

ВЛИЯНИЕ КОМБИНИРОВАННОГО ОРАЛЬНОГО КОНТРАЦЕПТИВА НА АКТИВНОСТЬ И ЭКСПРЕССИЮ ГЛИКОПРОТЕИНА-Р

Е.Н. Якушева, докт. мед. наук, **А.А. Котлярова**, **А.В. Щулькин**, канд. мед. наук,
И.Ю. Виноградов, канд. мед. наук, **Н.М. Попова**, канд. мед. наук

Рязанский государственный медицинский университет им. акад. И.П. Павлова;

Рязань, ул. Высоковольная, 9

E-mail: p34-66@yandex.ru.

В исследовании на кроликах изучено влияние комбинированного орального контрацептива на функциональную активность эфлюксного полиспецифического белка-транспортера гликопротеина-Р, определяемую по фармакокинетике маркерного субстрата фексофенадина, и его экспрессию в печени и тонком кишечнике. Установлено, что введение препарата в течение 21 дня приводит к ингибированию функциональной активности Pgp на организменном уровне и снижению экспрессии белка-транспортера в печени. Выявлены корреляционные зависимости между активностью гликопротеина-Р, его экспрессией в гепатоцитах и уровнем эстрадиола на фоне применения препарата.

Ключевые слова: гликопротеин-Р, ABCB1 белок, функциональная активность, экспрессия, линдинет, этинилэстрадиол, гестоден, фексофенадин.

Гликопротеин-Р (Pgp) – АТФ-зависимый белок-транспортер (ABCB1), который экскретирует из клетки широкий спектр липофильных лекарственных веществ и поэтому играет важную роль в их фармакокинетике [6]. Лекарственные средства способны модулировать функциональную активность Pgp, что влияет на эффективность и безопасность фармакотерапии. Учитывая практическую значимость межлекарственных взаимодействий, такие организации США, как U.S. Department of Health and Human Services, Food and Drug Administration, Center for Drug Evaluation and Research рекомендуют тестировать новые лекарственные препараты на принадлежность к субстратам и ингибиторам Pgp [5].

В настоящее время не менее 200 млн женщин в мире используют комбинированные оральные контрацептивы [2]. Одним из наиболее часто применяемых в гинекологической практике препаратов является микродозированный контрацептив, содержащий 0,03 мг этинилэстрадиола и 0,075 мг гестодена. Однако его влияние на функциональную активность Pgp не изучено, что и стало целью настоящего исследования.

Экспериментальная часть

Работа выполнена на 20 половозрелых кроликах-самках породы Шиншилла, массой 4500 ± 200 г, находящихся в состоянии диэструса. Эксперименты осуществляли в соответствии с правилами лабораторной практики (прил. к приказу Минздравсоцразвития РФ № 708н от 23.08. 2010).

В соответствии с задачами эксперимента кролики были разделены на 2 группы. На животных 1-й группы ($n=10$) проводилось изучение влияния контрацептива на функциональную активность Pgp на уровне целостного организма; 2-й группы ($n=10$) – изучение влияния контрацептива на экспрессию Pgp в печени и тонком кишечнике.

Животным 1-й группы вводили контрацептив в дозе 6,5 мкг/кг массы этинилэстрадиола и 16,5 мкг/кг массы гестодена в течение 21 дня. За сутки до начала эксперимента и через 21 день после введения препарата определяли функциональную активность Pgp по анализу фармакокинетики его маркерного субстрата фексофенадина после однократного перорального введения в дозе 67,5 мг/кг массы [1]. В те же сроки у животных исследовали уровни эстрадиола, прогестерона и тестостерона в сыворотке крови радиоиммунным методом. Количественное определение фексофенадина в плазме крови проводили методом ВЭЖХ на хроматографе Stayer [1]. С помощью программы «Kinetic 5.0» модельно-независимым методом рассчитывали фармакокинетические параметры фексофенадина.

Кролики 2-й группы были разделены на 2 серии. 1-я серия ($n=5$) – интактные животные, 2-я серия ($n=5$) – кролики, получавшие препарат. На 21-е сутки после введения контрацептива животных выводили из эксперимента методом воздушной эмболии. Иммуногистохимическим методом определяли экспрессию Pgp в печени и тонком кишечнике, которую оценивали полуколичественно по выраженности окраски мембраны исследуемых клеток в «+» (+ –

слабая экспрессия, ++ – умеренная экспрессия, +++ – выраженная экспрессия). В печени дополнительно вычисляли процент мембраны гепатоцита, экспрессирующей Pgr, от общей поверхности мембраны и суммарную экспрессию Pgr в печени, рассчитанную как площадь поверхности мембраны гепатоцита, экспрессирующей Pgr, умноженную на интенсивность окраски мембраны [3]. Выбор тканей для оценки экспрессии Pgr обусловлен фармакокинетикой фексофенадина.

Полученные результаты обрабатывали с помощью программы «Stat Soft Statistica 7.0». Тип распределения данных оценивали по критерию Шапиро–Уилка. Наличие достоверных различий при нормальном распределении данных определяли по критерию Стьюдента повторных измерений, при распределении данных, отличном от нормального, – по критериям Вилкоксона и Манна–Уитни. Полученные результаты представлены в виде среднего арифметического и среднего квадратичного отклонения ($M \pm SD$) при нормальном распределении данных; медианы нижнего и верхнего квартилей (Med, Iq, uq) при распределении данных, отличном от нормального.

Введение кроликам контрацептива курсом 21 день приводило к достоверному ($p < 0,05$) повышению C_{\max} фексофенадина на 60,0%, AUC_{0-24} – на 104,5%, $AUC_{0-\infty}$ – на 158,2%, снижению CI – на 58,7% и Vd на – 46,4% по сравнению с исходными данными (табл. 1).

При оценке гормонального статуса кроликов выявлено, что на 21-й день эксперимента содержание эстрадиола в сыворотке крови достоверно ($p < 0,05$) уменьшалось на 30,1%, тестостерона – на 43,1% по сравнению с показателями интактных животных (см. табл. 1).

После введения кроликам препарата отмечалось достоверное ($p < 0,05$) снижение площади поверхности мембран гепатоцитов, экспрессирующих Pgr, на 20,8%; суммарной экспрессии

Pgr в печени на 31,6% и суммарной экспрессии Pgr в печени и тонком кишечнике на 12,2% (табл. 2).

При изучении корреляции между фармакокинетическими параметрами фексофенадина, экспрессией Pgr в печени и тонком кишечнике и гормональным статусом кроликов были получены прямопропорциональная и обратнопропорциональная зависимости (см. рисунок).

Таблица 1

**ФАРМАКОКИНЕТИЧЕСКИЕ ПАРАМЕТРЫ
ФЕКСОФЕНАДИНА И ГОРМОНАЛЬНЫЙ СТАТУС КРОЛИКОВ
ПРИ ВВЕДЕНИИ КОНТРАЦЕПТИВА (n=10)**

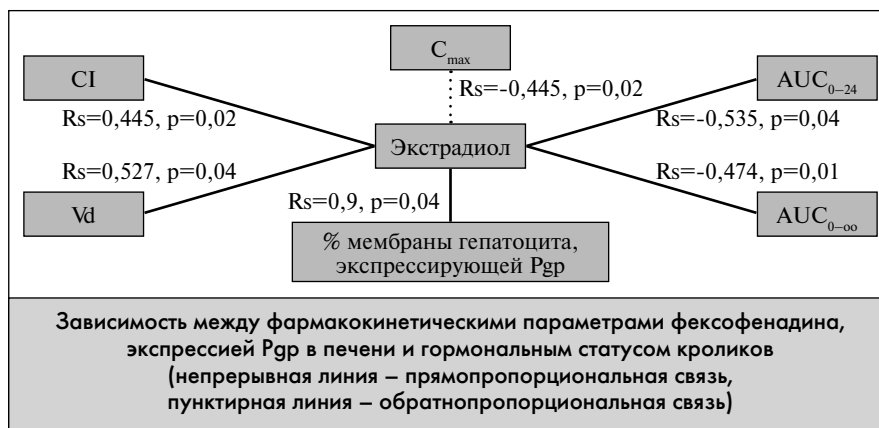
Изучаемые параметры	Исходные значения	Контрацептив 21 день
C_{\max} , нг/мл	300,2±166,8	480,4±157,5*
AUC_{0-24} , нг*ч/мл	2655,2±1367,3	5440,2±2132,5*
$AUC_{0-\infty}$, нг*ч/мл	3398,2 (2250,7; 4327,9)	8774,3 (7404,7; 9062,1)*
CI, л/ч	79,5 (61,0; 139,1)	32,8 (27,2; 38,9)*
Vd, л	1443,3 (1042,5; 2021,7)	773,1 (648,1; 935,9)*
Эстрадиол, пг/мл	416,3±127,5	290,8±122,2*
Прогестерон, нг/мл	1,83±0,796	1,73±0,73
Тестостерон, нмоль/л	0,295±0,188	0,168±0,094*

Примечание. Здесь и в табл. 2: * – $p < 0,05$ – достоверные различия с данными у интактных животных.

Таблица 2

**ЭКСПРЕССИЯ ГЛИКОПРОТЕИНА-Р В ПЕЧЕНИ И ТОНКОМ КИШЕЧНИКЕ
КРОЛИКОВ ПРИ ВВЕДЕНИИ КОНТРАЦЕПТИВА (n=10)**

Изучаемые параметры	Исходные значения	Контрацептив 21 день
Интенсивность окраски мембраны гепатоцитов в «+»	2,0 (1,6; 2,0)	1,7 (1,6; 1,8)
% мембраны гепатоцитов, экспрессирующей гликопротеин-Р	39,0 (37,8; 40,4)	30,9 (29,4; 32,2)*
Суммарная экспрессия в печени	0,76 (0,69; 0,81)	0,52 (0,50; 0,56)*
Интенсивность окраски мембраны эритроцитов в «+»	2,0 (2,0; 2,5)	1,8 (1,6; 2,0)
Суммарная интенсивность окраски мембраны гепатоцитов и эритроцитов в «+»	4,1 (4,0; 4,3)	3,6 (3,2; 3,7)*



После введения контрацептива в течение 21 дня получены данные об увеличении C_{\max} , AUC_{0-24} , $AUC_{0-\infty}$ и уменьшении Cl , Vd фексофенадина, что указывает на повышение содержания в плазме крови и снижение выведения маркерного субстрата из организма. Фексофенадин не подвергается метаболизму и его фармакокинетика зависит исключительно от функционирования Pgp, который препятствует его всасыванию в кишечнике и способствует выведению с желчью (90%) и мочой (10%) [4]. Таким образом, изменение фармакокинетических параметров фексофенадина на фоне курсового введения контрацептива приводило к снижению функциональной активности белка-транспортера на уровне целостного организма. Уменьшение суммарной экспрессии Pgp в печени и суммарной экспрессии транспортера в печени и тонком кишечнике свидетельствует о том, что снижение функциональной активности Pgp происходит за счет уменьшения его синтеза.

Изменение функциональной активности и экспрессии Pgp при введении контрацептива может быть связано как с прямым влиянием компонентов препарата, так и с изменением гормонального фона животных. Согласно данным литературы, эстрон — в 4 раза, эстриол — в 2 раза, этинилэстрадиол — в 3 раза по сравнению с контролем повышают активность Pgp и уровень mRNA гена MDR1 в клетках карциномы ободочной кишки человека, а прогестерон дозозависимо ингибирует белок-транспортер [7]. Информации о влиянии гестодена на функционирование Pgp в доступной литературе обнаружено не было.

Полученные корреляционные зависимости показали, что угнетение экспрессии и функциональной активности Pgp при введении контрацептива вероятнее всего связано со снижением уровня эстрадиола в плазме крови кроликов, однако, не исключено прямое ингибирующее влияние гестодена на Pgp.

Выводы

Внутрижелудочное введение кроликам комбинированного орального контрацептива в дозе 6,5 мкг/кг массы этинилэстрадиола и 16,5 мкг/кг массы гестодена в течение 21 дня вызывает ингибирование функциональной активности гликопротеина-P, определяемой по фармакокинетике маркерного субстрата фексофенадина, и уменьшение его суммарной экспрессии в печени и тонком кишечнике.

На фоне введения кроликам контрацептива в дозе 6,5 мкг/кг массы этинилэстрадиола и 16,5 мкг/кг массы гестодена в течение 21 дня выявлены корреляционные зависимости между уровнем эстрадиола в плазме крови, функциональной активностью гликопротеина-P на уровне целостного организма и экспрессией белка-транспортера в печени.

ЛИТЕРАТУРА/REFERENCES

1. Якушева Е.Н., Черных И.В. Влияние финастерид на функциональную активность гликопротеина-P в эксперименте. Рос. медико-биол. вестн. им. акад. И.П. Павлова, 2012; 4: 46–50. (Yakusheva E.N., Chernykh I.V. The influence of finasteride on the functional activity of P-glycoprotein. Rossiyskiy mediko-biologicheskiy vestnik imeni akademika I.P. Pavlova, 2012; 4: 46–50 (in Russian)).
2. Якушевская О.В., Ревасова З.В. Эффективная контрацепция в современных условиях. РМЖ, 2013; 23: 1122–1126. (Yakushevskaya O.V., Z.V. Revasova. Effective contraception in modern conditions. RMJ, 2013; 23: 1122–1126 (in Russian)).
3. Malhotra R. et al. Quantitative Immunohistochemical Analysis Reveals Association between Sodium Iodide Symporter and Estrogen Receptor Expression in Breast Cancer. PLoS ONE, 2013; 8. 1: 1–9.
4. Molimard M. et al. Comparison of pharmacokinetics and metabolism of desloratadine, fexofenadine, levocetirizine and mizolastine in humans. Fund. & Clin. Pharmacol. 2004; 18. 4: 399–411.
5. U.S. Food and Drug Administration, Center for Drug Evaluation and Research. Guidance for industry: drug interaction studies study design, data analysis, implications for dosing, and labeling recommendations. – URL: <http://www.fda.gov/downloads/Drugs/Guidance/ComplianceRegulatoryInformation/Guidances/ucm292362.pdf>.
6. Wessler D.J. et al. The P-Glycoprotein Transport System and Cardiovascular Drugs. JACC, 2013; 61 (25): 2495–2502.
7. Winnie Y., Kim L., Leslie Z. P-glycoprotein (P-gp/MDR1)-Mediated Efflux of Sex-Steroid Hormones and Modulation of P-gp Expression In Vitro. Pharmac. Res., 2004; 21: 1284–1293.

Поступила 25 июня 2014 г.

EFFECT OF A COMBINED ORAL CONTRACEPTIVE ON THE ACTIVITY AND EXPRESSION OF P-GLYCOPROTEIN

E.N. Yakusheva, MD; A.A. Kotlyarova; A.V. Shchulkin, PhD; I.Yu. Vinogradov, PhD; N.M. Popova, PhD
Acad. I.P. Pavlov Ryazan State Medical University; 9, Vysokovoltnaya St., Ryazan

SUMMARY

The effect of a combined oral contraceptive containing ethinylestradiol and gestodene on the functional activity of the efflux poly-specific transporter protein P-glycoprotein and its expression in the liver and small intestine was investigated in Chinchilla rabbits. The activity of the transporter protein was assessed from the pharmacokinetics of its marker substrate fexofenadine after its single intragastric administration. The expression of P-glycoprotein was determined immunohistochemically and estimated semiquantitatively. Radioimmunoassay was used to measure the serum levels of estradiol, progesterone, and testosterone in the rabbits. The 21-day administration of the agent was found to inhibit P-glycoprotein functional activity at the whole-organism level. Correlations were found between the activity of P-glycoprotein, its expression in hepatocytes, and the serum level of estradiol after administration of the agent.

Key words: P-glycoprotein, ABCB1 protein, functional activity, expression, lindinet, ethinylestradiol, gestodene, fexofenadine.