

О. А. Зейналов¹, В. В. Ядерец¹, Т. С. Стыценко¹, М. А. Петросян²,
В. А. Андрюшина¹

СИНТЕЗ И БИОЛОГИЧЕСКАЯ АКТИВНОСТЬ СИНТЕТИЧЕСКИХ ПРОИЗВОДНЫХ 17 α -ГИДРОКСИПРОГЕСТЕРОНА

¹ Учреждение Российской академии наук Центр "Биоинженерия" РАН, Москва, Россия, e-mail: andryushina@biengi.ac.ru;

² Научно-исследовательский институт акушерства и гинекологии РАМН, Санкт-Петербург, Россия

Изучены гестагенная и контрацептивная (в сочетании с эстрогеном) активности мегестрола ацетата, пролигестона и двух сложных эфиров мепрегенола ацетата (АМОЛ): бутирата и гемисукцината. Установлено отсутствие корреляции между величинами гестагенной и контрацептивной активности у синтетических производных 17 α -гидроксипрогестерона: из двух соединений (пролигестон и мегестрола ацетат), показавших наивысшую (100 %) контрацептивную активность в сочетании с этинилэстрадиолом, одно (пролигестон) практически лишено гестагенной активности, другое (мегестрола ацетат) является высокоактивным гестагеном. Подтверждена закономерность превышения инъекционной гестагенной активности над пероральной у ацетата мегестрола и мепрегенола ацетата. Выявлен вклад индивидуального эстрогена в величину контрацептивной активности эфиров мепрегенола.

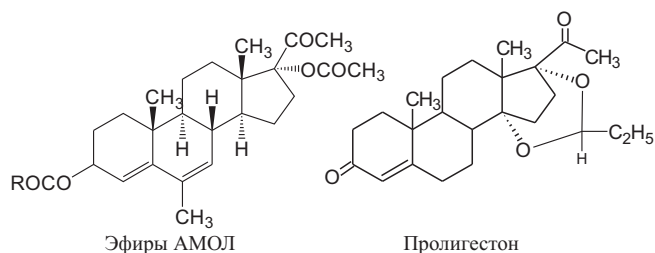
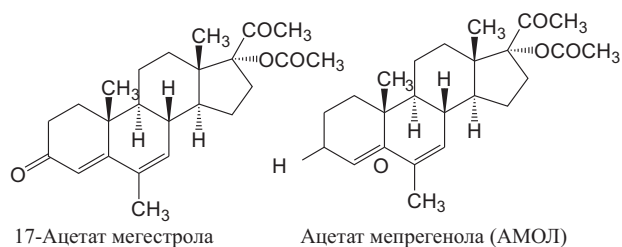
Ключевые слова: гестагены, контрацептивная активность, производные 17 α -гидроксипрогестерона, пролигестон.

Ранее мы сообщали о некоторых закономерностях биологической активности производных 17 α -гидроксипрогестерона — сложных эфиров мепрегенола ацетата (АМОЛ) [1–4]. Наибольшим спросом пользуются препараты на основе гестагенов этого ряда в сочетании с эстрогенами для корреляции поведенческих реакций у домашних животных, таких как гиперсексуальность, агрессивность, что можно объяснить снижением концентрации циркулирующих тестостерона и эстрогенов путем ингибирующего влияния на секрецию гонадотропинов, а также их седативным действием на ЦНС [5].

Среди наиболее широко используемых в ветеринарной практике препаратов особое место занимают препараты на основе мегестрола ацетата и пролигестона: первый — из-за своей доступности на мировом рынке, а второй — благодаря пролонгированности действия (от 6 до 9 мес) и возможности применения как в анэстральный период, так и в начале проэструса без риска развития нежелательных изменений в эндометрии и яичниках. Однако в доступных литературных источниках данные по гестагенной и контрацептивной активности пролигестона отсутствуют, а имеющиеся в литературе сведения по гестагенной активности мегестрола ацетата [6], вызывают некоторое сомнение в связи с тем, что приведенная активность при пероральном введении препарата оказалась выше, чем при инъекционной. Аналогичная зависимость приведена и по АМОЛ [6, 7].

Целью нашего исследования было сравнительное изучение контрацептивной и гестагенной активностей мегестрола ацетата, пролигестона, АМОЛ и 2 ранее исследованных соединений — бутирата и гемисукцината АМОЛ, имеющих 100 % контрацептивную актив-

ность в эксперименте на животных. Кроме того, изучена контрацептивная активность этинилэстрадиола (ЭЭ) с целью определения эффекта его влияния на контрацептивную активность изученных нами ранее комбинаций гестагенов ряда АМОЛ с этинилэстрадиолом. С этой же целью были определены также величины контрацептивной активности 4 вышеперечисленных гестагенов в сочетании с ЭЭ с уменьшенной вдвое дозой гестагена.



R=—CH₂CH₂CH₃, бутират

R=—CH₂CH₂COOH, гемисукцинат

Экспериментальная химическая часть

Мегестрола ацетат, АМОЛ и его эфиры (гемисукцинат и бутират) были получены разработанными нами ранее методами [2, 4]. Синтез пролигестона осуществлен серией химических реакций из 14 α -гидроксианд-

ростендиона, полученного направленным гидроксильрованием андростендиона грибом *Curvularia lunata* ВКПМ F-981 из коллекции Центра “Биоинженерия” РАН [8]. ^1H ЯМР-спектры соединений получены на спектрометре Unity+400 (Varian), рабочая частота 400 МГц.

3-Этокси-14 α -гидроксиандроста-3,5-диен-17-он (I, этиловый енолэфир 14 α -ОН-АД). 2,5 г 14 α -ОН-АД (I) суспендируют в смеси 3,75 мл триметилортоформиата и 2,5 мл этанола. К полученной суспензии прибавляют 0,02 мл 0,5 % раствора H_2SO_4 в этаноле при энергичном перемешивании, через 2 ч перемешивания при 25 °С прибавляют 0,005 мл триэтиламина. Полученные кристаллы отфильтровывают, промывают этанолом и сушат до постоянного веса. Получают 2,2 г этилового енолэфира 14 α -ОН-АД, идентичного по физико-химическим характеристикам ранее описанному [9], т. пл. 209 – 212 °С. Выход 80,3 % (теор.).

ПМР-спектр (CDCl_3 , DMSO), δ , м.д.: 1,003 (с, 6H, 18- CH_3 , 19- CH_3), 1,28 (т, 3H, O- CH_2 - CH_3), 3,11 (с, 1H, 14-ОН), 3,73 (к, 2H, $-\text{CH}_2$ - CH_3), 5,10 (с, 1H, 4-Н), 5,21 (м, 1H, 6-Н).

17 α -Этиниландрост-4-ен-14 α ,17 α -диола-3-он (II). 1,5 г енолэфира I и 1,6 г комплекса литийацетилидэтилендиамин суспендируют в 9 мл сухого диоксана и перемешивают в течение 20 ч при температуре 25 °С в токе азота. Через 20 ч смесь охлаждают до 0 °С, осторожно приливают 12 мл воды и перемешивают 30 мин. Происходит кристаллизация продукта. Выпавший осадок отфильтровывают, промывают смесью диоксан — вода (1:1), 10 % раствором уксусной кислоты и водой. Кристаллы полученного 3-этокси-17 α -этиниландроста-3,5-диен-14 α ,17 α -диола (т. пл. 248 – 250 °С) суспендируют в смеси 7,5 мл уксусной кислоты и 2,5 мл воды и по каплям прибавляют раствор 30 % H_2SO_4 до получения pH 0,5. Через 1 ч раствор нейтрализуют раствором NaOH, прибавляют 10 мл воды. Полученный осадок отфильтровывают, промывают смесью уксусная кислота — вода (50 % раствор), сушат до постоянной массы. Получают 1 г 17 α -этиниландрост-4-ен-14 α ,17 α -диола-3-она (II), идентичного по физико-химическим характеристикам ранее описанному [9], т. пл. 250 – 252 °С [9]. Выход 67,1 % (теор.). ПМР-спектр (CDCl_3), δ , м.д.: 1,051 (с, 3H, 18- CH_3), 1,206 (с, 3H, 19- CH_3), 2,51 (с, 1H, 21-Н), 3,84 (с, 1H, 14-ОН), 4,45 (с, 1H, 17-ОН), 5,73 (с, 1H, 4-Н).

17 α -Этинил-14 α ,17 α -пропилидендиоксиандрост-4-ен-3-он (III). 1,4 г вещества II суспендируют в 1 мл пропионового альдегида и 0,5 мл уксусной кислоты, прибавляют 0,1 мл 30 % раствора H_2SO_4 в уксусной кислоте, перемешивают при комнатной температуре в течение 1 ч. Реакционную массу охлаждают, прибавляют 35 мл воды и нейтрализуют 15 % раствором NaOH в воде. Выпавшие кристаллы отфильтровывают, промывают водой и метанолом. Получают 1,21 г 17 α -этинил-14 α ,17 α -пропилидендиоксиандрост-4-ен-3-она (III), идентичного по физико-химиче-

ским характеристикам ранее описанному [11], т. пл. 170 – 172 °С. Выход 80 % (теор.).

ПМР-спектр (CDCl_3), м.д.: 0,94 (т, 3H, CH'_3 - CH_2), 1,023 (с, 3H, 18- CH_3), 1,195 (с, 3H, 19- CH_3), 2,51 (с, 1H, 21-Н), 4,88 (т, 1H, CH'_2 - CH_3), 5,77 (с, 1H, 4-Н).

14 α ,17 α -Пропилидендиоксипрегн-4-ен-3,20-дион. 1 г вещества III суспендируют в смеси 6 мл уксусной кислоты и 1,2 мл воды и прибавляют 0,15 мл 30 % раствора H_2SO_4 в уксусной кислоте и 60 мг HgO. Реакционную смесь перемешивают в течение 2 ч при температуре 50 °С. Затем реакционную массу охлаждают до 0 °С и прибавляют 0,4 мл 5 % водного раствора NaOH и воду. Выпавшие кристаллы отфильтровывают, промывают 25 % водным раствором уксусной кислоты, кристаллизуют из метанола, сушат до постоянной массы. Получают 0,74 г 14 α ,17 α -пропилидендиоксипрегн-4-ен-3,20-диона (пролигестона), идентичного по физико-химическим характеристикам ранее описанному [9, 10], т. пл. 93 – 94 °С. Выход 70 %.

ПМР-спектр (CDCl_3), м.д.: 0,843 (с, 3H, 18- CH_3), 0,96 (т, 3H, CH'_3 - CH_2), 1,178 (с, 3H, 19- CH_3), 2,14 (3H, с, 21- CH_3), 4,86 (т, 1H, CH'_2 - CH_3), 5,68 (с, 1H, 4-Н).

Экспериментальная биологическая часть

Исследования по определению гестагенной активности проводили на инфантильных самках кроликов породы “Шиншилла”. Животные были получены из питомника “Рапполово” РАМН и содержались в регламентированных условиях вивария НИИАГ им. Д. О. Отта РАМН на стандартном рационе.

Эстрогенподготовленным самкам кроликов в течение 5 дней ежедневно (в утренние часы 09.00 – 11.00) вводили испытуемые препараты в определенном диапазоне доз (5 кроликов на 1 дозу) в виде масляного раствора (растворитель — растительное масло) в объеме 0,3 мл перорально (в желудок) с использованием зонда. На следующий день после последнего введения препарата кроликов забивали путем введения воздуха в ушную вену под легким эфирным наркозом. После вскрытия фрагмент одного рога матки брали для гистологической обработки. Срезы препаратов матки с толщиной 6 мкм исследовали на светооптическом уровне при увеличении $\times 12$.

Оценку гестагенной активности проводили по 4-балльной шкале McPhail, принимая во внимание степень прегравидных изменений эндометрия.

Для каждого фрагмента матки оценивали несколько срезов, после чего проводили статистическую обработку полученных в группе данных методом регрессионного анализа. Вычисления вели по уравнению регрессии $y = a + blgx$, где y — фармакологический эффект (индекс McPhail), x — доза гестагена в мг/кг (в логарифмическом масштабе), a и b — коэффициенты регрессии.

Биологическую активность соединений оценивали методом регрессионного анализа по величинам ED₅₀, соответствующим индексу McPhail, равному 2.

Относительную прогестагенную активность вычисляли, принимая за единицу активность прогестерона.

Контрацептивную активность определяли на половозрелых белых крысах линии Вистар массой 160–180 г (самки) и 200–250 г (самцы). Каждая группа состояла из 15 крыс самок. Самцов использовали для покрытия из расчета 2 самца на 5 самок.

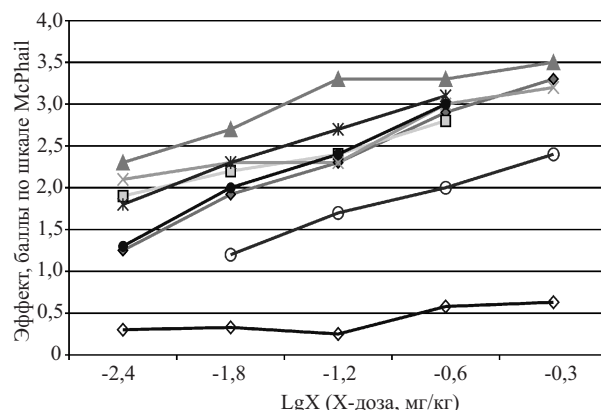
Как ЭЭ, так и исследуемые в эксперименте эстроген-гестагенные комбинации, вводили в виде масляного раствора (растворитель — растительное масло) в желудок (перорально) в объеме 0,3 мл с использованием зонда в течение 14 дней. В группе животных, получавших только эстроген, доза ЭЭ соответствовала 0,04 мг/кг. Во всех остальных группах, получавших эстроген-гестагенные комбинации, доза ЭЭ также составила 0,04 мг/кг, а гестагена — 0,4 или 0,8 мг/кг.

Введение препаратов и взятие влагалищных мазков проводили в утренние часы 09.00–11.00. На третий день введения препаратов самок подсаживали к самцам. Ежедневно проводили цитологический анализ влагалищных мазков. День обнаружения сперматозоидов в мазке считали первым днем возможной беременности. Покрытых самок отсаживали в отдельные клетки и завершали 14-дневный курс введения испытуемых препаратов. На 18–20 день после покрытия животных подвергали эвтаназии путем дислокации шейных позвонков. При вскрытии проводили ревизию полости матки на наличие плодов, плацент и мест имплантаций. Подсчитывали количество желтых тел, мест имплантации, плацентации, число плодов. На основании этих данных определяли пред- и постимплантационную эмбриональную гибель.

Контрацептивную активность рассчитывали по формуле:

$$КА(\%) = \left(1 - \frac{Б_о \cdot П_к}{Б_к \cdot П_о}\right) \cdot 100,$$

где $Б_о$ и $Б_к$ — число беременных крыс в опыте и контроле, соответственно; $П_о$ и $П_к$ — число покрытых крыс в опыте и контроле, соответственно.



Влияние исследуемых препаратов на степень секреторной трансформации эндометрия матки инфантильных крольчих: 1 — пролигестон (перорально), 2 — мегэстрола ацетат (перорально), 3 — АМОЛ (подкожно), 4 — АМОЛа гемисукцинат (перорально), 5 — АМОЛа бутират (перорально), 6 — АМОЛ (перорально), 7 — АМОЛа гемисукцинат (подкожно), 8 — прогестерон (подкожно).

Результаты и их обсуждение

На рисунке представлен график зависимости индекса McPhail, отражающего гестагенную активность изучаемых препаратов, от логарифма дозы.

Как видно из табл. 1, мегэстрола ацетат при пероральном введении обладает выраженной гестагенной активностью, которая в 33 раза превышает активность прогестерона, а относительная гестагенная активность АМОЛ еще в 2 раза выше.

При подкожном способе введения наибольшую активность проявляет АМОЛ.

АМОЛ, гемисукцинат АМОЛ, пролигестон, бутират АМОЛ и мегэстрола ацетат в сочетании с ЭЭ в большей или меньшей степени обладают контрацептивной активностью (табл. 2).

Как видно из табл. 2, и пролигестон и мегэстрола ацетат в дозе 0,8 мг/кг в сочетании с ЭЭ (0,04 мг/кг) проявляют 100 % контрацептивный эффект, в то время как по гестагенной активности они очень сильно раз-

Таблица 1

Гестагенная активность изученных соединений в тесте Clauberg-McPhail при пероральном введении

Соединение	Способ введения	Диапазон доз, мг/кг	Число животных	Параметры кривой доза — эффект		ED ₅₀ , мг/кг	ОА
				a	b		
Прогестерон	подкожно	0,0125 – 1,0	30	2,85	1,47	0,27	1
Мегэстрола ацетат	перорально	0,004 – 0,5	25	0,68	3,42	0,0082	33
Мегэстрола ацетат	подкожно	0,004 – 0,5	25	3,45	0,37	0,0001	2700
АМОЛ	перорально	0,004 – 0,5	25	0,53	3,25	0,0044	61,4
АМОЛ	подкожно	0,004 – 0,5	25	3,71	0,55	0,0008	337,5
Пролигестон	перорально	0,004 – 0,5	25	0,62	0,16	294896882,35	0
Пролигестон	подкожно	0,004 – 0,5	25	2,89	1,16	0,17	1,6
Бутират АМОЛ	перорально	0,004 – 0,5	26	3,52	0,94	0,024	11,2
Бутират АМОЛ	подкожно	0,004 – 0,5	25	3,53	0,76	0,0097	27,8
Гемисукцинат АМОЛ	перорально	0,004 – 0,5	20	3,53	0,93	0,023	11,7
Гемисукцинат АМОЛ	подкожно	0,004 – 0,5	20	3,58	0,77	0,0087	31

Примечания: a, b — коэффициенты регрессии, вычисленные по уравнению $y = a + b \lg(x)$; ОА — относительная гестагенная активность.

Контрацептивная активность комбинации этинилэстрадиола (0,04 мг/кг) с гестагенами

Состав	Доза, мг/кг	Количество крыс в группе				КА *, %
		всего	покрытых	беременных	небеременных	
Растительное масло (контроль)		15	12	12		0
ЭЭ + АМОЛ	0,8	15	8	1		87,5
ЭЭ + пролигестон	0,8	17	11	0		100
ЭЭ + пролигестон	0,4	15	13	2	11	83,4
ЭЭ + бутират АМОЛ	0,8	17	14	0		100
ЭЭ + бутират АМОЛ	0,4	15	12	4	8	64,1
ЭЭ + гемисукцинат АМОЛ	0,8	12	7	0		100
ЭЭ + гемисукцинат АМОЛ	0,4	15	13	4	9	66,9
ЭЭ + мегестрола ацетат	0,8	15	11	0		100
ЭЭ + мегестрола ацетат	0,4	15	14	6	8	53,9
ЭЭ	0,4	15	11	8	3	21,7
Пролигестон	0,8	15	15	13	2	13
Мегестрола ацетат	0,8	15	13	10	3	23

* КА — контрацептивная активность.

личаются: мегестрола ацетат является высокоактивным гестагеном, а пролигестон проявляет очень слабый гестагенный эффект только в инъекционной форме. Такое же отсутствие корреляции между гестагенной и контрацептивной активностью было отмечено нами ранее для эфиров этого ряда, имеющих нормальное и изо-строение эфирного радикала при С3 [3], и для пары ацетомепрегенол — гемисукцинат амолла [2]. Последний в сравнении с ацетомепрегенолом обладал большей контрацептивной активностью при меньшей гестагенной.

Три из изученных соединения — пролигестон, гемисукцинат АМОЛ и бутират АМОЛ, показавшие 100 % контрацептивный эффект в дозе гестагена 0,8 мг/кг в сочетании с ЭЭ (0,04 мг/кг), — сохранили достаточно высокую активность при снижении дозы вдвое и той же концентрации ЭЭ. Контрацептивная активность мегестрола ацетата снизилась в 2 раза при снижении вдвое дозы гестагена. Активность АМОЛа даже при высшей дозировке не достигала 100 %.

Контрацептивная активность самого ЭЭ невысока, однако при рассмотрении эстроген-гестагенных препаратов следует оценивать их действие в совокупности, учитывая, что гестагенный и эстрогенный компоненты влияют на активность друг друга. Так, достоверно известно, что сочетанное применение ЭЭ с гестагенами позволяет снизить дозировку последних и обеспечить более стойкий контрацептивный эффект [9]. Следует также учитывать и вклад индивидуально эстрогена в величину КА: так один из наиболее активных контрацептивных препаратов гемисукцинат АМОЛа в сочетании с ЭЭ дает 100 % контрацептивный эффект, в то время как замена ЭЭ на валерианат эстрадиола в той же дозировке приводит к снижению активности до 60 % [2].

Особенно важно наличие эстрогенной компоненты в препаратах для самцов животных, поскольку коррекция поведения у самцов частично основана на антиандрогенном эффекте эстрогенов. У женских особей эк-

зогенный эстроген по механизму отрицательной обратной связи с системой гипоталамус/гипофиз подавляет секрецию гонадотропинов, снижая до некоторой степени концентрацию циркулирующих эстрогенов [5]. В обоих случаях эффект успокоения достигается дополнительным седативным воздействием гестагенов на ЦНС животных.

ЛИТЕРАТУРА

1. О. А. Зейналов, В. А. Андрюшина, Д. А. Авданина, *Рос. ветерин. ж.*, № 1, 16 – 20 (2005).
2. О. А. Зейналов, В. А. Андрюшина, Т. С. Савинова и др., *Вопр. биол. мед. и фарм. химии*, № 1, 32 – 36 (2005).
3. О. А. Зейналов, В. А. Андрюшина, И. М. Егоров и др., *Вопр. биол. мед. и фарм. химии*, № 4, 10 – 12 (2005).
4. О. А. Зейналов, В. А. Андрюшина, Т. С. Савинова и др., *Вопр. биол. мед. и фарм. химии*, № 2, 8 – 11 (2004).
5. Дж. Симпсон (ред.), *Руководство по репродукции неонатологии собак и кошек*, Софион, Москва (2005), глава 16.
6. Г. В. Никитина, *Фармакол. и токсикол.*, **52**(3), 44 – 47 (1989).
7. Г. М. Кадагский, Г. С. Гриненко, Г. В. Никитина и др., *Хим.-фарм. журн.*, № 10, 1212 – 1215 (1983).
8. В. В. Ядерец, В. А. Андрюшина, Н. Е. Войшвилло и др., *Хим.-фарм. журн.*, **43**(1), 52 – 55 (2009).
9. В. В. Корхов, *Медицинские аспекты применения контрацептивных препаратов*, Специальная литература, Санкт-Петербург (1996).

Поступила 12.11.10

Gestagen and contraceptive (in combination with estrogen) activities of megestrole acetate proligestone and two esters of mepregenoле acetate (butyrate and gemisuktsinate) are studied. The absence of correlation between the values of gestagens and contraceptive activity of the synthetic derivatives of 17 α -hydroxyprogesterone is established. Among two compounds (proligestone and megestrole acetate) showed the highest (100 %) contraceptive activity in combination with ethynilestadiol proligestone is practically devoid of gestagen activity but megestrole acetate is a highly active gestagens. Correctness of exceeding injection over oral gestagen activity of acetate megestrole and mepregenoле acetate is

confirmed. The contribution of individual estrogen in the value of contraceptive activity of ethers of mepregenole is revealed.

Key words: progestogens, contraceptive activity, derivatives of 17α -hydroxyprogesterone, proligeston.