Check for updates

Влияние женских половых гормонов на функционирование белка-транспортера гликопротеина-Р

© А.В. Щулькин[1*], И.В. Черных[1], П.Ю. Мыльников[1], Д.О. Уткин[2], Е.Н. Якушева[1]

[1]ФГБОУ ВО «Рязанский государственный медицинский университет им. акад. И.П. Павлова» Минздрава России, Рязань, Россия; [2]ГУЗ Рязанской области «Областной клинический онкологический диспансер», Рязань, Россия

Гликопротеин-Р (Pgp, ABCB1-белок) — белок-транспортер, локализующийся в мембране гепатоцитов, энтероцитов тонкого и толстого кишечника, эпителиоцитов почечных канальцев, эндотелиальных клеток гистогематических барьеров, опухолевых клеток.

Цель исследования: изучить в эксперименте влияние физиологических концентраций эстрадиола и прогестерона на функциональную активность Pgp на уровне целостного организма.

Материал и методы. Работа выполнена на 17 половозрелых кроликах-самках породы шиншилла. 1-й группе кроликов была проведена «ложная операция» (*n*=5); 2-й группе (*n*=6) выполняли овариэктомию; 3-й группе (*n*=6) проводили овариэктомию и в течение 14 дней, начиная с 14-х послеоперационных суток, вводили эстрадиол (по 0,5 мг), а затем комбинацию эстрадиола (0,5 мг) и прогестерона (5 мг) в течение 14 сут. За 7 дней до начала исследования, на 14, 28 и 42-е сутки после операции у кроликов всех групп методом ВЭЖХ определяли функциональную активность Pgp по фармакокинетике его маркерного субстрата фексофенадина. Накопление фексофенадина в организме свидетельствует об ингибировании Pgp, а снижение его содержания — об индукции Pgp.

Результаты. Овариэктомия приводила к снижению функциональной активности Pgp. Введение эстрадиола в течение 14 сут после овариэктомии существенно не влияло на функциональную активность белка-транспортера. Введение комбинации эстрадиола и прогестерона в течение 14 дней привело к повышению активности Pgp относительно показателя у овариэктомированных животных и исходного уровня.

Заключение. Влияние физиологических концентраций эстрадиола и прогестерона на функционирование белка-транспортера свидетельствует о том, что эффективность фармакотерапии субстратами Pgp может зависеть от фазы менструального цикла, а для повышения эффективности соответствующей фармакотерапии возможна корректировка доз лекарственных средств.

Ключевые слова: гликопротеин-Р, ABCB1-белок, функциональная активность, фексофенадин, ВЭЖХ, прогестерон, эстрадиол.

Influence of female hormones on the P-glycoprotein functioning

© Alexey V. Shchulkin[1*], Ivan V. Chernykh[1], Pavel Yu. Mylnikov[1], Dmitry O. Utkin[2], Elena N. Yakusheva[1]

[1]Ryazan State Medical University, Ryazan, Russia; [2]Regional clinical Oncological Dispensary, Ryazan, Russia

The P-glycoprotein (Pgp, ABCB1-protein) is a transport protein localized in the membrane of hepatocytes, small and large intestine enterocytes, renal tubular epitheliocytes, endothelial cells of histohematic barriers, and tumor cells.

Aim — to study the effect of estradiol and progesterone physiological concentrations on the Pgp functional activity on the whole body.

Material and methods. The work was performed on 17 adult female chinchilla rabbits. The first group of rabbits underwent a "false operation" (n=5); the second group (n=6) underwent ovariectomy. The third group (n=6) was ovariectomized and received estradiol (0.5 mg/rabbit) for 14 days (starting on the 14th postoperative day), followed by combined administration of estradiol (0.5 mg/rabbit) and progesterone (5 mg/rabbit) for 14 days. The Pgp functional activity was determined in rabbits of all groups using HPLC analysis of fexofenadine pharmacokinetics on day 7 before the study onset and on day 14, 28, and 42 after the operation. Accumulation of fexofenadine in rabbits indicates Pgp inhibition, and a decrease in its content means Pgp induction.

Results. Ovariectomy led to a decrease in the Pgp functional activity. The estradiol introduction for 14 days after ovariectomy did not significantly affect the transport protein functional activity. Combined administration of estradiol and progesterone for 14 days resulted in an increase in the Pgp activity, compared to that in the ovariectomy series and baseline values.

Conclusions. The dependence of the transport protein activity on the dynamics of physiological estradiol and progesterone concentrations suggests that the effectiveness of pharmacotherapy with Pgp substrates may depend on the menstrual cycle phase, and drug dose correction may be used to increase the pharmacotherapy effectiveness.

Keywords: P-glycoprotein, ABCB1-protein, functional activity, fexofenadine, HPLC, progesterone, estradiol.

Гликопротеин-Р (Pgp, ABCB1-белок) — АТФ-зависимый белок-транспортер, локализующийся в цитоплазматической мембране гепатоцитов, энтероцитов тонкого и толстого кишечника, эпителиоцитов почечных канальцев, эндотелиальных клеток гистогематических барьеров, а также опухолевых клеток. Во всех них он выполняет одну и ту же функцию: выводит ксено- и эндобиотики во внеклеточное пространство, биологические жидкости (кровь, желчь или мочу) и просвет кишечника. Таким образом, Pgp играет важную роль в фармакокинетике (всасывание, распределение и выведение) лекарственных средств — его субстратов, транспорте эндогенных веществ (например, стероидных и тиреоидных гормонов) и формировании резистентности опухолевых клеток к химиотерапии [1].

Copyright © 2018 by the MediaSphere
Licensee: CC BY-NC-ND
doi: 10.14341/probl9545

Проблемы эндокринологии 2018. — Т. 64. — №3. — С. 144—150
Problems of Endocrinology 2018;64(3):144-150

Функциональная активность Pgp меняется под влиянием различных факторов. Ряд веществ — индукторы (рифампицин, глюкокортикостероиды, тироксин) повышают активность этого белка-транспортера, что может снижать эффективность терапии субстратами Pgp (дигоксин, дабигатрана этексилат, статины и др.), тогда как ингибиторы (верапамил, амиодарон, кетоконазол) снижают активность Pgp, что может приводить к относительной передозировке его субстратов [2]. Способность лекарственных средств ингибировать функциональную активность Pgp можно использовать в терапии онкологических заболеваний с целью преодоления множественной лекарственной устойчивости, обусловленной повышенной активностью данного белка-транспортера [3].

В исследованиях *in vitro* на различных клеточных линиях были получены противоречивые результаты относительно влияния женских половых гормонов на функциональную активность и экспрессию Pgp. Так, на клетках линии LS180 (клетки рака толстой кишки человека) было показано, что эстрогены и прогестерон в концентрации 50 мкМ повышают экспрессию мРНК гена *MDR1*, кодирующего белок-транспортер [4]. В то же время на клетках рака молочной железы, трансдуцированных геном *MDR1*, эстрадиол в концентрациях 10 пМ — 10 нМ снижал уровень Pgp [5]. На линиях клеток L-MDR1 и P388/dx было показано, что прогестерон ингибирует активность белка-транспортера в концентрации 13,3±3,2 и 30,2±9,8 мкМ соответственно [6]. Прогестерон в концентрации 50 мкМ также снижал функциональную активность Pgp на клеточной линии, резистентной к винбластину, о чем свидетельствовало повышение накопления в клетках винбластина (субстрата Pgp) в 4—5 раз [7]. Следует отметить, что *in vitro* использовались концентрации гормонов, существенно превышающие их сывороточные уровни в организме человека и животных ($3 \cdot 10^{-9}$ М). Кроме того, не изучалось совместное действие эстрадиола и прогестерона.

В женском организме на протяжении менструального цикла концентрации половых гормонов постоянно меняются. Это позволяет предположить изменение функционирования Pgp в различные фазы цикла, что может повлиять на фармакокинетику лекарственных средств — субстратов белка-транспортера. Такое предположение косвенно подтверждается противоречивостью данных о половых различиях в фармакокинетике субстратов Pgp (верапамила, циклоспорина и др.), что может быть связано с разными фазами цикла у включенных в исследование женщин [8].

Цель исследования — изучить в эксперименте влияние физиологических концентраций эстрадиола и прогестерона на функциональную активность Pgp на уровне целостного организма.

Материал и методы

Дизайн исследования

Проведено экспериментальное проспективное контролируемое исследование с участием лабораторных животных.

Критерии соответствия

Работа выполнена на 17 половозрелых кроликах-самках породы шиншилла массой 3000—3500 г. Все животные на момент включения в исследование достигли половой зрелости и находились в состоянии течки (полиэструс).

Условия проведения

Животные были получены из питомника ОАО «Касимов—Миакро», имели необходимые ветеринарные свидетельства и содержались в стандартных условиях вивария ФГБОУ ВО РязГМУ Минздрава России. Работа с животными проводилась в соответствии с правилами лабораторной практики (приказ МЗ РФ №199н от 01.04.16).

Продолжительность исследования

Исследование проведено в 2017 г., продолжительность исследования для каждого животного составила 47 сут.

Анализ в подгруппах и описание медицинского вмешательства

Животные были разделены на три группы.

1-й (контрольной) группе кроликов (n=5) была проведена «ложная операция», заключающаяся во вскрытии кожных покровов и подкожной жировой клетчатки передней брюшной стенки с последующим послойным ушиванием раны. 2-й группе животных (n=6) выполняли овариэктомию. 3-й группе кроликов (n=6) проводили овариэктомию и с 14-х послеоперационных суток в течение 14 дней вводили эстрадиол по 0,5 мг/кролик, а затем комбинацию эстрадиола (0,5 мг/кролик) и прогестерона (5 мг/кролик) также в течение 14 сут.

Эстрадиол (прогинова, «Bayer», Германия) и прогестерон (утрожестан, «Besins Healthcare», Бельгия) вводили кроликам *per os* 1 раз в день. Подобная схема эксперимента имитирует менструальный цикл, когда во время менструации концентрация эстрогенов и прогестерона в крови снижается, в фолликулярную фазу концентрация эстрогенов возрастает, а в лютеиновую фазу увеличивается содержание как эстрогенов, так и прогестерона в крови.

Овариэктомию и «ложную операцию» выполняли в условиях операционной вивария РязГМУ под наркозом, который осуществляли в/м введением ксилазина гидрохлорида (рометар, СПОФА, Чехия) в дозе 4,0—6,0 мг/кг массы и золетила-50 («Virbac», Франция) в дозе 5—10 мг/кг массы.

 DOI: http://dx.doi.org/10.14341/probl9545

Основной исход исследования

За 7 дней до начала исследования, а также на 14, 28 и 42-е сутки после оперативного вмешательства у животных всех групп определяли функциональную активность Pgp (по фармакокинетике маркерного субстрата).

Дополнительные исходы исследования

Дополнительно у животных в указанные сроки определяли сывороточную концентрацию половых гормонов (тестостерона, эстрадиола, прогестерона).

Методы регистрации исходов

Функциональную активность Pgp оценивали по фармакокинетике фексофенадина (аллегра, «Sanofy Aventis», Франция) после его однократного перорального введения (67,5 мг/кг массы, в объеме 5 мл) в виде водной суспензии [9, 10]. Фексофенадин не подвергается биотрансформации и его фармакокинетика зависит преимущественно от активности данного белка-транспортера. Накопление фексофенадина в организме свидетельствует об ингибировании Pgp, а снижение содержания — об индукции Pgp.

Для определения концентрации фексофенадина кровь в объеме 5 мл забирали из краевой вены уха кролика в гепаринизированные пробирки через 1, 2, 3, 4, 5, 6, 12 и 24 ч после введения препарата. Образцы крови центрифугировали (1000 g, 10 мин), полученную плазму хранили до анализа при –29 °С в течение месяца. Концентрацию фексофенадина в плазме определяли на высокоэффективном жидкостном хроматографе Стайер с УФ-спектрофотометрическим детектором UVV 104 при длине волны 220 нм с применением обращенно-фазовой хроматографической колонки Ultrasphere 4,6×250 мм (зернение 5 мкм) фирмы «Beckman Coulter». Фексофенадин экстрагировали из плазмы с помощью дихлорметана (ACROS ORGANICS), этилацетата (ACROS ORGANICS) и диэтилового эфира (ХИММЕД). Элюирование выполняли подвижной фазой следующего состава (на 200 мл): 64 мл ацетонитрила, 133,7 мл бидистиллированной воды, содержащей 2,33 мл ледяной уксусной кислоты (ХИММЕД) и 0,936 мл триэтиламина (ACROS ORGANICS) [9, 10]. Триэтиламином доводили pH подвижной фазы до 5,0. Время удерживания пика фексофенадина составило 12,6 мин.

С использованием модельнонезависимого метода [11] рассчитывали следующие фармакокинетические параметры фексофенадина: C_{max} — максимальная концентрация (нг/мл), AUC_{0-t} — площадь под фармакокинетической кривой концентрация — время от нуля до времени последнего забора крови (нг×ч/мл); Cl — общий клиренс (л/ч). Концентрацию половых гормонов определяли в ЦНИЛ РязГМУ радиоиммунным методом с применением стандартной тест-системы производства IMMUNOTECH (Чехия) с дальнейшей обработкой полученных результатов на анализаторе Иммунотест (Россия).

Этическая экспертиза

Протокол исследования был рассмотрен и утвержден на заседании локального этического комитета ФГБОУ ВО РязГМУ Минздрава России №12 от 08.04.16.

Статистический анализ

Принципы расчета размера выборки: количество животных, использованных в исследовании, обусловлено их числом, минимально необходимым для экспериментальных фармакокинетических исследований [12].

Методы статистического анализа данных. Полученные результаты обрабатывали с помощью программы StatSoft Statistica 7.0 (США). Достоверность различий между показателями гормонального статуса животных оценивали с помощью критерия Фридмана. При наличии статистической значимости парные сравнения выполняли по критерию Вилкоксона. Полученные результаты представлены в виде медианы, нижнего и верхнего квартилей. Статистическую значимость различий между фармакокинетическими параметрами фексофенадина оценивали, исходя из представления о лог-нормальном распределении данных. Сравнение изучаемых фармакокинетических параметров проводили с помощью дисперсионного анализа (ANOVA) после их логарифмирования. Различия с исходными показателями внутри групп и межгрупповые сравнения выполняли по критерию множественного сравнения Фишера. Полученные результаты представлены в таблицах в виде среднего геометрического и его 95% доверительного интервала (ДИ). Различия считали статистически значимыми при $p<0,05$.

Зависимость между показателями гормонального фона животных 2-й и 3-й групп от фармакокинетических параметров фексофенадина оценивали с помощью коэффициента корреляции Пирсона (Rs).

Дополнительно рассчитывали двусторонний 90% ДИ отношения средних геометрических фармакокинетических параметров фексофенадина на фоне воздействия к параметрам интактных животных (внутри групп), а также 90% ДИ отношения средних геометрических фармакокинетических параметров фексофенадина на фоне воздействия (кролики 3-й группы) к параметрам животных, после овариэктомии (кролики 2-й группы). Согласно U.S. Food and Drug Administration, Center for Drug Evaluationand Research, значимыми считаются различия между фармакокинетическими параметрами, если двусторонний 90% ДИ их отношения находится за пределами диапазона 0,8—1,25 (80—125%), поскольку изменение фармакокинетических параметров только

более чем на 25% может привести к изменению фармакодинамики препаратов.

Результаты

Объекты (участники) исследования

Все животные завершили исследование и вошли в итоговый анализ.

Основные результаты исследования

Концентрации половых гормонов (тестостерон, прогестерон и эстрадиол) в сыворотке у животных различных групп до начала эксперимента не различались. При выполнении «ложной» операции гормональный статус кроликов существенно не изменялся на протяжении всего эксперимента.

У животных 2-й группы (изолированная овариэктомия) по сравнению с исходными показателями отмечалось значимое снижение (на 29,7%; p=0,028) уровня эстрадиола на 42-е сутки после операции **(рис. 1)**, а также уменьшение концентрации прогестерона на 30,9% (p=0,028) на 14-е сутки эксперимента, на 54,9% (p=0,028) на 28-е сутки и на 48,7% (p=0,028) на 42-е сутки **(рис. 2)**.

У кроликов 3-й группы (введение эстрадиола и прогестерона на фоне овариэктомии) концентрация эстрадиола на протяжении всего эксперимента статистически значимо не отличалась от исходных показателей (до овариэктомии) и превышала значения кроликов 2-й группы (изолированная овариэктомия) на 42-е сутки эксперимента на 62,3% (p=0,004) **(см. рис. 2)**. Уровень прогестерона снижался на 14-е сутки исследования на 46,9% (p=0,028), на 28-е сутки — на 88,1% (p=0,028), а на 42-е сутки повышался на 168,5% (p=0,046). В этот срок концентрация прогестерона у животных 3-й группы превышала показатели животных 2-й группы на 500,0% (p=0,002).

Концентрация тестостерона у животных всех исследуемых групп на протяжении всего эксперимента значимо не менялась.

Функциональную активность Pgp оценивали по фармакокинетике его маркерного субстрата — фексофенадина. Фексофенадин не подвергается биотрансформации, и его фармакокинетика зависит от данного белка-транспортера. Накопление фексофенадина в организме кроликов (повышение C_{max} и AUC_{0-t}) и снижение его выведения (уменьшение Cl) свидетельствуют о снижении функциональной активности Pgp в организме, а противоположные изменения показателей — о возрастании активности Pgp.

Фармакокинетические параметры фексофенадина у животных разных групп до начала эксперимента не различались **(см. таблицу)**.

В группе ложнооперированных животных фармакокинетические параметры фексофенадина значимо не отличались от исходных показателей на протяжении всего эксперимента, что свидетельствует об отсутствии изменения активности Pgp в организме.

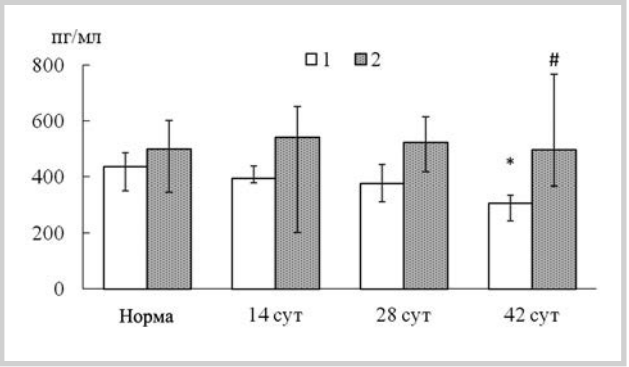

Рис. 1. **Концентрация эстрадиола в сыворотке крови кроликов после овариэктомии и последующего введения комбинации эстрадиола и прогестерона. Данные представлены в виде медианы, верхнего и нижнего квартилей.**

Примечание. 1 — группа овариэктомии, 2 — группа животных, получавших комбинацию эстрадиола и прогестерона на фоне овариэктомии. * — p<0,05 при сравнении с показателями интактных животных (норма), # — то же при сравнении с показателеями у животных группы овариэктомии.

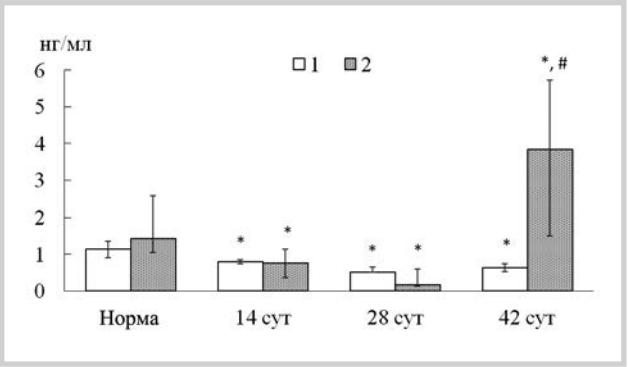

Рис. 2. Концентрация прогестерона в сыворотке крови кроликов после овариэктомии и последующего введения комбинации эстрадиола и прогестерона. Данные представлены в виде медианы, верхнего и нижнего квартилей.

Примечание. Обозначения, как на рис. 1.

У животных второй группы (изолированная овариэктомия) на 14-е послеоперационные сутки C_{max} фексофенадина возрастала в 1,61 раза (90% ДИ 1,09—2,38; p=0,039), AUC_{0-t} — в 1,56 раза (90% ДИ 1,08—2,24; p=0,05), а Cl снижался в 0,325 раза (90% ДИ 0,12—0,95; p=0,036) по сравнению с исходными показателями. На 28-е сутки отмечалось снижение Cl в 0,52 раза (90% ДИ 0,31—0,87; p=0,07) по сравнению с параметрами до операции. На 42-е сутки отмечалось увеличение C_{max} фексофенадина в 2,43 раза (90% ДИ 1,87—3,15; p=0,0008), AUC_{0-t} — в 2,24 раза (90% ДИ 1,53—3,28; p=0,0017) и снижение Cl в 0,37 раза (90% ДИ 0,17—0,82; p=0,06) **(см. таблицу)** по сравнению с исходными значениями. Полученные данные свидетельствуют о накоплении фексо-

Фармакокинетические параметры фексофенадина при овариэктомии и введении комбинации эстрадиола и прогестерона

Показатель		Срок эксперимента			
		исходные значения	14-е сутки	28-е сутки	42-е сутки
C_{max}, нг/мл	Овариэктомия	276,46 (175,03; 436,67)	445,97 (322,8; 616,07)*	409,23 (222,85; 751,47)	671,55 (344,9; 1307,5)*
	Эстрадиол+прогестерон	352,06 (247,49; 500,81)	366,75 (252,83; 532,00)	467,82 (414,49; 528,00)	258,33 (196,08; 340,34)*#
AUC_{0-t}, нг·ч/мл	Овариэктомия	3198,09 (1883,65; 5429,77)	4977,98 (3338,49; 7422,59)*	3852,71 (2451,45; 6054,95)	7169,97 (3840,12; 13387,2)*
	Эстрадиол+прогестерон	3491,2 (2680,56; 4547,08)	3757,87 (2551,21; 5535,26)	4904,0 (4282,64; 5615,61)*	2157,73 (1659,80; 2805,03)*#
Cl, л/ч	Овариэктомия	16,17 (9,25; 28,27)	5,26 (1,59; 17,41)*	8,42 (5,75; 12,33)*	6,04 (2,49; 14,62)*
	Эстрадиол+прогестерон	14,72 (10,51; 20,62)	9,13 (5,81; 14,34)*	7,44 (5,15; 10,77)*	19,25 (10,45; 35,49)#

Примечание. * — $p<0,05$ при сравнении с исходными показателями, # — то же при сравнении с показателями в группе овариэктомии. Параметры представлены в виде среднего геометрического и его 90% ДИ.

фенадина в организме кроликов и замедлении его выведения, что отражает снижение функциональной активности Pgp. Максимальные и клинически значимые различия (90% ДИ отношения средних геометрических фармакокинетических параметров фексофенадина у животных, подвергнутых овариэктомии, к параметрам интактных животных, находящиеся вне диапазона 0,8—1,25) были зарегистрированы на 42-е сутки после операции.

У животных 3-й группы (введение эстрадиола и прогестерона на фоне овариэктомии) на 14-е сутки после овариэктомии Cl фексофенадина снижался в 0,62 раза (90% ДИ 0,45—0,86; p=0,024) по сравнению с исходными значениями. На 28-е сутки (14-е сутки после начала введения эстрадиола) AUC_{0-t} фексофенадина увеличивалась в 1,4 раза (90% ДИ 1,16—1,7; p=0,038), а Cl снижался в 0,5 раза (90% ДИ 0,4—0,64; p=0,042). На 42-е сутки эксперимента (14-е сутки после начала введения эстрадиола и 14-е сутки после начала введения комбинации эстрадиола и прогестерона) отмечалось снижение C_{max} в 0,73 раза (90% ДИ 0,56—0,96; p=0,041) и AUC_{0-t} в 0,618 раза (90% ДИ 0,46—0,83; p=0,044).

Обнаруженные изменения фармакокинетики фексофенадина свидетельствуют о его накоплении и замедлении выведения в течение 28 сут исследования, т.е. об ингибировании Pgp. Снижение содержания фексофенадина в организме кроликов при введении комбинации эстрадиола и прогестерона на протяжении 14 сут по сравнению с исходными показателями отражает индукцию белка-транспортера.

При сравнении фармакокинетических показателей фексофенадина у животных 2-й и 3-й групп в течение 28 сут исследования значимых различий выявлено не было. На 42-е сутки C_{max} фексофенадина у животных 3-й группы была ниже, чем у кроликов 2-й группы в 0,385 раза (90% ДИ 0,23—0,64; p=0,031), AUC_{0-t} — ниже в 0,30 раза (90% ДИ 0,19—0,49; p=0,016), а Cl — выше в 3,19 раза (90% ДИ 1,49—6,81; p=0,009).

Дополнительные результаты исследования

При корреляционном анализе во 2-й группе была выявлена прямая связь между концентрацией прогестерона и общим клиренсом фексофенадина (Rs=0,536; p=0,007), а концентрация эстрадиола не обнаруживала связи ни с одним из изученных фармакокинетических параметров.

В 3-й группе обнаружена обратная зависимость между концентрацией прогестерона и C_{max} (Rs= –0,435; p=0,034 и AUC_{0-1} (Rs=–0,497; p=0,014) фексофенадина и между концентрацией эстрадиола и C_{max} фексофенадина (Rs= –0,388; p=0,061). Зависимость между концентрацией прогестерона и Cl фексофенадина (Rs=0,733; p=0,00024) оказалась прямой.

Нежелательные явления

В ходе выполнения исследования не было зафиксировано ни одного летального исхода.

Обсуждение

Резюме основного результата исследования

Начиная с 14-х суток после овариэктомии функциональная активность Pgp на уровне целостного организма снижается и достигает минимума на 42-е сутки после операции. Учитывая отсутствие значимых изменений концентрации эстрадиола в первые 28 сут, уменьшение активности белка-транспортера в эти сроки скорее всего связано со снижением уровня прогестерона, что подтверждается корреляцией между концентрацией прогестерона и общим клиренсом фексофенадина. Наибольшее снижение активности Pgp наблюдалось на 42-е сутки исследования, когда снижался уровень и эстрадиола, и прогестерона.

Введение 0,5 мг эстрадиола в течение 14 сут после овариэктомии существенно не влияло на функциональную активность Pgp; она оставалась ниже

исходной и статистически не отличалась от таковой у животных 2-й группы. Введение комбинации эстрадиола и прогестерона в течение 14 дней повышало активность Pgp по сравнению не только с показателями 2-й группы, но и с исходными показателями. На наш взгляд, это обусловлено тем, что при введении комбинации гормонов происходят нормализация уровня эстрадиола (она значимо не отличается от нормы) и повышение концентрации прогестерона.

Обсуждение основного результата исследования

Выявленные изменения активности Pgp согласуются с полученными нами ранее данными о более низкой его активности у кроликов самцов, чем у самок [13]. Видимо, одной из причин половых различий в функциональной активности белка-транспортера является стимулирующее влияние эстрадиола и прогестерона на его функциональную активность.

Влияние эстрадиола и прогестерона на активность Pgp может обусловливать вариабельность фармакокинетики субстратов белка-транспортера у женщин [8]. Однако нами не найдено исследований, в которых изучалась бы связь безопасности и эффективности фармакотерапии субстратами Pgp от фазы менструального цикла.

Функционирование Pgp может меняться в результате непосредственного влияния веществ на его активность, либо за счет модификации экспрессии гена *MDR1*, кодирующего белок-транспортер [1]. Действие половых гормонов в физиологических (относительно низких) концентрациях на белок-транспортер скорее всего связано с изменением его экспрессии.

В базе данных TRANSFAC обнаружена локализация предполагаемого estrogen response element выше сайта инициации транскрипции [14], но не в промоторе гена *MDR1*. Однако были выявлены сайты связывания для транскрипционного фактора AP-1, что указывает на возможность опосредованного влияния эстрадиола на экспрессию Pgp. Эстрогены уменьшают экспрессию белка c-Jun, являющегося основным компонентом AP-1. Повышенная экспрессия c-Jun связана с подавлением экспрессии гена *MDR1* в различных клеточных линиях человека [16].

На клетках линии T47D, трансфецированных промотором гена *mdr1b,* показано, что агонист прогестероновых рецепторов R5020 в физиологической концентрации $5{\cdot}10^{-7}$ M, действуя через прогестероновый рецептор PR_A, стимулирует экспрессию гена, кодирующего Pgp в матке мышей [17].

Эстрогены и гестагены в высоких концентрациях (10 мкМ) также способны действовать как типичные ксенобиотики через другие типы ядерных рецепторов, такие как прегнан X-рецептор (PXR) [18, 19], который повышает экспрессию гена *MDR1* [20].

Ограничения исследования

В выполненной работе не изучалась экспрессия Pgp в органах и тканях, что не позволяет однозначно ответить на вопросы: за счет чего изменилось функционирование белка-транспортера (вследствие модуляции экспрессии или собственно активности), а также в каком конкретно органе модуляция активности Pgp (кишечник, почки, печень) привела к изменению фармакокинетики его маркерного субстрата — фексофенадина.

Дальнейшие исследования в данной области позволят установить органоспецифичные молекулярные механизмы изменения функционирования данного белка-транспортера в различные фазы менструального цикла.

Заключение

Овариэктомия кроликов приводит к снижению функциональной активности Pgp; введение эстрадиола (0,5 мг) после операции в течение 14 сут не влияет на активность белка-транспортера, а последующее применение комбинации эстрадиола (0,5 мг) и прогестерона (5 мг) в течение 14 сут повышает активность Pgp.

Зависимость функционирования белка-транспортера от физиологических колебаний концентраций эстрадиола и прогестерона свидетельствует о том, что эффективность и безопасность фармакотерапии субстратами Pgp в разные фазы менструального цикла может различаться, что требует коррекции доз лекарственных средств в зависимости от фазы цикла.

Дополнительная информация

Источник финансирования. Работа поддержана грантом РФФИ 16-04-00320 а

Конфликт интересов. Авторы декларируют отсутствие явных и потенциальных конфликтов интересов, связанных с публикацией настоящей статьи.

ЛИТЕРАТУРА | REFERENCES

1. Якушева Е.Н., Щулькин А.В., Попова Н.М. и др. Структура, функции гликопротеина-Р и его значение для рациональной фармакотерапии. // *Обзоры по клинической фармакологии и лекарственной терапии* .— 2014. — Т. 12. — № 2. — С. 3-11. [Yakusheva EN, Shchulkin AV, Popova NM, et al. Structure, functions of P-glycoprotein and its role in rational pharmacotherapy. *Obzory po klinicheskoi farmakologii i lekarstvennoi terapii*. 2014;12(2):3-11. (In Russ.)].
2. Кукес В.Г., Грачев С.В., Сычев Д.А., Раменская Г.В. *Метаболизм лекарственных средств. Научные основы персонализированной медицины: руководство для врачей.* — М.:

ГЭОТАР-Медиа; 2008. [Kukes VG, Grachev SV, Sychev DA, Ramenskaya GV. *Metabolizm lekarstvennykh sredstv. Nauchnyye osnovy personalizirovannoy meditsiny. Guidelines for doctors.* — M.: GEOTAR-Media; 2008. (In Russ.)].

3. Gottesman MM. Mechanisms of cancer drug resistance. *Annu Rev Med*. 2002;53:615-627. doi: 10.1146/annurev.med.53.082901.103929
4. Kim WY, Benet LZ. P-glycoprotein (P-gp/MDR1)-Mediated Efflux of Sex-Steroid Hormones and Modulation of P-gp Expression In Vitro. *Pharm Res*. 2004;21(7):1284-1293. doi: 10.1023/b:pham.0000033017.52484.81
5. Mutoh K, Tsukahara S, Mitsuhashi J, et al. Estrogen-mediated post transcriptional down-regulation of P-glycoprotein in MDR1-transduced human breast cancer cells. *Cancer Sci*. 2006;97(11):1198-1204. doi: 10.1111/j.1349-7006.2006.00300.x
6. Frohlich M, Albermann N, Sauer A, et al. In vitro and ex vivo evidence for modulation of P-glycoprotein activity by progestins. *Biochem Pharmacol*. 2004;68(12):2409-2416. doi: 10.1016/j.bcp.2004.08.026
7. Yang CP, DePinho SG, Greenberger LM, et al. Progesterone interacts with P-glycoprotein in multidrug-resistant cells and in the endometrium of gravid uterus. *J Biol Chem*. 1989;264(2):782-788.
8. Cummins CL, Wu CY, Benet LZ. Sex-related differences in the clearance of cytochrome P450 3A4 substrates may be caused by P-glycoprotein. *Clin Pharmacol Ther*. 2002;72(5):474-489. doi: 10.1067/mcp.2002.128388
9. Якушева Е.Н., Черных И.В., Щулькин А.В., Гацанога М.В. Методика определения принадлежности лекарственных средств к числу субстратов гликопротеина-Р. // *Российский медико-биологический вестник им. акад. И.П. Павлова*. — 2015. — № 3. — С. 49-53. [Yakusheva EN, Chernykh IV, Shchulkin AV, Gatsanoga MV. Methods of identification of drugs as P-glycoprotein substrates.*Rossiiskii mediko-biologicheskii vestnik*. 2015;(3):49-53. (In Russ.)].
10. Гацанога М.В., Черных И.В., Щулькин А.В. и др. Можно ли оценивать принадлежность лекарственных веществ к субстратам гликопротеина-Р на самках кроликов породы шиншилла. // *Наука молодых (Eruditio juvenium)*. — 2016. — № 3. — С. 5-10. [Gatsanoga MV, Chernykh IV, Shchulkin AV, et al. The method of assessment of drugs belonging to the substrates of P-glycoprotein on female rabbits. *Nauka molodykh (Eruditio juvenium)*.2016;(3):5-10. (In Russ.)].
11. Каркищенко Н.Н., Хоронько В.В., Сергеева С.А., Каркищенко В.Н. *Фармакокинетика*. — Ростов-на-Дону: Феникс; 2001. [Karkishchenko NN, Khoronko VV, Sergeyeva SA, Karkishchenko VN. *Farmakokinetika*. Rostov-na-Donu: Feniks; 2001. (In Russ.)].
12. *Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств*. / Под ред. Миронова А.Н. — М.: Гриф и К, 2012. [Mironova AN, editor. *Rukovodstvo po provedeniyu doklinicheskikh issledovaniy lekarstvennykh sredstv*. — Moscow: Grif i K, 2012. (In Russ.)].
13. Якушева Е.Н., Черных И.В., Щулькин А.В. и др. Половые различия функциональной активности и экспрессии гликопротеина-Р у кроликов. // *Российский физиологический журнал им. И.М. Сеченова*. — 2014. — Т. 100. — № 8. — С. 944-952. [Yakusheva EN, Chernykh IV, Shchulkin AV, et al. Sex differences of P-glycoprotein functional activity and expression in rabbits. *Russian journal of physiology*. 2014;100(8):944-952. (In Russ.)].
14. Coles LD, Lee IJ, Voulalas PJ, Eddington ND. Estradiol and progesterone-mediated regulation of P-gp in P-gp overexpressing cells (NCI-ADR-RES) and placental cells (JAR). *Mol Pharm*. 2009;6(6):1816-1825. doi: 10.1021/mp900077q
15. Arias A, Rigalli JP, Villanueva SS, et al. Regulation of expression and activity of multidrug resistance proteins MRP2 and MDR1 by estrogenic compounds in Caco-2 cells. Role in prevention of xenobiotic-induced cytotoxicity. *Toxicology*. 2014;320:46-55. doi: 10.1016/j.tox.2014.03.007
16. Miao ZH, Ding J. Transcription factor c-Jun activation represses mdr-1 gene expression. *Cancer Res*. 2003;63(15):4527-4532.
17. Piekarz RL, Cohen D, Horwitz SB. Progesterone regulates the murine multidrug resistance mdr1b gene. *J Biol Chem*. 1993;268(11):7613-7616.
18. Mnif W, Pascussi JM, Pillon A, et al. Estrogens and antiestrogens activate hPXR. *Toxicol Lett*. 2007;170(1):19-29. doi: 10.1016/j.toxlet.2006.11.016
19. Kliewer SA, Moore JT, Wade L, et al. An Orphan Nuclear Receptor Activated by Pregnanes Defines a Novel Steroid Signaling Pathway. *Cell*. 1998;92(1):73-82. doi: 10.1016/s0092-8674(00)80900-9
20. Geick A, Eichelbaum M, Burk O. Nuclear receptor response elements mediate induction of intestinal MDR1 by rifampin. *J Biol Chem*. 2001;276(18):14581-14587. doi: 10.1074/jbc.M010173200

ИНФОРМАЦИЯ ОБ АВТОРАХ

***Щулькин Алексей Владимирович**, к.м.н. [Alexey V. Shchulkin, MD, PhD]; адрес: Россия, 390026, Рязань, ул. Высоковольтная, 9 [address: 9 Vysokovoltnaya street, Ryazan, 390026, Russia]; ORCID: http://orcid.org/0000-0003-1688-0017; eLibrary SPIN: 2754-1702; e-mail: alekseyshulkin@rambler.ru

Черных Иван Владимирович, к.б.н. [Ivan V. Chernykh, PhD]; ORCID: http://orcid.org/0000-0002-5618-7607; eLibrary SPIN: 5238-6165; e-mail:ivchernykh88@mail.ru

Мыльников Павел Юрьевич [Pavel Yu. Mylnikov]; ORCID: http://orcid.org/0000-0001-7829-2494; eLibrary SPIN: 8503-3082; e-mail: dukeviperlr@gmail.com

Уткин Дмитрий Олегович [Dmitry O. Utkin]; ORCID: http://orcid.org/0000-0002-6620-2073; eLibrary SPIN: 2368-7127; e-mail: riverflow49@gmail.com

Якушева Елена Николаевна, д.м.н., проф. [Elena N. Yakusheva, MD, PhD, professor]; ORCID: http://orcid.org/0000-0001-6887-4888, eLibrary SPIN: 2865-3080; e-mail: e.yakusheva@rzgmu.ru

ИНФОРМАЦИЯ

Рукопись получена: 25.12.2017. Одобрена к публикации: 28.01.2018.

КАК ЦИТИРОВАТЬ:

Щулькин А.В., Черных И.В., Мыльников П.Ю., Уткин Д.О., Якушева Е.Н. Влияние женских половых гормонов на функционирование белка-транспортера гликопротеина-Р в эксперименте. // *Проблемы эндокринологии*. — 2018. — Т. 64. — № 4. — С.144-150. doi: 10.14341/probl9545

TO CITE THIS ARTICLE:

Shchulkin AV, Chernykh IV, Mylnikov PY, Utkin DO, Yakusheva EN. Influence of female hormones on the P-glycoprotein functioning in the experiment. *Problems of Endocrinology*. 2018;64(4):144-150. doi: 10.14341/probl9545