, F. Permanent, bilateral common carotid artery occlusion in the rat: A model for chronic cerebral hypoperfusion-related neurodegenerative diseases [Text] /

F. Eszter, G.M.L. Paul, B. Ferenc // *Brain Research Reviews*. – 2007. – V.54, №1. – P.162–180.

182. Eyal, S. Drug interactions at the blood-brain barrier: fact or fantasy? [Text] / S. Eyal, P. Hsiao, J.D. Unadkat // *Pharmacol. Ther.* – 2009. – V.123. – P.80–104.

183. Fallacara, A.L. A New Strategy for Glioblastoma Treatment: In Vitro and In Vivo Preclinical Characterization of Si306, a Pyrazolo[3,4-d]Pyrimidine Dual Src/P-Glycoprotein Inhibitor [Text] / A.L. Fallacara, C. Zamperini, A. Podolski-Renić [et al.] // *Cancers (Basel)*. – 2019. – V.11, №6. – P.848.

184. Fang, W. Penetration of verapamil across blood brain barrier follow in cerebral ischemia depending on both paracellular pathway and P-glycoprotein transportation [Text] / W. Fang, P. Lv, X. Geng [et al.] // *Neurochem. Int.* – 2013. – V.62, №1. – P.23–30.

185. Farkas, E. Permanent, bilateral common carotid artery occlusion in the rat: A model for chronic cerebral hypoperfusion-related neurodegenerative diseases [Text] / E. Farkas, P.G.M. Luiten, F. Bari // *Brain research reviews*. – 2007, №54. – P.162–180.

186. Fernandez-Zapico, M.E. A functional family-wide screening of SP/KLF proteins identifies a subset of suppressors of KRAS-mediates cell growth [Text] / M.E. Fernandez-Zapico, A.G. Lomberk, S. Tsuji [et al.] // *Biochem. J.* – 2011. – V.435, №2. – P.529–537.

187. Ferreira, R.J. Molecular docking characterizes substrate-binding sites and efflux modulation mechanisms within P-glycoprotein [Text] / R.J. Ferreira, M.J. Ferreira, D.J. dos Santos // *J. Chem. Inf. Model.* – 2013. – V.53, №7. – P.1747–1760.

188. Fradette, C. Animal models of acute moderate hypoxia are associated with a down-regulation of CYP1A1, 1A2, 2B4, 2C5, and 2C16 and up-regulation of CYP3A6 and P-glycoprotein in liver [Text] / C. Fradette, J. Batonga, S. Teng [et al.] // *Drug Metab. Dispos.* – 2007. – V.35, №5. – P.765–771.

189. Frecska, E. A possibly sigma-1 receptor mediated role of dimethyltryptamine in tissue protection, regeneration, and immunity [Text] / E. Frecska,

A. Szabo, M.J. Winkelman [et al.] // *J. of neural transm.* – 2013. – V.120, №4. – P.1024–1033.

190. Garrigues, A. The multidrug transporter, P-glycoprotein, actively mediates cholesterol redistribution in the cell membrane [Text] / A. Garrigues, A.E. Escargueil, S. Orłowski // *PNAS.* – 2002. – V.99, №16. – P.10347–10352.

191. Ginsberg, M.D. Current Status of Neuroprotection for Cerebral Ischemia. Synoptic Overview [Text] / M.D. Ginsberg // *Stroke.* – 2009. – V.40. – P.111–114.

192. Gladek, I. HIF1A gene polymorphisms and human diseases: graphical review of 97 association studies [Text] / I. Gladek, J. Ferdin, S. Horvat [et al.] // *Genes Chromosomes Cancer.* – 2017. – V.56, №6. – P.439–452.

193. Grau, A.J. Risk factors, outcome, and treatment in subtypes of ischemic stroke: the German stroke data bank [Text] / A.J. Grau, C. Weimar, F. Bugge [et al.] // *Stroke.* – 2001. – V.32. – P.2559–2566.

194. Green, A.R. Animal models of stroke: do they have value for discovering neuroprotective agents [Text] / A.R. Green, T. Odergren, T. Ashwood // *Trends. Pharmacol. Sci.* – 2003. – V.24. – P.402–408.

195. Guekht, A. ARTEMIDA Trial (A Randomized Trial of Efficacy, 12 Months International Double-Blind Actovegin): A Randomized Controlled Trial to Assess the Efficacy of Actovegin in Poststroke Cognitive Impairment [Text] / A. Guekht, I. Skoog, S. Edmundson [et al.] // *Stroke.* – 2017. – V.48. – P.1262–1270.

196. Guennoun, R. Progesterone and allopregnanolone in the central nervous system: Response to injury and implication for neuroprotection [Text] / R. Guennoun, F. Labombarda, M.C. Gonzalez Deniselle [et al.] // *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology.* – 2015. – V.146. – P.48–61.

197. Guidance for Industry. Bioanalytical Method Validation. U.S. Department of Health and Human Services Food and Drug Administration Center for Drug Evaluation and Research (CDER) Center for Veterinary Medicine (CVM). – London, 2018. – 41p.

198. Guidelines for the Early Management of Patients With Acute Ischemic Stroke: 2019 Update to the 2018 Guidelines for the Early Management of Acute Ischemic Stroke A Guideline for Healthcare Professionals From the American Heart Association/American Stroke Association [Text] / W.J. Powers, A.A. Rabinstein, T. Ackerson [et al.] // *Stroke*. – 2019. – V. 50, №12. – P.344–418.

199. Guner, Y.S. P-glycoprotein induction by breast milk attenuates intestinal inflammation in experimental necrotizing enterocolitis [Text] / Y.S. Guner, A.L. Franklin, N.K. Chokshi [et al.] // *Lab. Invest.* – 2011. – V.91, №11. – P.1668–1679.

200. Hacke, W. Thrombolysis with Alteplase 3 to 4.5 hours after acute ischemic stroke [Text] / W. Hacke, M. Kaste, E. Bluhmki [et al.] // *N. Eng. J. Med.* – 2008. – V.359, №13. – P.1317–1322.

201. Hagenbuch, B. Transport of Xenobiotics Across the Blood-Brain Barrier [Text] / B. Hagenbuch, B. Gao, P.J. Meier // *News Physiol. Sci.* – 2002. – №17. – P.231–234.

202. Hartter, S. Oral bioavailability of dabigatran etexilate (Pradaxa®) after co-medication with verapamil in healthy subjects [Text] / S. Hartter, R. Sennewald, G. Nehmiz [et al.] // *BJCP*. – 2013. – V.75, №4. – P.1053–1062.

203. Hashimoto, S. Effect of coadministration of rifampicin on the pharmacokinetics of linezolid: clinical and animal studies [Text] / S. Hashimoto, K. Honda, K. Fujita [et al.] // *J. Pharm. Health Care Sci.* – 2018. – V.4. – P.27.

204. Haslam, I.S. Rifampin and digoxin induction of MDR1 expression and function in human intestinal (T84) epithelial cells [Text] / I.S. Haslam, K. Jones, T. Coleman [et al.] // *Br. J. Pharmacol.* – 2008. – V.154, №1. – P.246–255.

205. Hata, R. Evolution of brain infarction after transient focal cerebral ischemia in mice [Text] / R. Hata, K. Maeda, D. Hermann [et al.] // *J. Cereb. Blood. FlowMetab.* – 2000. – V.20, №6. – P.937–946.

206. Hayashi, T. Conversion of psychological stress into cellular stress response: Roles of the sigma-1 receptor in the process [Text] / T. Hayashi // *Psychiatry and Clinical Neurosciences*. – 2015. – V.69. – P.179–191.
207. Hochman, J.H. Interactions of human P-glycoprotein with simvastatin, simvastatin acid, and atorvastatin [Text] / J.H. Hochman, N. Pudvah, J. Qiu [et al.] // *Pharm.Res.* – 2004. – V.21, №9. – P.1686–1691.
208. Hodges, L.M. Very important pharmacogene summary: ABCB1 (MDR1, P-glycoprotein) [Text] / L.M. Hodges, S.M. Markova, L.W. Chinn [et al.] // *Pharmacogenet. Genomics*. – 2011. – V.21, №3. – P.152–161.
209. Hoffmeyer, S. Functional polymorphisms of the human multidrug-resistance gene: multiple sequence variations and correlation of one allele with P-glycoprotein expression and activity in vivo [Text] / S. Hoffmeyer, O. Burk, O. von Richter [et al.] // *Proc. Natl. Acad. Sci USA*. – 2000. – V.97, №7. – P.3473–3478.
210. Hoosain, F.G. Bypassing P-Glycoprotein Drug Efflux Mechanisms: Possible Applications in Pharmaco-resistant Schizophrenia Therapy [Text] / F.G. Hoosain, Y.E. Choonara, L.K. Tomar [et al.] // *Biomed. Res. Int.* – 2015. – V.484963. – P.1–21.
211. Huang, L. Significance and Mechanisms of P-glycoprotein in Central Nervous System Diseases [Text] / L. Huang, B. Li, X. Li [et al.] // *Curr. Drug. Targets*. – 2019. – V.20, №11. – P.1141–1155.
212. Ikemura, K. An antioxidant Trolox restores decreased oral absorption of cyclosporine A after liver ischemia–reperfusion through distinct mechanisms between CYP3A and P-glycoprotein in the small intestine [Text] / K. Ikemura, K. Inoue, H. Mizutani [et al.] // *European Journal of Pharmacology*. – 2012. – Vol.690, №1–3. – P.192–201.
213. In Vitro Drug Interaction Studies — Cytochrome P450 Enzyme- and Transporter-Mediated Drug Interactions Guidance for Industry / U.S. Department of

Health and Human Services Food and Drug Administration Center for Drug Evaluation and Research (CDER) // *Clinical Pharmacology*. – 2020. – January. – 43 p.

214. Jaganathan, S.K. Can flavonoids from honey alter multidrug resistance? [Text] / S.K. Jaganathan // *Med. Hypotheses*. – 2011. – V.76, №4. – P.535–537.

215. Jaisue, S. Pharmacokinetics of fexofenadine following LPS administration to rats [Text] / S. Jaisue, J.P. Gerber, A.K. Davey // *Xenobiotica*. – 2010. – V.40, №11. – P.743–750.

216. Jeddiabc, F. Nrf2 overexpression is associated with P-glycoprotein upregulation in gastric cancer [Text] / F. Jeddiabc, N. Soozangarabc, M. Reza Sadeghiab [et al.] // *Biomedicine and Pharmacotherapy*. – 2018. – V.97. – P.286–292.

217. Jha, N.K. ABC Transporters in Neurological Disorders: An Important Gateway for Botanical Compounds Mediated Neuro-Therapeutics [Text] / N.K. Jha, R. Kar, R. Niranjana // *Curr. Top. Med. Chem.* – 2019. – V.19, №10. – P.795–811.

218. Ji, B. Modulation of P-glycoprotein in rat brain microvessel endothelial cells under oxygen glucose deprivation [Text] / B. Ji, J. Cen, L. He [et al.] // *Journal of Pharmacy and Pharmacology*. – 2013. – V.65. – P.1508–1517.

219. Ji, Q. The impact of ABCB1 and CES1 polymorphisms on dabigatran pharmacokinetics and pharmacodynamics in patients with atrial fibrillation [Text] / Q. Ji, C. Zhang, Q. Xu [et al.] // *British journal of clinical pharmacology*. – 2021. – V.87, №5. – P.2247–2255.

220. Jia, Y.G. Ischemic postconditioning attenuates liver warm ischemia-reperfusion injury through Akt-eNOS-NO-HIF pathway [Text] / Y.G. Jia, T. Yang, X.G. Sun [et al.] // *J. Biomed. Sci.* – 2011. – V.18, №1. – P.79.

221. Jiang, W. IRIP, a New Ischemia/Reperfusion-Inducible Protein That Participate in the Regulation of Transporter Activity [Text] / W. Jiang, O. Prokopenko, L. Wong [et al.] // *Mol. Cell. Biol.* – 2005. – V.25, №15. – P.6496–6508.

222. Jiang, X.-L. Clinical Pharmacokinetics and Pharmacodynamics of Clopidogrel [Text] / X.-L. Jiang, S. Samant, L.J. Lesko // *Clin. Pharmacokinet.* – 2017. – V.54, №2. – P.147–166.
223. Jin, Z. Quercetin improves blood-brain barrier dysfunction in rats with cerebral ischemia reperfusion via Wnt signaling pathway [Text] / Z. Jin, J. Ke, P. Guo [et al.] // *Am. J. Transl. Res.* – 2019. – V.11, №8. – P.4683–4695.
224. Jin-Lian, H. Schisandra chinensis regulates drug metabolizing enzymes and drug transporters via activation of Nrf2-mediated signaling pathway [Text] / H. Jin-Lian, Z.W. Zhou, J.J. Yin [et al.] // *Drug Des. Devel. Ther.* – 2015. – №9. – P.127–146.
225. Jovin, T.G. Thrombectomy 6 to 24 Hours after Stroke [Text] / T.G. Jovin, R.G. Nogueira, D. Investigators // *N. Engl. J. Med.* – 2018. – V.378, №12. – P.1161–1162.
226. Juliano, R.L. A surface glycoprotein modulating drug permeability in Chinese hamster ovary cell nutans [Text] / R.L. Juliano, V. Ling // *Biochem. Biophys. Acta.* – 1976. – V.455, №1. – P.155–162.
227. Kaczynski, J. Sp1- and Kruppel-like transcription factors [Text] / J. Kaczynski, T. Cook, R. Urrutia // *Genome Biol.* – 2003. – V.4, №2. – P.206.
228. Kalra, R. The effect of hypoxia on acquired drug resistance and response to epidermal growth factor in Chinese hamster lung fibroblasts and human breast-cancer cells in vitro [Text] / R. Kalra, A.M. Jones, J. Kirk [et al.] // *Int. J. Cancer.* – 1993. – V.54, №4. – P.650–655.
229. Kalvass, J.C. Why Clinical Modulation of Efflux Transport at the Human Blood–Brain Barrier Is Unlikely: The ITCEvidence-Based Position [Text] / J.C. Kalvass, J.W. Polli, D.L. Bourdet [et al.] // *Clin. Pharmacol. Ther.* – 2013. – V.94, 31. – P.80–94.
230. Kang, K.A. Oxidative Stress, Nrf2, and Epigenetic Modification Contribute to Anticancer Drug Resistance [Text] / K.A. Kang, J.W. Hyun // *Toxicol. Res.* – 2017. – V.33, №1. – P.1–5.

231. Katnik, C. Activation of $\sigma 1$ and $\sigma 2$ receptors by afobazole increases glial cell survival and prevents glial cell activation and nitrosative stress after ischemic stroke [Text] / C. Katnik, A. Garcia, A.A. Behensky [et al.] // *J. Neurochem.* – 2016. – V.139, №3. – P.497–509.
232. Khaksar, S. Correlation Between Cannabidiol-Induced Reduction of Infarct Volume and Inflammatory Factors Expression in Ischemic Stroke Model [Text] / S. Khaksar, M.R. Bigdeli // *Basic Clin. Neurosci.* – 2017. – V.8, №2. – P.139–146.
233. Kim, S.W. Casein Kinase 2 (CK2)-mediated Phosphorylation of Hsp90 β as a Novel Mechanism of Rifampin-induced MDR1 Expression [Text] / S.W. Kim, M. Hasanuzzaman, M. Cho [et al.] // *J. Biol. Chem.* – 2015. – V.290, №27. – P.17029–17040.
234. Kitada, K. Amplification of the ABCB1 region accompanied by a short sequence of 200bp from chromosome 2 in lung cancer cells [Text] / K. Kitada, T. Yamasaki, S. Aikawa // *Cancer Genet. Cytogenet.* – 2009. – V.194, №1. – P.4–11.
235. Klepsch, F. Exhaustive sampling of docking poses reveals binding hypotheses for propafenone type inhibitors of P-glycoprotein [Text] / F. Klepsch, P. Chiba, G.F. Ecker // *PLoS Comput. Biol.* – 2011. – V.7, №5. – P.1–13.
236. Ko, J. Evaluation of Omeprazole and Lansoprazole as Inhibitors of Cytochrome P450 Isoforms [Text] / J. Ko, N. Sukhova, D. Thacker [et al.] // *Drug Metabolism and Disposition.* – 1997. – V.25, №7. – P.853–862.
237. Kofla, G. Doxorubicin induces drug effluxpumpsin *Candida albicans* [Text] / G. Kofla, V. Turner, B. Schulz [et al.] // *Med. Mycol.* – 2011. – V.49, №2. – P.132–142.
238. Koizumi, J. Experimental studies of ischemic brain edema. I. A new experimental model of cerebral embolism in rats in which recirculation can be introduced in the ischemic area [Text] / J. Koizumi, Y. Yoshida, T. Nakazawa [et al.] // *Jpn. J. Stroke.* – 1986. – V.8. – P.1–8.

239. Konieczny, K.M. Clinically Important Drug–Drug Interactions Between Antiarrhythmic Drugs and Anticoagulants [Text] / K.M. Konieczny, P. Dorian // J. Innov. Card. Rhythm. Manag. – 2019. – V.10, №3. – P.3552–3559.

240. Konig, J. Transporters and drug-drug interactions: important determinants of drug disposition and effects [Text] / J. Konig, F. Muller, M.F. Fromm // Pharmacol. Rev. – 2013. – V.65, №3. – P.944–966.

241. Kryzhanovskii, S.A. On the Mechanism of the Cardioprotective Action of σ_1 Receptor Agonist Anxiolytic Fabomotizole Hydrochloride (Afobazole) [Text] / S.A. Kryzhanovskii, L.M. Kozhevnikova, I.B. Tsorin [et al.] // Bull. Exp. Biol. Med. – 2018. – V.165, №5. – P.660–664.

242. Kubitzka, D. Absence of clinically relevant interactions between rivaroxaban - an oral, direct Factor Xa inhibitor--and digoxin or atorvastatin in healthy subjects [Text] / D. Kubitzka, M. Becka, A. Roth [et al.] // J. Int. Med. Res. – 2012. – V.40, №5. – P.1688–1707.

243. Kullak-Ublick, G.A. No major effects of vitamin D₃ (1,25 dihydroxyvitamin D₃) on absorption and pharmacokinetics of folic acid and fexofenadine in healthy volunteers [Text] / G.A. Kullak-Ublick, C. Gubler, K. Spanaus [et al.] // Eur. J. Clin. Pharmacol. – 2016. – V.72. – P.797–805.

244. Kullak-Ublick, G.A. Regulation of drug and bile salt transporters in liver and intestine [Text] / G.A. Kullak-Ublick, M.B. Becker // Drug Metab. Rev. – 2003. – V.35, №4. – P.305–317.

245. Kumar, A. Possible role of P-glycoprotein in the neuroprotective mechanism of berberine in intracerebroventricular streptozotocin-induced cognitive dysfunction [Text] / A. Kumar, J. Mishra, K. Chopra [et al.] // Psychopharmacology (Berl). – 2016. – V.233, №1. – P.137–152.

246. Kunta, J.R. Intestinal drug transporters: in vivo function and clinical importance [Text] / J.R. Kunta, P.J. Sinko // Curr. Drug Metab. – 2004. – V.5. – P.109–124.

247. Ladurner, G. Cerebrolysin Study Group. Neuroprotective treatment with cerebrolysin in patients with acute stroke: a randomised controlled trial [Text] / G. Ladurner, P. Kalvach, H. Moessler // *J. Neural. Transm.* – 2005. – V.112. – P.415–428.
248. Lagares, L.M. Multiclass Classifier for P-Glycoprotein Substrates, Inhibitors, and Non-Active Compounds [Text] / L.M. Lagares, N. Minovski, M. Novic // *Molecules.* – 2019. – V.24, №10. – P.2006.
249. Lapchak, P.A. Translational Stroke Research Using a Rabbit Embolic Stroke Model: A Correlative Analysis Hypothesis for Novel Therapy Development [Text] / P.A. Lapchak // *Translational Stroke Research.* – 2010. – V.1, №2. – P.96–107.
250. Lazarowski, A. Neuronal mdr-1 gene expression after experimental focal hypoxia: a new obstacle for neuroprotection? [Text] / A. Lazarowski, L. Caltana, A. Merelli [et al.] // *J. Neurol. Sci.* – 2007. – V.258. – P.84–92.
251. Le Cluyssell, E.L. Pregnane X receptor: molecular basis for special differences in CYP3A induction by xenobiotics [Text] / E.L. Le Cluyssell // *Chem. Biol. Interact.* – 2001. – V.134, №3. – P.283–289.
252. Leandro, K. ABC transporters in drug-resistant epilepsy: mechanisms of upregulation and therapeutic approaches [Text] / K. Leandro, J. Bicker, G. Alves [et al.] // *Pharmacol. Res.* – 2019. – V.144. – P.357–376.
253. Lee, J.M. An important role of Nrf2-ARE pathway in the cellular defense mechanism [Text] / J.M. Lee, J.A. Johnson // *J. Biochem. Mol. Biol.* – 2004. – V.37, №2. – P.139–143.
254. Lee, S.D. Dose-Dependent Targeted Suppression of P-glycoprotein Expression and Function in Caco-2 Cells [Text] / S.D. Lee, J. Osei-Twum, K.M. Wasan // *Mol. Pharm.* – 2013. – V.10, №6. – P.2323–2330.
255. Lee, C. Effects of pravastatin on the pharmacokinetic parameters of nimodipine after oral and intravenous administration in rats: Possible role of CYP3A4

inhibition by pravastatin [Text] / C. Lee, J. Choi, D. Choi // *Indian journal of pharmacology*. – 2012. – V.44, №5. – P.624–628.

256. Leisz, S. Nimodipine-Dependent Protection of Schwann Cells, Astrocytes and Neuronal Cells from Osmotic, Oxidative and Heat Stress Is Associated with the Activation of AKT and CREB [Text] / S. Leisz, S. Simmermacher, J. Prell [et al.] // *Int. J. Mol. Sci.* – 2019. – V.20, №18. – P.4578.

257. Leopoldo, M. An updated patent review on P-glycoprotein inhibitors (2011-2018) [Text] / M. Leopoldo, P. Nardulli, M. Contino [et al.] // *Expert Opin. Ther. Pat.* – 2019. – V.29, №6. – P.455–461.

258. Li, J. Advances in inhibition of protein-protein interactions targeting hypoxia-inducible factor-1 for cancer therapy [Text] / J. Li, W. Xi, X. Li [et al.] // *Bioorg. Med. Chem.* – 2019. – V.27, №7. – P.1145–1158.

259. Linlin, S.C. Drug transporter, P-glycoprotein (MDR1), is an integrated component of the mammalian blood-testis barrier [Text] / S.C. Linlin, C. Yan, D.D. Mruc // *Int. J. Biochem. Cell Biol.* – 2009. – V.41, №12. – P.2578–2587.

260. Liu, L. Hypoxia-inducible factor-1 alpha contributes to hypoxia-induced chemoresistance in gastric cancer [Text] / L. Liu, X. Ning, L. Sun [et al.] // *Cancer Sci.* – 2008. – V.99, №1. – P.121–128.

261. Liu, P. Validation of a preclinical animal model to assess brain recovery after acute stroke [Text] / P. Liu, Y.-Y. Tang, X.-S. Yanga [et al.] // *European Journal of Pharmacology*. – 2018. – V.835, №15. – P.75–81

262. Liu, X.Q. Enzyme kinetics and inhibition of nimodipine metabolism in human liver microsomes [Text] / X.Q. Liu, Y.L. Ren, Z.Y. Qian [et al.] // *Acta Pharmacologica Sinica*. – 2000. – V.21, №8. – P.690–694.

263. Lotz, C. Role of the tumor microenvironment in the activity and expression of the P-glycoprotein in human colon carcinoma cells [Text] / C. Lotz, D.K. Kekkeher, B. Gassner [et al.] // *Oncol. Rep.* – 2007. – V.17, №1. – P.239–244.

264. Mahon, P.C. FIH-1: a novel protein that interacts with HIF-1 α and VHL to mediate repression of HIF-1 transcriptional activity [Text] / P.C. Mahon, K. Hirota, G.L. Semenza // *Genes & Dev.* – 2001. – №15. – P.2675 – 2686.

265. Majid, A. Neuroprotection in Stroke: Past, Present, and Future [Text] / A. Majid // *Neurology Volume.* – Hindawi Publishing Corporation ISRN, 2014. – P.1–17.

266. Malhotra, R. Quantitative Immunohistochemical Analysis Reveals Association between Sodium Iodide Symporter and Estrogen Receptor Expression in Breast Cancer [Text] / R. Malhotra, F. Varghese, A.B. Bukhari [et al.] // *PLoS ONE.* – 2013. – V.8, №1. – P.1–9.

267. Manitpisitkul, P. Intravenous verapamil kinetics in rats: marked arteriovenous concentration difference and comparison with humans [Text] / P. Manitpisitkul, W.L. Chiou // *Biopharm. Drug Dispos.* – 1993. – V.14, №7. – P.555–566.

268. Mason, J. The systemic safety of fexofenadine HCl [Text] / J. Mason, R. Reynolds, N. Rao // *Clin. Exp. Allergy.* – 1999. – V.29, №3. – P.163–170.

269. Mendell, J. Pharmacokinetics of the direct factor Xa inhibitor edoxaban and digoxin administered alone and in combination [Text] / J. Mendell, R.J. Noveck, M. Shi // *J. Cardiovasc. Pharmacol.* – 2012. – V.60, №4. – P.335–341.

270. Miller, D.S. Modulation of P-glycoprotein at the blood-brain barrier: opportunities to improve central nervous system pharmacotherapy [Text] / D.S. Miller, B. Bauer, A.M.S. Hartz // *Pharmacological reviews.* – 2008. – V.60, №2. – P.196–209.

271. Mimmack, M.L. Energy coupling to periplasmic binding protein-dependent transport systems: stoichiometry of ATP hydrolysis during transport in vivo [Text] / M.L. Mimmack, M.P. Gallagher, S.R. Pearce [et al.] // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* – 1989. – V.86, №21. – P.8257–8261.

272. Minnerup, J. Analysis of early phase and subsequent phase III stroke studies of neuroprotectants: outcomes and predictors for success [Text] / J. Minnerup,

H. Wersching, M. Schilling [et al.] // *Experimental & Translational Stroke Medicine*. – 2014. – V.6, №2. – P.1–6.

273. Mizutani, T. Genuine functions of P-glycoprotein (ABCB1) [Text] / T. Mizutani, M. Masatoshi, N. Emi [et al.] // *Curr. Drug Metab.* – 2008. – V.9, №2. – P.167–174.

274. Mohamed, L.A. Role of P-glycoprotein in mediating rivastigmine effect on amyloid- β brain load and related pathology in Alzheimer's disease mouse model [Text] / L.A. Mohamed, J.N. Keller, A. Kaddoumi // *Biochim. Biophys. Acta.* – 2016. – V.1862, №4. – P.778–787.

275. Molimard, M. Comparison of pharmacokinetics and metabolism of desloratadine, fexofenadine, levocetirizine and mizolastine in humans [Text] / M. Molimard, B. Diquet, M.S. Benedetti // *Fund. & Clin. Pharmacol.* – 2004. – V.18, №4. – P.399–411.

276. Moody, G.C. Fully automated analysis of activities catalysed by the major human liver cytochrome P450 (CYP) enzymes: assessment of human CYP inhibition potential [Text] / G.C. Moody // *Xenobiotica.* – 1999. – V.29, №1. – P.53–75.

277. Muller, C. P-glycoprotein stability is affected by serum deprivation and high cell density in multidrug-resistant cells [Text] / C. Muller, G. Laurent, V. Ling // *J. Cell Physiol.* – 1995. – V.163, №3. – P.538–544.

278. Murakami, T. Factors affecting the expression and function of P-glycoprotein in rats: drug treatments and diseased states [Text] / T. Murakami, R. Yumoto, J. Nagai [et al.] // *Pharmazie.* – 2002. – V.57, №2. – P.102–107.

279. Muz, B. Tariquidar sensitizes multiple myeloma cells to proteasome inhibitors via reduction of hypoxia-induced P-gp-mediated drug resistance [Text] / B. Muz, H.D. Kusdono, F. Azab [et al.] // *Leuk. Lymphoma.* – 2017. – V.58, №12. – P.2916–2925.

280. Nanayakkara, A.K. Targeted inhibitors of P-glycoprotein increase chemotherapeutic-induced mortality of multidrug resistant tumor cells [Text] / A.K. Nanayakkara, C.A. Follit, G. Chen [et al.] // *Sci Rep.* – 2018. – V.8. – P.967.

281. Nare, B. Benzimidazoles – potent anti-mitotic drugs: substrates for the P-glycoprotein transporter in multidrug-resistant cells [Text] / B. Nare, Z. Liu, R.K. Prichard // *Biochemical pharmacology.* – 1994. – V.48, №12. – Vol. – P.2215–2222.

282. Ohnishi, T. In vivo and in vitro evidence for ATP-dependency of P-glycoprotein-mediated efflux of doxorubicin at the blood-brain barrier [Text] / T. Ohnishi, I. Tamai, K. Sakanaka [et al.] // *Biochemical Pharmacology.* – 1995. – V.49, №10. – P.1541–1544.

283. Ohura, K. Design of Fexofenadine Prodrugs Based on Tissue-Specific Esterase Activity and Their Dissimilar Recognition by P-Glycoprotein [Text] / K. Ohura, Y. Nakada, S. Kotani [et al.] // *J. Pharm. Sci.* – 2015. – V.104, №9. – P.3076–3083.

284. Owuor, E.D. Antioxidants and oxidants regulated signal transduction pathways [Text] / E.D. Owuor, A.N. Kong // *Biochem. Pharmacol.* – 2002. – V.64, №5-6. – P.765–770.

285. Paglia, D.E. Studies on the quantitative and qualitative characterization of erythrocyte glutathione peroxidase [Text] / D.E. Paglia, W.N. Valentine // *J. Lab. Clin. Med.* – 1967. – V.70. – P. 158–169.

286. Pare, G. Genetic determinants of dabigatran plasma levels and their relation to bleeding [Text] / G. Pare, N. Eriksson, T. Lehr [et al.] // *Circulation.* – 2013. – V.127, №13. – P.1404–1412.

287. Park, J.-A. Neuroprotective Effect of Duloxetine on Chronic Cerebral Hypoperfusion-Induced Hippocampal Neuronal Damage [Text] / J.-A. Park, C.-H. Lee // *Biomol. Ther. (Seoul).* – 2018. – V.26, №2. – P.115–120.

288. Qingdong, K. Hypoxia-Inducible Factor-1 (HIF-1) [Text] / K. Qingdong, M. Costa // *Mol. Pharmacology.* – 2006. – V.70, №5. – P.1469–1480.

289. Rana, S.V. Effect of different oral doses of isoniazid-rifampicin in rats [Text] / S.V. Rana, R. Pal, K. Vaiphie [et al.] // *Mol. Cell. Biochem.* – 2006. – V.289, №(1-2). – P.39–47.
290. Rasmussen, M.K. Activation of the aryl hydrocarbon receptor decreases rifampicin-induced CYP3A4 expression in primary human hepatocytes and HepaRG [Text] / M.K. Rasmussen, M. Daujat-Chavanieu, S. Gerbal-Chaloin // *Toxicol. Lett.* – 2017. – V.277. – P.1–8.
291. Regardh, C.G. Pharmacokinetics and metabolism of omeprazole in animals and man – an overview [Text] / C.G. Regardh, M. Gabrielsson, K.J. Hoffman [et al.] // *Scandinavian Journal of Gastroenterology.* – 1985. – V.108. – P.79–94.
292. Rehakova, R. Brain cholesterol and the role of statins in neuroprotection [Text] / R. Rehakova, M. Cebova, Z. Matuskova [et al.] // *Act. Nerv. Super Rediviva.* – 2016. – V.58, №1. – P.11–17.
293. Ridout, F. A single-center, randomized, double-blind, placebo-controlled, crossover investigation of the effects of fexofenadine hydrochloride 180 mg alone and with alcohol, with hydroxyzine hydrochloride 50 mg as a positive internal control, on aspects of cognitive and psychomotor function related to driving a car [Text] / F. Ridout, Z. Shamsi, R. Meadows [et al.] // *Clin. Ther.* – 2003. – V.25, №5. – P.1518–1538.
294. Riordan, K.R. Amplification of P-glycoprotein genes in multidrug-resistant mammalian cell lines [Text] / J.R. Riordan, K. Deuchars, N. Kartner [et al.] // *Nature.* – 1985 – V.316. – P.817–819.
295. Robertson, S.J. P-glycoprotein expression in immortalised rat brain endothelial cells: comparisons following exogenously applied hydrogen peroxide and after hypoxia-reoxygenation [Text] / S.J. Robertson, K.D. Kania, S.B. Hladky [et al.] // *J. Neurochem.* – 2009. – V.111, №1. – P.132–141.
296. Roerig, D.L. Kinetic characterization of P-glycoprotein-mediated efflux of rhodamine 6G in the intact rabbit lung [Text] / D.L. Roerig, S.H. Audi, S.B. Ahlf // *Drug Metab. Dispos.* – 2004. – V.32, №9. – P.953–958.

297. Ryoo, I.G. Involvement of NRF2 Signaling in Doxorubicin Resistance of Cancer Stem Cell-Enriched Colonospheres [Text] / I.G. Ryoo, G. Kim, B.H. Choi [et al.] // *Biomol. Ther. (Seoul)*. – 2016. – V.24, №5. – P.482–488.
298. Sakata, K. Hypoxia-induced drug resistance: comparison to P-glycoprotein-associated drug resistance [Text] / K. Sakata, T.T. Kwok, B.J. Murphy [et al.] // *Br. J. Cancer*. – 1991. – V.64, №5. – P.809–814.
299. Samoto, K. P-glycoprotein expression in brain capillary endothelial cells after focal ischemia in rat [Text] / K. Samoto, K. Ikezaki, N. Yokoyama [et al.] // *Neurol. Res.* – 1994. – V.60. – P.257–260.
300. Sasongko, L. Imaging P-glycoprotein transport activity at the human blood-brain barrier with positron emission tomography [Text] / L. Sasongko, J.M. Link, M. Muzi [et al.] // *Clin. Pharmacol. Ther.* – 2005. – V.77. – P.503–514.
301. Saver, J.L. Prehospital Use of Magnesium Sulfate as Neuroprotection in Acute Stroke [Text] / J.L. Saver, S. Starkman, M. Eckstein [et al.] // *The new England journal of medicine*. – 2015. – V.372. – P.528–536.
302. Schinkel, A.H. N-glycosylation and deletion mutants of the human MDR1 P-glycoprotein [Text] / A.H. Schinkel, S. Kemp, M. Dolle [et al.] // *J. Biol. Chem.* – 1993. – V.268, №10. – P.7474–7481.
303. Schmidt, H.R. The Molecular Function of σ Receptors: Past, Present, and Future [Text] / H.R. Schmidt, A.C. Kruse // *Trends Pharmacol Sci.* – 2019. – V.40, №9. – P.636–654.
304. Seebacher, N.A. Glucose modulation induces lysosome formation and increases lysosomotropic drug sequestration via the P-glycoprotein drug transporter [Text] / N.A. Seebacher, D.J. Lane, P.J. Jansson [et al.] // *J. Biol. Chem.* – 2016. – V.291. – P.3796–3820.
305. Seebacher, N.A. Glucose modulation induces reactive oxygen species and increases P-glycoprotein-mediated multidrug resistance to chemotherapeutics [Text] /

N.A. Seebacher, D.R. Richardson, P.J. Jansson // *Br. J. Pharmacol.* – 2015. – V.172, №10. – P.2557–2572.

306. Seelig, A. Structure-activity relationship of P-glycoprotein substrates and modifiers [Text] / A. Seelig, E. Landwojtowicz // *Eur. J. Pharm. Sci.* – 2000. – V.12, №1. – P.31–40.

307. Semenza, G.L. Surviving ischemia: adaptive responses mediated by hypoxia-inducible factor 1 [Text] / G.L. Semenza // *J. Clin. Investig.* – 2000. – Vol.106. – P.809–812.

308. Sharma, W. Association of C3435T multi drug resistance gene-1 polymorphism with aspirin resistance in ischemic stroke and its subtypes [Text] / V. Sharma, S. Kaul, A. Al Hazzani [et al.] // *J. Neurol. Sci.* – 2012. – V.315, №1-2. – P.72–76.

309. Sharom, F.J. The P-glycoprotein multidrug transporter [Text] / F.J. Sharom // *Essays Biochem.* – 2011. – V.50. – P.161–178.

310. Shchulkin, A.V. The Role of P-Glycoprotein in Decreasing Cell Membranes Permeability during Oxidative Stress [Text] / A.V. Shchulkin, Y.V. Abalenikhina, P.D. Erokhina [et al.] // *Biochemistry (Moscow)*. – 2021. – V.86. – P.197–206.

311. Shimizu, M. Effects of itraconazole and diltiazem on the pharmacokinetics of fexofenadine, a substrate of P-glycoprotein [Text] / M. Shimizu, T. Uno, K. Sugavara [et al.] // *Br. J. Clin. Pharmacol.* – 2006. – V.61, №5. – P.538–544.

312. Sigdel, K.P. The conformation and dynamics of P-glycoprotein in a lipid bilayer investigated by atomic force microscopy [Text] / K.P. Sigdel, L.A. Wilt, B.P. Marsh [et al.] // *Biochem. Pharmacol.* – 2018. – V.156. – P.302–311.

313. Simons, F.E. Clinical pharmacology of new histamine H1 receptor antagonists [Text] / F.E. Simons, K.J. Simons // *Clin. Pharmacokinet.* – 1999. – V.36, №5. – P.329–352.

314. Sita, G. P-glycoprotein (ABCB1) and Oxidative Stress: Focus on Alzheimer's Disease [Text] / G. Sita, P. Hrelia, A. Tarozzi [et al.] // *Oxid. Med. Cell. Longev.* – 2017. – P.1–13.

315. Skazik, C. P-Glycoprotein (ABCB1) expression in human skin is mainly restricted to dermal components [Text] / C. Skazik, J. Wenzel, Y. Marquardt [et al.] // *Exp. Dermatol.* – 2011. – V.20, №5. – P.450–452.

316. Spudich, A. Inhibition of multidrug resistance transporter-1 facilitates neuroprotective therapies after focal cerebral ischemia [Text] / A. Spudich, E. Kilic, H. Xing [et al.] // *Nat. Neurosci.* – 2006. – №9. – P.487–488.

317. Stakhovskaya, L.V. Results of a randomized double blind multicenter placebo-controlled, in parallel groups trial of the efficacy and safety of prolonged sequential therapy with mexidol in the acute and early recovery stages of hemispheric ischemic stroke (EPICA) [Text] / L.V. Stakhovskaya, N.A. Shamalov, D.R. Khasanova [et al.] // *Zh. Nevrol. Psikhiatr. Im. S. S. Korsakova.* – 2017. – V.117, №3. – P.55–65.

318. Strauss, E. Gene-environment interaction for the HIF1-A 1772C>T polymorphisms and cigarette smoking increase susceptibility to abdominal aortic aneurysm [Text] / E. Strauss, K. Waliszewski, G. Oszkinis [et al.] // *Przegl. Lek.* – 2012. – V.69, №10. – P.744–749.

319. Syunyakov, T.S. Evaluation of the therapeutic efficacy and safety of the selective anxiolytic afobazole in generalized anxiety disorder and adjustment disorders: Results of a multicenter randomized comparative study of diazepam [Text] / T.S. Syunyakov, G.G. Neznamov // *Ter. Arkh.* – 2016. – V.88, №8. – P.73–86.

320. Syvanen, S. Species differences in blood-brain barrier transport of three positron emission tomography radioligands with emphasis on P-glycoprotein transport [Text] / S. Syvanen, O. Lindhe, M. Palner [et al.] // *Drug Metab. Dispos.* – 2009. – V.37, №3. – P.635–643.

321. Szakacs, G. The role of ABC transporters in drug absorption, distribution, metabolism, excretion and toxicity (ADME-Tox) [Text] / G. Szakacs, A. Varadi, C. Ozvegy-Laczka [et al.] // *Drug Discov. Today.* – 2008. – V.13, №9–10. – P.379–393.

322. Tahara, H. P-glycoprotein plays a major role in the efflux of fexofenadine in the small intestine and blood-brain barrier, but only a limited role in its biliary excretion [Text] / H. Tahara, H. Kusuhara, E. Fuse [et al.] // *Drug Metabolism and Disposition*. – 2005. – V.33, №7. – P.963–968.

323. Tallis, S. Changes in CNS cells in hyperammonemic portal hypertensive rats [Text] / S. Tallis, L.R. Caltana, P.A. Souto [et al.] // *J. Neurochem.* – 2014. – V.128, №3. – P.431–444.

324. Tanaka, T. Cobalt promotes angiogenesis via hypoxia-inducible factor and protects tubulointerstitium in the remnant kidney model [Text] / T. Tanaka, I. Kojima, T. Ohse [et al.] // *Laboratory Investigation*. – 2005. – V.85. – P.1292–1307.

325. Tang, Y.Z. P-glycoprotein regulating biphasic insulin secretion in rat pancreatic beta cells [Text] / Y.Z. Tang, D.Q. Li, F.J. Sun [et al.] // *Chin. Med. J. (Engl)*. – 2009. – V.12, №21. – P.2587–2592.

326. Terada, Y. Intestinal P-glycoprotein expression is multimodally regulated by intestinal ischemia-reperfusion [Text] / Y. Terada, J. Ogura, T. Tsujimoto [et al.] // *J. Pharm. Pharm. Sci.* – 2014. – V.17, №2. – P.266–276.

327. Thiebaut, F. Cellular localization of the multidrug-resistance gene product P-glycoprotein in normal human tissues [Text] / F. Thiebaut, T. Tsuruo, H. Hamada [et al.] // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. – 1987. – V.84, №21. – P.7735–7738.

328. Tomita, M. Effects of intestinal ischemia/reperfusion on P-glycoprotein mediated biliary and renal excretion of rhodamine123 in rat [Text] / M. Tomita, H. Kishimoto, Y. Takizawa [et al.] // *Drug Metab. Pharmacokinet.* – 2009. – V.24, №5. – P.428–437.

329. Tournier, N. Strategies to Inhibit ABCB1- and ABCG2-Mediated Efflux Transport of Erlotinib at the Blood-Brain Barrier: A PET Study on Nonhuman Primates [Text] / N. Tournier, S. Goutal, S. Auvity [et al.] // *J. Nucl. Med.* – 2017. – V.58, №1. – P.117–122.

330. Ueda, K. Human P-glycoprotein transports cortisol, aldosterone, and dexamethasone, but not progesterone [Text] / K. Ueda, N. Okamura, M. Hirai [et al.] // *J. Biochem.* – 1992. – V.267, №34. – P.24248–24252.
331. Ushigome, F. Human placental transport of vinblastine, vincristine, digoxin and progesterone: contribution of P-glycoprotein [Text] / F. Ushigome, H. Takanaga, H. Matsuo [et al.] // *Eur. J. Pharmacol.* – 2000. – V.408, №1. – P.1–10.
332. Vautier, S. ABCB1: the role in Parkinson's disease and pharmacokinetics of antiparkinsonian drugs [Text] / S. Vautier, C. Fernandez // *Drug Metab. Toxicol.* – 2009. – V.5, №11. – P.1349–1358.
333. Vilas-Boas, W. Mechanisms of P-gp inhibition and effects on membrane fluidity of a new rifampicin derivative, 1,8-dibenzoyl-rifampicin [Text] / V. Vilas-Boas, R. Silva, C. Nunes [et al.] // *Toxicol. Lett.* – 2013. – V.220, №3. – P.259–266.
334. Volk, J. Immunohistochemical localization of P-glycoprotein in rat brain and detection of its increased expression by seizures are sensitive to fixation and staining variables [Text] / H. Volk, H. Potschka, W. Löscher // *Journal of Histochemistry & Cytochemistry.* – 2005. – V.53, №4. – P.517–531.
335. Volka, H.A. Neuronal expression of the drug efflux transporter P-glycoprotein in the rat hippocampus after limbic seizures [Text] / H.A. Volka, K. Burkhardt, H. Potschka [et al.] // *Neurosci.* – 2004. – V.123, №3. – P.751–759.
336. Voronin, M.V. Effect of afobazole on mitochondrial monoamine oxidase A activity in vitro [Text] / M.V. Voronin, L.N. Aksenova, O.A. Buneena [et al.] // *Bull. Exp. Biol. Med.* – 2009. – V.148, №1. – P.23–25.
337. Waghray, D. Inhibit or Evade Multidrug Resistance P-glycoprotein in Cancer Treatment [Text] / D. Waghray, Q. Zhang // *J. Med. Chem.* – 2018. – V.61, №12. – P.5108–5121.
338. Walenga, J.M. Drug and dietary interactions of the new and emerging oral anticoagulants [Text] / J.M. Walenga, C. Adiguzel // *Int. J. Clin. Pract.* – 2010. – V.64. – P.956–967.

339. Wang, F. Effect of Si-RNA-silenced HIF-1 α gene on myocardial ischemia-reperfusion-induced insulin resistance [Text] / F. Wang, L. Gui-You, L. Da-Xing [et al.] // *Int. J. Clin. Exp. Med.* – 2015. – V.8, №9. – P.15514–15520.
340. Wang, G.L. Hypoxia-induciblefactor 1 isabasic-helix-loop-helix-PAS heterodimer regulated by cellular O₂ tension [Text] / G.L. Wang, B.H. Jang, E.A. Rue [et al.] // *Proc. Natl. Acad. Sci.* – 1995. – V.92. – P.5510–5514
341. Wang, H Ameliorating effect of luteolin on memory impairment in an Alzheimer's disease model [Text] / H. Wang, H. Wang, H. Cheng [et al.] // *Molecular medicine reports.* – 2016. – V.13, №5. – P.4215–4220.
342. Wang, P.H. Pgp Rules: a decision tree based prediction server for P-glycoprotein substrates and inhibitors [Text] / P.H. Wang, Y.S. Tu, Y.J. Tseng // *Bioinformatics.* – 2019. – P. 4193–4195.
343. Wang, Q. Hypertonic saline downregulates endothelial cell-derived VEGF expression and reduces blood-brain barrier permeability induced by cerebral ischaemia via the VEGFR2/eNOS pathway [Text] / Q. Wang, Y. Deng, L. Huang [et al.] // *Int. J. Mol. Med.* – 2019. – V.44, №3. – P.1078–1090.
344. Wang, X. New monocyte locomotion inhibitory factor analogs protect against cerebral ischemia-reperfusion injury in rats [Text] / X. Wang, C. Wang, Y. Yang [et al.] // *Bosn. J. Basic Med. Sci.* – 2017. – V.17, №3. – P.221–227.
345. Wang, X. Nrf2 Upregulates ATP Binding Cassette Transporter Expression and Activity at the Blood–Brain and Blood–Spinal Cord Barriers [Text] / X. Wang, C.R. Campos, J.C. Peart [et al.] // *J. Neurosci.* – 2014. – V.34, №25. – P.8585–8593.
346. Wartenberg, M. Regulation of the multidrug resistance transporter P-glycoprotein in multicellular prostate tumor spheroids by hyperthermia and reactive oxygen species [Text] / M. Wartenberg, S. Gronczynska, M.M. Bekhite [et al.] // *Int. J. Cancer.* – 2005. – V.113, №2. – P.229–240.
347. Wen-sen, J. Regulation of hypoxia inducible factor-1 α expression by the alteration of redox status in HepG2 cells [Text] / J. Wen-sen, K. Zhao-lu, S. Zhi-fen [et al.] // *J. Exp. Clin. Cancer Res.* – 2011. – V.30, №1. – P.61.

348. Wessler, D.J. The P-Glycoprotein Transport System and Cardiovascular Drugs [Text] / D.J. Wessler, L.T. Grip, J. Mendell [et al.] // JACC. – 2013. – V.61, №25. – P.2495–2502.
349. Xie, J. Expression and significance of hypoxia-inducible factor-1 α and MDR1/P-glycoprotein in laryngeal carcinoma tissue and hypoxic Hep-2 cells [Text] / J. Xie, D.W. Li, X.W. Chen [et al.] // Oncol. Lett. – 2013. – V.6, №1. – P.232–238.
350. Xixi, G. Enhanced Cytotoxicity of Doxorubicin against Lung Adenocarcinoma Cell Line A549 in vitro by Omeprazole [Text] / G. Xixi, W. Wendong, W. Jiashun // Acta Medicinæ Universitatis Scientiæ et Technologiæ Huazhong. – 2012. – №5. – P.1–12.
351. Xu, L. Low dose intravenous minocycline is neuroprotective after middle cerebral artery occlusion reperfusion in rats [Text] / L. Xu, S.C. Fagan, J.L. Waller [et al.] // BMC Neurology. – 2004. – V.4. – P.1–7.
352. Yague, E. P-glycoprotein (MDR1) expression in leukemic cells is regulated at two distinct steps, mRNA stabilization and translational initiation [Text] / E. Yague, A.L. Armesilla, G. Harrison [et al.] // Biol. Chem. – 2003. – V.278. – P.10344–10352.
353. Yamaguchi, T. Structural and Pharmacological Studies of an ABC Multidrug Transporter [Text] / T. Yamaguchi // Yakugaku Zasshi. – 2016. – V.136, №2. – P.197–202.
354. Yamamoto, M. A possible role of a lipid peroxidation in cellular damage, caused by cerebral ischemia and the protective effect of α -tocopherol administration [Text] / M. Yamamoto, T. Shina, T. Vozumi [et al.] // Stroke. – 1983, №14. – P.977–982.
355. Yang, C. Vascular and Cellular Pathophysiology of Stroke Neuroinflammatory mechanisms of blood-brain barrier damage in ischemic stroke [Text] / C. Yang, K.E. Hawkins, S. Dore [et al.] // Am. J. Physiol. Cell. Physiol. – 2019. – V.316, №2. – P.135–153.

356. Yang, C.P. Differential transport properties of two mdr gene products are distinguished by progesterone [Text] / C.P. Yang, D. Cohen, L.M. Greenberger [et al.] // *J. Biol. Chem.* – 1990. – V.265, №18. – P.10282–10288.
357. Yang, X. Regulation of P-glycoprotein by Bajijiasu in vitro and in vivo by activating the Nrf2-mediated signalling pathway [Text] / X. Yang, G. Hu, L. Lv [et al.] // *Pharm. Biol.* – 2019. – V.57, №1. – P.184–192.
358. Yano, K. Advances in Studies of P-Glycoprotein and Its Expression Regulators [Text] / K. Yano, T. Tomono, T. Ogihara // *Biol. Pharm. Bull.* – 2018. – V.41, №1. – P.11–19.
359. Yano, K. Role of P-glycoprotein in regulating cilnidipine distribution to intact and ischemic brain [Text] / K. Yano, S. Takimoto, T. Motegi [et al.] // *Drug Metab. Pharmacokinet.* – 2014. – V.29, №3. – P.254–258.
360. Yasar, S. Effect of Omeprazole on the Pharmacokinetics of Rosuvastatin in Healthy Male Volunteers [Text] / S. Yasar, I. Zafar, A. Lateef [et al.] // *Am. J. Therapeutics.* – 2016. – V.23, №6. – P.1514–1523.
361. Ye, X.-L. Oral administration of ampelopsin protects against acute brain injury in rats following focal cerebral ischemia [Text] / X.-L. Ye, L.-Q. Lu, W. Li [et al.] // *Exp. Ther. Med.* – 2017. – V.13, №5. – P.1725–1734.
362. Yoshiba, S. Hypoxia induces resistance to 5-fluorouracil in oral cancer cells via G(1) phase cell cycle arrest [Text] / S. Yoshiba, D. Ito, T. Nagumo [et al.] // *Oral Oncol.* – 2009. – V.45, №2. – P.109–115.
363. Youdim, K.A. Flavonoid permeability across an in situ model of the blood-brain barrier [Text] / K.A. Youdim, M.Z. Qaiser, D.J. Begley [et al.] // *Free Radic Biol Med.* – 2004. – V.36, №5. – P.592–604.
364. Yu, N. Effects of Brain IKK β Gene Silencing by Small Interfering RNA on P-Glycoprotein Expression and Brain Damage in the Rat Kainic Acid-Induced Seizure Model [Text] / N. Yu, H. Liu, Y. Zhang [et al.] // *CNS Neurol. Disord. Drug Targets.* – 2014. – V.13, №4. – P.661–672.

365. Zeiadeh, I. Strategies for Enhancing the Permeation of CNS-Active Drugs through the Blood-Brain Barrier: A Review [Text] / I. Zeiadeh, A. Najjar, R. Karaman. // *Molecules*. – 2018. – V.23, №6. – 1289.
366. Zhang, J. Hyperammonemia enhances the function and expression of P-glycoprotein and Mrp2 at the blood-brain barrier through NF- κ B [Text] / J. Zhang, M. Zhang, B. Sun [et al.] // *J. Neurochem.* – 2014. – V.131, №6. – P.791–802.
367. Zhang, L. P-glycoprotein restricted transport of nimodipine across blood-brain barrier [Text] / L. Zhang, X. Liu, L. Xie [et al.] // *Acta Pharmacol. Sin.* – 2003. – V.24, №9. – P.903–906.
368. Zhang, T. Neuroprotective and axonal outgrowth-promoting effects of tetramethylpyrazine nitron in chronic cerebral hypoperfusion rats and primary hippocampal neurons exposed to hypoxia [Text] / T. Zhang, J. Gu, L. Wu [et al.] // *Neuropharmacology*. – 2017. – V.118, №15. – P.137–147.
369. Zhang, W. Cell-cycle-dependent turnover of P-glycoprotein in multidrug-resistant cells [Text] / W. Zhang, V. Ling // *J. Cell Physiol.* – 2000. – V.184, №1. – P.17–26.
370. Zhao, R. Fexofenadine Brain Exposure and the Influence of Blood-Brain Barrier P-Glycoprotein After Fexofenadine and Terfenadine Administration [Text] / R. Zhao, J.C. Kalvass, S.B. Yanni [et al.] // *Drug Metab. Dispos.* – 2009. – V.37, №3. – P.529–535.
371. Zhenyu, D. Expression and significance of hypoxia-inducible factor-1 alpha and MDR1/P-glycoprotein in human colon carcinoma tissue and cells [Text] / D. Zhenyu, L. Yang, X. Xie [et al.] // *J. Cancer Res. Clin. Oncol.* – 2010. – V.136, №11. – P.1697–1707.
372. Zhong-Ping, M. Expression and significance of glucose transporter-1, P-glycoprotein, multidrug resistance-associated protein and glutathione S-transferase- π in laryngeal carcinoma [Text] / M. Zhong-Ping, Z. Li-jun, Z. Shui-hong [et al.] // *Oncol. Lett.* – 2015. – V.9, №2. – P.806–810.

373. Zhou, H.L. Intercellular transfer of P-glycoprotein from the drug-resistant human bladder cancer cell line BIU-87 does not require cell-to-cell contact [Text] / H.L. Zhou, X. Yang, F. Zhang [et al.] // *J. Urol.* – 2013. – V.190, №3. – P.1069–1075.

374. Zhou, Q. ABCB1 gene polymorphisms, ABCB1 haplotypes and ABCG2 c.421c > A are determinants of inter-subject variability in rosuvastatin pharmacokinetics [Text] / Q. Zhou, Z.R. Ruan, H. Yuan [et al.] // *Pharmazie.* – 2013. – V.68, №2. – P.129–134.

375. Zhou, Y. Ginsenoside Rg1 provides neuroprotection against blood brain barrier disruption and neurological injury in a rat model of cerebral ischemia/reperfusion through downregulation of aquaporin 4 expression [Text] / Y. Zhou, H.Q. Li, L. Lu [et al.] // *Phytomedicine.* – 2014. – V.21, №7. – P.998–1003.

БЛАГОДАРНОСТИ

Автор выражает глубокую благодарность:

Научному консультанту – заведующей кафедрой фармакологии с курсом фармации ФДПО ФГБОУ ВО РязГМУ Минздрава России, д.м.н., профессору Якушевой Елене Николаевне за помощь и поддержку на всех этапах выполнения диссертационной работы;

заведующему ЦНИЛ ФГБОУ ВО РязГМУ Минздрава России, к.б.н., доценту Никифорову Александру Алексеевичу за помощь в выполнении иммуногистохимического исследования;

ФГБНУ «НИИ Фармакологии им. В.В. Закусова» за предоставленные субстанции омберацетама и фабомотизола.

ООО «НПК «Фармасофт» за предоставленную субстанцию этилметилгидроксипиридина сукцината.