

© Коллектив авторов, 2018
УДК 615.357.015.42

Щулькин А.В., Черных И.В., Якушева Е.Н., Никифоров А.А., Попова Н.М., Давыдов В.В.

Влияние эстрадиола на функциональную активность гликопротеина-Р в эксперименте

ФГБОУ ВО «Рязанский Государственный медицинский университет» Минздрава России, 390026, г. Рязань, Высоковольная ул., д. 9

Цель — изучение функциональной активности белка-транспортера гликопротеина-Р (P_{gr}) при овариоэктоми и последующем введении эстрадиола в эксперименте *in vivo*. **Методика.** Исследование выполнено на 23 кроликах-самках Шиншилла массой 4300—4700 г. 1-я группа — ложноперированные животные, 2-я — овариоэктоми, кроликам 3-й и 4-й групп с 15-х сут. после овариоэктоми перорально вводили эстрадиол в дозах 0,5 мг и 2 мг, соответственно. За 7 сут. до начала исследования, на 14-е, 28-е и 42-е сут. после оперативного вмешательства у всех животных определяли функциональную активность гликопротеина-Р по фармакокинетике его маркерного субстрата фексофенадина методом ВЭЖХ и сывороточные концентрации половых гормонов (эстрадиола, прогестерона, тестостерона) радиоиммунным методом. **Результаты.** Овариоэктоми приводила к снижению функциональной активности гликопротеина-Р, что проявлялось изменением фармакокинетики его маркерного субстрата фексофенадина: повышением C_{max} , AUC_{0-t} и снижением Cl. Введение эстрадиола в дозе 0,5 мг в течение 28 сут. на фоне овариоэктоми повышало функциональную активность гликопротеина-Р по сравнению с показателями группы «овариоэктоми», однако активность белка-транспортера оставалась сниженной по сравнению с исходными данными. Применение эстрадиола в дозе 2 мг на фоне овариоэктоми повышало функциональную активность гликопротеина-Р по сравнению с показателями группы «овариоэктоми», и восстанавливало активность белка-транспортера до показателей интактных животных. Корреляционных зависимостей между содержанием эстрадиола и функциональной активностью гликопротеина-Р выявлено не было. **Заключение.** Введение эстрадиола в низкой дозе стимулирует P_{gr} на уровне организма, но недостаточно для восстановления его исходной активности. Возможно, для полного восстановления функциональной активности P_{gr} до исходного уровня необходимо дополнительное введение прогестерона. При введении эстрадиола в высокой дозе, активность P_{gr} повышается до исходного, дооперационного уровня даже без нормализации содержания прогестерона.

Ключевые слова: гликопротеин-Р, АВСВ1-белок, функциональная активность, фексофенадин, ВЭЖХ, эстрадиол.

Для цитирования: Щулькин А.В., Черных И.В., Якушева Е.Н., Никифоров А.А., Попова Н.М., Давыдов В.В. Влияние эстрадиола на функциональную активность гликопротеина-Р в эксперименте. *Патологическая физиология и экспериментальная терапия*. 2018; 62(3): 80—86.

DOI: 10.25557/0031-2991.2018.03.80-86

Для корреспонденции: Щулькин Алексей Владимирович, канд. мед. наук, доцент каф. фармакологии с курсом фармации ФДПО ФГБОУ ВО РязГМУ Минздрава, e-mail: alekseyshulkin@rambler.ru

Финансирование. Работа поддержана грантом РФФИ 16-04-00320 а.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила 23.01.2018

Shchulkin A.V., Chernykh I.V., Yakusheva E.N., Nikiforov A.A., Popova N.M., Davydov V.V.

Effect of estradiol on P-glycoprotein functional activity in experiment

Ryazan State Medical University, 9 Vysokovoltynaya Str., 390026, Ryazan, Russia

The aim of the study was to evaluate the P-glycoprotein functional activity after ovariectomy followed by estradiol treatment. **Methods.** The study was conducted on 23 Chinchilla rabbits weighing 4300—4700 g. Group 1 underwent a sham surgery; Group 2 was ovariectomized; Groups 3 and 4 underwent ovariectomy followed by oral estradiol treatment (0.5 mg and 2 mg, respectively). On day 7 prior to the experiment and on days 14, 28, and 42 after the surgery, P-glycoprotein functional activity was determined in rabbits of all groups by measuring fexofenadine pharmacokinetics using HPLC and serum concentrations of sex hormones (estradiol, progesterone, testosterone) using the radio immune method. **Results.** Ovariectomy decreased the P-glycoprotein functional activity as evident from changes in the fexofenadine pharmacokinetics — increased C_{max} and AUC_{0-t} and decreased Cl. The estradiol administration at a dose of 0.5 mg for 28 days after ovariectomy increased the P-glycoprotein functional activity compared to the ovariectomy group; however, the P-glycoprotein functional activity remained lower than at baseline. The estradiol treatment at a dose of 2 mg after ovariectomy increased the P-glycoprotein functional activity compared to the ovariectomy group and restored the

P-glycoprotein functional activity to the value for intact animals. No correlations were found between the maintenance of estradiol content and the P-glycoprotein functional activity. **Conclusion.** The treatment with low-dose estradiol stimulated Pgp at the level of a whole body but was not sufficient to restore its original activity. Perhaps, for a complete recovery of the Pgp functional activity to the baseline level, additional administration of progesterone is required. When estradiol was administered at a high dose the Pgp activity increased to the baseline, preoperative level even without normalization of the progesterone content.

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

For citation: Shchulkin A.V., Chernykh I.V., Yakusheva E.N., Nikiforov A.A., Popova N.M., Davydov V.V. Influence of estradiol on P-glycoprotein functional activity at experiment. *Patologicheskaya Fiziologiya i Eksperimental'naya Terapiya. Pathological Physiology and Experimental Therapy, Russian Journal.* 2018; 62(3): 80—86. (in Russian). DOI: 10.25557/0031-2991.2018.03.80-86

For correspondence: *Aleksey V. Shchulkin*, Candidat of Medical Sciences, Associate Professor of the Department of Pharmacology with the course of Pharmacy, Ryazan State Medical University, 9, ul. Vysokovolt'naya, Ryazan, 390026, Russia, e-mail: alekseyshulkin@rambler.ru

Information about authors:

Shchulkin A.V., <http://orcid.org/0000-0003-1688-0017>

Chernykh I.V., <http://orcid.org/0000-0002-5618-7607>

Yakusheva E.N., <http://orcid.org/0000-0001-6887-4888>

Nikiforov A.A., <https://orcid.org/0000-0001-9742-4528>

Popova N.M., <http://orcid.org/0002-5166-8372>

Davydov V.V., <http://orcid.org/0000-0001-6479-7504>

Conflict of interest. The authors declare no conflict of interest. The article was not previously published.

Acknowledgments. The work is supported by a grant from the Russian Foundation for Basic Research 16-04-00320 a.

Received 23.01.2018

Введение

Гликопротеин-P (Pgp, ABCB1-белок) — АТФ-зависимый мембранный эффлюксный транспортер, способный удалять из клетки широкий спектр веществ различной химической структуры, в том числе лекарственные средства. Он экспрессируется в кишечнике, почках, печени и эндотелиальных клетках капилляров гистогематических барьеров, в том числе в мозге, семенниках и плаценте. Белок-транспортер препятствует абсорбции, участвует в экскреции (с мочой и желчью) и тканевом распределении веществ, являющихся его субстратами [1]. Повышенная экспрессия и функциональная активность Pgp в опухолевых клетках связана с феноменом их множественной лекарственной устойчивости [2].

Функциональная активность Pgp способна изменяться под влиянием различных веществ и факторов. Индукторы (рифампицин, глюкокортикостероиды, тироксин и др.) повышают активность данного белка-транспортера, а ингибиторы (верапамил, амиодарон, кетоконазол и др.) ее снижают, что может приводить к снижению эффективности терапии субстратами Pgp или к их относительной передозировке [1]. С другой стороны, способность лекарственных веществ ингибировать функциональную активность Pgp может использоваться в терапии онкологических заболеваний с целью преодоления множественной лекарственной устойчивости [2].

В ряде исследований на клетках линий LS180 (human colon cell line) человеческой карциномы яичника (NCI-ADR-RES) и линии клеток человеческой карциномы плаценты (JAR) было показано, что эстрогены (50 мкМ — 0,1 нМ) способны стимулировать активность и экспрессию Pgp [3, 4]. В то же время на клетках рака молочной железы, трансдуцированных геном MDR1, кодирующим Pgp, было показано, что эстрадиол в концентрациях 10 пМ—10 нМ снижает уровень белка Pgp (но не активность гена MDR1) [5]. Работы по изучению влияния эстрогенов на функционирование данного белка-транспортера на уровне целостного организма в научной литературе отсутствуют.

Цель исследования — изучить функциональную активность Pgp в эксперименте *in vivo* в условиях овариоэктомии и последующего введения эстрадиола.

Методика

Работа выполнена на 23 половозрелых кроликах-самках Шиншилла массой 4300—4700 г. 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 1 апреля 2016 г.) и одобрена этическим комитетом университета.

Все животные были разделены на 4 группы. Контрольная (1-я гр., $n = 5$) — «ложная операция»: вскрытие кожных покровов и подкожной жировой клетчатки передней брюшной стенки с последующим послойным ушиванием раны. Кроликам опытной группы проводили овариоэктомию (2-я гр., $n = 6$). Третьей группе животных ($n = 6$) выполняли овариоэктомию и с 15-х сут. после операции вводили эстрадиол («Прогинова» «Bayer Pharma AG», Германия) 10 мкг в дозе $0,5 \text{ мг}$ 1 раз в сут. в течение 4 нед. [6]. Кроликам 4-й группы ($n = 6$) выполняли овариоэктомию, с 15-х сут. вводили эстрадиол по той же схеме в дозе 2 мг . Овариоэктомию и «ложную» операцию выполняли в условиях операционной вивария РязГМУ под наркозом — в/м введением ксилазина гидрохлорида ($4,0\text{—}6,0 \text{ мг/кг}$, «Рометар», «СПОФА», Чехия) и зоветила-50 ($5\text{—}10 \text{ мг/кг}$, «Virbac», Франция).

За 7 сут. до начала исследования и на 14-е, 28-е и 42-е сут. после оперативного вмешательства у животных всех групп определяли функциональную активность P_{gr} и сывороточные концентрации половых гормонов (тестостерона, эстрадиола, прогестерона).

Функциональную активность P_{gr} оценивали по анализу фармакокинетики фексофенадина («Аллегра» «Sanofy Aventis», Франция) после его однократного перорального введения ($67,5 \text{ мг/кг}$, 5 мл на животное) в виде водной суспензии [7]. Для определения концентрации фексофенадина кровь в объеме 5 мл брали 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°C в течение 1 мес. Концентрацию фексофенадина в плазме крови кроликов определяли методом высокоэффективной жидкостной хроматографии на хроматографе «Стайер» (Россия) с УФ-детектором при длине волны 220 нм по ранее описанному методу [8].

С использованием модельнонезависимого метода [9] 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 ($\text{нг}\cdot\text{ч/мл}$); Cl — общий клиренс (л/ч). Концентрации половых гормонов определяли в ЦНИЛ РязГМУ радиоиммунным методом с применением стандартной тест-системы производства «IMMUNOTEST» (Чехия), с дальнейшей обработкой полученных результатов на анализаторе «Иммунотест» (Россия).

Полученные результаты обрабатывали с помощью программы «StatSoft Statistica 7.0» (США). Статистическую значимость 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 (фармакокинетические параметры) представлены в таблицах в виде среднего геометрического и его 95% доверительного интервала. Различия считали статистически значимыми при $p < 0,05$.

Дополнительно рассчитывали двухсторонний 90% доверительный интервал (ДИ) отношения средних геометрических фармакокинетических параметров фексофенадина на фоне воздействия (овариоэктоми, введения эстрадиола) к параметрам интактных животных (внутри групп), а также 90% ДИ отношения средних геометрических фармакокинетических параметров фексофенадина на фоне воздействия (введения эстрадиола) к параметрам животных, подвергнутых овариоэктоми. Согласно U.S. Food and Drug Administration, Center for Drug Evaluation and Research значимыми считаются различия между фармакокинетическими параметрами, если двухсторонний 90% ДИ их отношения находится за пределами диапазона $0,8\text{—}1,25$ ($80\text{—}125\%$), поскольку изменение фармакокинетических параметров только более чем на 25% может привести к изменению фармакодинамики препарата.

Результаты и обсуждение

Концентрация половых гормонов (тестостерона, прогестерона и эстрадиола) в сыворотке крови у животных разных групп до начала эксперимента статистически значимо не различалась.

При выполнении «ложной операции» гормональный статус кроликов (уровень тестостерона, эстрадиола, прогестерона в сыворотке крови) существенно не изменялся на протяжении всего эксперимента.

У животных 2-й группы по сравнению с исходными показателями отмечалось значимое снижение концентрации эстрадиола на 42-е сут. овариоэктоми — на $29,7\%$ ($p = 0,028$) (рис. 1), уменьшение концентрации прогестерона на 14-е сут. эксперимента на $30,9\%$ ($p = 0,028$), на 28-е сут. — на $54,9\%$ ($p = 0,028$), на 42-е сут. — на $48,7\%$ ($p = 0,028$) (рис. 2).

У кроликов 3-й группы (введение эстрадиола в дозе 0,5 мг на фоне овариоэктомии) на протяжении всего эксперимента концентрация эстрадиола статистически значимо не отличалась от показателей кроликов до операции (рис. 1). В тоже время концентрация прогестерона по сравнению со значениями интактных животных снижалась на 14-е сут. на 36,9% ($p = 0,075$), на 28-е сут. (14-е сут. введения эстрадиола) — на 67,1% ($p = 0,028$), на 42-е сут. (28-е сут. введения эстрадиола) — на 46,6% ($p = 0,028$) (рис. 2).

У животных 4-й группы (введение эстрадиола в дозе 2 мг на фоне овариоэктомии) на 14-е и 28-е сут. эксперимента концентрация эстрадиола статистически значимо не отличалась от показателей кроликов до овариоэктомии, а на 42-е сут. исследования (28-е сут. введения эстрадиола) превышала их на 55,2% ($p = 0,075$) (рис. 1). Содержание прогестерона снижалось на 14-е сут. исследования на 47,6% ($p = 0,028$), на 28-е сут. (14-е сут. введения эстрадиола) — на 58,7% ($p = 0,028$), на 42-е сут. (28-е сут. введения эстрадиола) — на 40,6% ($p = 0,028$) по сравнению со значениями интактных животных (рис. 2).

На 28-е сут. эксперимента (14-е сут. введения эстрадиола) содержание эстрадиола и прогестерона как в 3-й, так и в 4-й группах статистически значимо не отличалось от показателей животных 2-й группы (овариоэктомия). При этом на 42-е сут. исследования (28-е сут. введения эстрадиола) концентрация эстрадиола у животных, получавших препарат в дозе 0,5 мг, превосходила значения в группе овариоэктомии на 49,7% ($p = 0,004$), а у кроликов, получавших эстрадиол в дозе 2 мг, — на 76,2% ($p = 0,026$). Уровень прогестерона на 42-е сут. (28-е сут. введения эстрадиола) у кроликов, получавших эстрадиол в высокой дозе, превосходил показатели животных 2-й группы на 32,8% ($p = 0,075$).

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

Функциональную активность P_{gr} в исследовании оценивали по фармакокинетике его маркерного субстрата — фексофенадина. Фексофенадин — не подвергается биотрансформации и его фармакокинетика зависит от функционирования 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 P_{gr} на уровне целостного организма, и наоборот.

Фармакокинетические параметры фексофенадина у животных разных групп до начала эксперимента статистически значимо не различались. В группе

«ложнооперированных» животных фармакокинетические параметры фексофенадина статистически значимо не отличались от исходных показателей (до проведения «ложной операции») на протяжении всего эксперимента, что свидетельствует об отсутствии изменения функциональной активности P_{gr} на уровне целостного организма.

У животных 2-й группы на 14-е сут. овариоэктомии происходило увеличение C_{max} фексофенадина 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, $p = 0,05$) и снижение Cl в 3,07 раза (90% ДИ 1,05; 8,96, $p = 0,036$) по сравнению с параметрами интактных кроликов. На 28-е сут. после операции отмечалось снижение Cl в 1,92 раза (90% ДИ 1,15; 3,21, $p = 0,07$) по сравнению с интактными животными. На 42-е сут. овариоэктомии 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

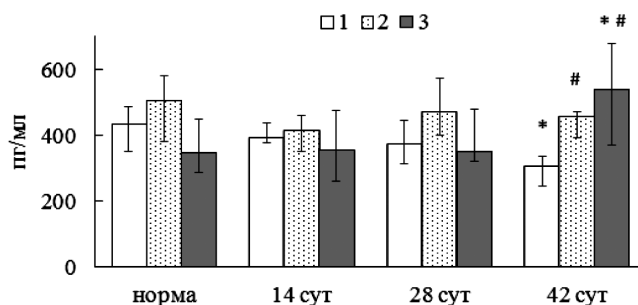


Рис. 1. Концентрация эстрадиола в сыворотке крови кроликов после овариоэктомии и последующего введения эстрадиола. Данные представлены в виде медианы, верхнего и нижнего квартилей: 1 — животные, подвергнутые овариоэктомии, 2 — животные, получавшие эстрадиол в дозе 0,5 мг, 3 — животные, получавшие эстрадиол в дозе 2 мг; * — статистически значимые отличия от показателей интактных животных (норма), $p < 0,05$, # — достоверные отличия от показателей животных, подвергнутых овариоэктомии.

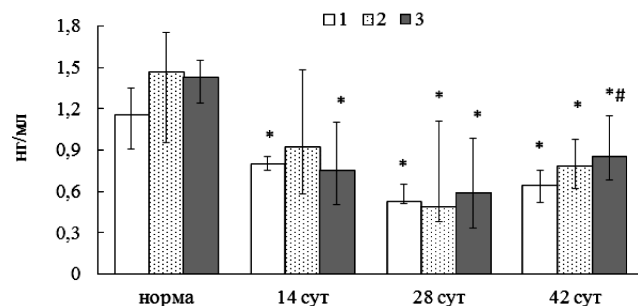


Рис. 2. Концентрация прогестерона в сыворотке крови кроликов после овариоэктомии и последующего введения эстрадиола. Данные представлены в виде медианы, верхнего и нижнего квартилей: 1 — животные, подвергнутые овариоэктомии, 2 — животные, получавшие эстрадиол в дозе 0,5 мг, 3 — животные, получавшие эстрадиол в дозе 2 мг; * — статистически значимые отличия от показателей интактных животных (норма), $p < 0,05$, # — статистически значимые отличия от показателей животных, подвергнутых овариоэктомии.

1,53; 3,28, $\rho = 0,0017$) и снижение Cl в 2,67 раза (90% ДИ 1,22; 5,88, $\rho = 0,06$) по сравнению с исходными показателями (таблица). Полученные изменения фармакокинетики фексофенадина свидетельствуют о снижении функциональной активности P_{gr} . При этом максимальные и клинически значимые различия (90% ДИ отношения средних геометрических фармакокинетических параметров фексофенадина у животных, подвергнутых овариоэктомии, к параметрам интактных животных находится вне диапазона 0,8—1,25) были получены на 42 сут. овариоэктомии, когда наблюдались наиболее выраженные гормональные нарушения.

Не было выявлено корреляции между концентрацией эстрадиола и изучаемыми фармакокинетическими параметрами маркерного субстрата P_{gr} , однако в то же время наблюдалась прямопропорциональная зависимость между содержанием прогестерона и общим клиренсом фексофенадина $R_s = 0,536$, $\rho = 0,007$, что свидетельствует о том, что снижение функциональной активности P_{gr} животных 2-й группы может быть связано с более низким уровнем прогестерона.

У животных 3-й группы на 14-е сут. овариоэктомии происходило повышение C_{max} фексофенадина в 1,6 раза (90% ДИ 0,87; 2,34, $\rho = 0,0638$), AUC_{0-t} — в 1,47 раза (90% ДИ 0,99; 2,15, $\rho = 0,045$) и снижение Cl в 1,85 раза (90% ДИ 1,12; 3,08, $\rho = 0,024$) по сравнению с исходными значениями до овариоэктомии. На 28-е сут. исследования (14-е сут. введения эстрадиола) C_{max} фексофенадина увеличивалась в 1,56 раза (90% ДИ 1,11; 2,19, $\rho = 0,024$), AUC_{0-t} — в 1,58 раза (90% ДИ 1,03; 2,42, $\rho = 0,019$), Cl снижался в 1,69 раза (90% ДИ 0,84; 3,33, $\rho = 0,056$) по сравнению с параметрами

интактных животных. На 42-е сут. эксперимента (28-е сут. введения эстрадиола) отмечалось повышение C_{max} в 1,43 раза (90% ДИ 0,93; 2,19, $\rho = 0,065$), AUC_{0-t} — в 1,46 раза (90% ДИ 0,88; 2,46, $\rho = 0,044$), Cl снижался в 1,66 раза (90% ДИ 0,84; 3,22, $\rho = 0,059$) по сравнению с исходными показателями до операции (таблица).

На 42-е сут. исследования C_{max} фексофенадина у животных 3-й группы была ниже аналогичного показателя кроликов 2-й группы в 2,33 раза (90% ДИ 1,54; 3,45, $\rho = 0,003$), AUC_{0-t} — в 2,27 раза (90% ДИ 1,56; 3,23, $\rho = 0,001$), Cl превышал показатель второй группы в 2,28 раза (90% ДИ 1,36; 3,85, $\rho = 0,014$).

Результаты показывают, что эстрадиол в низкой дозе (0,5 мг) стимулирует P_{gr} на уровне целостного организма, но недостаточно для восстановления его исходной активности. Возможно, для полного восстановления функциональной активности P_{gr} до исходного уровня необходимо дополнительное введение прогестерона. Сниженный сывороточный уровень прогестерона у животных третьей группы на протяжении всего эксперимента подтверждает данную гипотезу.

У животных 4-й группы на 14-е сут. овариоэктомии наблюдалось повышение AUC_{0-t} в 1,19 раза (90% ДИ 1,07; 1,32, $\rho = 0,027$) и снижение Cl в 1,16 раза (90% ДИ 1,04; 1,29, $\rho = 0,044$) по сравнению с фармакокинетическими параметрами кроликов до операции. На 28-е сут. исследования (14-е сут. введения эстрадиола) AUC_{0-t} фексофенадина увеличивалась в 1,24 раза (90% ДИ 1,02; 1,5, $\rho = 0,007$) по сравнению со значениями интактных животных. На 42-е сут. эксперимента фармакокинетические параметры фексофенадина статистически

Таблица

Фармакокинетические параметры фексофенадина при овариоэктомии и введении эстрадиола

		Сроки эксперимента			
		Исходные значения	14 сут.	28 сут.	42 сут.
C_{max} , нг/мл	Овариоэктомия	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 0,5 мг	203,4 (95,6; 432,7)	290,53 (168,06; 502,22)*	318,09 (210,04; 481,75)*	290,05 (216,47; 388,65)*#
	Эстрадиол 2 мг	240,02 (172,47; 334,03)	285,26 (217,04; 374,93)	288,72 (225,9; 368,95)	260,84 (222,30; 306,06)#
AUC_{0-t} , нг*ч/мл	Овариоэктомия	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 0,5 мг	2165,38 (1045,79; 4483,59)	3174,4 (2304,85; 4372,06)*	3423,54 (2127,7; 5508,69)*	3181,82 (2820,19; 3589,82)*#
	Эстрадиол 2 мг	2813,2 (2247,47; 3521,34)	3340,49 (2704,98; 4125,29)*	3491,85 (2882,27; 4230,36)*	3087,69 (2668,4; 3572,81)#
Cl , л/ч	Овариоэктомия	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 0,5 мг	22,89 (9,99; 52,46)	12,32 (9,64; 15,75)*	13,69 (8,45; 22,19)*	13,79 (11,09; 17,17)*#
	Эстрадиол 2 мг	16,14 (12,51; 20,81)	13,91 (11,45; 16,89)*	14,55 (12,20; 17,34)#	14,44 (11,63; 17,92)#

Примечание. * — статистически значимые отличия от исходных показателей, $p < 0,05$; # — статистически значимые отличия от показателей животных, подвергнутых изолированной овариоэктомии, $p < 0,05$. Параметры представлены в виде среднего геометрического и его 95%-ного доверительного интервала.

значимо не отличались от исходных значений до овариоэктомии (таблица).

У животных 4-й группы на 42-е сут. опыта C_{\max} фексофенадина была ниже аналогичного показателя кроликов 2-й группы в 2,56 раза (90% ДИ 1,69; 3,85, $p = 0,001$), AUC_{0-t} — в 2,33 раза (90% ДИ 1,62; 3,33, $p = 0,001$), Cl превышал показатель второй группы в 2,39 раза (90% ДИ 1,42; 4,03, $p = 0,01$). Cl был больше аналогичного показателя группы овариоэктомии также и на 28-е сут. опыта в 1,73 раза (90% ДИ 1,21; 2,47, $p = 0,017$) (таблица).

Полученные результаты свидетельствуют о том, что при введении эстрадиола в высокой дозе (2 мг), активность P_{gr} повышается до исходного, дооперационного уровня даже без нормализации содержания прогестерона.

Следует отметить, что при проведении корреляционного анализа в 3-й и 4-й группах не было выявлено взаимосвязи между концентрациями эстрадиола, прогестерона и изучаемыми фармакокинетическими параметрами фексофенадина.

Выявленная в ходе исследования динамика активности P_{gr} согласуется с полученными нами ранее данными о более низкой активности P_{gr} у самцов кроликов Шиншилла по сравнению с самками [10]. Видимо, одной из причин половых различий в функциональной активности белка-транспортера может являться стимулирующее влияние эстрадиола и прогестерона на функциональную активность P_{gr} .

Согласно данным литературы, функционирование P_{gr} может изменяться в результате непосредственного изменения его активности либо модификации экспрессии гена белка-транспортера [11, 12]. На линии клеток LS180 (human colon cell line) было показано, что через 72 ч инкубации бета-эстрадиол в концентрации 50 мкМ повышает экспрессию мРНК гена MDR1, кодирующего P_{gr} в 1,4 раза [3]. На линии клеток человеческой карциномы яичника (NCI-ADR-RES), которые не содержат эстрогеновый рецептор ER α , было показано, что экспрессия P_{gr} не изменяется при воздействии низких концентраций эстрадиола (10^{-10} — 10^{-8} М), но увеличивается в 2,4 раза под действием высоких концентраций (10^{-7} — 10^{-6} М). На линии клеток человеческой карциномы плаценты (JAR), содержащих высокие концентрации ER α и ER β , индукция P_{gr} наблюдалась также при низких концентрациях эстрадиола 10^{-9} М. Так как клетки NCI-ADR-RES экспрессируют ER β на относительно высоком уровне, индукция P_{gr} при высоких концентрациях эстрадиола может быть опосредована ER β . Поиск в области промотора гена MDR1 человека места связывания с эстрогеновыми рецепторами с использованием базы данных

TRANSFAC выявил присутствие предполагаемого estrogen response element выше сайта инициации транскрипции [4].

В то же время [13] при проведении аналогичного анализа с использованием базы данных TFSEARCH не было обнаружено estrogen response element в промоторе гена MDR1. Однако в данном анализе были обнаружены сайты связывания для транскрипционного фактора AP-1, что указывает на возможность опосредованного действия эстрадиола на экспрессию P_{gr} . 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 [14].

Эстрогены в высоких концентрациях 10 мкМ также способны действовать как типичные ксенобиотики и взаимодействовать с другими типами ядерных рецепторов, такими как прегнан X-рецептор (PXR), который повышает экспрессию гена MDR1 [15].

Таким образом, можно предположить, что в нашем исследовании эстрадиол стимулировал активность P_{gr} в низкой дозе, действуя через эстрогеновые рецепторы, а в высокой дозе — дополнительно влияя на PXR.

Выводы

Овариоэктомия у кроликов Шиншилла приводит к снижению функциональной активности белка-транспортера гликопротеина-Р, что проявляется изменением фармакокинетики его маркерного субстрата-фексофенадина: повышением C_{\max} , AUC_{0-t} и снижением Cl . Введение эстрадиола в низкой дозе (0,5 мг) в течение 28 сут. на фоне овариоэктомии повышает функциональную активность гликопротеина-Р по сравнению с показателями группы овариоэктомии, однако активность белка-транспортера остается сниженной по сравнению с исходными данными. Применение эстрадиола в высокой дозе (2 мг) на фоне овариоэктомии повышает функциональную активность гликопротеина-Р по сравнению с показателями группы овариоэктомии, и восстанавливает активность белка-транспортера до показателей интактных животных.

References

1. Yakusheva E.N., Chernyh I.V., Shchulkin A.V., Popova N.M. P-Glycoprotein: structure, physiological role and molecular mechanisms of modulation functional activity. *Uspekhi fiziologicheskikh nauk*. 2014; 45 (4): 89-98. (in Russian)
2. Gottesman M.M. Mechanisms of cancer drug resistance. *Annu. Rev. Med.* 2002; 53: 615-27.

3. Kim W.Y., Benet L.Z. P-glycoprotein (P-gp/MDR1)-Mediated Efflux of Sex-Steroid Hormones and Modulation of P-gp Expression In Vitro. *Pharmac. Res.* 2004; 21(7): 1284-93.
4. Coles L.D., Lee I.J., Voulalas P.J., Eddington N.D. 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): 1816-25.
5. Mutoh K., Tsukahara S., Mitsuhashi J., Katayama K., Sugimoto Y. Estrogen-mediated post transcriptional down-regulation of P-glycoprotein in MDR1-transduced human breast cancer cells. *Cancer Sci.* 2006; 97(11): 1198-204.
6. Haines C., James A., Sahota D., Chen Z.Y., Panesar N., Tomlinson B., Chow L., Benzie I., Husband A. Comparison between phytoestrogens and estradiol in the prevention of atheroma in ovariectomized cholesterol-fed rabbits. *Climacteric.* 2006; 9: 430-6.
7. Yakusheva E.N., Chernykh I.V., Shchulkin A.V., Gatsanoga M.V. Methods of identification of drugs as P-glycoprotein substrates. *Rossiyskiy mediko-biologicheskii vestnik imeni akademika I.P. Pavlova.* 2015; 3: 49-53. (in Russian)
8. Gatsanoga M.V., Chernykh I.V., Shchulkin A.V., Yakusheva E.N., Popova N.M. 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 Russian)
9. Karkishchenko N.N., Horon'ko V.V., Sergeeva S.A., Karkishchenko V.N. *Pharmacokinetics [Farmakokinetika].* Rostov-na-Donu: Feniks, 2001. (in Russian)
10. Yakusheva E.N., Chernykh I.V., Shchulkin A.V., Kotlyarova A.A., Nikiforov A.A. Sex differences of P-glycoprotein in functional activity and expression in rabbits. *Rossiyskiy fiziologicheskii zhurnal imeni I.M. Sechenova.* 2014; 10 (8): 944-52. (in Russian)
11. Bauer B., Hartz A.M.S., Fricker G., Miller D.S. Modulation of P-Glycoprotein transport function at the blood-brain barrier. *Exp. Biol. Med.* 2000; 230 (2): 118-27.
12. Lee S.D., Osei-Twum J., Wasan K.M. Dose-dependent targeted suppression of P-glycoprotein expression and function in Caco-2 cells. *Mol. Pharm.* 2013; 10 (6): 2323-30.
13. Arias A., Rigalli J.P., Villanueva S.S., Ruiz M.L., Luquita M.G., Perdomo V.G. 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.
14. Miao Z.H., Ding J. Transcription factor c-Jun activation represses mdr-1 gene expression. *Cancer Res.* 2003; 63 (15): 4527-32.
15. Geick A., Eichelbaum M., Burk O. Nuclear Receptor Response Elements Mediate Induction of Intestinal MDR1 by Rifampin. *J. Biolog. Chemistry.* 2001; 276: 14 581-87.

Сведения об авторах

Шулькин Алексей Владимирович, канд. мед. наук, доцент каф. фармакологии с курсом фармации ФДПО ФГБОУ ВО РязГМУ Минздрава России, e-mail: alekseystulkin@ Rambler.ru

Черных Иван Владимирович, канд. биол. наук, ассистент каф. общей и фармацевтической химии ФГБОУ ВО РязГМУ Минздрава России, e-mail: ivchernykh88@mail.ru

Якушева Елена Николаевна, доктор мед. наук, проф., зав. каф. фармакологии с курсом фармации ФДПО ФГБОУ ВО РязГМУ Минздрава России, e-mail: e.yakusheva@rzgmu.ru

Никифоров Александр Алексеевич, канд. мед. наук, доцент каф. фармакологии с курсом фармации ФДПО ФГБОУ ВО РязГМУ Минздрава России, e-mail: alnik003@yandex.ru

Попова Наталья Михайловна, канд. мед. наук, ст. преподаватель каф. фармакологии с курсом фармации ФДПО ФГБОУ ВО РязГМУ Минздрава России, e-mail: p34-66@yandex.ru

Давыдов Виктор Викторович, докт. мед. наук, проф., каф. патофизиологии ФГБОУ ВО РязГМУ Минздрава России, e-mail: davydov.vikt@yandex.ru