

ОРИГИНАЛЬНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

© Котлярова А.А., Якушева Е.Н., 2014
УДК 615.256.3

ИЗУЧЕНИЕ ВЛИЯНИЯ КОМБИНИРОВАННОГО ОРАЛЬНОГО
КОНТРАЦЕПТИВА «ЯРИНА» НА ФУНКЦИОНАЛЬНУЮ АКТИВНОСТЬ
ГЛИКОПРОТЕИНА-Р

А.А. Котлярова, Е.Н. Якушева

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

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

Ключевые слова: гликопротеин-Р, ABCB1 белок, этинилэстрадиол, дроспиренон, фексофенадин, фармакокинетика.

По данным многочисленных исследований нежелательные лекарственные реакции (НЛР) являются распространенным явлением в клинической практике [2, 3]. Традиционно в группу высокого риска по лекарственным взаимодействиям относятся лица пожилого и старческого возраста, нередко применяющие большое число препаратов из-за наличия различных заболеваний. В западной литературе обсуждается проблема НЛР среди лиц молодого возраста. Результаты исследования свидетельствуют о преобладании НЛР среди женщин, относительно мужчин, и эта разница особенно очевидна в возрасте от 15 до 44 лет. Отмеченное явление может быть обусловлено гендерными различиями в функционировании системы биотрансформации и транспортеров лекарственных средств. Ключевая роль в данном процессе связана с половыми гормонами [4, 15, 18]. Помимо действия естественных гормонов, особенно актуально учитывать эффекты экзогенных гормональных препаратов, например, оральных гормональных контрацептивов, которые занимают важное место в про-

филактике возникновения нежелательной беременности, а также в лечении гинекологических, дерматологических и эндокринных заболеваний. В России, которая традиционно считается страной с выраженной гормонофобией – по данным официальной статистики, их применяют от 8 до 13% женщин репродуктивного возраста [1, 7]. Гормональные контрацептивы, чаще всего, применяются на протяжении нескольких месяцев, а иногда и лет. В период их приема нередко возникает необходимость фармакотерапии остро возникающих или хронических заболеваний. Это, несомненно, влечет за собой риск возникновения межлекарственных взаимодействий и может быть одной из причин изменения эффективности проводимой терапии и проявления нежелательных лекарственных реакций.

Гликопротеин-Р (Pgp) или ABCB1 белок представляет собой эффлюксный АТФ-зависимый белок-транспортер, участвующий в переносе субстратов из клетки, а также препятствующий их всасыванию в кишечнике [21]. Pgp локализован на мембранах энтероцитов, гепатоцитов, эпите-

лиоцитов почечных канальцев и коры надпочечников, эндотелиоцитов гистогематических барьеров. Известно, что многие гормональные вещества, например половые стероиды, глюкокортикоиды, тиреоидные гормоны способны модулировать функциональную активность и экспрессию Pgp [5, 10, 12, 13]. Однако влияние комбинированных оральных контрацептивов на белок-транспортер изучено недостаточно.

Цель работы – изучить влияние комбинированного орального контрацептива «Ярина» на функциональную активность Pgp в эксперименте.

Материалы и методы

Работа выполнена на 10 половозрелых кроликах-самках породы Шиншилла, массой от 4500 до 5100 г., находящихся в состоянии течки. Препарат «Ярина» (0,03 мг этинилэстрадиола и 3,0 мг дроспиренона; производитель: «BAYER SCHERING PHARMA AG», Германия) вводили животным per os в дозах 6,5 мкг/кг массы этинилэстрадиола и 650 мкг/кг массы дроспиренона 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 Pgp по фармакокинетике его маркерного субстрата – фексофенадина. Фексофенадин (Препарат «Телфаст» 180 мг; производитель: Aventis Pharma, Италия) вводили животным перорально с помощью металлического зонда в дозе 67,5 мг/кг массы [11]. 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 крови пробы центрифугировали при 3000 об/мин в течение 10 минут и хранили до анализа при температуре -29°C . 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%) [17]. Таким образом, по концентрации фексофенадина в крови можно судить о функционировании Pgp, который

обеспечивает его более быстрое или медленное выведение, а также препятствует всасыванию в кишечнике.

Содержание фексофенадина в плазме крови определяли методом ВЭЖХ в изократическом режиме на хроматографе Stayer («Аквилон», Россия) и колонке Ultrasphere 4,6x250 мм (Beckman Coulter, США) с термостатированием при 45°C . Анализ выполняли при длине волны 220 нм и скорости подвижной фазы 1 мл/мин. Экстракцию и хроматографирование маркерного субстрата осуществляли по методу Раменской Г.В. с соавт. [6] в модификации [9]. Количественное определение фексофенадина выполняли по методу абсолютной калибровки по высоте пиков, с использованием стандарта фексофенадина (Strasbourg cedex).

Расчет концентрации фексофенадина осуществляли с помощью программы «Мультихром». Фармакокинетические параметры [максимальную концентрацию (C_{\max} , нг/мл), период полувыведения ($T_{1/2}$, ч), площадь под фармакокинетической кривой концентрация-время (AUC_{0-t} , нг*ч/мл; $AUC_{0-\infty}$, нг*ч/мл), среднее время удерживания (MRT_{24} , 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_{0-24}) вычисляли с помощью офисного пакета «Excel 2010».

Статистическая обработка полученных данных осуществлялась с использованием программы Statistica 8.0. Характер распределения данных оценивали 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, имеющих распределение отличное от нормального).

Полученные данные представлены в виде среднего арифметического значения и стандартной ошибки средней арифметиче-

ской в случае нормального распределения признака или в виде медианы, верхнего и нижнего квартиля – при распределении данных отличным от нормального.

Результаты и их обсуждение

Изучение функциональной активности Pgp на уровне целостного организма проводили по анализу фармакокинетики его маркерного субстрата – фексофенадина. Высокие концентрации фексофенадина в плазме крови кроликов и его медленное выведение из организма свидетельствуют о низкой функциональной активности Pgp, а низкое содержание фексофена-

дина в плазме крови и его быстрое выведение – о высокой функциональной активности белка-транспортера.

У интактных животных были получены фармакокинетические параметры фексофенадина, представленные в таблице 1.

14-дневное и 21-дневное пероральное введение кроликам-самкам препарата «Ярина» в дозе этинилэстрадиола 6,5 мкг/кг и дроспиренона 650 мкг/кг массы приводило к статистически значимому изменению фармакокинетических параметров маркерного субстрата Pgp – фексофенадина (табл. 1).

Таблица 1

Основные фармакокинетические параметры фексофенадина при введении препарата «Ярина» ($M \pm t$ – при нормальном распределении признаков; медиана, нижний и верхний квартиль – при распределении признака отличным от нормального)

Изучаемые параметры	Исходные значения n=10	«Ярина» 14 дней n=10	«Ярина» 21 день n=10
C_{max} , нг/мл	414,50 (224,60;454,66)	708,55* (529,01;1133,42)	711,66* (660,88;775,91)
T_{max} , ч	4 (3;5)	4 (3;4)	4 (4;4)
$T_{1/2}$, ч	4,67 (4,23; 9,02)	14,21* (12,33; 17,76)	13,07 (11,46; 14,86)
AUC_{0-24} , нг*ч/мл	2470,17±375,22	9132,73±1332,25*	10532,06±1556,02*
$AUC_{0-\infty}$, нг*ч/мл	3248,12 (1595,31;3520,56)	11199,4* (8956,55;19594,5)	13763,7* (10042,7;17671,7)
C_{max} / AUC_{0-24}	0,18 (0,11; 0,19)	0,09 (0,08; 0,1)	0,08 (0,07; 0,1)
$C_{max} / AUC_{0-\infty}$	0,16 (0,11; 0,18)	0,06 (0,05; 0,07)	0,06 (0,05; 0,06)
MRT_{24} , ч	8,22 (6,95; 9,45)	10,66* (10,05; 11,21)	10,44* (10,34; 11,18)
MRT , ч	10,53 (6,98; 12,78)	21,52* (19,04; 25,81)	20,87* (18,17; 22,61)
Cl , л/ч	94,21 (73,61; 162,8)	24,11* (15,31; 29,62)	20,05* (16,98; 25,91)
Vd , л	1291,52±163,95	511,31±54,78*	427,81±44,54*
K_{el} , 1/ч	0,13±0,025	0,05±0,008*	0,05±0,007*

Примечание: * – $p < 0,05$ – достоверные различия со значениями у интактных животных (исходные значения); n – количество животных в серии.

Введение кроликам комбинированного орального контрацептива «Ярина» в течение 14 дней приводило к достоверному ($p < 0,05$) повышению C_{max} фексофенадина на 70,9 %, AUC_{0-24} на 269,7 %, $AUC_{0-\infty}$ на 244,8 %, $T_{1/2}$ на 204,3 %, MRT_{24} на 29,7 %, MRT на 104,4 %, снижению Cl

на 74,4 %, Vd на 60,4 % и K_{el} на 61,5 % по сравнению с исходными показателями.

Применение контрацептивного препарата в течение 21 дня также сопровождалось достоверным ($p < 0,05$) и по ряду показателей более выраженным изменением изучаемых фармакокинетических

показателей: наблюдалось повышение C_{max} фексофенадина на 71,7 %, $T_{1/2}$ на 179,9%, AUC_{0-24} на 326,4%, $AUC_{0-\infty}$ на 323,7%, MRT_{24} на 27 %, MRT на 98,2%, снижение Cl на 78,7 %, Vd на 66,9 % и K_{el} на 61,5% в сравнении с данными интактных животных.

В проведенном исследовании изучено влияние орального контрацептива «Ярина» на функциональную активность Pgr. Достоверное повышение значений C_{max} , AUC_{0-24} , $AUC_{0-\infty}$, $T_{1/2}$, MRT_{24} и MRT и снижение Cl , Vd и K_{el} фексофенадина характеризуют замедленное выведение маркерного субстрата из организма животного и могут являться доказательством ингибирующего влияния комбинации этинилэстрадиола и дроспиренона на функциональную активность Pgr в печени и почках – органах, обеспечивающих выведение фексофенадина.

По современным представлениям в печеночном поглощении этинилэстрадиола участвуют три транспортера (OATP1B1, OATP2B1 и NTCP), а его экскрецию в желчь осуществляет, вероятно, транспортер BCRP, а не Pgr [22]. В своих исследованиях, Kim W.Y. с коллегами изучали влияние на модуляцию Pgr различных стероидных гормонов, в том числе и этинилэстрадиола. Исследование проводилось на культуре клеток карциномы ободочной кишки человека – LS180. Результаты показали, что этинилэстрадиол повышает уровень белка-транспортера Pgr в 3 раза по сравнению с контролем. По мнению авторов, необходимы дальнейшие исследования в условиях целостного организма [16].

В изученной нами литературе не было обнаружено информации о характере влияния дроспиренона на функциональную активность изучаемого белка-транспортера. Известно, что дроспиренон является производным спиронолактона обладающим гестагенным, антигонадотропным, антиандрогенным и антиминералокортикоидным эффектами [8]. Данные научной литературы о характере влияния спиронолактона на P-gr противоречивы: по одним источникам спиронолактон является субстратом и ингиби-

тором P-gr [19], по другим он повышает экспрессию P-gr в тонком кишечнике крыс [14], и клеточной линии гепатокарциномы человека HepG2 через прегнан X ядерный рецептор [20].

Таким образом, можно предположить, что ингибирующее влияние препарата «Ярина» на функциональную активность Pgr связано, видимо, с наличием в его составе гестогенного компонента дроспиренона. Концентрация гестагена в препарате в 100 раз выше, чем эстрогенного компонента этинилэстрадиола, что определяет доминирование его эффекта на функциональную активность Pgr.

Выводы

Внутрижелудочное введение кроликам-самкам комбинированного орального контрацептива «Ярина» в дозах 6,5 мкг/кг массы этинилэстрадиола и 650 мкг/кг массы дроспиренона в течение 14 и 21 дней вызывает ингибирование функциональной активности белка-транспортера гликопротеина-P, что установлено по фармакокинетике его маркерного субстрата – фексофенадина, и подтверждается достоверным повышением C_{max} , AUC_{0-24} , $AUC_{0-\infty}$, $T_{1/2}$, MRT_{24} , 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. Влияние индивидуальных особенностей пациентов на риск развития нежелательных лекарственных реакций / В.Г. Кукес [и др.] // Вестник Росздравнадзора. – 2011. – № 6. – С. 59-63.
3. Казаков А.С. Осложнения фармакотерапии, связанные с взаимодействием лекарственных средств / А.С. Казаков, В.К. Лепяхин, А.В. Астахова // Рос. медико-биол. вестн. им. акад. И.П. Павлова. – 2013. – №3. – С. 70-76.
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. Кулес [и др.]. – М.: ГЭОТАР-Медиа, 2008. – 304 с.
6. Раменская Г.В. Разработка методики количественного определения маркера активности Р-гликопротеина фексофенадина в плазме крови / Г.В. Раменская, Е.А. Скуридина, Л.М. Красных // Хим.-фармац. журн. – 2006. – Т. 40, №12. – С. 47-50.
7. Репродуктивное здоровье населения России 2011: резюме отчета Федеральной службы государственной статистики (Росстата) Министерство здравоохранения РФ. – М., 2012. – 56 с.
8. Твердикова М.А. Дроспиренон – надежная контрацепция и неконтрацептивный эффект / М.А. Твердикова, А.А. Гависова // Русский медицинский журнал. – 2012. – Т. 20, №1. – С. 1-5.
9. 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.
10. 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.
11. 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.
12. Якушева Е.Н. Влияние орального гормонального контрацептива «Жанин» на функциональную активность гликопротеина-Р / Е.Н. Якушева, А.А. Котлярова, А.А. Никифоров // Рос. медико-биол. вестн. им. акад. И.П. Павлова. – 2013. – №4. – С. 65-70.
13. 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.
14. Induction of rat intestinal P-glycoprotein by spironolactone and its effect on absorption of orally administered digoxin / C.I. Ghanem [et al.] // J. Pharmacol. Exp. Ther. – 2010. – Vol. 318, № 3. – P. 1146-1152.
15. Kando J.C. Gender as a risk factor for adverse events to medications / J.C. Kando, K.A. Yonkers, J.O. Cole // Drugs. – 1995. – Vol. 50. – P. 1-6.
16. Kim W.Y. P-glycoprotein (P-gp/MDR1)-mediated efflux of sex-steroid hormones and modulation of P-gp expression in vitro / W.Y. Kim, L.Z. Benet // Pharm Res. – 2004. – Vol. 21, №7. – P. 1284-1293.
17. Molimard M. Comparison of pharmacokinetics and metabolism of desloratadine, fexofenadine, levocetirizine and mizolastine in humans / M. Molimard, B. Diquet, M.S. Benedetti // Fund. & Clin. Pharmacol. – 2004. – Vol. 18, № 4. – P. 399-411.
18. Muae J. A. Factors affecting the development of adverse drug reactions (Review article) / J. A. Muae // Saudi Pharmaceutical Journal. – 2014. – Vol. 22, №2. – P. 83-94.
19. Polymorphisms in human MDR1 (P-glycoprotein): recent advances and clinical relevance / C. Marzolini [et al.] // Clin Pharmacol Ther. – 2004. – Vol. 75, № 1. – P. 13-33.
20. Pregnane X receptor mediates the induction of P-glycoprotein by spironolactone in HepG2 cells / J.P. Rigalli [et al.] // Toxicology. – 2011 – Vol. 285, № 1. – P. 18-24.
21. Schinkel A.H. The physiological function of drug-transporting P-glycoproteins/ A.H. Schinkel // Cancer Biology. – 1997. – №8. – P. 161-170.
22. Transporter Studies with the 3-O-Sulfate Conjugate of 17 – Ethinylestradiol: Assessment of Human Liver Drug Transporters / H. Yong-Hae [et al.] // Drug me-

tabolism and disposition. – 2010. – Vol. 38, № 7. – P. 1072-1082.

**ORAL HORMONAL CONTRACEPTIVE "YARINA" INFLUENCE
ON P-GLYCOPROTEIN FUNCTIONAL ACTIVITY**

A.A. Kotljarova, E.N. Yakusheva

In the research on rabbits influence of combined oral contraceptive "Yarina" 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 "Yarina" for 14 and 21 days resulting in inhibition of Pgp functional activity.

Keywords: *P-glycoprotein, ABCB1 protein, ethinylestradiol, drospirenone, fexofenadine, pharmacokinetics.*

Котлярова А.А. – аспирант кафедры фармакологии с курсом фармации ФДПО ГБОУ ВПО РязГМУ Минздрава России.

E-mail: KAA.RZ@yandex.ru.

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

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