

ФАРМАКОЛОГИЯ РЕПРОДУКТИВНОЙ СИСТЕМЫ

ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ НОВОГО ГЕСТАГЕННОГО СОЕДИНЕНИЯ 17 α -АЦЕТОКСИ-3 β -БУТАНОИЛОКСИ-6-МЕТИЛ-ПРЕГНА-4,6-ДИЕН-20-ОН (АБМП) С БЕЛКАМИ КРОВИ ЧЕЛОВЕКА И ЭМБРИОНАЛЬНОЙ ТЕЛЯЧЬЕЙ СЫВОРОТКИ

В. Б. Ветчинкина, А. В. Семейкин, В. М. Ржезников, Н. Л. Шимановский¹

Изучено взаимодействие стероидов с гестагенной активностью [прогестерона, медроксипрогестерона ацетата (МПА) и нового синтетического гестагена 17 α -ацетокси-3 β -бутаноилокси-6-метил-прегна-4,6-диен-20-она (АБМП)] с сывороточным альбумином и глобулинами крови человека и эмбриональной телячьей сыворотки. Взаимодействие изучаемых гестагенов с неспецифическими участками связывания белков крови изучали методом флуоресцентных зондов, а со специфическими участками связывания — методом радиометрии. Средство нового гестагенного соединения АБМП к неспецифическим участкам связывания сравнимо с МПА и прогестероном, а к специфическим участкам связывания много слабее (в 39,4; 4,6 раза соответственно), что может приводить к более эффективному действию исследуемого гестагенного соединения на органы-мишени.

Ключевые слова: гестагены, сывороточный альбумин, глобулины

ВВЕДЕНИЕ

Гестагены, используемые в медицине для регуляции репродукции и в терапии заболеваний женской половой сферы, обладают выраженным физико-химическим сродством к различным белкам плазмы крови (специфическое связывание: секс (половой) стероид-связывающий глобулин, кортикостероид-связывающий глобулин (транскортин), прогестерон-связывающий глобулин; неспецифическая связывающая система- сывороточный альбумин человека, САЧ).

Связывание с белками крови играет существенную роль в реализации специфической фармакологической активности указанных соединений [2], влияя на процессы их распределения в организме и взаимодействия с клетками-мишенями (матка, яичники, молочная железа). Взаимодействие с сывороточными белками может снижать концентрацию свободного (биологически активного) стероида в крови *in vivo*, а также *in vitro* при использовании клеточных культур для определения активности соединений, так как инкубационные среды (телячья эмбриональная сыворотка, ТЭС), содержат альбумины и глобулины. Выявление способности новых гестагенных соединений взаимодействовать с белками крови необходимо для прогнозирования их активности в организме и адекватной оценки результатов тестирования на моделях *in vitro*.

В проведенных ранее исследованиях нового стероидного соединения 17 α -ацетокси-3 β -бутаноилокси-6-метил-прегна-4,6-диен-20-она (АБМП), полученного в эндокринологическом научном центре (ЭНЦ) и онкологическом научном центре (ОНЦ) РАМН (В. М. Ржезников и соавт.), обнаружена его высокая специфическая гестагенная активность при отсутствии заметной андрогенной и эстрогенной активности [3].

Настоящее исследование посвящено изучению способности АБМП связываться с белками крови в сравнении с прогестероном и медроксипрогестерона ацетатом (МПА).

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

В работе использовали следующие реактивы и химические соединения: эмбриональная телячья сыворотка (“Sigma”, США); сывороточный альбумин человека (“Sigma”, США); диметилсульфоксид (Россия); 1-Cl-2,4 динитрохлорбензол (“Sigma”, США); K₂HPO₄ (Россия); ³H-прогестерон, (³H-P₄, “Amersham”, Великобритания); трис-HCl (“Merck”, Германия); тритон X-100 (Россия); РОРОР — 1,4-бис-2-метил-5-фениллоксизалилбензол — (“Serva”, Германия); PPO — 2,5-дифенилоксазол (“Serva”, Германия); KCl, K₂HPO₄, ТХУ, толуол (хч, Россия); медроксипрогестерона ацетат (Россия); прогестерон (“Sigma”, США); АБМП (ОНЦ и ЭНЦ РАМН); ЭДТА, динатриевая соль (Россия); ДТТ (диэтил-три-этол) (Россия), уголь Norit А. Взаимодействие изучаемых гестагенов с неспецифической транспортной системой крови проводили методом флуоресцентных зондов. Измерение парамет-

¹ Кафедра молекулярной фармакологии и радиобиологии (зав. — чл.-корр. РАМН Н. Л. Шимановский) медико-биологического факультета ГОУ ВПО РГМУ Росздрава, Москва, 117869, ул. Островитянова, 1.

ров флуоресценции зонда 1-анилинонафталино-8-сульфаната (АНС) при связывании с САЧ, белками телячьей эмбриональной сыворотки и плазмы крови человека (Научный центр хирургии – НИЦХ РАМН) проводили по методу, описанному Ю. А. Владимировым и Г. Е. Добрецовым (1980), в модификации и регистрировали с помощью спектрофлуориметра MPF-3 “Hitachi” (Япония).

В эксперименте раствор АНС 10^{-5} М в кювете объемом 2 мл (на 0,1 М фосфатном буфере, pH 7,4) титровали раствором САЧ ($5,4 \cdot 10^{-4}$ М) (на 0,1 М фосфатном буфере, pH 7,4), плазмой крови человека ($6,31 \cdot 10^{-4}$ М — содержание сывороточного альбумина) или эмбриональной телячьей сывороткой ($3,57 \cdot 10^{-4}$ М — содержание сывороточного альбумина). Титрование проводили без добавления гестагенов (прогестерон, АБМП, медроксипрогестерона ацетат) и с добавлением их в концентрации 10^{-4} М – 10^{-6} М. Исходные концентрации гестагенов 10^{-2} М готовили на C_2H_5OH (96 %). Чтобы избежать тушения флуоресценции (-ОН) группой, C_2H_5OH предварительно испаряли. Раствор АНС приготавливали непосредственно перед употреблением из кристаллической соли $(АНС)_2Mg_2H_2O$.

Титрование проводили при температуре $25^\circ C$.

Флуоресценция возбуждалась светом с длиной волны 380 нм, измерение флуоресценции проводили при длине волны 480 нм.

Соответствующие концентрации свободного (c_i) и связанного АНС (r_i) находили по формулам:

$$R_i = F_i / F_{\max}$$

$$C_i = a_i - r_i,$$

где F_{\max} — предельная величина интенсивности флуоресценции; F_i — интенсивность флуоресценции при добавлении порции АНС (a_i) к белку, имеющему постоянную молярную концентрацию (P); C_i — концентрация свободного АНС, R_i — концентрация связанного с белком АНС.

Параметры связывания определяли из линейной аппроксимации кривых связывания в двойных обратных координатах ($1/c$, $1/r$) согласно модели некооперативного связывания на одинаковых участках:

$$1/r = 1/K_{\text{acc}} N_c + 1/N,$$

где N — концентрация участков связывания в исследуемом растворе, K_{acc} — константа ассоциации, которая характеризует силу связывания АНС с белками плазмы крови. В данном случае K_{acc} и n (число мест связывания зонда на одной молекуле белка) находили, используя кривую флюориметрического титрования АНС белком. При этом в каждой точке кривой титрования мы имеем различные концентрации центров связывания N_i , а именно:

$$N_i = nP_i,$$

где P_i — молярная концентрация белка (исходя из молярной концентрации 70 Da).

Тогда уравнение можно записать в виде $P_i/r_i = 1/K_{\text{acc}} n c_i + 1/n$,

что позволяет определить K_{acc} и n по линейной аппроксимации экспериментальной кривой.

В качестве эталона флуоресценции использовали раствор 10^{-5} М АНС в бутаноле, квантовый выход зонда в котором равен 0,66.

Наряду с САЧ участие в связывании стероидных гормонов с компонентами крови принимает специфическая транспортная система крови. Способность соединений конкурировать с 3H -меченным прогестероном (3H -P₄) за связывание (относительная конкурентная способность) со специфической транспортной системой крови человека и телячьей эмбриональной сывороткой оценивали по методу Л. С. Бассалык [1] в модификации. В пробирки, приготовленные для инкубации, помещали спиртовой раствор 3H -P₄ (50 нМ), спиртовой раствор исследуемого соединения в концентрациях от 10^{-8} до 10^{-3} М и 100 мкл разведенной (концентрация белка в растворе при использовании метода адсорбции на угле, покрытом декстраном, дол-

Таблица 1. Параметры связывания зонда АНС с белками плазмы в присутствии изучаемых гестагенов

Гестаген	САЧ, $K_{\text{acc}},$ $\cdot 10^6 \text{ M}^{-1}$	Плазма крови человека $\cdot 10^6 K_{\text{acc}},$ M^{-1}	ЭТС $K_{\text{acc}},$ $\cdot 10^6 \text{ M}^{-1}$	САЧ, N	Плазма крови человека, n	ЭТС, n	Связывающая емкость		
							САЧ	плазма крови человека	ЭТС
АБМП 10^{-5} М	$0,312 \pm 0,056^*$	$0,782 \pm 0,025$	$0,214 \pm 0,047^*$	$1,24 \pm 0,21$	$0,65 \pm 0,15$	$2,2 \pm 0,21$	$0,386 \pm 0,13$	$0,508 \pm 0,09^*$	$0,478 \pm 0,21$
АБМП 10^{-6} М	$0,333 \pm 0,052^*$	$0,771 \pm 0,027^*$	$0,212 \pm 0,040^*$	$1,19 \pm 0,19$	$0,66 \pm 0,15$	$2,22 \pm 0,2$	$0,396 \pm 0,12^*$	$0,508 \pm 0,09^*$	$0,47 \pm 0,12$
МПА, 10^{-5} М	$0,352 \pm 0,012$	$0,263 \pm 0,056^*$	$0,193 \pm 0,01^*$	$1,58 \pm 0,30$	$2,16 \pm 0,19$	$1,97 \pm 0,2$	$0,556 \pm 0,156$	$0,568 \pm 0,123^*$	$0,38 \pm 0,1$
МПА, 10^{-6} М	$0,350 \pm 0,06$	$0,530 \pm 0,15^*$	$0,273 \pm 0,51$	$1,38 \pm 0,55$	$1,48 \pm 0,2$	$1,97 \pm 0,2$	$0,483 \pm 0,3$	$0,784 \pm 0,18^*$	$0,537 \pm 0,36$
Прогестерон, 10^{-5} М	$0,116 \pm 0,250^*$	$0,709 \pm 0,01^*$	$0,203 \pm 0,04^*$	$2,26 \pm 0,21$	$2,00 \pm 0,10$	$1,98 \pm 0,15$	$0,262 \pm 0,23^*$	$1,418 \pm 0,06^*$	$0,401 \pm 0,1$
Прогестерон, 10^{-6} М	$0,365 \pm 0,05$	$0,880 \pm 0,023$	$0,240 \pm 0,12$	$1,34 \pm 0,61$	$1,63 \pm 0,18$	$1,80 \pm 0,17$	$0,489 \pm 0,33$	$1,434 \pm 0,2^*$	$0,432 \pm 0,145$
Контроль (титрование без гестагенов)	$0,390 \pm 0,04$	$0,880 \pm 0,03$	$0,270 \pm 0,30$	$1,48 \pm 0,21$	$2,39 \pm 0,21$	$1,74 \pm 0,21$	$0,577 \pm 0,125$	$2,103 \pm 0,12$	$0,469 \pm 0,12$

Примечание. n — число участков связывания, K_{acc} — константа связывания АНС с белками крови, * — отличия от контроля статистически достоверны при $p < 0,05$.

жна быть в пределах 2 – 4 мг/мл) плазмы крови человека (эмбриональной телячьей сыворотки). Инкубировали 2 ч, после чего добавляли 100 мкл ТЭД-буфера с 50 % глицерином, встряхивали и инкубировали еще 2 ч. Далее добавляли по 200 мкл суспензии активированного угля (0,5 % угля Norit А, 0,05 % декстрана Т-70 в ТЭД-буфере, рН 7,4 с 30 % глицерином), тщательно встряхивали и инкубировали 30 мин. Затем пробы центрифугировали в течение 15 мин при 1500 г. Отбирали из каждой пробы по 100 мкл надосадочной жидкости во флаконы с 5 мл сцинтилляционной жидкости на основе диоксана и радиометрировали.

Величину связывания стероидных гормонов с белками крови выражали в фМ гормона, связанного одним 1 мг белка крови. Эту величину рассчитывали по формуле:

$$N = (T - NSB) \cdot K / (2,22 \cdot A \cdot C),$$

где N — связывание (фМ/мг белка); T — средняя величина общего (в отсутствии конкурента) связывания меченого гормона в имп/мин, регистрируемых β -радиометром; NSB — средняя величина неспецифического (в присутствии конкурента) связывания в аналогичной аликвоте в имп/мин, регистрируемых β -радиометром; K — коэффициент, учитывающий разведение пробы суспензией угля и эффективность счета β -радиометра; 2,22 — коэффициент пересчета из имп/мин, регистрируемых β -радиометром, в Кюри/мМ; A — удельная радиоактивность ^3H -стероида в Кюри/мМ; C — концентрация белка в аликвоте в мг/мл.

Относительную конкурентную способность соединений рассчитывали по формуле:

$$\text{ОКС} = [E] \cdot 100 \% / [I],$$

где [E] — концентрация прогестерона, вытесняющая ^3H -P₄ из комплексов с P₄-специфическими связывающими участками на 50 %; [I] — концентрация соединения, при которой наблюдается 50 % вытеснение прогестерона из комплексов с P₄-специфическими связывающими участками.

Таблица 2. Параметры специфического связывания гестагенов (в %)

Гестаген	ОКС	Вытеснение изучаемым гестагеном P ₄ из связи с белками плазмы
МПА (плазма крови)	8,0 ± 0,09*	98,6 ± 1,9
МПА (ЭТС)	6,0 ± 0,04*	95,6 ± 1,5
АБМП (плазма крови)	0,21 ± 0,015*	90,1 ± 2,0
АБМП (ЭТС)	1,39 ± 0,09*	89,3 ± 2,2

Примечание. ОКС, % — общая величина связывания; * — достоверное отличие ОКС, % МПА от RBA % АБМП в соответствующих исследуемых объектах — плазме крови человека и эмбриональной телячьей сыворотке при $p < 0,05$. P₄ — ^3H -меченный прогестерон (^3H -P₄).

Статистическую обработку результатов проводили с помощью пакета программ Windows, ошибки средних значений рассчитывали с достоверностью $p < 0,05$ по t -критерию Стьюдента.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Результаты определения параметров связывания 1-анилинонафталино-8-сульфата (АНС) с белками плазмы без изучаемых гестагенов и в их присутствии представлены в табл. 1. Данные регистрируемой интенсивности флуоресценции АНС в растворах белков крови были обработаны методом двойных обратных координат и по ним были найдены параметры связывания зонда АНС с белками плазмы крови.

Параметры связывания АНС с белками крови показывают, что новое соединение АБМП (10^{-5} – 10^{-6} М) в плазме крови человека и телячьей эмбриональной сыворотке меньше, чем препараты сравнения МПА и прогестерон, влияет на изменение K_{acc} , число участков при этом не изменяется.

Данные (табл. 1) показывают, что АБМП в концентрации 10^{-5} М меньше (на $60,2 \pm 5,3$ %; при $p < 0,05$), чем препарат сравнения прогестерон снижает сродство АНС к САЧ; к белкам плазмы крови — на 59 и 7,13 % по сравнению с МПА и прогестероном соответственно, при $p < 0,05$. Нет достоверных различий между влиянием АБМП на параметры связывания АНС с белками ЭТС и препаратами сравнения МПА и прогестероном.

В ходе изучения способности нового гестагена и препаратов сравнения связываться со специфической транспортной системой крови, представленной глобулинами [5, 6], были получены данные, представленные в табл. 2. ОКС (в %) характеризует способность соединения вытеснять P₄ из связи его со специфической транспортной системой крови.

Контрольные эксперименты с САЧ по аналогичной методике показали отсутствие специфического связывания с ним P₄ и изучаемых стероидов.

Приведенные данные показывают, что ОКС % МПА выше, чем ОКС % АБМП ($p < 0,05$), что свидетельствует о большей силе связывания МПА со специфической транспортной системой крови. На основе экспериментов по изучению способности нового гестагенного соединения и препаратов сравнения можно сделать заключение о том, что АБМП слабее, чем препараты сравнения МПА и прогестерон взаимодействует со специфической и неспецифической транспортными системами крови и поэтому сильнее может оказывать свое биологическое действие, что и проявилось при изучении его противоопухолевого и гестагенного действия [4].

Следует подчеркнуть, что разница между МПА и АБМП в связывании с белками много сильнее выражена в случае его специфического связывания, которое имеет основное значение в определении взаимодействия стероида с клетками-мишенями.

Таким образом, АБМП в меньшей степени взаимодействует с белками крови, чем природный прогестерон и синтетический гестагенный препарат МПА, что может способствовать увеличению его свободной концентрации и, как следствие, фармакологической активности в организме.

ВЫВОДЫ

1. АБМП слабее влияет на сродство 1-анилинонафталино-8-сульфаната (АНС) к сывороточному альбумину человека, чем препарат сравнения прогестерон. В плазме крови человека данный эффект АБМП по сравнению с медроксипрогестерона ацетатом (МПА) и прогестероном слабее на 59 и 7,13 % соответственно. Достоверных различий влияния АБМП с МПА и прогестероном на взаимодействие АНС с эмбриональной телячьей сывороткой не выявлено.

2. АБМП в меньшей степени, чем препарат сравнения МПА (в 39,4 и 4,6 раза соответственно) вытесняет меченый прогестерон из участков его специфического

связывания с транспортными белками крови человека и эмбриональной телячьей сыворотки, что может приводить к более эффективному действию АБМП на органы-мишени.

ЛИТЕРАТУРА

1. Л. С. Бассалык, *Рецепторы стероидных гормонов в организме человека*, Медицина, Москва (1987).
2. П. В. Сергеев, П. А. Галенко-Ярошевский, Н. Л. Шимановский, *Очерки биохимической фармакологии*, 9-е изд., РЦ "Фармединфо", Москва (1996).
3. П. В. Сергеев, А. В. Семейкин, Н. Л. Шимановский, *Хим.-фарм. ж.*, **39**(7), 20 – 22 (2005).
4. П. В. Сергеев, А. В. Семейкин, Т. А. Федотчева и др., *Экспер. и клин. фармакол.*, № 4, 54 – 56 (2004).
5. Irina Grishkovskaya, George V. Avvakumov, *Gisela Sklenar*, изд. 505 (2000).
6. George V. Avvakumov, Irina Grishkovskaya, *Yves A. Muller*, изд. 277 (2001).

Поступила 28.09.07

INTERACTION OF THE NEW GESTAGEN COMPOUND 17 α -ACETOXY-3 β -BUTANOYLOXY-6-METHYLPREGNA-4,6-DIEN-20-ON WITH HUMAN BLOOD PROTEINS AND CALF EMBRYO SERUM

V. B. Vetchinkina, A. V. Semeikin, V. M. Rzheznikov, and N. L. Shimanovskii

Department of Molecular Pharmacology and Radiobiology, State Medical University, ul. Ostrovityanova 1, Moscow, 117869 Russia

Molecular mechanisms of sex hormones (progesterone, medroxyprogesterone acetate (MPA), and new synthetic gestagen 17 α -acetoxy-3 β -butanoyloxy-6-methylpregna-4,6-dien-20-on (ABMP) with human serum albumin, globulins, and calf embryo serum were studied. The binding of ABMP to albumin and progesterone-binding proteins were investigated using spectroscopic techniques (with the use of 1-anilino-8-naphthalenesulfonate as fluorescent probe) and radiolabeled progesterone, (either progesterone or MPA as comparative progestines). There is no difference between the non-specific binding of ABMP, progesterone, and MPA, but the ABMP binding is much smaller as compared to the binding of progestines, so that the new progestine ABMP will produce a more effective action on the target tissue than comparative progestines.