

© Коллектив авторов, 2013
УДК 615.256.3.015.4

ВЛИЯНИЕ ОРАЛЬНОГО ГОРМОНАЛЬНОГО КОНТРАЦЕПТИВА «ЖАНИН» НА ФУНКЦИОНАЛЬНУЮ АКТИВНОСТЬ ГЛИКОПРОТЕИНА-P

Е.Н. Якушева, А.А. Котлярова, А.А. Никифоров

Рязанский государственный медицинский университет им. акад. И.П. Павлова, г. Рязань

В исследовании на кроликах изучено влияние комбинированного орального контрацептива «Жанин» на функциональную активность эффлюксного белка-транспортера гликопротеина-P (Pgp). Активность Pgp оценивали методом анализа фармакокинетики маркерного субстрата фексофенадина. Установлено, что введение препарата «Жанин» в течение 14 и 21 дня приводит к ингибированию функциональной активности Pgp.

Ключевые слова: гликопротеин-P, этинилэстрадиол, диеногест, фексофенадин, фармакокинетика.

По данным Всемирной организации здравоохранения прием оральных гормональных контрацептивов считается одной из самых распространенных форм контрацепции [14]. По различным оценкам в России их применяют от 8 до 13% женщин [1,8]. Наиболее часто назначаются оральные контрацептивы, в состав которых входят различные комбинации эстрогенов и гестагенов. Эстрогенным компонентом комбинированных оральных контрацептивов чаще всего является этинилэстрадиол. А гестагенный компонент представлен различными синтетическими гестагенами, самыми распространенными из которых являются линэстренол, левоноргестрел, гестоден, ципротерона ацетат, диеногест, дроспиренон [9].

По результатам анализа региональных, национальных и глобальных показателей в большинстве развитых стран в ближайшие годы можно прогнозировать рост приверженности к гормональной контрацепции [17]. Поскольку контрацептивы назначаются длительными курсами, велика вероятность того, что в период их приема может возникнуть необходимость фармакотерапии других заболеваний [6]. Это, несомненно, влечет за собой риск возникновения межлекарственных взаимодей-

ствий и может быть одной из причин изменения эффективности проводимой терапии при совместном назначении лекарственных средств и проявления нежелательных лекарственных реакций. Основным направлением в решении данной проблемы является оценка возможных фармакокинетических взаимодействий, для чего необходимо учитывать функциональное состояние системы биотрансформации и транспортеров лекарственных средств [4].

Одним из основных транспортеров ксенобиотиков и ряда биобиотиков является гликопротеин-P (Pgp), который представляет собой эффлюксный АТФ-зависимый белок-транспортер, участвующий в переносе субстратов из клетки, а также препятствующий их всасыванию [19]. Pgp локализован на мембране энтероцитов, в гепатоцитах, эпителиоцитах почечных канальцев и коры надпочечников, эндотелиоцитах гистогематических барьеров. Известно, что многие гормональные вещества, например половые стероиды, глюкокортикоиды, тиреоидные гормоны способны модулировать функциональную активность и экспрессию Pgp [5, 12, 16]. Однако влияние комбинированных оральных контрацептивов на белок-транспортер изучено недостаточно.

Целью настоящего исследования является изучение влияния монофазного комбинированного орального контрацептива «Жанин» на функциональную активность P_{gr} в эксперименте.

Материалы и методы

Работа выполнена на 10 половозрелых кроликах-самках породы шиншилла, массой 4500±200 г., находящихся в состоянии течки. Драже «Жанин» (0,03 мг этинилэстрадиола и 2,0 мг диеногеста; производитель: «BAYER SCHERING PHARMA AG», Германия) вводили животным per os в дозах 6,5 мкг/кг массы этинилэстрадиола и 450 мкг/кг массы диеногеста 1 раз в сутки в 12 часов дня. За сутки до начала эксперимента, через 14 и 21 день введения препарата у кроликов определяли функциональную активность P_{gr} по фармакокинетике его маркерного субстрата – фексофенадина. Фексофенадин («Телфаст» 180 мг; производитель: Aventis Pharma, Италия) вводили животным перорально с помощью металлического зонда в дозе 67,5 мг/кг массы [3, 10]. Через 1, 2, 3, 4, 5, 6, 8, 12 и 24 часа от момента введения препарата из ушной вены кроликов забирали кровь в объеме 5 мл. Для получения плазмы пробы центрифугировали при 3000 об/мин в течение 10 минут и хранили до анализа при температуре -29⁰С. Содержание фексофенадина в плазме крови определяли методом ВЭЖХ на хроматографе «Стайер» с ультрафиолетовым детектором и колонке «Beckman Coulter» 4,6*250 мм, зернением 5 мкм. Экстракцию и хроматографирование маркерного субстрата осуществляли по методу Раменской Г.В. с соавт. [7] в модификации Черных И.В. [11]. Анализ выполняли при длине волны 220 нм и скорости подвижной фазы 1 мл/мин.

Количественное определение фексофенадина выполняли по методу абсолютной калибровки по высоте пиков с использованием стандарта фексофенадина (Strasbourg cedex). Примененный метод хроматографического анализа обладал следующими характеристиками: время удерживания – 13,1 мин; предел обнаружения фексофенадина в плазме крови 50 нг/мл.

Расчет концентрации фексофенадина осуществляли с помощью программы «Мультихром». Фармакокинетические параметры - максимальную концентрацию (C_{max}, нг/мл), время достижения максимальной концентрации (T_{max}, ч), период полувыведения (T_{1/2}, ч), площадь под фармакокинетической кривой концентрация-время (AUC_{0-t}, нг*ч/мл; AUC_{0-∞}, нг*ч/мл), среднее время удерживания (MRT₂₄, ч; MRT, ч), константу элиминации (K_{el}, 1/ч), общий клиренс (Cl, л/ч) объем распределения (Vd, л) рассчитывали модельно-независимым методом с использованием программы Kinetica 5.0. Коэффициент абсорбции (C_{max}/AUC_{0-∞}) рассчитывали с помощью офисного пакета «Microsoft Excel 2010».

Уровень половых гормонов определяли радиоиммунным методом в ЦНИЛ ГБОУ ВПО РязГМУ Минздрава России.

Статистическая обработка полученных данных осуществлялась с использованием программы Statistica 8.0. Характер распределения данных определяли по критерию Шапиро-Уилка. Наличие статистически достоверных межгрупповых различий определяли по критерию Ньюмена-Кейлса после проведения дисперсионного анализа повторных измерений (тест ANOVA – для показателей, имеющих нормальное распределение, критерий Фридмана – для показателей, распределение которых отличалось от нормального).

Полученные данные представлены в виде среднего арифметического значения и стандартной ошибки средней арифметической в случае нормального распределения признака или в виде медианы, верхнего и нижнего квартиля – при распределении данных отличным от нормального.

Результаты и их обсуждение

Пероральное введение кроликам-самкам препарата «Жанин» в дозе этинилэстрадиола 6,5 мкг/кг и диеногеста 450 мкг/кг массы курсом 14 и 21 день приводило к статистически значимому изменению фармакокинетических параметров маркерного субстрата P_{gr} – фексофенадина. Полученные результаты представлены в таблице 1.

Таблица 1

Основные фармакокинетические параметры фексофенадина при введении препарата «Жанин» ($M \pm m$ – при нормальном распределении данных; медиана, нижний и верхний квартиль – при распределении данных отличном от нормального)

Исследуемые параметры	Исходные значения n=10	«Жанин» 14 дней n=10	«Жанин» 21 день n=10
C_{max} , нг/мл	248,31 (155,4; 512,4)	901,3* (459,1; 1143,53)	805,83* (601,81; 1343,79)
T_{max} , ч	4 (3;5)	4 (3;4)	4 (4;4)
$T_{1/2}$, ч	9,45 (4,04; 15,78)	13,04** (10,32;17,04)	23,90* (18,72; 41,18)
AUC_{0-24} , нг*ч/мл	1524,50 (930,41; 3519,59)	10 632,01* (5715,71; 12335,50)	9166,87* (6775,80; 16354,20)
$AUC_{0-\infty}$, нг*ч/мл	2353,15 (933,73; 5049,7)	17713,10* (9330,24; 21470,5)	23593,26* (18051,90;33272,50)
C_{max} / AUC_{0-24}	0,15 (0,1; 0,21)	0,087* (0,07; 0,1)	0,083* (0,07; 0,1)
$C_{max} / AUC_{0-\infty}$	0,101 (0,076; 0,205)	0,072** (0,047; 0,084)	0,039* (0,032; 0,046)
MRT_{24} , ч	8,47±0,965	10,55±0,292*	11,02±0,176*
MRT , ч	16,05 (7,17; 22,16)	20,90** (16,31; 26,47)	36,16* (26,49; 57,84)
Cl , л/ч	141,99 (48,72; 288,73)	13,56* (12,29; 24,89)	10,91* (7,08;14,46)
Vd , л	1948,6±342,26	440,24±71,92**	444,42±59,51*
K_{el} , 1/ч	0,09 (0,06; 0,3)	0,05** (0,04; 0,07)	0,03* (0,02; 0,04)
Эстрадиол пг/мл	374,33 (322,84; 407,07)	272,06 (248,23; 327,99)	245,29 (223,4; 357,17)
Тестостерон нмоль/л	0,175 (0,1; 0,21)	0,21 (0,14; 0,24)	0,17 (0,14; 0,21)
Прогестерон нг/мл	2,685±0,179	2,276±0,185**	1,682±0,134*

Примечание:

* - $p < 0,05$ - достоверные различия со значениями у интактных животных (исходные значения);

** - $p < 0,05$ - достоверные различия со значениями на 21 день введения препарата.

Введение кроликам комбинированного орального контрацептива «Жанин» в течение 14 дней приводило к достоверному ($p < 0,05$) повышению C_{max} фексофенадина на 263%, AUC_{0-24} на 597,4%, $AUC_{0-\infty}$ на 652,7%, MRT_{24} на 24,6%, снижению Cl на 90,5% и $C_{max}/AUC_{0-\infty}$ на 40 % по сравнению с исходными показателями.

Применение контрацептивного препарата в течение 21 дня сопровождалось достоверным ($p < 0,05$) изменением ряда изучаемых фармакокинетических показателей фексофенадина: наблюдалось повышение C_{max} фексофенадина на 224,5%, $T_{1/2}$ на 152%, AUC_{0-24} на 501,3%, $AUC_{0-\infty}$ на 902,6%,

MRT_{24} на 30,1%, MRT на 125,3%, снижение Cl на 92,3%, Vd на 77,2%, K_{el} на 66,7% и C_{max} / AUC_{0-t} на 46,7% в сравнении данными интактных животных.

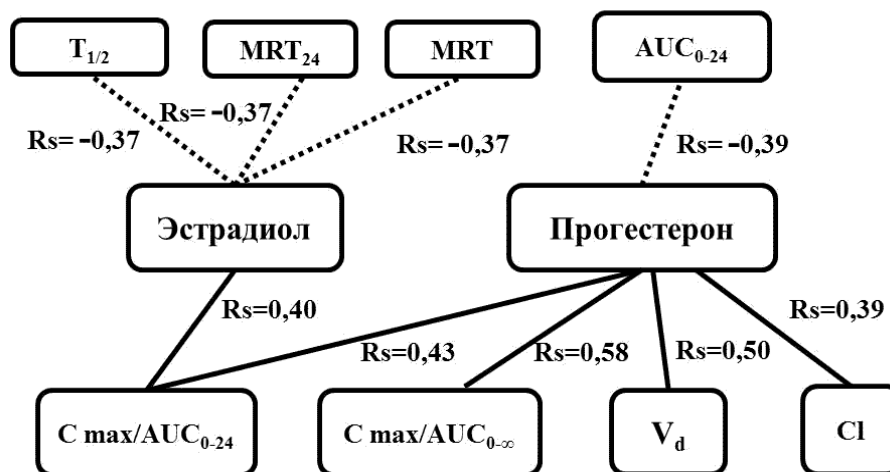
После введения препарата «Жанин» курсом 21 день наблюдалось достоверное ($p < 0,05$) увеличение $T_{1/2}$ на 76,7%, MRT на 73% и снижение K_{el} на 40% по сравнению с фармакокинетическими параметрами фексофенадина полученными на 14 день введения контрацептива.

На фоне введения орального гормонального контрацептива «Жанин» изучалась динамика уровня половых гормонов кроликов: эстрадиола, прогестерона и те-

тестостерона (табл. 1). Результаты исследования свидетельствуют о достоверном ($p < 0,05$) снижении концентрации прогестерона на 21 день введения препарата на 37,4% от исходных значений. В отношении эстрадиола выявлена тенденция к снижению концентрации, которая, однако, не имела достоверного характера и составляла 34,5% на 21 день введения препарата. Уровень тестостерона в ходе исследования практически не изменялся.

На рис. 1 представлена оценка корреляционных зависимостей изучаемых фармакокинетических параметров от показателей гормонального статуса кроликов. Выявлена обратно пропорциональная

связь ($p < 0,05$) между уровнем эстрадиола и $T_{1/2}$ ($R_s = -0,37$), MRT_{24} ($R_s = -0,37$), MRT ($R_s = -0,37$) и концентрацией прогестерона и AUC_{0-24} ($R_s = -0,39$), а также прямо пропорциональная связь между уровнем эстрадиола и C_{max}/AUC_{0-24} ($R_s = 0,40$), прогестерона и C_{max}/AUC_{0-24} ($R_s = 0,43$), $C_{max}/AUC_{0-\infty}$ ($R_s = 0,58$), Cl ($R_s = 0,39$) и V_d ($R_s = 0,50$). Таким образом, полученная корреляционная зависимость свидетельствует о том, что при снижении концентрации половых гормонов - прогестерона и эстрадиола в организме животных, снижается выведение фексофеналина, а следовательно и функциональная активность P_{gr} .



Примечание: Непрерывной линией показана прямо пропорциональная связь, пунктирной линией – обратно пропорциональная связь.

Рис. 1. Зависимость изучаемых фармакокинетических параметров фексофенадина от гормонального статуса кроликов при введении препарата «Жанин» (коэффициент корреляции Спирмена - R_s)

В проведенном исследовании изучено влияние орального контрацептива «Жанин» на функциональную активность P_{gr} . Достоверное повышение значений C_{max} , AUC_{0-24} , $AUC_{0-\infty}$, $T_{1/2}$, MRT , MRT_{24} , а также снижение значений Cl , K_{el} и V_d фексофенадина могут служить доказательством ингибирующего влияния комбинации этинилэстрадиола и диеногеста на функциональную активность P_{gr} в печени и почках

- органах, ответственных за выведение фексофенадина. Достоверное снижение C_{max}/AUC_{0-t} до и после введения препарата «Жанин» позволяет предположить отсутствие ингибирующего влияния комбинации этинилэстрадиола и диеногеста на активность P_{gr} в слизистой оболочке кишечника, что подтверждает тканеспецифичность влияния ряда лекарственных средств на белок-транспортёр [13].

Введение препарата «Жанин» на протяжении 21 дня привело к увеличению $T_{1/2}$, MRT и снижению K_{el} фексофенадина по сравнению с соответствующими фармакокинетическими параметрами при 14-дневном применении контрацептива. Этот факт может свидетельствовать о более выраженном ингибировании активности Pgp при использовании комбинации этинилэстрадиола и диеногеста более длительным курсом.

По современным представлениям этинилэстрадиол является субстратом Pgp, но не изменяет его активность [15]. В других исследованиях было выявлено, что в печеночном поглощении этинилэстрадиола участвуют три транспортера (OATP1B1, OATP2B1 и NTCP), а его экскрецию в желчь осуществляет, вероятно, транспортер BCRP, а не Pgp [20]. В изученной нами литературе не было обнаружено информации о характере влияния диеногеста на функциональную активность белка-транспортера. Известно, что диеногест является синтетическим прогестином, обладающим структурным сходством с тестостероном и прогестероном. По химическому строению он является 19-норгестагеном, но вместо этинильной группы в положении 17 α находится цианометильная группа [2], содержащая третичный атом азота, наличие которого в молекуле характерно для структуры ингибиторов Pgp [18]. Таким образом, можно предположить, что ингибирующее влияние препарата «Жанин» на функциональную активность Pgp связано, видимо, с наличием в его составе диеногеста.

Выводы

Внутрижелудочное введение кроликам комбинированного орального контрацептива «Жанин» в дозах 6,5 мкг/кг массы этинилэстрадиола и 450 мкг/кг массы диеногеста в течение 14 и 21 дней вызывает ингибирование функциональной активности белка-транспортера гликопротеина-P печени и почек, установленное по фармакокинетике его маркерного субстрата – фексофенадина, что подтверждается достоверным повышением C_{max} , AUC_{0-24} ,

$AUC_{0-\infty}$, $T_{1/2}$, MRT_{24} и MRT и снижением Cl, Vd и K_{el} .

Литература

1. Алесина И.Л. Современные тенденции гормональной контрацепции / И.Л. Алесина // Фарматека. – 2011. – №13. – С.18-23.
2. Захаренко Н.Ф. Эндометриоз: поиск фарматерапевтического компромисса / Н.Ф. Захаренко, Н.В. Косей, Л.М. Коломиец // Репродуктивная эндокринология. – 2012. – Т. 2, №4. – С. 52-56.
3. Колхир С.В. Клиническое значение изучения активности транспортера лекарственных средств гликопротеина-P для оптимизации фармакотерапии: автореф. дис. канд. мед. наук : 14.00.25 / С.В. Колхир; ГОУ ВПО ММА им. И.М. Сеченова. – М., 2007. – 21 с.
4. Кукес В.Г. Клинико-фармакологические подходы к повышению качества доклинических и клинических исследований новых лекарственных средств / В.Г. Кукес // Ведомости научного центра экспертизы средств медицинского применения. – 2006. – №1. – С. 7-10.
5. Метаболизм лекарственных средств. Научные основы персонализированной медицины: руководство для врачей / В.Г. Кукес [и др.]. – М.: ГЭОТАР-Медиа, 2008. – 304 с.
6. Острейкова Л.И. Возможности применения нового низкодозированного контрацептива "Жанин" / Л.И. Острейкова // Гинекология. – 2002. – Т.4, №4. – С. 166-171.
7. Раменская Г.В. Разработка методики количественного определения маркера активности P-гликопротеина фексофенадина в плазме крови / Г.В. Раменская, Е.А. Скуридина, Л.М. Красных // Хим.-фармац. журн. – 2006. – Т. 40, №12. – С. 47-50.
8. Репродуктивное здоровье населения России 2011: резюме отчета Федеральной службы государственной статистики (Росстата) Министерство здравоохранения РФ. – М., 2012. – 56 с.
9. Сергеев П.В. Фармакологические свойства гестагенов / П.В. Сергеев, Н.Л. Шимановский // Фарматека. – 2003. – № 8. – С. 33-41.

10. Скуридина Е.А. Особенности фармакокинетики фексофенадина при совместном применения с верапамилом и негрустином: автореф. дис. канд. фармац. наук: 15.00.02 / Е.А. Скуридина; ГОУ ВПО ММА им. И.М. Сеченова. – М., 2007. – 24 с.
11. Черных И.В. Разработка методики определения концентрации фексофенадина в плазме крови методом ВЭЖХ на хроматографе Stayer / И.В. Черных // Материалы межрегиональной научно-практической конференции молодых ученых «Аспирантские чтения 2012». – Рязань, 2012. – С. 96-98.
12. Якушева Е.Н. Дозозависимое влияние тироксина на функциональную активность гликопротеина-Р в эксперименте / Е.Н. Якушева, А.В. Щулькин, А.С. Бирюкова // Биомедицина. – 2012. – №2. – С. 53-60.
13. Якушева Е.Н. Влияние финастерида на функциональную активность гликопротеина-Р в эксперименте / Е.Н. Якушева, И.В. Черных // Рос. медико-биол. вестн. им. акад. И.П. Павлова. – 2012. – №4. – С. 46-50.
14. Hormonal contraception and HIV: Technical Statement. - Geneva: World Health Organization; WHO Guidelines Approved by the Guidelines Review Committee, 2012. – URL: [<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK131971/pdf/TOC.pdf>]
15. Identification of the Hepatic Efflux Transporters of Organic Anions Using Double-Transfected Madin-Darby Canine Kidney II Cells Expressing Human Organic Anion-Transporting Polypeptide 1B1 (OATP1B1) / Multidrug Resistance-Associated Protein 2, OATP1B1 / Multidrug Resistance 1, and OATP1B1/Breast Cancer Resistance Protein. / S. Matsu-shima [et al.] // J PharmacolExpTher. – 2005. – Vol. 314, № 3. – P. 1059-1067.
16. In vitro and ex vivo evidence for modulation of P-glycoprotein activity by progestins / M. Fröhlich [et al.] // Biochem Pharmacol. – 2004. – Vol. 68, № 12. – P. 2409-2416.
17. National, regional, and global rates and trends in contraceptive prevalence and unmet need for family planning between 1990 and 2015: a systematic and comprehensive analysis / L. Alkema [et al.] // The Lancet. – 2013. – Vol. 381. – P. 1642-1652.
18. Poongavanam V. Fingerprint-based in silico models for the prediction of P-glycoprotein substrates and inhibitors / V. Poongavanam, N. Haider, G.F. Ecker // Bioorg Med Chem. – 2012. – Vol. 20, №18. – P. 5388-5395.
19. Schinkel A.H. The physiological function of drug-transporting P-glycoproteins / A.H. Schinkel // Cancer Biology. – 1997. – №8. – P. 161-170.
20. Transporter Studies with the 3-O-Sulfate Conjugate of 17 – Ethinylestradiol: Assessment of Human Liver Drug Transporters / H. Yong-Hae [et al.] // Drug metabolism and disposition. – 2010. – Vol. 38, № 7. – P. 1072-1082.

ORAL HORMONAL CONTRACEPTIVE "JANINE" INFLUENCE ON P-GLYCOPROTEIN FUNCTIONAL ACTIVITY

E.N. Yakusheva, A.A. Kotlyarova, A.A. Nikiforov

In the research on rabbits influence of combined oral contraceptive, "Janine" on the functional activity of the protein efflux transporter P-glycoprotein (Pgp) was studied. Pgp activity was assessed by pharmacokinetic analysis of marker substrate fexofenadine. It was found that administration of the drug "Janine" for 14 and 21 days, resulting in inhibition of Pgp functional activity.

Keywords: *P-glycoprotein, ethinylestradiol, dienogest, fexofenadine, pharmacokinetics.*

Якушева Е.Н. – д-р мед. наук, доц., зав. кафедрой фармакологии с курсом фармации и фармакотерапии ФПДО ГБОУ ВПО РязГМУ Минздрава России.

E-mail: e.yakusheva@rzgmu.ru.