

чение нескольких дней в больнице. После операции больные постепенно начинают чувствовать себя лучше: у них улучшается настроение, возрастает мышечная сила, исчезают другие симптомы заболевания. Однако необходимо набраться терпения! В течение некоторого времени после операции может потребоваться введение гормона (гидрокортизона, кортизона, преднизолона) в инъекциях или таблетках, поскольку после операции значительно снижается выделение АКТГ гипофизом.

Другим методом лечения болезни Иценко—Кушинга является протонотерапия (подробнее см. "Лучевая терапия" // Пробл. эндокринолог. — 1997. — № 2). После проведения по-

добного лечения многие пациенты полностью излечиваются. Однако в тяжелых случаях возникает необходимость в хирургическом удалении одного или обоих надпочечников. Данная операция называется адреналэктомией. Разрез производят на животе или в области поясницы. После двусторонней (а иногда и односторонней) адреналэктомии обязательно требуется постоянный прием глюкокортикоидных препаратов (см. "Динамическое наблюдение" и другие разделы // Пробл. эндокринолог. — 1997. — № 2).

Поступила 06.01.97

♦ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЭНДОКРИНОЛОГИЯ

© В. П. ФЕДОТОВ, 1997

УДК 615.357:577.175.62].076

В. П. Федотов

ИЗУЧЕНИЕ БИОЛОГИЧЕСКИХ СВОЙСТВ СТРУКТУРНЫХ АНАЛОГОВ ПОЛОВЫХ СТЕРОИДОВ С ЦЕЛЬЮ СОЗДАНИЯ ЛЕКАРСТВЕННЫХ ПРЕПАРАТОВ¹

Эндокринологический научный центр (дир. — акад. РАМН И. И. Дедов) РАМН, Москва

Представлены результаты исследования биологических свойств структурных аналогов половых стероидов. Изменение химической структуры половых гормонов позволило выявить ряд соединений — потенциальных лекарственных препаратов с анаболическим, противоопухолевым, контрацептивным действием. Некоторые сильные эстрогены могут быть использованы в медицинской практике в заместительной терапии. Подробно излагаются биологические характеристики нитроксипроизводного этинилэстрадиола — нистранола, обладающего чрезвычайно высоким индексом контрацепции (в 4,6 раза выше, чем у этинилэстрадиола). В результате проведенных исследований предложен новый отечественный двухкомпонентный оральный контрацептив "Нитрогест". Гестагенным компонентом препарата является ацетомепрегенол (синтезированный в Научно-исследовательском химико-фармацевтическом институте), а эстрогенным — нистранол, заменивший традиционный этинилэстрадиол в аналогичных препаратах, использующихся в настоящее время.

Biological properties of structural analogs of sex steroids are studied. Alteration of the chemical structure of sex steroids helped single out a number of potential drugs possessing anabolic, antitumor, and contraceptive effects. Some potent estrogens may be used for replacement therapy. The biological characteristics of nitroxy derivative of ethynylestradiol nistranol are described in detail. This agent is characterized by an extremely high contraception index (4.6 times higher than ethynylestradiol). A new Russian two-component oral contraceptive Nitrogest has been developed, with the gestagenic component acetomepregnol synthesized at the Research Chemical Pharmaceutical Institute and the estrogen nistranol replacing the traditional ethynylestradiol.

Излагаемые ниже материалы являются результатом многолетнего творческого сотрудничества коллективов лаборатории биологических исследований гормональных соединений и лаборатории химии стероидов и простагландинов (зав. — проф. К. К. Пивницкий) Института экспериментальной эндокринологии Эндокринологического научно-го центра РАМН.

Основными объектами изучения являлись структурные аналоги половых стероидных гормонов. Исследования преследовали 2 цели: теоретическую — изучение структурно-функциональных отношений в молекулах половых стероидов и практическую — изыскание потенциальных лекарственных средств на базе этих исследований.

Синтез стероидных соединений осуществляли сотрудники лаборатории химии стероидов и простагландинов В. М. Ржезников, Л. Е. Голубов-

ская, О. Н. Минайлова и др. Исследование комплекса биологических свойств синтезированных аналогов проводили Т. И. Иваненко, Е. В. Покровская, Н. В. Олейник, И. Н. Баранова, В. В. Пучкова.

Изучение диссоциации биологических свойств при химической модификации тестостерона позволило в свое время обнаружить среди исследуемых соединений препарат с высокой анаболической активностью и подавленными половыми функциями. Результатом этих длительных исследований было создание препарата силаболина, который успешно прошел клинические испытания и был внедрен в медицинскую практику как высокоэффективный анаболик длительного действия.

В последние годы усилия сотрудников обеих лабораторий были сконцентрированы на изучении аналогов женских половых гормонов. Принцип исследований строился на одновременной оценке связывания стероидов с белками — рецепторами матки *in vitro* (методом конкурентного анализа) и *in vivo* (методом лигандного обмена)

¹ Доклад был представлен на 3-х Научных чтениях им. акад. АМН СССР Н. А. Юдаева (Москва, 16 декабря 1996 г.).

Таблица 1

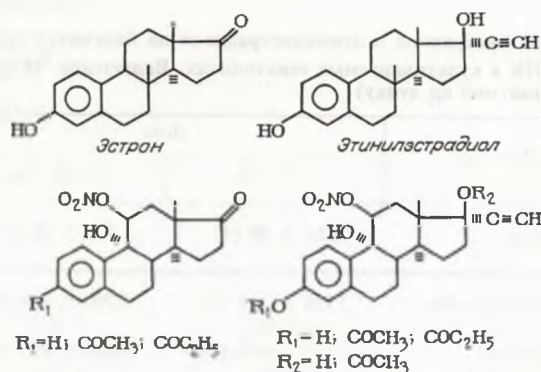


Рис. 1. Нитроксипроизводные эстрона и этинилэстрадиола.

при сопоставлении с действием препаратов на массу матки (утеротропный тест). Исследовали также антиэстрогенные и антигонадотропные свойства аналогов с помощью соответствующих методов биотестирования. Сопоставление эффектов, полученных при парентеральном и оральном введении препаратов, дало возможность оценить их устойчивость к ферментативным влияниям и кислотно-щелочным контрастам пищеварительного тракта.

Проведенные исследования позволили объединить аналоги в 3 основные группы.

1. Соединения, имеющие примерно равную способность связываться с рецепторами *in vitro* и давать биологический эффект при введении в организм.

2. Соединения, конкурентно неактивные *in vitro*, но оказывающие выраженное утеротропное (эстрогенное) действие. Эти соединения, по-видимому, метаболизируют в организме до более активных стероидов.

3. Некоторые структурные аналоги эстрогенов имеют выраженное сродство к рецепторам *in vitro*, но не дают эффекта в утеротропном тесте, т. е. не проявляют специфических гормональных свойств. Причиной такого феномена может быть их метаболизм до неактивных соединений или краткосрочность пребывания гормон-рецепторного комплекса в ядре клетки-мишени, что не позволяет индуцировать увеличение мышечной массы матки. В последнем случае обычно констатируют лишь ранние эстрогенные эффекты (накопление воды в матке).

Для дальнейших исследований представляли интерес первые 2 группы стероидов.

Скрининг аналогов эстрона, эстрадиола, эстриола на наличие эстрогенной, антигонадотропной и контрацептивной активности позволил обнаружить широкий спектр диссоциации этих функций, присущих половым стероидам. С позиций поиска потенциальных лекарственных препаратов наибольший интерес представляли соединения с высокой эстрогенной или антиэстрогенной активностью, а также аналоги, обладающие выраженными контрацептивными свойствами. Одновременно осуществляли отбор соединений, активных при оральном введении. Охарактеризованные нами антиэстрогены были включены в программу совместных исследований с Онкологическим научным центром РАМН как гормоноцитотоксичными.

Контрацептивная активность соединений I—VII по сравнению с этинилэстрадиолом (введение PER OS)

Соединение	Диапазон доз, мг/кг	ИБ ₅₀ , мг/кг	Относительная активность, %	ИК
Этинилэстрадиол	0,025—0,1	0,074	100	1,0
<i>Производные этинилэстрадиола</i>				
I	0,00125—0,01	0,0034	2176	4,57
II	0,00125—0,01	0,0065	1139	1,76
III	0,00125—0,01	0,0032	2313	2,31
IV	0,00125—0,01	0,0052	1432	3,7
<i>Производные эстрона</i>				
V	0,025—0,2	0,074	100	1,3
VI	0,025—0,2	0,037	204	2,2
VII	0,025—0,2	0,071	104	1,5

Примечание. ИБ₅₀ — доза, вызывавшая ингибицию беременности на 50%. ИК — индекс контрацепции, равный отношению контрацептивной активности к утеротропной активности.

статики и проявили себя эффективными противоопухолевыми соединениями. Несколько исследованных аналогов с гормональной активностью, превышающей активность природных эстрогенов, могут быть использованы в медицинской практике в заместительной терапии.

В отношении контрацептивных свойств наиболее интересной оказалась группа нитроксипроизводных эстрона и особенно этинилэстрадиола (рис. 1). Отличительной чертой соединений этой группы является то, что контрацептивный эффект у них проявляется при оральном введении. В табл. 1 представлен индекс контрацепции некоторых исследованных соединений. Среди нитроксипроизводных этинилэстрадиола уникальным оказался 11-нитрат, 3,17β-диацетат-окси-9α, 11β-диокси-этинилэстрадиол (соединение I), названный нистранолом. Его эстрогенная активность в утеротропном тесте превышала таковую этинилэстрадиола в 4,7 раза, в то время как контрацептивная активность была выше в 21 раз. Индекс контрацепции был в 4,6 раза выше, чем у этинилэстрадиола.

При более глубоком изучении нистранола обнаружено, что это соединение не способно конкурировать с природными эстрогенами за связывание с их рецепторами *in vitro* (табл. 2), но обладает этой способностью при введении в организм (метод лигандного обмена). Через 24 ч после введения животным нистранола его связывание с рецепторами эстрадиола существенно превышало таковое этинилэстрадиола. Соответственно этому увеличение массы матки в этот срок было наи-

Таблица 2

Относительная конкурентная способность нистранола

Соединение	Относительная конкурентная способность, %
Эстрадиол	100
Этинилэстрадиол	150 ± 16,8
Нистранол	0,15; 0,17

Таблица 3

Влияние нистранола и этинилэстрадиола на биосинтез суммарных РНК в культивируемых гепатоцитах. Включение ^3H -уридина (в имп/мин на лунку)

Препарат	Доза	
	10^{-8} М	$2 \cdot 10^{-7}$ М
Контроль	581 ± 56 (4)	678 ± 48 (3)
Этинилэстрадиол	2338 ± 214 (3)	3200 ± 924 (4)
<i>p</i>	$< 0,001$	$< 0,01$
Нистранол	1593 ± 699 (3)	5830 ± 455 (4)
<i>p</i>	$< 0,05$	$< 0,01$

Примечание. Здесь и в табл. 4 *p* — достоверность различий с контролем. В скобках — число наблюдений.

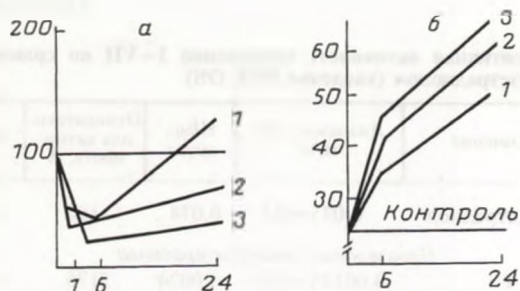


Рис. 2. Влияние нистранола и этинилэстрадиола на связывание эстрадиола цитозольной фракцией матки ("метод обмена"; а) и массу матки (б) неполовозрелых крыс.

1 — эстрадиол, 2 — этинилэстрадиол, 3 — нистранол.

По осям ординат — связывание эстрадиола в цитозоле матки (в %); б — масса матки (в мг); по осям абсцисс — срок исследования (в ч).

большим по сравнению с таковым при введении эстрадиола и этинилэстрадиола (рис. 2). Отсутствие рецепции в опытах *in vitro* связано, видимо, с тем, что обе ответственные за связывание с рецепторами C_3 - и C_{17} -гидроксильные группы в нистраноле защищены ацетоксильными заместителями. В организме же, вероятно, происходит гидролиз этих сложноэфирных группировок с образованием биологически активных метаболитов. Предполагается, что комплекс стероид—рецептор длительное время удерживается в клетке (ядре). Это подтверждается долгим периодом (более 24 ч) снижения концентрации цитозольных рецепторов эстрадиола в тканях матки крыс.

Справедливость такого предположения подтверждена наличием эффекта пролонгации биологического действия нистранола. Показано, что после однократного введения препарата прирост массы матки неполовозрелых крыс в последующие 7 дней непрерывно увеличивался по сравнению с контролем и в 2 раза превосходил таковой после введения аналогичной дозы этинилэстрадиола (рис. 3).

Возможность возникновения обменных и сосудистых нарушений при длительном применении двухкомпонентных оральных контрацептивов (ОК) связывают преимущественно с эстрогенной компонентой препаратов. В связи с этим были проведены исследования по сравнению влияния

нистранола и этинилэстрадиола на состояние липидного и белкового обмена. Использование различных доз стероидов позволило установить, что лишь при превышении в 500 раз терапевтической дозы эстрогена, применяемого в ОК, нистранол вызывал снижение концентрации холестерина и триглицеридов в крови. Меньшие дозы препарата не влияли на эти показатели липидного обмена. Этинилэстрадиолу, напротив, было свойственно гипертриглицеридемическое действие при некоторых дозах.

В исследовании на культуре гепатоцитов получены эффекты нистранола, сравнимые с таковыми этинилэстрадиола, которые заключались в стимулирующем влиянии на биосинтез суммарных РНК (по включению ^3H -уридина; табл. 3) и биосинтез белка (по включению C^{14} -лейцина; табл. 4). Последующее общетоксикологическое изучение нистранола также не выявило каких-либо нежелательных побочных эффектов.

Уникальные свойства нистранола (его высокая контрацептивная активность при оральном введении) сделали его предпочтительным (по сравнению с этинилэстрадиолом) компонентом в качестве эстрогенного фрагмента в двухкомпонентном контрацептивном препарате. Наличие синтезированного в Научно-исследовательском химико-фармацевтическом институте и утвержденного Минздравом Российской Федерации гестагена ацетомепрегенаола дало возможность объединить

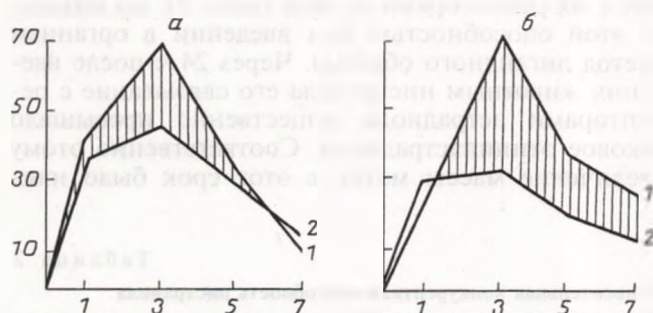


Рис. 3. Интенсивность и продолжительность действия нистранола и этинилэстрадиола при однократном введении неполовозрелым самкам крыс.

а — подкожное введение; б — оральное введение. 1 — нистранол; 2 — этинилэстрадиол. По осям ординат — прирост массы матки (в мг); по осям абсцисс — срок исследования (в днях).

Таблица 4

Влияние нистранола и этинилэстрадиола на биосинтез белка в культивируемых гепатоцитах. Включение C^{14} -лейцина (в имп/мин на лунку)

Препарат	Доза	
	10^{-8} М	$2 \cdot 10^{-7}$ М
Контроль	305 ± 20 (3)	388 ± 12 (4)
Этинилэстрадиол	208 ± 16 (3)	693 ± 39 (4)
<i>p</i>	$> 0,05$	$< 0,005$
Нистранол	350 ± 33 (3)	799 ± 63 (4)
<i>p</i>	$> 0,05$	$< 0,01$

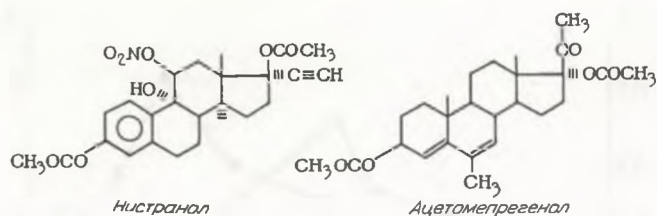


Рис. 4. Нитрогест.

оба соединения в едином препарате и попытаться создать современный ОК на базе отечественных компонентов. В дальнейшем препарат получил название "Нитрогест" (рис. 4).

Приступая к созданию и изучению этого нового двухкомпонентного контрацептивного препарата, мы исходили из того, что его будущее как лекарственного средства может состояться лишь при условии, что он не уступит современным ОК в активности, т. е. обеспечит надежную гарантию предотвращения беременности, а также безопасность применения. Результаты проведенных исследований нистранола давали нам надежду на создание высокоэффективного низкодозированного препарата.

В большинстве современных двухкомпонентных ОК в качестве эстрогенного компонента используют этинилэстрадиол (табл. 5), причем доза его в таблетке составляет 30 мкг и выше, что при длительном использовании ОК может давать нежелательные побочные эффекты (нарушение липидного обмена, сосудистые изменения и др.). В связи с этим все наши дальнейшие исследования были ориентированы на изучение сочетаний нистранола и ацетомепрегенола, в которых доза эстрогена была заведомо ниже доз этинилэстрадиола, применяющихся в мировой практике создания двухкомпонентных ОК.

Сочетание нистранола с ацетомепрегенолом в различных количественных соотношениях показало в экспериментах на крысах 100% ингибицию беременности, в то время как компоненты триквилара, марвелона, ортоновума, эгестренола в

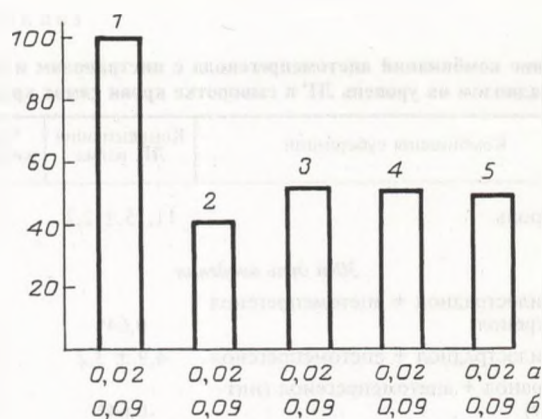


Рис. 5. Контрацептивный эффект нитрогеста по сравнению с официальными ОК в монофазном варианте доз.

а — эстроген; б — гестаген. 1 — нитрогест; 2 — марвелон; 3 — триквилар; 4 — ортоновум; 5 — эгестренол. По оси ординат — ингибция беременности (в %); по оси абсцисс — дозы (в мг/кг/день).

сравнимых дозах вызывали лишь частичный эффект (рис. 5). Более того, 100% эффект сохранялся и при дальнейшем снижении дозы нистранола при неизменном количестве ацетомепрегенола.

У нитрогеста обнаружен и посткоитальный контрацептивный эффект, когда препарат вводили крысам на 1—2-й день беременности. При этом действующие дозы препарата были на 2 порядка ниже, чем дозы известного гестагенного контрацептива RU-486, который применяют для прерывания беременности на ранних сроках или вызывания абортa на поздних сроках беременности (табл. 6).

Дальнейшими исследованиями показано, что нитрогест интенсивно влияет на уровень половых гормонов в крови. 30-дневное введение крысам комбинации нистранола с ацетомепрегенолом приводило к исчезновению стадии проэструса и эструса, уровень лютеинизирующего гормона (ЛГ) при этом был ниже чувствительности радиоиммуннологического метода определения содержания этого гормона (табл. 7). В то же время длитель-

Таблица 5

Двухкомпонентные ОК монофазного типа

Препарат	Эстроген	Доза, мкг	Гестаген	Доза, мкг
Линдиол	Этинилэстрадиол	500	Линестрел	2500
Нон-овлон	То же	50	Норэтистерона ацетат	1000
Овидон	" "	50	α-Норгестрел	250
Демулен	" "	35	Этиндиол	1000
Диане-35	" "	35	Ципротеронаацетат	2000
Микрогинон	" "	30	Левоноргестрел	150
Минизистон	" "	30	Левоноргестрел	125
Регивидон	" "	30	α-Норгестрел	150
Марвелон	" "	30	Дезогестрел	150
Мерсилон	" "	20	Дезогестрел	150
Норинил	Местранол	50	Норэтистерон	1000

Таблица 6

Контрацептивные эффекты нитрогеста и RU-486 при подкожном введении самкам крыс

Субстанция	Доза, мг/кг (эстроген + гестаген)	Число крыс в группе		Ингибция беременности, %
		оплодотворенных	беременных	
Контроль	Растворитель	25	25	
	0,0025 ± 0,01	17	12	29,4
Нитрогест	0,005 ± 0,02	16	1	93,75
	0,01 ± 0,04	16	1	93,75
Контроль	Растворитель	16	16	
	0,125	12	12	0
RU-486	0,25	10	10	0
	0,5	12	12	0

Таблица 7

Влияние комбинаций ацетомепрегенола с нистранолом и этинилэстрадиолом на уровень ЛГ в сыворотке крови самок крыс

Комбинация субстанций	Концентрация ЛГ, нг/мл	Число животных
Контроль	11,15 ± 2,2	8
30-й день введения		
Этинилэстрадиол + ацетомепрегенол (эгестренол)	0,64*	2
Этинилэстрадиол + ацетомепрегенол	4,9 ± 3,2	5
Нистранол + ацетомепрегенол (нитрогест)	0,64*	9

Примечание. * — чувствительность метода в данных условиях опыта. Суммарные дозы за 30 дней введения: эстроген — 0,5 мг/кг, гестаген — 1,5 мг/кг.

ное введение нитрогеста в желудок не влияло на концентрацию пролактина в крови, равно как и введение аналогичных доз препарата сравнения — марвелона.

В Институте медицинской приматологии РАМН (дир. — акад. РАМН Б. А. Лапин) исследовали характер влияния нитрогеста на содержание в крови эстрадиола и прогестерона на самках павианов гамадрилов. 21-дневное оральное введение препарата и марвелона (препарат сравнения) в равной степени предотвращало пики повышения уровня половых гормонов в ходе эстрального цикла (рис. 6). После прекращения эксперимента все обезьяны, получавшие нитрогест, перенесли беременность, закончившуюся рождением здоровых детенышей (данные Н. Д. Гончаровой).

В результате проведенных исследований составлена лекарственная форма нового низкодозированного двухкомпонентного ОК монофазного действия. При соотношении доз, принятом в большинстве аналогичных ОК — 1:5, количество нистранола и ацетомепрегенола, входящих в таблетку, было меньше, чем в применяющихся в настоящее время ОК. Если широко известный низкодозированный ОК монофазного действия марвелон содержит 30 мкг этинилэстрадиола и 150 мкг дезогестрела, то таблетка нитрогеста состоит из 25 мкг нистранола и 125 мкг ацетомепрегенола.

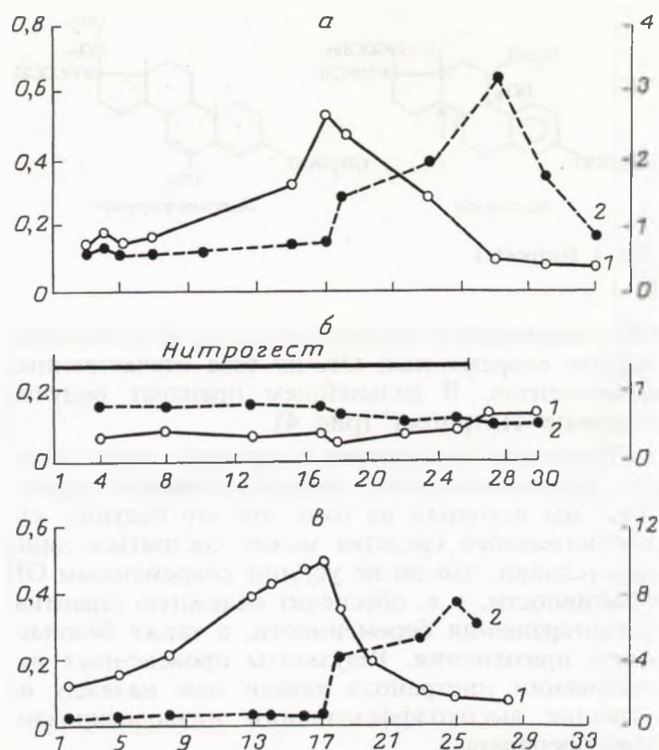


Рис. 6. Динамика уровня эстрадиола (1) и прогестерона (2) в плазме периферической крови у обезьяны № 1639 на протяжении менструального цикла в контрольный период (а), на фоне введения нитрогеста (б) и восстановительный период (в).

По осям ординат: слева — концентрация эстрадиола (в нг/мл), справа — концентрация прогестерона (в нг/мл); по осям абсцисс — дни цикла.

Токсикологические исследования нитрогеста и его эстрогенного компонента нистранола, проведенные в отделе токсикологии Кардиологического научного центра РАМН, показали их низкую токсичность при однократном введении и хорошую переносимость при назначении в условиях длительных хронических экспериментов на крысах и собаках.

По завершении биологических исследований научно-техническая документация по препарату "Нитрогест" передана в Фармакологический комитет Минздрава Российской Федерации, который разрешил клинические испытания препарата.

Поступила 30.01.97