

Слепнев Александр Александрович

**Роль усыновленных рецепторов в регуляции клинически значимых
белков-транспортеров половыми гормонами**

1.5.4. Биохимия

АВТОРЕФЕРАТ

**диссертации на соискание ученой степени
доктора медицинских наук**

Работа выполнена в федеральном государственном бюджетном образовательном учреждении высшего образования «Рязанский государственный медицинский университет имени академика И.П. Павлова» Министерства здравоохранения Российской Федерации

Научный консультант:

доктор медицинских наук, профессор **Якушева Елена Николаевна**

Официальные оппоненты:

Шабанов Петр Дмитриевич, доктор медицинских наук, профессор, Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Институт экспериментальной медицины», заведующий лабораторией биохимической фармакологии;

Федотчева Татьяна Александровна, доктор медицинских наук, федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования «Российский национальный исследовательский медицинский университет имени Н.И. Пирогова» Министерства здравоохранения Российской Федерации, профессор кафедры молекулярной фармакологии и радиобиологии им. П.В. Сергеева Института биомедицины;

Тюренок Иван Николаевич, доктор медицинских наук, профессор, член-корреспондент РАН, федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Волгоградский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации, профессор кафедры организации фармацевтического дела, фармацевтической технологии и биотехнологии

Ведущая организация:

Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Ярославский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации

Защита состоится «___»_____2025 г. в ___ на заседании диссертационного совета 21.2.060.02, созданного на базе ФГБОУ ВО РязГМУ Минздрава России по адресу: 390026 г. Рязань, ул. Высоковольтная, д. 9

С диссертацией можно ознакомиться в библиоцентре ФГБОУ ВО РязГМУ Минздрава России (390026, г. Рязань, ул. Шевченко, д. 34, корп. 2) и на сайте www.rzgmu.ru

Автореферат разослан «_____»_____2025 г.

Ученый секретарь диссертационного совета,
кандидат медицинских наук, доцент

Короткова Н.В.

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы исследования

Все белки-транспортёры могут быть отнесены к двум основным суперсемействам – ABC-транспортёры (англ.: ATP-binding cassette) и транспортёры растворённых веществ (англ.: solute carrier family, SLC) – SLC-транспортёры. При этом первые осуществляют трансмембранный перенос субстратов за счёт энергии АТФ, а вторые – без её использования [A. Sajid et al., 2023].

Основными клинически значимыми представителями ABC-транспортёров являются Р-гликопротеин (англ.: P-glycoprotein, Pgp, ABCB1-белок, MDR1-белок) и белок резистентности рака молочной железы (англ.: Breast Cancer Resistance Protein, BCRP, ABCG2-белок) [FDA, 2023], а SLC-транспортёров – полипептид, транспортирующий органические анионы OATP1B1 и полипептид, транспортирующий органические анионы OATP1B3 (англ.: organic anion transporting polypeptide, OATP) [C. Colas et al., 2016].

Pgp и BCRP являются эффлюксными белками-транспортёрами, то есть обеспечивают выведение веществ из клеток во внеклеточное пространство и биологические жидкости. Данные транспортёры экспрессируются в клетках печени, кишечника, почечных канальцев, эндотелиальных клетках гистогематических барьеров, где выполняют защитную функцию, препятствуя всасыванию субстратов в системный кровоток, выводя их в желчь и мочу или ограничивая проникновение через тканевые барьеры в забарьерные органы [R. Mineiro et al., 2023]. Pgp и BCRP обладают широкой субстратной специфичностью. Субстратами Pgp являются биобиотики (стероидные и тиреоидные гормоны) и ксенобиотики (противоопухолевые, гипотензивные и антигистаминные препараты, сердечные гликозиды, антиагреганты, антикоагулянты, антибиотики, ингибиторы ВИЧ-протеазы, иммунодепрессанты и др.) [В.Г. Кукес и др., 2008]. К субстратам BCRP относят противоопухолевые средства (метотрексат, митоксантрон), празозин, циметидин, глибенкламид, сульфасалазин, нитрофурантоин, розувастатин [S. Kitamura et al., 2008; Z. Ni et

al., 2010; Z.S. Chen et al., 2003].

OATP1B1/OATP1B3 являются инфлюксными белками-транспортерами, то есть обеспечивают проникновение субстратов внутрь клеток. OATP1B1/OATP1B3 экспрессируются в основном в гепатоцитах и обладают достаточно узкой субстратной специфичностью. Их субстратами являются статины (аторвастатин, розувастатин) и сартаны (валсартан, телмисартан) [FDA, 2023].

Функционирование белков-транспортеров может изменяться под влиянием различных веществ. Индукторы повышают их активность, а ингибиторы ее снижают [В.Г. Кукес и др., 2008].

В ряде исследований изучалось влияние половых гормонов на функционирование Pgp и BCRP. В опытах *in vivo* на самках кроликов показано, что эстрадиол и прогестерон стимулируют активность и количество Pgp [А.В. Щулькин, 2019]. В эксперименте *in vitro* выявлено, что 17 β -эстрадиол индуцирует экспрессию BCRP в клетках хориокарциномы плаценты человека BeWo [H. Wang et al., 2006]. Установлено, что тестостерон не влияет на синтез BCRP в клетках BeWo, однако совместно с 17 β -эстрадиолом увеличивает количество белка и мРНК BCRP в два раза. Выявлено, что эстриол, плацентарный лактоген и пролактин повышают количество BCRP в клетках BeWo, а хорионический гонадотропин человека не оказывает влияния на данный белок-транспортер [H. Wang et al., 2008]. Молекулярные механизмы влияния половых гормонов на экспрессию Pgp и BCRP на данный момент не установлены. В научной литературе нами не обнаружено сведений о гормональной регуляции OATP1B1/OATP1B3.

Ядерные рецепторы (англ.: nuclear receptors, NR) – это большое суперсемейство лиганд-активируемых факторов транскрипции клеток, которые ответственны за регуляцию экспрессии генов посредством взаимодействия с соответствующими лигандами, коактиваторами и корепрессорами, тем самым контролируя дифференцировку клеток, поддержание гомеостаза и метаболические процессы организма.

Ядерные рецепторы кодируются у человека 48 генами, образуют суперсемейство филогенетически родственных белков и классифицируются на эндокринные рецепторы (рецепторы стероидных и тиреоидных гормонов, витаминов D и A), орфанные рецепторы и усыновленные рецепторы [E.R. Weikum et al., 2018].

К усыновленным рецепторам относят прегнан-Х-рецептор (англ.: pregnane X receptor, PXR), конститутивный андростановый рецептор (англ.: constitutive androstane receptor, CAR), печеночный Х рецептор альфа и бета (англ.: liver X receptor, LXR) и фарнезоидный Х рецептор (англ.: farnesoid X receptor, FXR).

До недавнего времени эти рецепторы рассматривались только в качестве ксеносенсоров, однако позже была выявлена их роль в регуляции метаболических процессов организма, в частности под действием половых гормонов [X. Chai et al., 2013; B. Blumberg et al., 1998]. Учитывая то обстоятельство, что данные рецепторы регулируют экспрессию белков-транспортеров, логично предположить, что воздействие половых гормонов на Pgp, BCRP, OATP1B1 и OATP1B3 может быть опосредовано указанными усыновленными рецепторами.

В рамках настоящего исследования и проверялась данная гипотеза.

Степень разработанности проблемы

При изучении влияния половых гормонов на функционирование Pgp и BCRP были получены противоречивые результаты.

Так, в человеческих эпителиальных клетках проксимальных почечных канальцев эстрадиол повышал экспрессию мРНК белка Pgp и активность транспортера [Y. Kanado et al., 2019]. В другом исследовании на клетках рака молочной железы, с учетом наличия/отсутствия эстрогеновых рецепторов (англ.: estrogen receptor, ER), двух $ER\alpha^+$ положительных (MCF-7 и T47-D) и двух ER^- отрицательных (MDA-MB-231 и NCI/ADR-RES), было показано, что эстрадиол снижал уровень белка Pgp в $ER\alpha$ -положительных клеточных линиях [K. Mutoh et al., 2006].

В клеточной линии хориокарциномы плаценты человека JAR прогестерон снижал поглощение саквинавира – субстрата Pgp, а верапамил блокировал

данный эффект [L.D. Coles et al., 2009]. В эксперименте на роговицах новозеландских кроликов выявлено, что тестостерон в концентрации 100 и 150 мкМ не влиял на опосредованный Pgr транспорт эритромицина через роговицу, однако в концентрациях 250 и 500 мкМ ингибировал активность белка-транспортера, при этом IC_{50} составила $241 \pm 27,6$ мкМ [S. Dey et al., 2004]. Однако в другом исследовании тестостерон не влиял на уровень белка Pgr в культурах почечной ткани мышей и в эпителиальных клетках проксимальных канальцев почек человека [Y. Kanado et al., 2019].

Обработка эстрадиолом клеток аденокарциномы молочной железы человека MCF-7 снижала уровень белка BCRP. Напротив, в альвеолярных базальных эпителиальных клетках A549, не содержащих рецепторов эстрогена, эстрадиол не оказывал существенного влияния на данный показатель [Y. Imai, 2005]. В клеточной линии BeWo обработка прогестероном снизила экспрессию гена *BCRP*. Но, в то же время, в другом исследовании обработка клеток BeWo совместно прогестероном и эстрадиолом вызвала большее повышение экспрессии белка BCRP, чем при использовании только прогестерона. ICI (антагонист ядерных эстрогеновых рецепторов) и RU486 (антагонист ядерного прогестеронового рецептора) подавляли эффекты, вызванные двумя половыми стероидными гормонами [H. Wang et al., 2006].

В линии клеток рака молочной железы человека MCF-7 лечение дигидротестостероном снизило уровни экспрессии гена *ABCG2*, кодирующего BCRP [B. Al-Momany et al., 2021].

Исследований по оценке влияния половых гормонов на активность и количество OATP1B1/OATP1B3 в доступной литературе обнаружить не удалось.

Научный коллектив кафедры фармакологии ФГБОУ ВО РязГМУ Минздрава России на протяжении нескольких лет занимается изучением функционирования и механизмов регуляции белков-транспортеров [Н.М. Попова и др., 2024; Е.Н. Якушева и др., 2014, 2015, 2017, 2018]. В работах была изучена активность Pgr при моделировании патологических состояний таких как: нарушения мозгового кровообращения [И.В. Черных и др., 2019], гипоксии

[Е.Н. Якушева и др., 2016], неврологические расстройства [М.М. Градинарь и др., 2024], патологии эндокринной системы [Е.Н. Якушева и др., 2016].

Учитывая все вышеизложенное целесообразно провести экспериментальное исследование *in vitro*, посвященное оценке функционирования и механизмов регуляции Pgr, BCRP, OATP1B1, OATP1B3 через усыновленные рецепторы под действием половых гормонов.

Цель исследования

Изучить влияние половых гормонов на функционирование клинически значимых белков-транспортеров (Р-гликопротеина, белка резистентности рака молочной железы, полипептидов, транспортирующих органические анионы 1B1 и 1B3) и оценить роль усыновленных рецепторов (прегнан Х рецептора, конститутивного андростанового рецептора, печеночного Х рецептора альфа, фарнезоидного Х рецептора) в данном процессе.

Задачи исследования

Для достижения поставленной цели решались следующие задачи:

1. Изучить прямое влияние эстрадиола, прогестерона и тестостерона на активность клинически значимых белков-транспортеров (Р-гликопротеина, белка резистентности рака молочной железы, полипептидов, транспортирующих органические анионы 1B1 и 1B3) при кратковременном воздействии.

2. Изучить влияние эстрадиола, прогестерона и тестостерона на экспрессию генов, количество белка и активность клинически значимых белков-транспортеров (Р-гликопротеина, белка резистентности рака молочной железы, полипептидов, транспортирующих органические анионы 1B1 и 1B3) при длительном воздействии.

3. Изучить роль усыновленных рецепторов (прегнан Х рецептора, конститутивного андростанового рецептора, фарнезоидного Х рецептора, печеночного Х рецептора альфа) в регуляции Р-гликопротеина под действием половых гормонов.

4. Изучить роль усыновленных рецепторов (прегнан Х рецептора, конститутивного андростанового рецептора, фарнезоидного Х рецептора,

печеночного X рецептора альфа) в регуляции белка резистентности рака молочной железы под действием половых гормонов.

5. Изучить роль усыновленных рецепторов (прегнан X рецептора, конститутивного андростанового рецептора, фарнезоидного X рецептора, печеночного X рецептора альфа) в регуляции полипептида, транспортирующего органические анионы 1B1 под действием половых гормонов.

6. Изучить роль усыновленных рецепторов (прегнан X рецептора, конститутивного андростанового рецептора, фарнезоидного X рецептора, печеночного X рецептора альфа) в регуляции полипептида, транспортирующего органические анионы 1B3 под действием половых гормонов.

Научная новизна

В ходе выполнения работы впервые:

на клетках линии Caco-2 изучено влияние эстрадиола, прогестерона и тестостерона на количество и активность белков-транспортеров Pgp и BCRP. Установлена роль усыновленных рецепторов PXR, CAR, FXR, LXR α в данном процессе;

на клетках линии HepG2 изучено влияние эстрадиола, прогестерона и тестостерона на количество и активность белков-транспортеров OATP1B1 и OATP1B3. Показана роль усыновленных рецепторов PXR, CAR, FXR, LXR α в данном процессе;

показано, что в большинстве случаев изменение количества транспортеров (Pgp, BCRP, OATP1B1, OATP1B3) под действием половых гормонов связано с однонаправленным изменением экспрессии их генов и сопровождается соответствующей модуляцией их активности;

выявлено, что действие половых гормонов на изучаемые белки-транспортеры через усыновленные рецепторы в клетках, которые не являются их мишенями, наблюдается при использовании гормонов в высоких концентрациях, превышающих физиологические (1, 10, 100 мкМ), поэтому данный механизм регуляции реализуется только при терапевтическом применении гормональных лекарственных препаратов.

Теоретическая и практическая значимость работы

В ходе выполнения исследования изучено влияние половых гормонов – эстрадиола, прогестерона, тестостерона на количество и активность клинически значимых белков-транспортеров и оценена роль в данном процессе усыновленных рецепторов – CAR, PXR, FXR, LXR α .

При кратковременном воздействии на клетки Caco-2 и HepG2 установлено прямое дозозависимое тканеспецифическое ингибирующее действие половых гормонов на активность белков-транспортеров.

Показано, что эстрадиол, стимулируя CAR, повышает количество и активность Pgp. Прогестерон, стимулируя PXR, повышает количество данного белка-транспортера. Тестостерон снижает количество Pgp, ингибируя конститутивный андростановый рецептор.

Изученные половые гормоны во всех концентрациях, превышающих физиологические, повышают количество BCRP, причем в реализации действия эстрадиола принимают участие CAR и PXR, а тестостерона и прогестерона – FXR и PXR.

Эстрадиол повышает количество белка-транспортера OATP1B1, действуя через CAR и PXR, а тестостерон повышает количество белка-транспортера OATP1B1, посредством FXR, PXR и LXR α . Прогестерон вызывает снижение количества OATP1B1 без участия изученных усыновленных рецепторов.

В ходе исследования показано, что эстрадиол повышает уровень OATP1B3, действуя через FXR, тестостерон увеличивает количество данного белка-транспортера за счет влияния на LXR α , а прогестерон не оказывает воздействия на содержание OATP1B3.

Выявлено, что изменение экспрессии генов, кодирующих белки-транспортеры, под действием половых гормонов сопровождается однонаправленной динамикой количества транспортеров, но не всегда совпадает с изменением их активности. Длительность воздействия гормонов влияет на направленность эффекта на транспортеры.

Действие половых гормонов на изучаемые белки-транспортеры через

усыновленные рецепторы реализуется при применении гормонов в высоких концентрациях, превышающих физиологические, что свидетельствует о том, что данные эффекты реализуется только при терапевтическом применении лекарственных препаратов на основе половых гормонов.

Полученные результаты раскрывают механизмы влияния половых гормонов на клинически значимые белки-транспортеры в клетках, не являющихся мишенями половых гормонов (энтероциты, гепатоциты). Усыновленные рецепторы, принимающие участие в регуляции белков-транспортеров, могут рассматриваться как мишени для модуляции их активности с целью эффективной и безопасной фармакотерапии их субстратами.

Методология и методы исследования

Исследование выполнено *in vitro* на клетках линий Caco-2 и HepG2 (анализ функционирования Pgp, BCRP и OATP1B1/OATP1B3 соответственно).

Уровень изучаемых белков-транспортеров, а также усыновленных рецепторов оценивался методом вестерн-блот, экспрессия генов определялась методом полимеразной цепной реакции в реальном времени (ПЦР-RT).

Активность транспортеров анализировалась по проникновению внутрь клеток их субстратов: Pgp – фексофенадина, BCRP – сульфасалазина, OATP1B1/OATP1B3 – аторвастатина.

Концентрации веществ анализировались методом ВЭЖХ-МС/МС с помощью разработанных и валидированных методик.

Роль усыновленных рецепторов в регуляции транспортеров оценивалась с помощью применения их специфических ингибиторов: PXR – кетоконазола, CAR – CINPA1, FXR – тауро-β-холевая кислота, LXRα – TFCA.

Полученные результаты обрабатывались адекватными статистическими методами.

Исследование соответствует пунктам 2, 7, 8 паспорта научной специальности 1.5.4. Биохимия (медицинские науки).

Положения, выносимые на защиту

1. Эстрадиол, стимулируя CAR, повышает количество и активность Pgp.

Прогестерон, стимулируя PXR, повышает количество белка-транспортера, однако повышения активности Pgr при этом не происходит, так как гестаген обладает негеномной (прямой) ингибирующей активностью по отношению к молекуле транспортера. Тестостерон снижает количество Pgr, ингибируя CAR.

2. Изученные половые гормоны во всех концентрациях, превышающих физиологические, увеличивают количество BCRP. В реализации действия эстрадиола принимают участие CAR и PXR, тестостерона и прогестерона – FXR и PXR.

3. Эстрадиол повышает количество OATP1B1, действуя через CAR и PXR, а тестостерон увеличивает уровень данного белка-транспортера, действуя через FXR, PXR и LXR α . Прогестерон вызывает снижение количества OATP1B1.

4. Эстрадиол повышает уровень OATP1B3, действуя через FXR, тестостерон увеличивает количество данного белка-транспортера за счет влияния на LXR α . Прогестерон не оказывает воздействия на уровень OATP1B3.

Степень достоверности и апробация результатов

Высокая степень достоверности полученных результатов обусловлена достаточным объемом экспериментальных данных, полученных с использованием современных методов исследования с последующей статистической обработкой.

Работа выполнена при частичной поддержке грантов РФФИ №16-04-00320 а, №18-415-623001 р_мол_а.

Основные положения диссертации доложены, обсуждены и опубликованы в материалах: 76-й международной научно-практической конференции студентов и молодых ученых «Достижения фундаментальной, прикладной медицины и фармации» (Самарканд, 2022); Всероссийской конференции молодых ученых, посвященной 100-летию со дня рождения профессора А.А. Никулина и 80-летию Рязанского государственного медицинского университета имени академика И.П. Павлова (Рязань, 2023); XXIV съезде физиологического общества им. И.П. Павлова (Санкт-Петербург, 2023); Международной конференции «Рецепторы и внутриклеточная сигнализация» (Серпухов, 2023); Общероссийской научно-

практической конференции акушеров-гинекологов «Оттовские чтения» (Москва, 2024); I Пленуме фармакологов России, посвященном 160-летию со дня рождения академика Н.П. Кравкова «Традиции и перспективы развития Российской фармакологии» (Рязань, 2025).

Апробация работы состоялась 27 июня 2025 г. на заседании кафедр биологической химии; фармакологии; фармацевтической химии и фармакогнозии; управления и экономики фармации; профильных гигиенических дисциплин; математики, физики и медицинской информатики; сердечно-сосудистой, рентгенэндоваскулярной хирургии и лучевой диагностики и центральной научно-исследовательской лаборатории (протокол № 3 от 27.06.2025).

Внедрение результатов исследования в практику

Основные положения работы используются в учебном процессе при обучении студентов на кафедрах биологической химии и фармакологии ФГБОУ ВО РязГМУ Минздрава России, а также внедрены в практику работы Центральной научно-исследовательской лаборатории ФГБОУ ВО РязГМУ Минздрава России.

Личный вклад автора

Автором самостоятельно подготовлен аналитический обзор литературы по изучаемой проблеме, составлена программа исследования, проведены эксперименты *in vitro*, хроматографические исследования, вестерн-блот анализ, обработка и интерпретация данных, подготовка публикаций по диссертационной работе.

Сведения о публикациях по теме диссертации

По результатам диссертационной работы опубликовано 23 работы: 12 статей в рецензируемых журналах, рекомендованных ВАК при Минобрнауки России, включая 10 статей в изданиях, входящих в базы Web of Science и Scopus; 2 патента Российской Федерации, 9 статей в других изданиях и тезисов докладов в материалах российских и международных конференций.

Структура и объем диссертации

Диссертация состоит из следующих разделов: введение, обзор литературы

(глава 1), материалы и методы исследования (глава 2), результаты исследования (глава 3), обсуждение полученных результатов, заключение, выводы, практические рекомендации, перспективы дальнейшей разработки темы, список сокращений, список литературы.

Диссертационная работа изложена на 187 страницах, проиллюстрирована 53 рисунками и 14 таблицами. Список литературы включает 50 источников отечественной и 288 иностранной научной литературы.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Материалы и методы исследования

Исследование проводилось на клеточных линиях аденокарциномы ободочной кишки человека Сасо-2 и гепатоцеллюлярной карциномы человека НерG2, полученных из коллекции клеточных линий ФГБУН ИНЦ РАН (Санкт-Петербург). Линия Сасо-2 использовалась для изучения транспортеров Pgp и BCRP, НерG2 – для исследования транспортеров OATP1B1 и OATP1B3.

Клетки культивировали в среде DMEM с высоким содержанием глюкозы (4500 мг/л), с добавлением 15% эмбриональной бычьей сыворотки, 4 мМ L-глутамина и антибиотиков (100 ЕД/мл пенициллина, 100 мкг/мл стрептомицина) в условиях 37°C и 5% содержания CO₂. Для экспериментов клетки снимали трипсинизацией и высевали в 6- или 24-луночные планшеты (Corning, США). Линию Сасо-2 культивировали 21 сутки до спонтанной дифференцировки в поляризованные энтероцитоподобные клетки, экспрессирующие Pgp и BCRP, а НерG2 использовали при достижении монослоя.

На каждый эксперимент было выполнено по 3 повторения (n=3).

В ходе исследования были сформированы следующие группы:

Первая группа – изучение влияния эстрадиола, прогестерона и тестостерона на активность Pgp, BCRP, OATP1B1, OATP1B3 при кратковременном воздействии – 15 и 30 мин (оценка прямого влияния гормонов на белки-транспортеры);

Вторая группа – изучение влияния эстрадиола, прогестерона и тестостерона на экспрессию генов, кодирующих Pgp, BCRP, OATP1B1, OATP1B3.

Третья группа – изучение влияния эстрадиола, прогестерона и тестостерона на относительное количество Pgr, BCRP, OATP1B1, OATP1B3.

Четвертая группа – изучение влияния эстрадиола, прогестерона и тестостерона на активность Pgr, BCRP, OATP1B1, OATP1B3 при длительном воздействии – 24 ч.

Пятая группа – изучение способности эстрадиола, прогестерона и тестостерона активировать CAR, PXR, FXR, LXR α .

Шестая группа – изучение роли CAR, PXR, FXR, LXR α во влиянии эстрадиола, прогестерона и тестостерона на относительное количество Pgr, BCRP, OATP1B1, OATP1B3.

Изучение влияния эстрадиола, прогестерона и тестостерона на активность Pgr, BCRP, OATP1B1, OATP1B3

Клетки линии Caco-2 (при изучении Pgr и BCRP) и клетки линии HepG2 (при изучении OATP1B1/OATP1B3) культивировали в 24-луночных планшетах. При достижении монослоя (клетки линии HepG2) или при достижении монослоя и инкубации в течение 21 сут (клетки линии Caco-2) добавляли гормоны эстрадиол / прогестерон / тестостерон («Sigma Aldrich», США) в концентрациях 1 нМ, 10 нМ, 100 нМ, 1 мкМ, 10 мкМ, 100 мкМ и инкубировали в течение 24 ч. В контрольные лунки добавляли питательную среду, содержащую этанол (растворитель тестируемых веществ) в конечной концентрации 0,0001%. После окончания инкубации клетки троекратно промывали фосфатным буфером и оценивали функциональную активность белков-транспортёров по проникновению их субстратов (фексофенадина для Pgr, сульфасалазина - BCRP, аторвастатина - OATP1B1/OATP1B3) внутрь клеток. Анализ проводили методом ВЭЖХ-МС/МС.

Для оценки прямого влияния половых гормонов на активность изучаемых белков-транспортёров, их добавляли к клеткам во всех тестируемых концентрациях и преинкубировали 30 мин с клетками Caco-2 или 15 мин с клетками HepG2. Затем транспортную среду меняли на среду, содержащую комбинацию – тестируемые гормоны и субстраты транспортёров и оценивали

проникновение субстратов внутрь клеток. Разная продолжительность преинкубации связана с типом транспортеров (Pgp и BCRP – эффлюксные; OATP1B1/OATP1B3 – инфлюксные) и достаточна для того, чтобы молекула тестируемого вещества могла соединиться с транспортером и изменить его активность. В качестве классических ингибиторов транспортеров (для подтверждения адекватности методики) использовали кетоконазол – ингибитор Pgp, кверцетин – ингибитор BCRP, рифампицин – ингибитор OATP1B1/OATP1B3 (все компоненты «Sigma Aldrich», США). При оценке длительного влияния половых гормонов на активность транспортеров (в течение 24 ч) дополнительную преинкубацию не проводили, а сразу оценивали транспорт их субстратов.

Изучение влияния эстрадиола, прогестерона и тестостерона на экспрессию генов, кодирующих Pgp, BCRP, OATP1B1, OATP1B3 и на относительное количество изучаемых белков-транспортеров

Клетки линии Caco-2 (при изучении Pgp и BCRP) и клетки линии HepG2 (при изучении OATP1B1/OATP1B3) культивировали в 6-луночных планшетах. Эстрадиол, прогестерон, тестостерон прибавляли к клеткам в концентрациях 1 нМ, 10 нМ, 100 нМ, 1 мкМ, 10 мкМ, 100 мкМ и инкубировали в течение 24 ч. После окончания инкубации клетки снимали с лунок и анализировали экспрессию генов, кодирующих Pgp, BCRP, OATP1B1, OATP1B3 методом ПЦР в реальном времени и относительное количество изучаемых белков-транспортеров методом вестерн-блот.

Изучение способности эстрадиола, прогестерона и тестостерона активировать CAR, PXR, FXR, LXR α

Клетки линии Caco-2 и HepG2 культивировали в 6 луночных планшетах.

Эстрадиол, или прогестерон или тестостерон добавляли к клеткам в концентрациях 1, 10, 100 мкМ и инкубировали в течение 24 ч. После окончания инкубации клетки снимали с лунок и анализировали относительное количество изучаемых усыновленных рецепторов CAR, PXR, FXR, LXR α в цитоплазматической и мембранной фракциях клеток методом вестерн-блот.

**Изучение роли CAR, PXR, FXR, LXR α во влиянии эстрадиола,
прогестерона и тестостерона на относительное количество Pgr, BCRP,
OATP1B1, OATP1B3**

Клетки линии Caco-2 (при изучении Pgr и BCRP) и клетки линии HepG2 (при изучении OATP1B1/OATP1B3) культивировали в 6 луночных планшетах. Для оценки роли усыновленных рецепторов (FXR, CAR, PXR, LXR α) во влиянии половых гормонов на относительное количество изучаемых белков-транспортёров совместно с половыми гормонами к клеткам добавляли ингибитор CAR - 5-[(Диэтиламино)ацетил]-10,11-дигидро-5H-дибензо[b,f]азепин-3-ил]этиловый эфир карбаминовой кислоты 10 мкМ (CINPA 1, «Tocris», Великобритания), ингибитор PXR – кетоконазол 10 мкМ («Sigma Aldrich», Германия), ингибитор FXR – тауро- β -холевая кислота 200 мкМ (β -ТА, «Sigma Aldrich», США), ингибитор LXR α – 3-(3,4-Диметоксифенил)-N-[4-(трифлуорометил)фенил]-2-пропенамид, N-(4-Трифлуорометилфенил) 3,4-диметоксициннамамид 30 мкМ (TFCA, «Sigma Aldrich», США). После окончания инкубации клетки снимали с лунок и анализировали относительное количество изучаемых белков-транспортёров методом вестерн-блот.

Определение экспрессии генов, кодирующих

Pgr, BCRP, OATP1B1, OATP1B3

Суммарную РНК выделяли с использованием набора RNeasy Mini Kit (QIAGEN, Германия). Концентрацию РНК в образцах определяли спектрофотометрически с помощью прибора NanoPhotometr NP80-Touch (Implen GmbH, Германия). Для проведения ПЦР в реальном времени на первом этапе РНК в количестве 1 мкг подвергали обратной транскрипции с использованием набора реактивов «БиоМастер ОТ-ПЦР SYBR Blue (2 $\times$) для проведения ОТ-ПЦР в реальном времени с SYBR Green I» (Биолабмикс, Россия). Обратная транскрипция проводилась при температуре 45 $^{\circ}$ C, время инкубации составило 10 минут, количество циклов – 1. На втором этапе с синтезированной кДНК проводили ПЦР в реальном времени. В качестве референсного, относительно которого вычислялась экспрессия генов, был выбран ген, кодирующий

глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназу (GAPDH).

Исследование проводилось по нижеприведенным условиям температурных циклов: денатурация (нагрев реакционной смеси) – при 95°C, охлаждение – при 53°C, элонгация – при 72°C.

Дальнейший анализ осуществляли на амплификаторе нуклеиновых кислот Applied Biosystems Quant Studio 5 с гибридизационно-флуоресцентной детекцией продуктов ПЦР в режиме реального времени (Life Technologies Holdings Pte. Ltd., Сингапур) с программным обеспечением QuantStudio Design and Analysis (Thermo Fisher Scientific, США). Расчет уровня экспрессии генов относительно референсного гена был осуществлен с помощью программного обеспечения LinRegPCR v.11.0 (Heart failure research center, Нидерланды). Последовательности праймеров представлены в Таблице 1.

Таблица 1 – Праймеры, использованные в работе (Евроген, Россия)

Для <i>MDR1</i> , кодирующего Pgp	
Прямой праймер	5'-CTTCTTTGCTCCTCCATTGC-3'
Обратный праймер	5'-CCGCTGTTCGTTTCCTTTAG-3'
Для <i>ABCG2</i> , кодирующего BCRP	
Прямой праймер	5'-CTGTCTACTCTTTGCTCAGCTTC-3'
Обратный праймер	5'-GCTCAGTTAACTCCTGTAAGTGC-3'
Для <i>SLCO1B1</i> , кодирующего OATP1B1	
Прямой праймер	5'-GGTGAATGCCCAAGAGATGATG-3'
Обратный праймер	5'-TGGAACCCAGTGCA AGTGATT-3'
Для <i>SLCO1B3</i> , кодирующего OATP1B3	
Прямой праймер	5'-GAAGGGTCTACTTGGGCTTATCT-3'
Обратный праймер	5'-CGATGCCTTGGTATCTTTTCCTT-3'
Для <i>GAPDH</i>	
Прямой праймер	5'-GTCCCTCTGACTTCAACAGCG-3'
Обратный праймер	5'-ACCACCCTGTTGCTGTAGCCAA-3'

Определение относительного количества Pgp, BCRP, OATP1B1, OATP1B3

После окончания инкубации с анализируемыми веществами клетки

снимали с лунок раствором трипсин-ЭДТА (0,25% трипсина и 0,2% ЭДТА, («Sigma-Aldrich», Германия), трижды промывали раствором фосфатного буфера («BioRad», США) и лизировали в NP40 Cell Lysis Buffer Thermo («Thermo Fisher Scientific», США) с добавлением смеси ингибиторов протеиназ («Sigma-Aldrich», Германия) в течение 30 минут при +4°C и постоянном перемешивании из расчета 10^7 клеток на 100 мкл буфера. Полученный лизат центрифугировали при 5000 *g* (СМ-50, «Eppendorf», Германия). 20 мкг белков супернатанта клеточного лизата подвергали электрофорезу с использованием 7,5% TGX Stain-Free FastCast Acrylamide Kit («Bio-Rad», США) в буферной системе Laemmli («BioRad», США). Образцы смешивали с буфером Laemmli («Bio-Rad», США), содержащем 50 мМ β-меркаптоэтанола («BioRad», США) в соотношении 1:3, инкубировали 10 мин при температуре 70°C. Гели подвергали электрофорезу при 100 В в течение 90 мин. Белки переносили на нитроцеллюлозную мембрану (Trans-Blot Turbo Mini- Size nitrocellulose, «Bio-Rad», США) с использованием Mini Trans-Blot («Bio-Rad», США) в течение 10 мин при 25 В и 1,3 А. Белки на мембране блокировали 1% раствором Casein Blocker («Bio-Rad», США), содержащим 0,1% Tween-20 («Sigma-Aldrich», Германия), при инкубации в течение 1 ч при комнатной температуре.

Детекцию белков Pgp, BCRP, OATP1B1, OATP1B3 проводили с использованием первичных антител (P-Glycoprotein Antibody MA5-13854, Invitrogen; США; AF5177 ABCG2 Antibody, Affinity, Китай; OATP2 Polyclonal Antibody, PA5-113548, «Invitrogen», США; SLCO1B3 Monoclonal antibody, Proteintech antibody 66381-1-Ig) в концентрации 1:200 в блокирующем растворе Casein blocker («Bio-Rad», США) в течение 2 ч при 37°C. Визуализацию первичных антител осуществляли с использованием вторичных антител (Rabbit-anti-Mouse IgG (H+L) Secondary Antibody, HRP, «Invitrogen», США или Goat anti-Rabbit IgG (H+L) Cross-Adsorbed Secondary Antibody, HRP, «Invitrogen», США) в разведении 1:4000 и инкубацией в течение 1 ч при комнатной температуре.

Хемилюминесценцию фиксировали с помощью ChemiDocXRS+ («Bio-Rad», США). Интенсивность полученных полос (бэндов) анализировали

денситометрически с помощью программного обеспечения ImageLab («Bio-Rad», США).

Молекулярная масса тестируемых белков была подтверждена путем сравнения с маркерами молекулярной массы (Precision plus protein standards Dual Color, «Bio-Rad», США).

Содержание Pgp, BCRP, OATP1B1, OATP1B3 оценивали относительно содержания белка домашнего хозяйства глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназы (GAPDH, англ.: glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase); первичные антитела GAPDH Loading Control Monoclonal Antibody (GA1R), DyLight 68 («Invitrogen», США), разведение 1:1000, вторичные кроличьи антитела – Rabbit-anti-Mouse IgG (H+L) Secondary Antibody, HRP («Invitrogen», США), разведение 1:4000).

Определение относительного количества CAR, PXR, FXR, LXR α в ядерной и цитоплазматической фракциях лизатов клеток

Выделение ядерной и цитоплазматической фракции лизата клеток осуществляли с помощью набора Protein Extraction Kit (Cytoplasmic Nuclear), («Bio-Rad», США).

20 мкг белков супернатанта клеточного лизата подвергали электрофорезу с использованием 7,5% TGX Stain-Free FastCast Acrylamide Kit («Bio-Rad», США) в буферной системе Laemmli («BioRad», США). Образцы смешивали с буфером Laemmli («Bio-Rad», США), содержащем 50 мМ β -меркаптоэтанола («BioRad», США) в соотношении 1:3, инкубировали 10 мин при температуре 70°C. Гели подвергали электрофорезу при 100 В в течение 90 мин. Белки переносили на нитроцеллюлозную мембрану (Trans-Blot Turbo Mini- Size nitrocellulose, «Bio-Rad», США) с использованием Mini Trans-Blot («Bio-Rad», США) в течение 10 мин при 25 В и 1,3 А. Белки на мембране блокировали 1% раствором Casein Blocker («Bio-Rad», США), содержащим 0,1% Tween-20 («Sigma», Германия), при инкубации в течение 1 ч и комнатной температуре.

Детекцию белков CAR, PXR, FXR, LXR α проводили с использованием первичных антител: MB67 CAR Monoclonal Antibody, «Invitrogen», США; MA5-

31808 PXR Monoclonal Antibody 1D12G1, «Invitrogen», США; PAC042Hu01 Polyclonal Antibody to Farnesoid X Receptor, «Cloud-Clone Corp», Китай; PAC044Hu01 Polyclonal Antibody to Liver X Receptor Alpha, «Cloud-Clone Corp», Китай). Концентрация антител 1:200, разведение в блокирующем растворе Casein blocker («Bio-Rad», США), инкубация в течение 2 ч при 37°C. Визуализацию первичных антител осуществляли с использованием вторичных антител (Rabbit-anti-Mouse IgG (H+L) Secondary Antibody, HRP, «Invitrogen», США или Goat anti-Rabbit IgG (H+L) Cross-Adsorbed Secondary Antibody, HRP, «Invitrogen», США) в разведении 1:4000 и инкубацией в течение 1 ч при комнатной температуре.

Хемилюминесценцию фиксировали с помощью ChemiDocXRS+ («Bio-Rad», США). Интенсивность полученных полос (бэндов) анализировали денситометрически с помощью программного обеспечения ImageLab («Bio-Rad», США). Содержание CAR, PXR, FXR, LXR α оценивали относительно содержания белка домашнего хозяйства глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназы (GAPDH).

Определение активности Pgr и BCRP

Непосредственно перед проведением транспортного эксперимента из лунок удаляли ростовую среду, а клетки однократно промывали нагретой до 37°C транспортной средой, после чего в лунки добавляли транспортную среду, содержащую фексофенадин или сульфасалазин в конечной концентрации 150 и 50 мкМ соответственно. Транспортная среда состояла из раствора Хэнкса («Sigma-Aldrich», Германия) с 25 мМ буферного раствора (англ.: 4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid, HEPES) («Sigma-Aldrich», Германия) и 1% диметилсульфоксида («ПанЭко», Россия) с добавлением тестируемых веществ. Клетки инкубировали в течение 5, 15, 30, 45 и 60 минут. Реакцию останавливали удалением транспортной среды, содержащей тестируемое вещество, и немедленной промывкой клеток 500 мкл ледяной транспортной среды. После этого клетки трижды промывали 500 мкл ледяного фосфатно-солевого буфера («ПанЭко», Россия).

Лизис клеток осуществляли трехкратным циклом заморозки-разморозки (замораживание при -80°C, затем размораживание при комнатной температуре).

Концентрацию общего белка в образцах определяли по методу Бредфорда с помощью коммерческого набора Pierce Coomassie Plus Bradford Assay Kit («ThermoFisher», США).

Определение активности ОАТР1В1/ОАТР1В3

Непосредственно перед проведением транспортного эксперимента из лунок удаляли ростовую среду, а клетки однократно промывали нагретой до 37°C транспортной средой, после чего в лунки добавляли транспортную среду, содержащую аторвастатин в конечной концентрации 1 мкМ. Клетки инкубировали в течение 5, 15, 30, 45 и 60 минут. Реакцию останавливали удалением транспортной среды, содержащей тестируемое вещество, и немедленной промывкой клеток 500 мкл ледяной транспортной среды. После этого клетки трижды промывали 500 мкл ледяного фосфатно-солевого буфера («ПанЭко», Россия). Лизис клеток осуществляли трехкратным циклом заморозки-разморозки (замораживание при -80 °C, затем размораживание при комнатной температуре).

Определение концентрации фексофенадина в лизате клеток

Концентрацию веществ (фексофенадина, сульфасалазина и аторвастатина) в лизате клеток анализировали методом ВЭЖХ-МС/МС на высокоэффективном жидкостном хроматографе «Ultimate 3000» («ThermoFisher», США) с tandemным масс-селективным детектором TSQ Fortis («ThermoFisher», США), градиентным насосом, дегазатором и автосемплером.

Пробоподготовка осуществлялась добавлением к 300 мкл лизата клеток эквивалентного (300 мкл) количества ацетонитрила («Химмед», Россия) с амантадином («Sigma-Aldrich», США) в концентрации 10 нг/мл в качестве внутреннего стандарта. Полученный раствор перемешивали на Vortex («Heidolph», Германия). Затем образцы центрифугировали 10 мин при 4°C и скорости 21 000 g на центрифуге Avanti JXN-3 Beckman Coulter («Beckman Coulter», США). Супернатант переносили в вials объемом 1 мл («ThermoFisher», США) и помещали в автосемплер.

Условия анализа на хроматографе: предколонка Selectra C18 Guard Cartridges SLC-18GDC46-5UM, хроматографическая колонка UCT Selectra C18

4,6 mm × 100 mm 5 μ m, 100 Å, термостатирование колонки 35°C. Скорость потока подвижной фазы составила 0,3 мл/мин, объем вводимой пробы – 20 мкл. В работе был применен градиентный режим элюирования в соотношении водный 0,1%-й раствор муравьиной кислоты /ацетонитрил: 0 мин -75% / 25%, 0,2 мин - 30% / 70%, 6 мин - 1% / 99%, 8 мин - 75% / 25%. Время удерживания фексофенадина составило в среднем 5,7 мин, амантадина – 3,6 мин. Длительность анализа – 10 мин.

Молекулы ионизировали в режиме положительной ионизации на электроспрее при напряжении 3500 В. Количественный анализ фексофенадина проводили с использованием следующих MRM переходов: m/z 502,3 $\rightarrow$ 466,2; анализ амантадина – по дочернему иону с m/z 152,1 $\rightarrow$ 135,08. Аналитический диапазон методики составил 0,5-50 нг/мл.

Определение концентрации сульфасалазина в лизате клеток

Для пробоподготовки к 300 мкл объекта (лизат клеток) добавляли 300 мкл метанола («Химмед», Россия) с внутренним стандартом валсартаном (100 нг/мл), перемешивали на вортексе Vortex («Heidolph», Германия) 5 мин, центрифугировали при +4°C 10 мин, скорость - 21000 g (центрифуга Avanti JXN-3 «Beckman Coulter», США). 400 мкл супернатанта переносили в вials и помещали в автосемплер для дальнейшего анализа. Объем инъекции составил 10 мкл.

Для хроматографического анализа использовали колонку Luna Omega 3 мкм Polar C18 50x2.1, 3 мкм, предколонку аналогичного типа – C18 3 мкм. Температура разделения – 35°C, скорость потока – 0,3 мл/мин. В работе был применен градиентный режим элюирования в соотношении водный 0,1%-й раствор муравьиной кислоты /метанол: 0,0 мин -60% / 40%; 0,3 мин - 15% / 85%; 4 мин - 1% / 99%; 6 мин - 60% / 40%; 10 мин - 60% / 40%. Время удерживания сульфасалазина составило в среднем 3,18 мин, валсартана – 3,49 мин. Длительность анализа – 8 мин.

Ионизацию молекул проводили электроспреем в режиме негативной ионизации (H-ESI) (высокотемпературный электроспрей) при напряжении 2500 В. Количественный анализ веществ выполняли с использованием следующих MRM переходов: m/z 397,1 $\rightarrow$ 197,1 для сульфасалазина и m/z 434,2 $\rightarrow$ 179,1 для валсартана (внутреннего стандарта). Аналитический диапазон методики составил 5-5000 нг/мл.

Определение концентрации аторвастатина в лизате клеток

Пробоподготовку осуществляли добавлением к 300 мкл лизата клеток эквивалентного (300 мкл) количества ацетонитрила с валсартаном в концентрации 10 нг/мл в качестве внутреннего стандарта. Полученный раствор перемешивали на Vortex («Heidolph», Германия). Затем образцы центрифугировали 10 мин при 4°C и скорости 21000 g на центрифуге Avanti JXN-3 Beckman Coulter («Beckman Coulter», США). Супернатант переносили в вials объемом 1 мл («ThermoFisher», США) и помещали в автосемплер.

Условия анализа на хроматографе: предколонка Selectra C18 Guard Cartridges SLC-18GDC46-5UM, хроматографическая колонка UCT Selectra C18 4,6 mm × 100 mm 5 um, 100 Å, термостатирование колонки 35°C. В работе был применен градиентный режим элюирования в соотношении водный 0,1%-й раствор муравьиной кислоты /ацетонитрил: 0,0 мин - 35% / 65%; 0,3 мин - 35% / 65%; 0,6 мин - 5% / 95%; 5,0 мин - 5% / 95%; 5,05 мин - 35% / 65%; 8,0 мин - 35% / 65%.

Молекулы ионизировали в режиме положительной ионизации при напряжении 3500 В. Количественный анализ веществ проводили с использованием следующих MRM переходов: 559,30 m/z → 466,20 m/z для аторвастатина и 436,2 m/z → 206,3* m/z для валсартана (внутреннего стандарта). Аналитический диапазон методики составил 0,5-200 нмоль/л.

Статистический анализ

Полученные результаты анализировали с помощью программ StatSoft Statistica 13,0, Microsoft Excel, GraphPad Prism8. Статистическую значимость различий оценивали дисперсионным анализом (ANOVA), парные сравнения с контролем выполняли с помощью теста Даннетта или Тьюки. При анализе двух групп оценку проводили с помощью t-критерия Стьюдента. Результаты в таблицах и на рисунках приведены в виде среднего арифметического и стандартного отклонения ($M \pm SD$). Статистически значимыми считали различия при $p < 0,05$. Значения IC_{50} (концентрации полумаксимального ингибирования) рассчитывали с помощью нелинейной регрессии на основе трехпараметрической логистической функции в программе GraphPad Prism8.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Влияние половых гормонов на активность Pgp, BCRP, OATP1B1, OATP1B3 при кратковременном воздействии

(оценка прямого влияния гормонов на белки-транспортеры)

В экспериментах *in vitro* оценивалось прямое влияние половых гормонов на активность транспортных белков Pgp, BCRP, OATP1B1 и OATP1B3 при кратковременном воздействии (15-30 минут).

Активность Pgp исследовали на клетках Caco-2 по проникновению субстрата транспортера – фексофенадина внутрь клеток. Классический ингибитор Pgp – кетоконазол, увеличивал внутриклеточное накопление фексофенадина, что свидетельствует о снижении активности транспортера и подтверждает адекватность тест-системы. Эстрадиол во всех концентрациях не влиял на активность Pgp, тогда как прогестерон (1-100 мкМ) и тестостерон (10-100 мкМ) достоверно ее ингибировали, о чем свидетельствует увеличение внутриклеточной концентрации фексофенадина (Таблица 2).

Таблица 2 – Влияние кетоконазола и половых гормонов при длительности воздействия 30 мин на концентрацию фексофенадина в лизате клеток Caco-2

	Концентрации фексофенадина, нг/мг белка			
	Кетоконазол	Эстрадиол	Прогестерон	Тестостерон
Контроль	128,81±22,43	132,67±21,13	122,23±10,82	126,06±25,76
1 нМ	132,75±6,60	124,23±11,40	131,45±11,36	131,77±16,08
10 нМ	139,90±15,69	137,19±10,90	132,71±9,58	118,57±10,50
100 нМ	165,30±26,11	143,13±16,51	144,97±12,33	147,05±20,71
1 мкМ	189,57±11,51*	149,65±34,47	153,67±3,94*	134,51±7,01
10 мкМ	255,67±25,89***	142,86±13,93	186,88±18,56***	175,73±21,17*
100 мкМ	388,50±32,22***	148,88±14,91	206,68±11,16***	195,62±25,83***
Примечание – * - $p<0,05$, ** - $p<0,01$, *** - $p<0,001$ – статистически значимые различия по сравнению с показателями контроля				

Активность BCRP оценивали по проникновению субстрата транспортера – сульфасалазина внутрь клеток Caco-2. Классический ингибитор BCRP – кверцетин увеличивал накопление сульфасалазина внутри клеток, что подтверждает выбранную экспериментальную модель. Эстрадиол в высокой концентрации (100 мкМ), прогестерон – в диапазоне концентраций 100 нМ-100

мкМ, тестостерон в концентрациях 10-100 мкМ ингибировали BCRP, о чем свидетельствовало увеличение внутриклеточного уровня сульфасалазина (Таблица 3).

Таблица 3 – Влияние кверцетина и половых гормонов при длительности воздействия 30 мин на концентрацию сульфасалазина в лизате клеток Сасо-2

	Концентрации сульфасалазина, нг/мг белка			
	Кверцетин	Эстрадиол	Прогестерон	Тестостерон
Контроль	206,89±19,50	206,79±33,28	243,36±20,37	221,56±19,38
1 нМ	213,85±25,68	226,20±24,67	253,19±36,70	238,39±26,83
10 нМ	223,91±34,50	241,25±21,55	260,31±28,24	252,31±34,04
100 нМ	251,37±26,68	234,71±43,13	307,00±32,91*	276,92±43,07
1 мкМ	288,32±28,38*	237,96±20,86	307,14±15,96*	283,47±35,82
10 мкМ	328,54±46,50**	278,27±30,39	342,66±27,88***	296,23±20,66*
100 мкМ	409,94±46,07***	311,93±45,23**	383,17±8,40***	337,71±36,96**
Примечание – * - $p \leq 0,05$, ** - $p < 0,01$, *** - $p < 0,001$ – статистически значимые различия по сравнению с показателями контроля				

Активность OATP1B1/OATP1B3 изучали на клетках линии HepG2 по проникновению внутрь клеток субстрата транспортеров – аторвастатина. Рифампицин – классический ингибитор OATP1B1/OATP1B3, снижал накопление субстрата, что подтверждает адекватность использованной тест-системы. Эстрадиол (100 мкМ) и прогестерон (1-100 мкМ) ингибировали активность транспортера (снижали внутриклеточный уровень аторвастатина), тогда как тестостерон не оказывал значимого эффекта (Таблица 4).

Таблица 4 – Влияние рифампицина и половых гормонов при длительности воздействия 15 мин на концентрацию аторвастатина в лизате клеток HepG2

	Концентрации аторвастатина, нг/мг белка			
	Рифампицин	Эстрадиол	Прогестерон	Тестостерон
Контроль	13,01±1,74	13,01±1,74	11,89±1,58	11,27±1,57
1 нМ	12,57±1,66	11,84±0,98	12,86±1,22	10,42±0,96
10 нМ	11,20±1,20	9,47±2,36	10,64±1,36	12,09±1,85
100 нМ	11,58±0,96	11,41±2,55	9,24±1,51	12,20±1,36
1 мкМ	10,58±1,32	9,93±1,73	8,47±1,31*	11,39±0,63
10 мкМ	9,28±1,06*	9,14±2,24#	8,29±1,00*	10,75±1,58
100 мкМ	7,48±2,35**	7,95±0,49*	6,54±1,19**	8,47±0,74#
Примечание – # - $p < 0,1$, * - $p < 0,05$, ** - $p < 0,01$, *** - $p < 0,001$ – статистически значимые различия по сравнению с показателями контроля				

Влияние половых гормонов на экспрессию генов, кодирующих Pgp, BCRP, OATP1B1, OATP1B3

Экспрессия гена *MDR1*, кодирующего Pgp, в клетках Caco-2 повышалась под действием эстрадиола (1-100 мкМ) и прогестерона (10-100 мкМ) и снижалась при экспозиции с тестостероном (10-100 мкМ) (Рисунок 1).

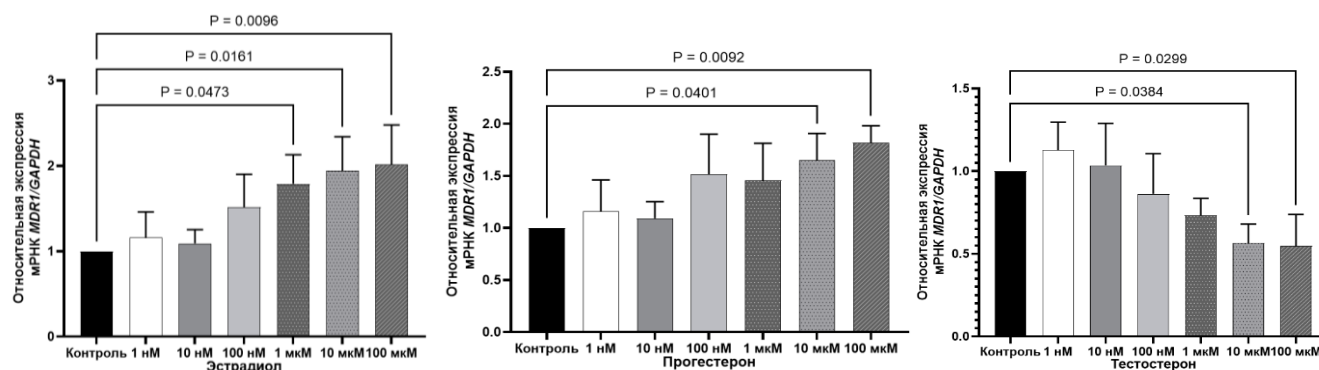


Рисунок 1 – Относительная экспрессия мРНК *MDR1* в клетках линии Caco-2 при воздействии эстрадиола, прогестерона и тестостерона. Среднее $\pm$ SD (n=3 в каждой серии)

Экспрессия гена *ABCG2*, кодирующего BCRP, увеличивалась под влиянием всех трех гормонов: эстрадиола (100 нМ-100 мкМ), прогестерона (10-100 мкМ) и тестостерона (1-100 мкМ) (Рисунок 2).

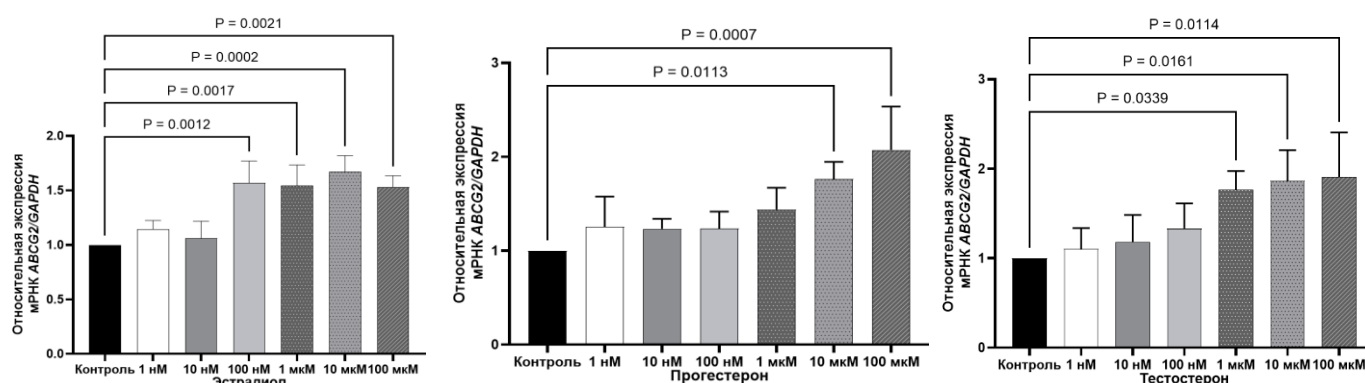


Рисунок 2 – Относительная экспрессия мРНК *ABCG2* в клетках линии Caco-2 при воздействии эстрадиола, прогестерона и тестостерона. Среднее $\pm$ SD (n=3 в каждой серии)

Эстрадиол (10-100 мкМ) и тестостерон (1-100 мкМ) повышали экспрессию гена *SLCO1B1*, кодирующего OATP1B1, а тестостерон (100 мкМ) вызывал тенденцию к ее снижению (Рисунок 3).

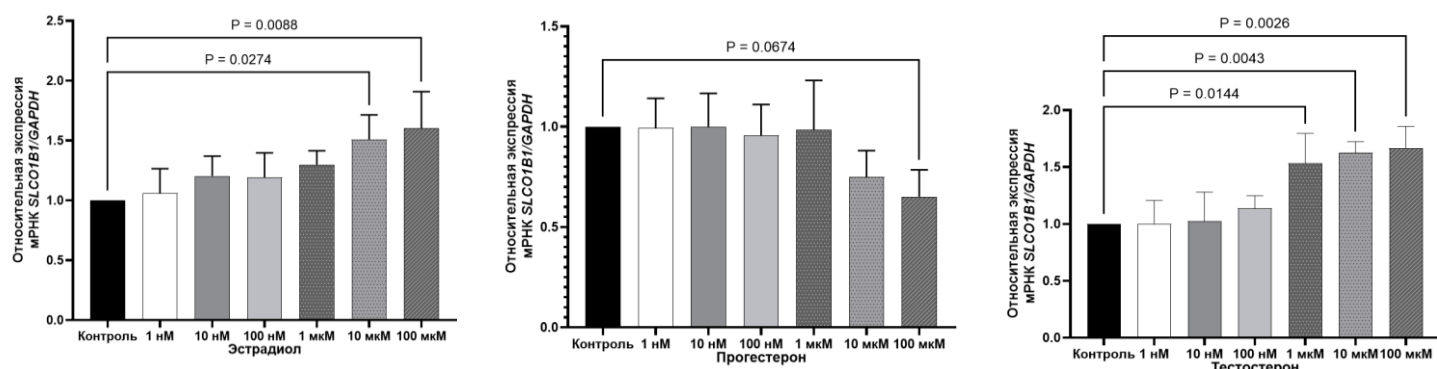


Рисунок 3 – Относительная экспрессия мРНК *SLCO1B1* в клетках линии HepG2 при воздействии эстрадиола, прогестерона и тестостерона. Среднее±SD (n=3 в каждой серии)

Экспрессия гена *SLCO1B3*, кодирующего OATP1B3, усиливалась под влиянием эстрадиола (1–100 мкМ) и тестостерона (1–100 мкМ) и не изменялась при действии прогестерона (Рисунок 4).

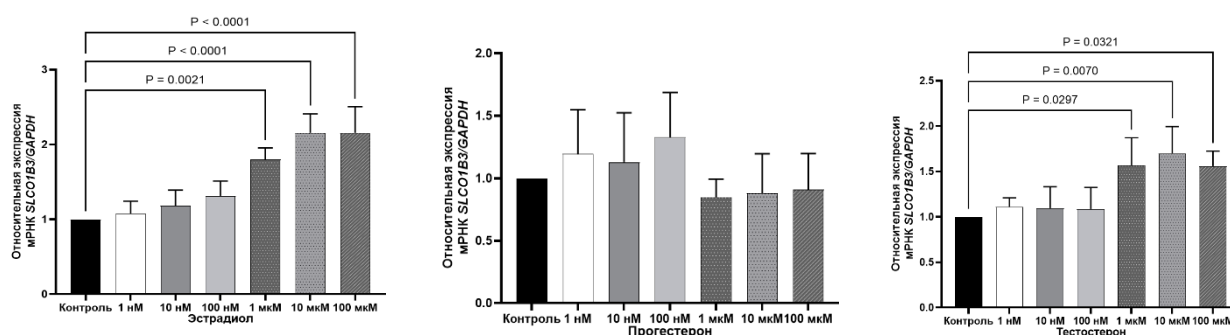


Рисунок 4 – Относительная экспрессия мРНК *SLCO1B3* в клетках линии HepG2 при воздействии эстрадиола, прогестерона и тестостерона. Среднее±SD (n=3 в каждой серии)

Влияние половых гормонов на относительное количество Pgr, BCRP, OATP1B1, OATP1B3

При длительности экспозиции 24 ч уровень Pgr в клетках Caco-2 повышался под действием эстрадиола (10-100 мкМ) и прогестерона (100 мкМ), но снижался при воздействии тестостерона (1-100 мкМ) (Рисунок 5).

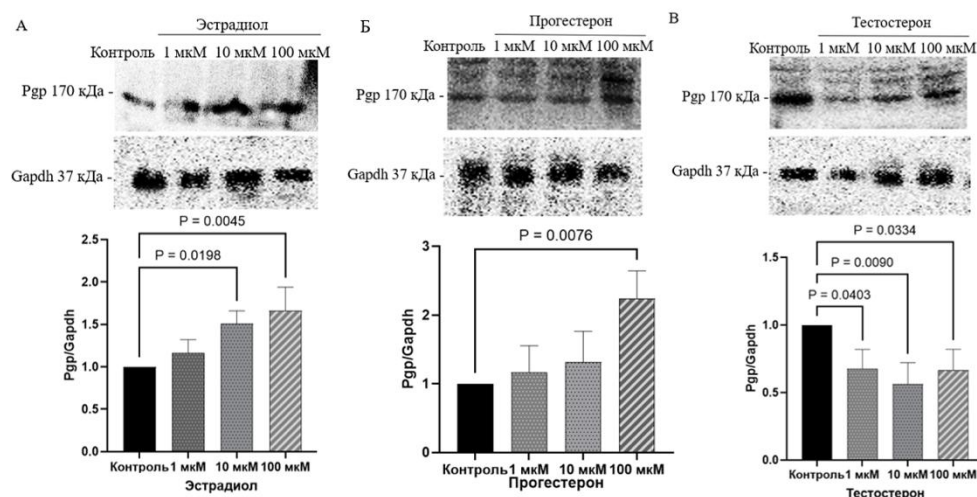


Рисунок 5 – Влияние половых гормонов (1-100 мкМ) на уровень белка Pgp (вестерн-блот анализ) в клеточной линии Сасо-2

Относительное количество BCRP увеличивалось при инкубации в течение 24 ч с эстрадиолом (100 нМ-100 мкМ), прогестероном (1-100 мкМ) и тестостероном (1-100 мкМ) (Рисунок 6)

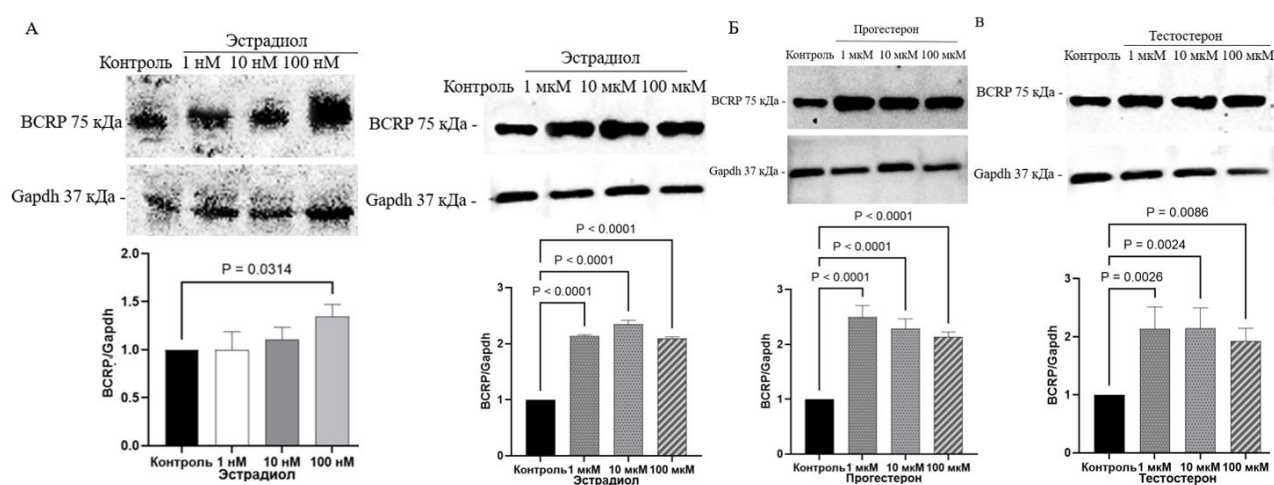


Рисунок 6 – Влияние половых гормонов (1-100 мкМ) на уровень белка BCRP (вестерн-блот анализ) в клеточной линии Сасо-2

Уровень OATP1B1 возрастал под влиянием эстрадиола (10-100 мкМ) и тестостерона (1-100 мкМ), но снижался при действии прогестерона (10-100 мкМ) (Рисунок 7).

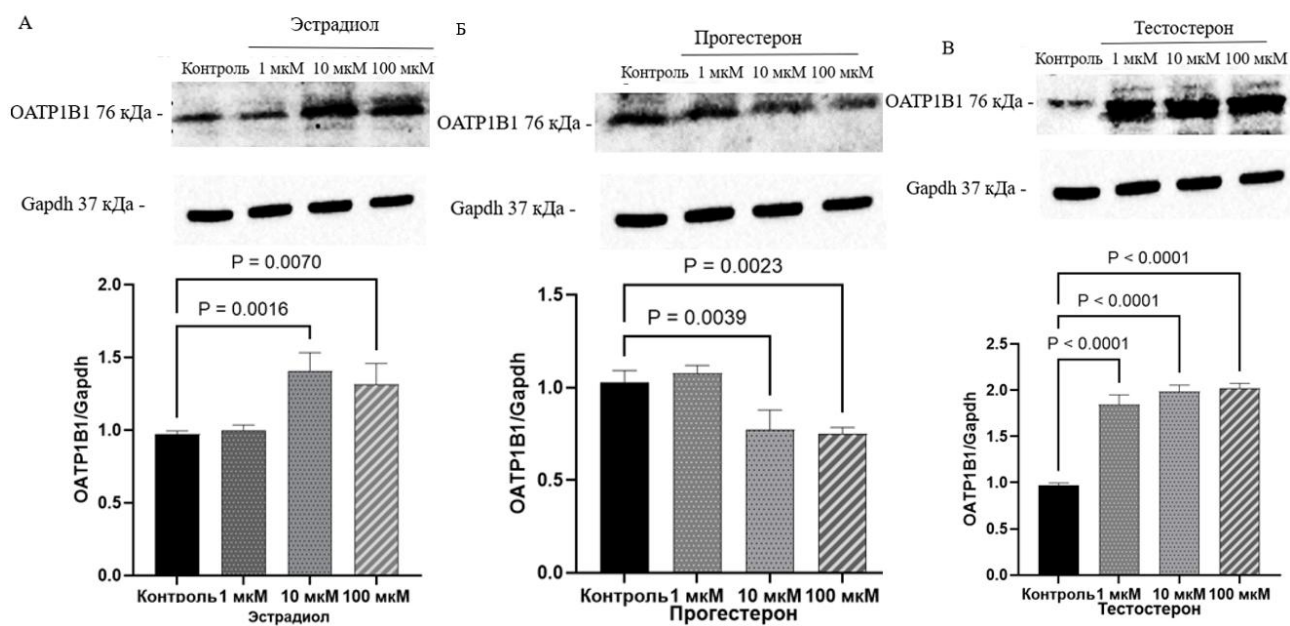


Рисунок 7 – Влияние половых гормонов (1-100 мкМ) на уровень белка ОАТР1В1 (вестерн-блот анализ) в клеточной линии HepG2

Эстрадиол (10-100 мкМ) и тестостерон (1-100 мкМ) при экспозиции 24 ч повышали относительное количество ОАТР1В3, а тестостерон во всех концентрациях достоверного эффекта не оказал (Рисунок 8).

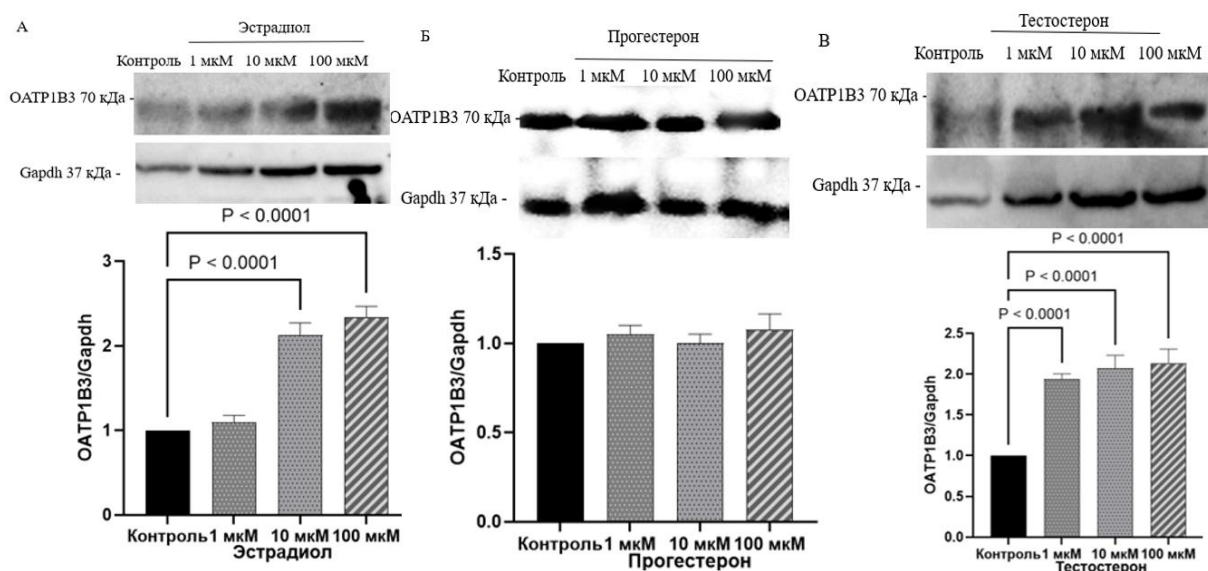


Рисунок 8 – Влияние половых гормонов (1-100 мкМ) на уровень белка ОАТР1В3 (вестерн-блот анализ) в клеточной линии HepG2

Влияние половых гормонов на активность Pgp, BCRP, OATP1B1/OATP1B3 при воздействии 24 ч

Эстрадиол в концентрациях 10-100 мкМ и экспозиции 24 ч снижал проникновение субстрата Pgp – фексофенадина внутрь клеток Сасо-2, что свидетельствует о повышении активности транспортера. Прогестерон не оказывал влияния на активность Pgp, а тестостерон (1–100 мкМ), наоборот, вызывал ее снижение, что проявлялось повышением внутриклеточного уровня фексофенадина (Таблица 5).

Таблица 5 – Влияние половых гормонов на концентрацию фексофенадина в лизате клеток Сасо-2 (нг/мг белка) при длительности воздействия 24 ч

Концентрация гормонов	Концентрация фексофенадина		
	Эстрадиол	Прогестерон	Тестостерон
Контроль	128,81±22,43	146,19±26,58	128,04±7,90
1 мкМ	107,44±32,05	114,46±27,92	194,00±10,45*
10 мкМ	73,64±9,06*	114,36±5,57	224,78±27,18**
100 мкМ	73,10±9,88*	107,33±30,84	257,75±49,33***
Примечание – * - $p \leq 0,05$, ** - $p < 0,01$, *** - $p < 0,001$ – статистически значимые различия по сравнению с показателями контроля			

Эстрадиол в концентрации 1 мкМ и длительности воздействия 24 ч снижал проникновение внутрь клеток Сасо-2 субстрата BCRP – сульфасалазина, что характеризует повышение активности транспортера. Прогестерон и тестостерон не оказывали значимого влияния на активность BCRP (Таблица 6).

Таблица 6 – Влияние половых гормонов на концентрацию сульфасалазина в лизате клеток Сасо-2 (нг/мг белка) при длительности воздействия 24 ч

Концентрация гормонов	Концентрация сульфасалазина		
	Эстрадиол	Прогестерон	Тестостерон
Контроль	231,59±20,52	236,26±14,66	236,26±14,66
1 мкМ	174,96±16,55*	223,33±27,02	200,21±10,6
10 мкМ	201,99±14,52	292,34±65,48	257,14±31,25
100 мкМ	248,21±34,04	279,01±20,40	260,02±15,51
Примечание – * - $p < 0,05$, ** - $p < 0,01$, *** - $p < 0,001$ – статистически значимые различия по сравнению с показателями контроля			

Активность инфлюксных транспортеров OATP1B1/OATP1B3, оцениваемая по проникновению внутрь клеток их субстрата аторвастатина, повышалась под

влиянием эстрадиола (10–100 мкМ) и тестостерона (1–100 мкМ), но снижалась при воздействии прогестерона (10–100 мкМ) (Таблица 7).

Таблица 7 – Влияние половых гормонов на концентрацию аторвастатина в лизате клеток НерG2 (нг/мг белка) при длительности воздействия 24 ч

Концентрации гормонов	Концентрации аторвастатина		
	Эстрадиол	Прогестерон	Тестостерон
Контроль	13,47±1,57	13,47±1,57	13,47±1,57
1 мкМ	13,98±0,27	11,21±1,76	16,76±1,57*
10 мкМ	16,48±1,04*	9,46±0,98*	17,71±1,53*
100 мкМ	16,72±0,93*	7,35±1,03**	16,47±0,99#
Примечание – # - $p < 0,1$, * - $p < 0,05$, ** - $p < 0,01$, *** - $p < 0,001$ – статистически значимые различия по сравнению с показателями контроля			

Влияние половых гормонов на относительное количество CAR, PXR, FXR, LXR α в ядерной фракции клеток Сасо-2 и НерG2

На следующем этапе исследования оценивалось влияние половых гормонов на активацию рецепторов CAR, PXR, FXR, LXR α . Для этого методом вестерн-блот анализировалось относительное количество данных рецепторов в ядерной фракции лизатов клеток Сасо-2 и НерG2 при экспозиции гормонов в течение 24 часов в дозах 1-100 мкМ.

Эстрадиол (10 и 100 мкМ) повышал уровень CAR в ядерной фракции лизата клеток Сасо-2, в концентрациях 1, 10 и 100 мкМ увеличивал ядерный уровень PXR и достоверно не влиял на количество FXR и LXR α . В клетках НерG2 эстрадиол в концентрациях 10 и 100 мкМ повышал уровень CAR, в концентрациях 1, 10 и 100 мкМ увеличивал уровень FXR и не влиял на ядерное содержание PXR и LXR α (Рисунки 9,10).

Прогестерон достоверно не влиял на уровень CAR в ядре во всех протестированных концентрациях как в клетках Сасо-2, так и НерG2. Гестаген (10 и 100 мкМ) увеличивал содержание PXR в клетках Сасо-2 и НерG2, повышал уровень FXR по сравнению с контролем в клетках Сасо-2 в концентрациях 1-100 мкМ, в клетках НерG2 – в концентрациях 1 и 10 мкМ. В ядерной фракции лизата клеток Сасо-2 прогестерон во всех протестированных концентрациях достоверно не влиял на содержание LXR α , а в клетках НерG2 прогестерон (1 и 10 мкМ)

вызывал повышение уровня LXR α (Рисунки 11,12).

Тестостерон в концентрации 100 мкМ вызывал тенденцию к снижению содержания CAR в ядерной фракции клеток Сасо-2, а в клетках НерG2 в концентрациях 10 и 100 мкМ вызывал его значимое снижение.

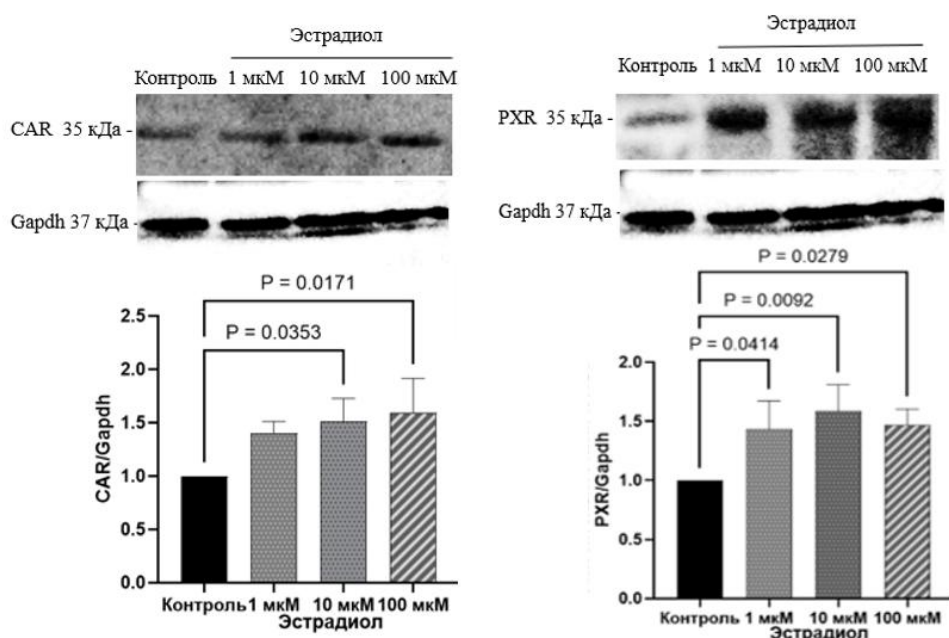


Рисунок 9 – Влияние эстрадиола (1-100 мкМ) на уровень CAR и PXR в ядерной фракции клеток Сасо-2

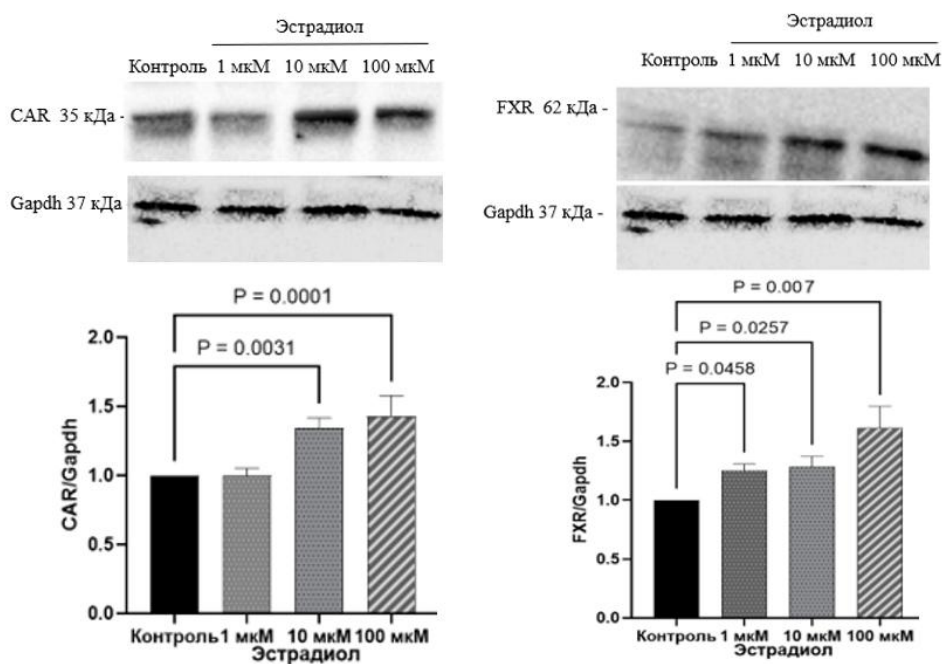


Рисунок 10 – Влияние эстрадиола (1-100 мкМ) на уровень CAR и FXR в ядерной фракции клеток НерG2

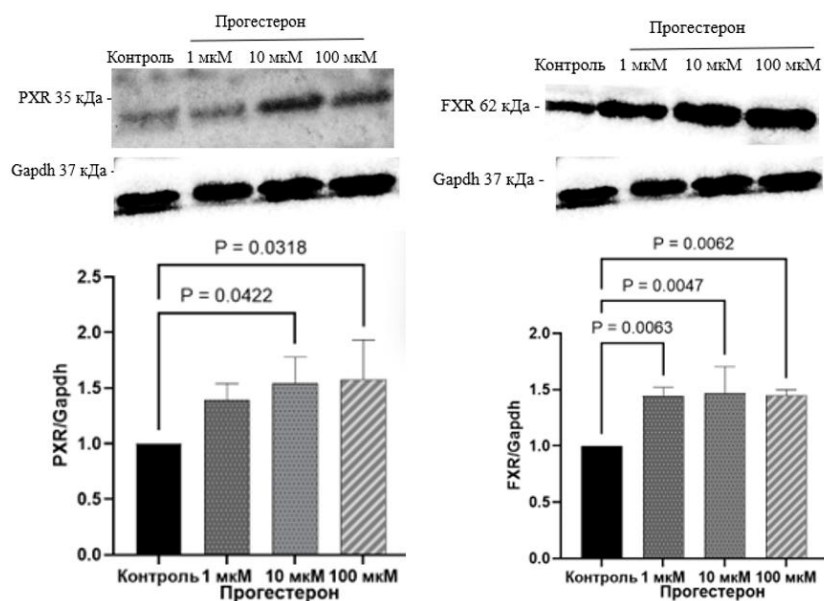


Рисунок 11 – Влияние прогестерона (1-100 мкМ) на уровень PXR и FXR в ядерной фракции клеток Сасо-2

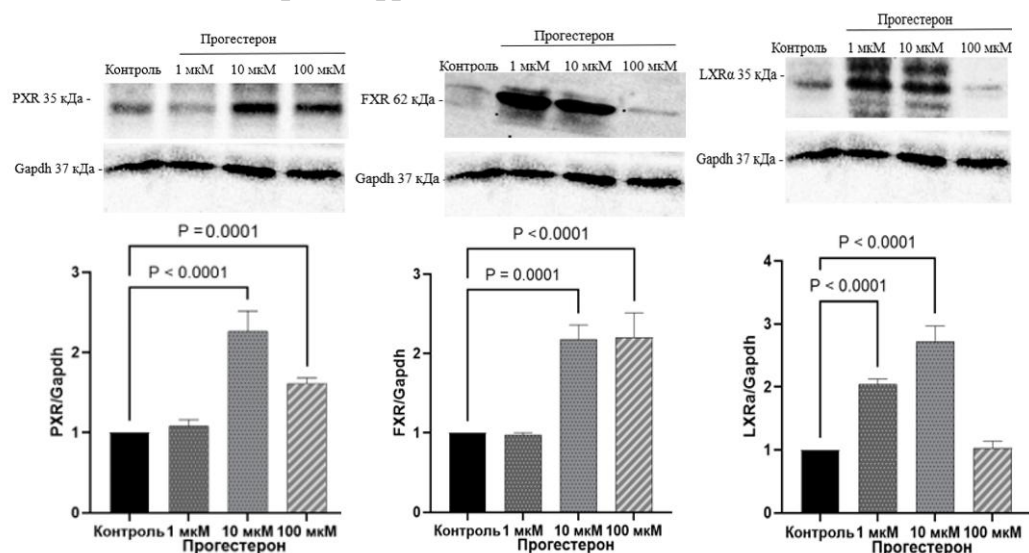


Рисунок 12 – Влияние прогестерона (1-100 мкМ) на уровень PXR, FXR и LXR α в ядерной фракции клеток НерG2

В клетках Сасо-2 тестостерон в концентрации 10 мкМ увеличивал уровень PXR и вызывал тенденцию к его увеличению в концентрациях 1 и 100 мкМ, в клетках НерG2 увеличивал количество PXR в концентрациях 10 и 100 мкМ. Тестостерон в клетках Сасо-2 достоверно повышал ядерное содержание FXR только в одной концентрации 10 мкМ. Напротив, в клетках НерG2 тестостерон повышал количество FXR во всех протестированных концентрациях 1-100 мкМ.

Тестостерон во всех изученных концентрациях не влиял на ядерный уровень LXR α в клетках Сасо-2, а в клетках НерG2 увеличивал уровень LXR α только в концентрации 10 мкМ (Рисунки 13, 14).

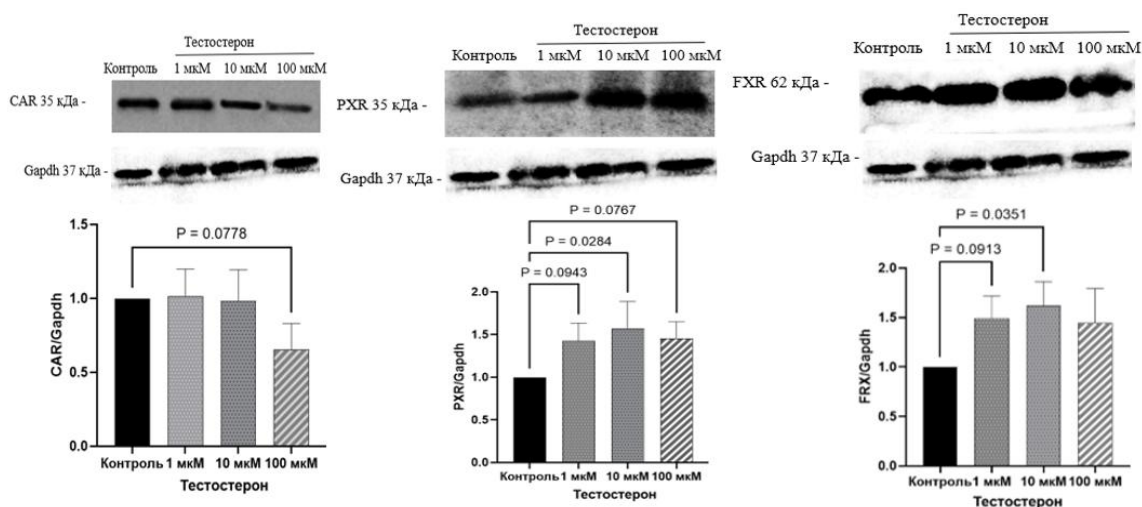


Рисунок 13 – Влияние тестостерона (1-100 мкМ) на уровень CAR, PXR и FXR в ядерной фракции клеток Сасо-2

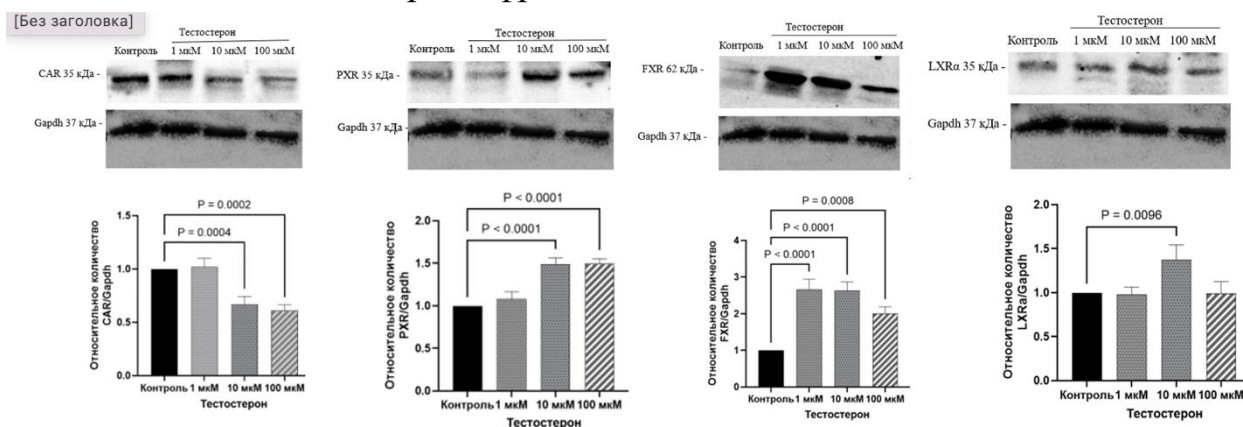


Рисунок 14 – Влияние тестостерона (1-100 мкМ) на уровень CAR, PXR и FXR в ядерной фракции клеток НерG2

Роль усыновленных рецепторов в регуляции транспортеров под действием половых гормонов

При оценке роли CAR, PXR, FXR, LXR α в механизмах регуляции транспортеров использовали их ингибиторы. Ингибитор CAR CINPA 1 нивелировал индуцирующее действие эстрогена на уровень Pgp: количество белка-транспортера при комбинировании CINPA 1 с эстрадиолом достоверно не отличалось от контроля. В то же время ингибитор PXR – кетоконазол, ингибитор FXR – тауро- β -холевая кислота и ингибитор LXR α – TFCA существенно не

влияти на способность эстрадиола повышать уровень Pgr (Рисунок 15).

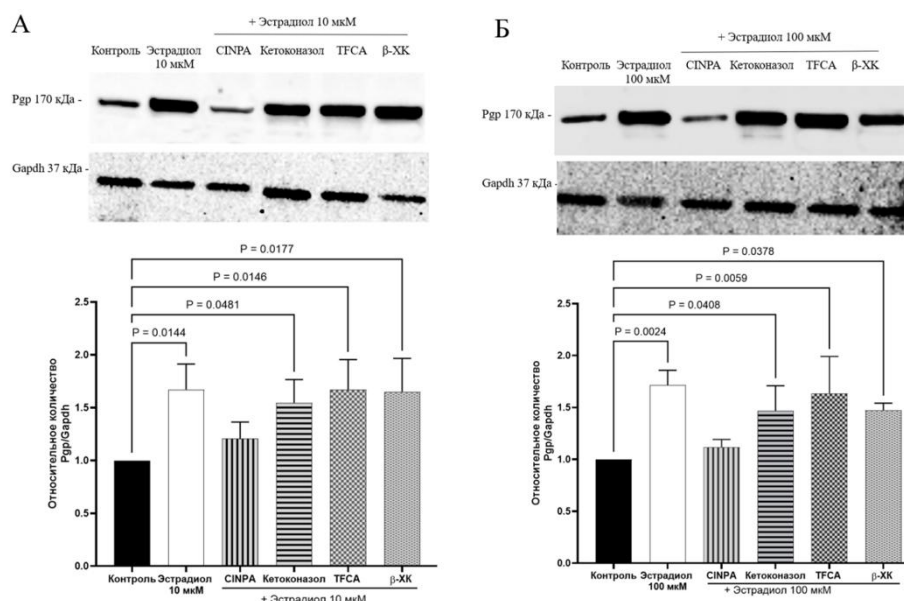


Рисунок 15 – Влияние ингибиторов усыновленных рецепторов на индуцирующее действие эстрадиола на уровень Pgr
Примечание – здесь и далее на рисунках CINPA – ингибитор CAR, кетоконазол – ингибитор PXR, TFCA – ингибитор LXR α , β -XK – ингибитор FXR

Кетоконазол и CINPA 1 нивелировали индуцирующее действие прогестерона (100 мкМ) на количество Pgr: его уровень при совместном применении кетоконазола и CINPA1 с прогестероном статистически значимо не отличался от показателей контроля. Ингибиторы FXR и LXR α существенного влияния на индуцирующее действие прогестерона не оказали (Рисунок 16).

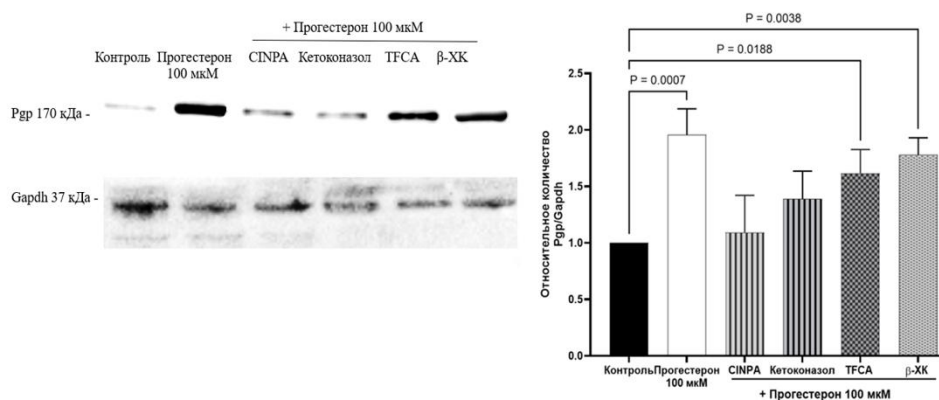


Рисунок 16 – Влияние ингибиторов усыновленных рецепторов на индуцирующее действие прогестерона на уровень Pgr

Применение ингибиторов рецепторов CAR, PXR, FXR и LXR α не влияло на подавляющее действие тестостерона на уровень Pgr.

Таким образом, индуцирующее действие эстрадиола на Pgr реализуется через CAR, прогестерона – через CAR и PXR.

При оценке роли CAR, PXR, FXR, LXR α в механизмах регуляции BCRP в клетках линии Сасо-2 были получены следующие результаты.

При концентрации эстрадиола 1 мкМ ингибирование всех изучаемых усыновленных рецепторов не влияло на индуцирующее действие эстрогена. При концентрации эстрадиола 10 мкМ ингибитор CAR – CINPA1 и ингибитор PXR – кетоконазол вызывали снижение количества BCRP в клетках линии Сасо-2 по сравнению с изолированным применением эстрогена, однако уровень транспортера оставался повышенным относительно контроля. Ингибитор LXR α – TFCA и ингибитор FXR – тауро- β -холевая кислота достоверного эффекта на индуцирующее действие эстрадиола не оказали, относительное количество BCRP превышало показатели контроля и значимо от серии изолированного применения гормона не отличалось. При концентрации эстрадиола 100 мкМ ингибитор CAR – CINPA1 и ингибитор PXR – кетоконазол предотвращали повышение относительного количества BCRP, оно достоверно не отличалось от показателей контроля (Рисунок 17).

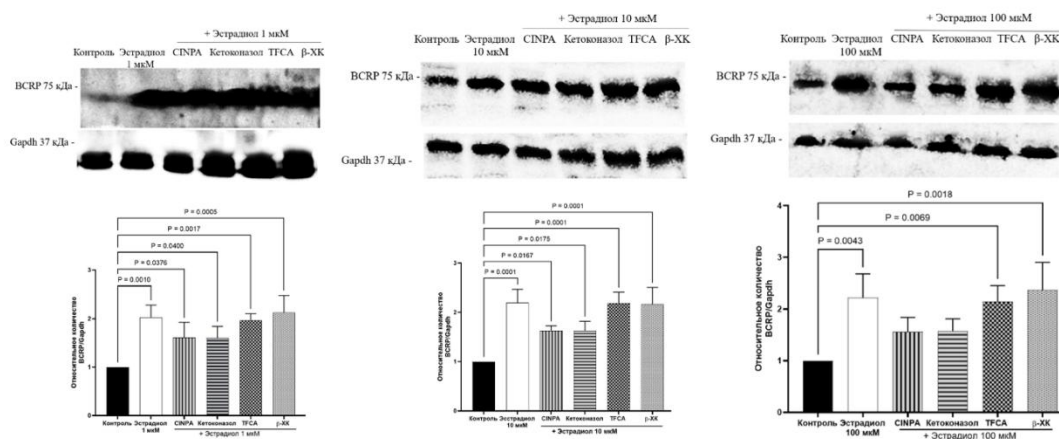


Рисунок 17 – Влияние ингибиторов усыновленных рецепторов на индуцирующее действие эстрадиола на уровень BCRP

При концентрации прогестерона 1 мкМ ингибитор PXR кетоконазол предотвращал повышение количества BCRP по сравнению с контролем, а ингибиторы других усыновленных рецепторов CINPA 1, тауро-β-холевая кислота и TFCA существенного эффекта на действие прогестерона не оказали. При концентрации прогестерона 10 мкМ ингибитор PXR – кетоконазол и ингибитор FXR - тауро-β-холевая кислота препятствовали повышению уровня BCRP под действием прогестерона, его относительное количество достоверно не отличалось от показателей контроля. Ингибитор CAR – CINPA1 и ингибитор LXRα – TFCA значимого эффекта на индуцирующее действие прогестерона (10 мкМ) не оказали. При концентрации прогестерона 100 мкМ аналогичным образом ингибиторы PXR и FXR препятствовали повышению количества BCRP под действием гестагена, а ингибиторы CAR – CINPA1 и ингибитор LXRα – TFCA достоверного эффекта на индуцирующее действие прогестерона не оказали (Рисунок 18).

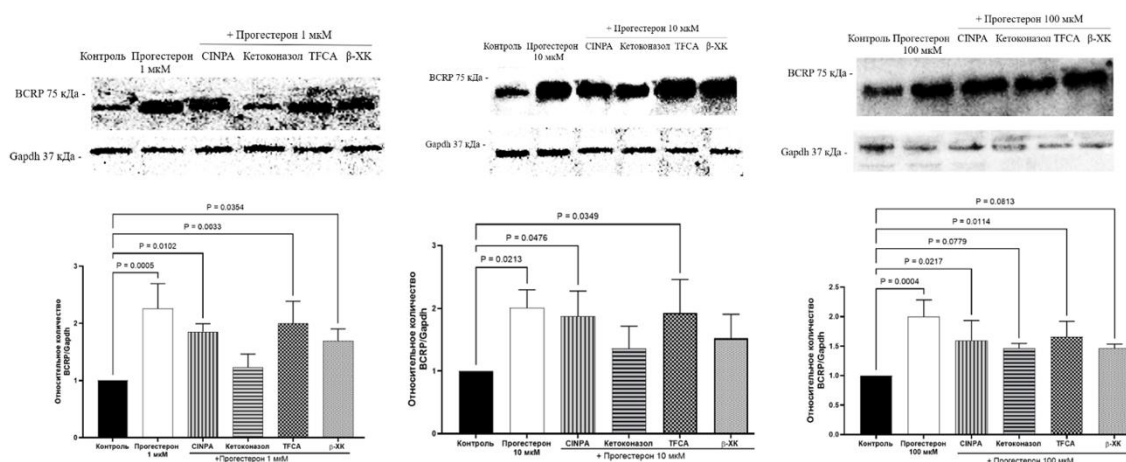


Рисунок 18 – Влияние ингибиторов усыновленных рецепторов на индуцирующее действие прогестерона на уровень BCRP

Ингибитор PXR – кетоконазол и ингибитор FXR – тауро-β-холевая кислота предотвращали индуцирующее действие тестостерона (1 мкМ), а ингибитор CAR – CINPA1 и ингибитор LXRα – TFCA достоверного эффекта на стимулирующее действие тестостерона не проявили. При концентрации тестостерона 10 мкМ аналогичным образом кетоконазол и тауро-β-холевая кислота предотвращали индуцирующее действие тестостерона. Ингибиторы

CAR и LXR α достоверного эффекта на стимулирующее действие тестостерона не оказали. При концентрации тестостерона 100 мкМ все протестированные ингибиторы усыновленных рецепторов достоверного эффекта на индуцирующее действие андрогена не проявили (Рисунок 19).

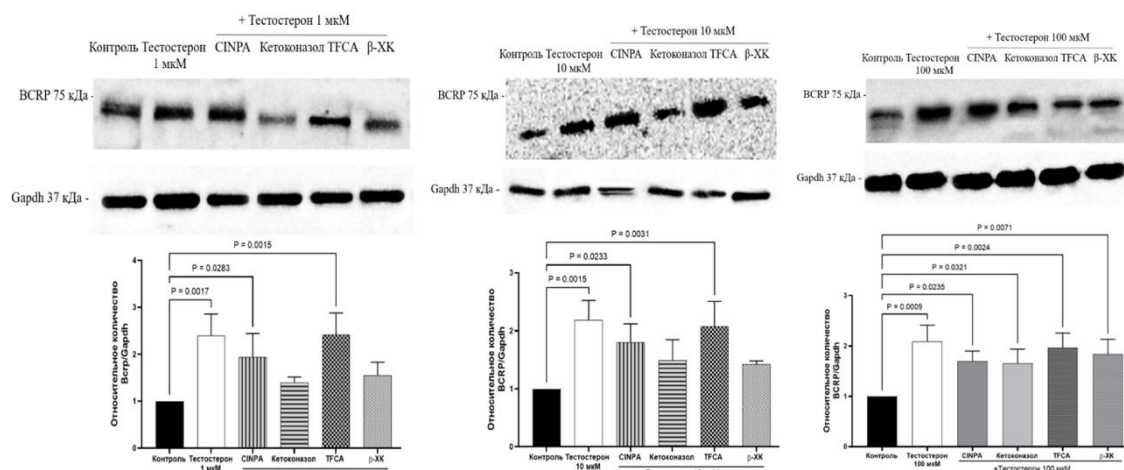


Рисунок 19 – Влияние ингибиторов усыновленных рецепторов на индуцирующее действие тестостерона на уровень BCRP

Полученные результаты характеризуют участие рецепторов CAR, PXR, FXR в синтезе BCRP под действием половых гормонов.

При оценке роли CAR, PXR, FXR, LXR α в механизмах регуляции OATP1B1 в клетках линии HepG2 были получены следующие результаты.

Ингибирование CAR CINPA 1 предотвращало индукцию OATP1B1 под действием эстрадиола в концентрациях 10 и 100 мкМ, его экспрессия не отличалась от контроля. Ингибирование FXR β -XK не предотвратило индукцию OATP1B1, вызванную эстрадиолом. Таким образом, действие эстрадиола на OATP1B1 опосредовано транскрипционным фактором CAR, который, по-видимому, является единственным из изученных нами ядерным рецептором, опосредующим индукцию OATP1B1 под действием эстрадиола (Рисунок 20).

Изолированное ингибирование FXR, PXR и LXR α , а также одновременное ингибирование исследуемых рецепторов не повлияло на подавляющее действие прогестерона на OATP1B1. Полученные результаты свидетельствуют о том, что изученные ядерные рецепторы не участвуют в снижении относительного количества OATP1B1 под влиянием прогестерона.

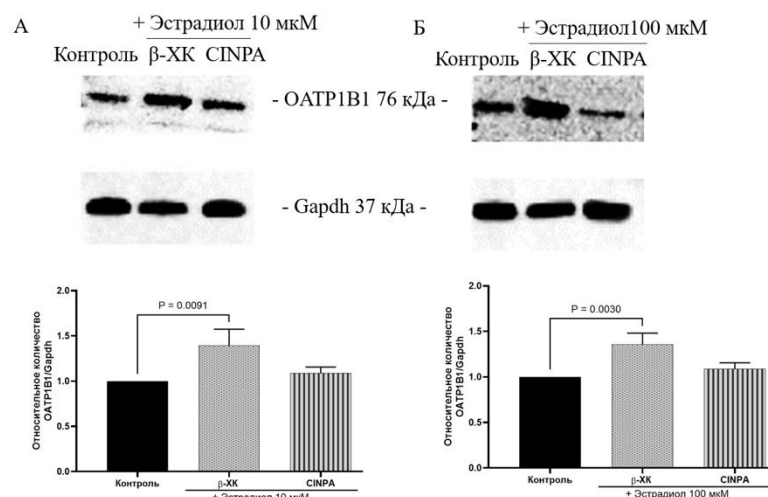


Рисунок 20 – Влияние ингибиторов усыновленных рецепторов на индуцирующее действие эстрадиола на уровень OATP1B1

Изолированное ингибирование FXR, CAR, PXR и LXR α не изменяло индуцирующее действие тестостерона на OATP1B1. Учитывая полученные в ходе исследования данные о том, что тестостерон вызывает увеличение количества PXR, LXR α и FXR в ядерной фракции клеток, был проведен эксперимент с одновременным ингибированием трех рецепторов. Одновременное ингибирование FXR, PXR и LXR α предотвращало увеличение экспрессии OATP1B1 под действием тестостерона в концентрациях 10 и 100 мкМ. Таким образом, по-видимому, все три рецептора – FXR, PXR и LXR α опосредуют индукцию OATP1B1 под действием тестостерона (Рисунок 21).

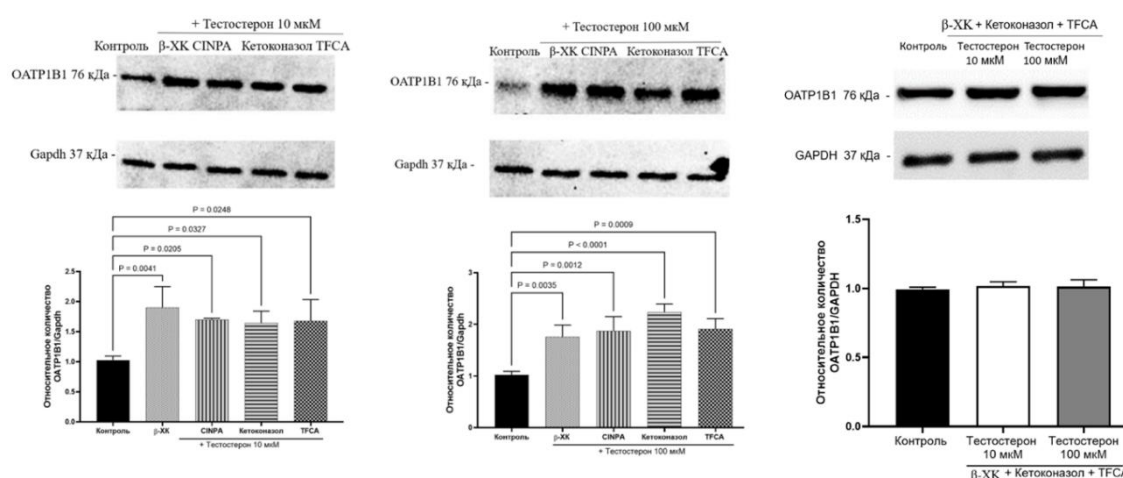


Рисунок 21 – Влияние ингибиторов усыновленных рецепторов и их комбинации на индуцирующее действие тестостерона на уровень OATP1B1

При оценке роли CAR, PXR, FXR, LXR α в механизмах регуляции OATP1B3 в клетках линии HepG2 были получены следующие результаты. В концентрации эстрадиола 10 мкМ ингибирование FXR снижало выраженность индукции OATP1B3 под действием гормона, уровень транспортера снижался по сравнению с изолированным использованием эстрогена, однако превышал показатели контроля. Ингибирование остальных усыновленных рецепторов (CAR, PXR и LXR α) на фоне эстрадиола (10 мкМ) статистически значимого эффекта не оказало, относительное количество OATP1B3 превышало показатели контроля. При использовании концентрации эстрадиола 100 мкМ ингибирование FXR также снижало выраженность индукции OATP1B3 под действием гормона, уровень транспортера достоверно не отличался от контрольных значений. При ингибировании CAR, PXR и LXR α на фоне эстрадиола (100 мкМ) статистически значимого эффекта не наблюдалось, относительное количество OATP1B3 превышало показатели контроля. Таким образом, FXR опосредует индуцирующий эффект эстрадиола на относительное количество OATP1B3 в клетках линии HepG2 (Рисунок 22).

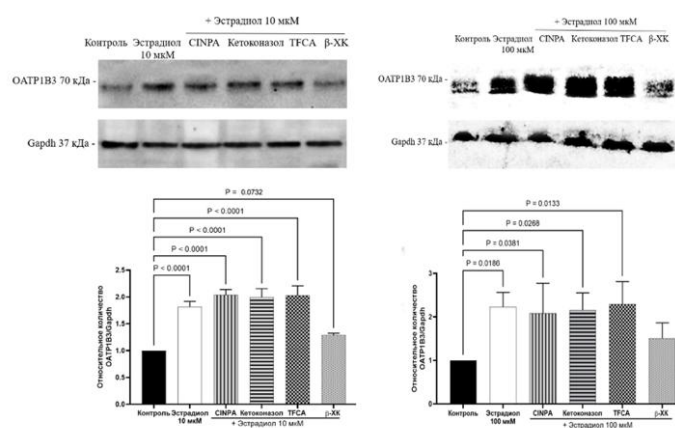


Рисунок 22 – Влияние ингибиторов усыновленных рецепторов на индуцирующее действие эстрадиола на уровень OATP1B3

При концентрации тестостерона 1 мкМ ингибирование LXR α предотвращало индукцию OATP1B3, уровень транспортера достоверно не отличался от контроля. Ингибирование CAR, PXR и FXR не влияло на эффект тестостерона. Аналогичные результаты были получены и при концентрации

тестостерона 10 мкМ, ингибирование LXR α предотвращало индукцию OATP1B3, а ингибирование CAR, PXR и FXR не влияло на индуцирующий эффект тестостерона. В концентрации тестостерона 100 мкМ ингибирование рецепторов не влияло на индуцирующее действие андрогена (Рисунок 23)

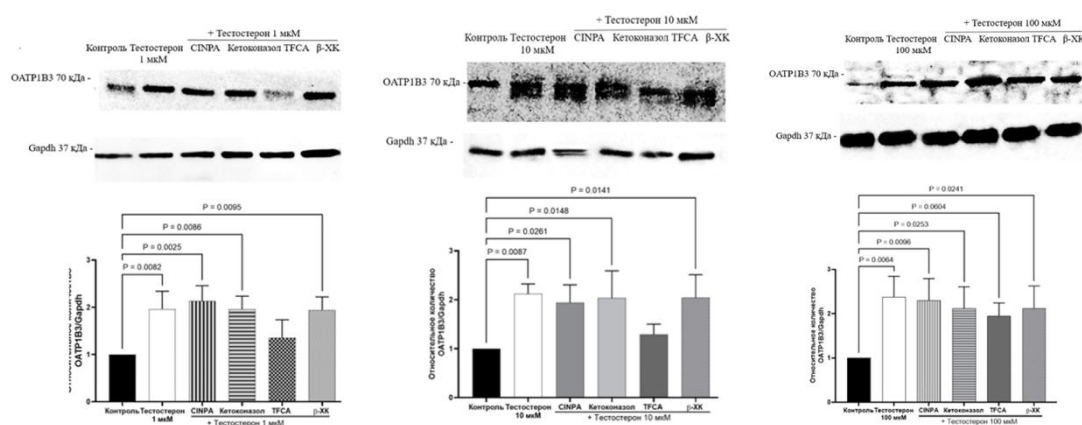


Рисунок 23 – Влияние ингибиторов усыновленных рецепторов на индуцирующее действие тестостерона на уровень OATP1B3

Таким образом, индуцирующее действие тестостерона на количество OATP1B3 реализуется через LXR α .

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В рамках настоящего исследования *in vitro* на клеточных линиях Caco-2 и HepG2 изучено влияние половых гормонов эстрадиола, прогестерона и тестостерона на функционирование основных клинически значимых белков-транспортеров – Pgp, BCRP, OATP1B1, OATP1B3 и оценена роль усыновленных рецепторов PXR, CAR, FXR и LXR α в данном процессе.

Было установлено, что эстрадиол повышает экспрессию гена *MDR1*, уровень белка и активность Pgp. Прогестерон повышает экспрессию гена *MDR1* и количество белка Pgp, но не влияет на его активность, что, скорее всего обусловлено его прямым ингибирующим действием на транспортер. Тестостерон снижает уровень мРНК гена *MDR*, уровень белка Pgp и его активность. Эстрадиол оказывает индуцирующее действие на Pgp через активацию CAR, прогестерон – через PXR и CAR, а тестостерон подавляет Pgp,

вероятнее всего, через снижение уровня CAR.

Эстрадиол увеличивает экспрессию гена *ABCG2* и количество белка BCRP, что сопровождается повышением активности белка-транспортера. Прогестерон стимулирует экспрессию гена *ABCG2*, увеличивает количество белка BCRP и не влияет на его активность. Тестостерон повышает экспрессию гена *ABCG2*, количество белка BCRP, не изменяя активность белка-транспортера. Отсутствие повышения активности BCRP на фоне увеличения уровня транспортера, скорее всего, связано с прямым ингибирующим действием гестагена и андрогена на его молекулу. Изучение механизмов индукции транспортера показало, что эстрадиол стимулирует BCRP через активацию CAR и PXR, прогестерон и тестостерон – через активацию PXR и FXR.

Эстрадиол повышает экспрессию гена *SLCO1B1* и количество белка OATP1B1. Прогестерон вызывает снижение уровня белка OATP1B1, без достоверного изменения экспрессии гена *SLCO1B1*. Тестостерон увеличивает экспрессию гена *SLCO1B1* и относительное количество OATP1B1. Действие эстрадиола на OATP1B1 опосредовано транскрипционным фактором CAR, который, по-видимому, является единственным из изученных нами ядерным рецептором, опосредующим индукцию OATP1B1 под действием эстрадиола. По результатам эксперимента можно предположить, что все три рецептора – FXR, PXR и LXR α опосредуют индукцию OATP1B1 тестостероном.

Эстрадиол и тестостерон увеличивают экспрессию гена *SLCO1B3* и количество белка OATP1B3, а прогестерон не влияет на экспрессию гена *SLCO1B3* и количество белка OATP1B3. Индуцирующий эффект эстрадиола на OATP1B3 опосредует FXR, а стимулирующее действие тестостерона реализуется через LXR α . Повышение количества OATP1B1/OATP1B3 под действием эстрадиола и тестостерона приводит к однонаправленному увеличению активности белков-транспортеров, воздействие прогестерона напротив, уменьшает активность OATP1B1/OATP1B3.

Ключевой отличительной особенностью половых гормонов во влиянии на изученные белки-транспортеры через усыновленные рецепторы PXR, CAR,

FXR, LXR α было то, что они оказывают свое действие в концентрациях существенно превышающие физиологические. Таким образом, выявлен новый механизм защиты от воздействия высоких доз половых гормонов клеток, не являющихся их мишенями, связанный со стимуляцией синтеза мембранных белков-транспортеров, посредством активации усыновленных ядерных рецепторов.

ВЫВОДЫ

1. В экспериментах *in vitro* при кратковременном воздействии на клетки Сасо-2 и НерG2 выявлено прямое дозозависимое тканеспецифическое ингибирующее действие половых гормонов на активность белков-транспортеров. Эстрадиол оказывает ингибирующее действие на активность BCRP, OATP1B1, OATP1B3 только в максимальной концентрации - 100 мкМ. Прогестерон ингибирует Pgp в концентрациях 10 и 100 мкМ, BCRP – в диапазоне концентраций от 100 нМ до 100 мкМ, OATP1B1, OATP1B3 – в концентрациях от 1 до 100 мкМ. Тестостерон ингибирует только АТФ-зависимые транспортеры – Pgp и BCRP в концентрациях 10 и 100 мкМ.

2. На клетках линии Сасо-2 при экспозиции 24 ч показано, что эстрадиол увеличивает количество мРНК гена *MDR1* (1-100 мкМ), относительное количество белка и активность Pgp (10-100 мкМ). Прогестерон повышает уровень мРНК гена *MDR1* (10-100 мкМ) и количество белка Pgp (100 мкМ), но не влияет на его активность. Тестостерон снижает уровень мРНК гена *MDR1* (10-100 мкМ), содержание белка Pgp и активность транспортера (1-100 мкМ).

3. На клетках линии Сасо-2 при длительности экспозиции 24 ч отмечено, что эстрадиол увеличивает экспрессию гена *ABCG2* и количество белка BCRP (100 нМ, 1, 10 и 100 мкМ), а также повышает активность белка-транспортера (1мкМ). Прогестерон повышает экспрессию гена *ABCG2* в концентрациях 10-100 мкМ, количество белка BCRP (1-100 мкМ) и не влияет на его активность. Тестостерон повышает уровень мРНК гена *ABCG2*, уровень белка BCRP (1-100 мкМ) и не изменяет его активность.

4. На клетках линии HepG2 при длительности воздействия 24 ч показано, что эстрадиол повышает экспрессию гена *SLCO1B1*, количество белка-транспортера и активность OATP1B1 (10 и 100 мкМ). Прогестерон (10 и 100 мкМ) вызывает снижение уровня белка OATP1B1 и его активности, без достоверного изменения экспрессии гена *SLCO1B1*. Тестостерон увеличивает экспрессию гена *SLCO1B1*, относительное количество и активность OATP1B1 (1, 10 и 100 мкМ).

5. На клетках линии HepG2 при длительности экспозиции 24 ч установлено, что эстрадиол увеличивает количество мРНК гена *SLCO1B3* (1-100 мкМ), уровень белка и активность OATP1B3 (10 и 100 мкМ). Прогестерон не влияет на содержание мРНК гена и количество белка OATP1B3, однако при этом уменьшает активность транспортера. Тестостерон увеличивает уровень мРНК гена *SLCO1B3*, количество белка и активность транспортера (1-100 мкМ).

6. Эстрадиол (10 и 100 мкМ) индуцирует Pgr, действуя через CAR, прогестерон (100 мкМ) повышает количество транспортера посредством CAR и PXR, а тестостерон (10-100 мкМ) снижает уровень Pgr, подавляя активацию CAR.

7. Эстрадиол в концентрации 100 мкМ индуцирует BCRP, действуя через CAR и PXR. PXR опосредует стимулирующее действие прогестерона в концентрациях 1-100 мкМ на уровень BCRP, а FXR – дополнительно в концентрациях 10-100 мкМ. PXR и FXR участвуют в реализации стимулирующего действия тестостерона (1 и 10 мкМ) на уровень BCRP.

8. Действие эстрадиола (10 и 100 мкМ) на OATP1B1 опосредовано транскрипционным фактором CAR, который, по-видимому, является единственным из изученных нами ядерным рецептором, опосредующим индукцию OATP1B1 под действием эстрадиола. Ядерные рецепторы - FXR, PXR и LXR α опосредуют индукцию OATP1B1 под действием тестостерона в концентрации 10 и 100 мкМ.

9. FXR опосредует индуцирующий эффект эстрадиола (в концентрации 10 и 100 мкМ) на относительное количество OATP1B3 в клетках линии HepG2. Индуцирующее действие тестостерона (1-100 мкМ) на количество OATP1B3

реализуется через LXR α .

10. Усыновленные ядерные рецепторы PXR, CAR, FXR, LXR α играют важную роль посредников при воздействии половых гормонов (эстрадиола, прогестерона и тестостерона) в концентрациях, превышающих физиологические, на клетки кишечника и печени - основных органов, участвующих в фармакокинетике лекарственных веществ и не являющихся для них тканями-мишенями.

ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

1. В экспериментах *in vitro* эстрадиол при экспозиции 24 ч можно использовать в качестве индуктора Pgr, BCRP, OATP1B1, OATP1B3, а тестостерон в качестве ингибитора Pgr и индуктора OATP1B1/OATP1B3.

2. Прогестерон можно применять в экспериментах *in vitro* при кратковременном воздействии (15 и 30 мин) как прямой ингибитор Pgr, BCRP, OATP1B1/OATP1B3, а тестостерон как ингибитор Pgr и BCRP.

3. Усыновленные рецепторы CAR и PXR можно использовать в качестве мишеней для модуляции активности белка-транспортера Pgr; CAR, PXR и FXR для модуляции BCRP; CAR – для модуляции OATP1B1; FXR и LXR α для модуляции OATP1B3.

ПЕРСПЕКТИВЫ ДАЛЬНЕЙШЕЙ РАЗРАБОТКИ ТЕМЫ

1. Выявленный механизм защиты клеток от воздействия половых гормонов в концентрациях, превышающих физиологические, необходимо подтвердить в исследованиях *in vivo*, например, на пациентах с гиперпродукцией данных гормонов.

2. Целесообразно изучить роль других орфанных и усыновленных рецепторов в регуляции клинически значимых белков-транспортеров.

3. Перспективно оценить влияние половых гормонов на другие орфанные и усыновленные рецепторы, в разных клеточных линиях что позволит выявить или объяснить их эффекты, не связанные с влиянием на гормонзависимые ткани.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

Статьи в журналах, рекомендованных ВАК при Минобрнауки России

1. Method for testing drugs belonging to substrates and inhibitors of the transporter protein BCRP on Caco-2 cells / Yu.S. Tranova, **A.A. Slepnev**, I.V., Chernykh [et al] // Doklady biochemistry and biophysics. – 2025. – Т. 520, № 1. – С. 89-95. – (co-authors: A.V. Shchulkin, P.Yu. Mylnikov, N.M. Popova, M.I. Povetko, E.N. Yakusheva).
2. Влияние половых гормонов на активность полипептидов, транспортирующих органические анионы OATP1B1/OATP1B3 *in vitro* / **А.А. Слепнев**, А.В. Щулькин, Ю.В. Абаленихина [и др.] // Прикладные информационные аспекты медицины. – 2025. – Т. 28, № 2. – С. 60-65. – (соавт. П.Д. Ананьева, П.Ю. Мыльников, Е.Н. Якушева).
3. Влияние половых гормонов на экспрессию генов ABC транспортеров - Р-гликопротеина и белка резистентности рака молочной железы *in vitro* / **А.А. Слепнев**, А.В. Щулькин, Ю.В. Абаленихина Мыльников [и др.] // Прикладные информационные аспекты медицины. – 2025. – Т. 28, № 1. – С. 76-82. – (соавт. П.Д. Ананьева, С.К. Правкин, Е.Н. Якушева).
4. Влияние половых гормонов на экспрессию генов, кодирующих полипептиды, транспортирующие органические анионы OATP1B1/OATP1B3 *in vitro* / **А.А. Слепнев**, Ю.В. Абаленихина, А.В. Щулькин [и др.] // Вопросы биологической, медицинской и фармацевтической химии. – 2025. – Т. 28, № 6. – С. 21-26. – (соавт. П.Д. Ананьева, М.Г. Коноплева, М.А. Курганова, Е.Н. Якушева).
5. Регуляция полипептида, транспортирующего органические анионы OATP1B3, половыми гормонами / **А.А. Слепнев**, Ю.В. Абаленихина, А.В. Щулькин [и др.] // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. – 2024. – Т. 177, № 5. – С. 591-595. – (соавт. П.Д. Ананьева, Е.Н. Якушева).
6. The role of adopted orphan nuclear receptors in the regulation of an organic anion transporting polypeptide 1B1 (OATP1B1) under the action of sex hormones / A.V. Shchulkin, Y.V. Abalenikhina, **A.A. Slepnev** [et al.] // Current issues in molecular biology. – 2023. – Vol. 45, № 12. – P. 9593-9605. – (co-authors: E.D. Rokunov, E.N. Yakusheva).
7. Количественная оценка белка резистентности рака молочной железы при беременности у кроликов / Н.М. Попова, **А.А. Слепнев**, Ю.В. Абаленихина [и др.] // Биомедицинская химия. – 2023. – Т. 69, № 1. – С. 72-77. – (соавт. А.В. Щулькин, Е.Д. Рокунов, Е.Н. Якушева).
8. Влияние половых гормонов на белок транспортер ABCG2 в клетках линии Caco-2 / **А.А. Слепнев**, Ю.В. Абаленихина, Н.М. Попова [и др.] // Биологические мембраны. – 2023. – Т. 40, № 5. – С. 370-378. – (соавт. А.В. Щулькин, Е.Н. Якушева).
9. Механизм влияния тестостерона на белок-транспортер Р-гликопротеин / **А.А. Слепнев**, Ю.В. Щулькин, Ю.В. Абаленихина Ю.В. [и др.] // Российский физиологический журнал им. И.М. Сеченова. – 2022. – Т. 108, № 9. – С. 1188-1199. – (соавт. Н.М. Попова, И.В. Черных, Е.Н. Якушева).

10. Клетки линии Сасо-2 как модель для изучения абсорбции лекарственных веществ / А.В. Щулькин, Ю.С. Транова, Ю.В. Абаленихина [и др.] // Экспериментальная и клиническая гастроэнтерология. – 2022. – Т.206, № 10. – С. 63-69. – (соавт. А.С. Есенина, **А.А. Слепнев**, Е.Н. Якушева).

11. Линия клеток НерG2 как модель для изучения проникновения статинов в гепатоциты / П.Д. Ерохина, **А.А. Слепнев**, П.Ю. Мыльников [и др.] // Экспериментальная и клиническая гастроэнтерология. – 2022. – Т. 206, № 10. – С. 70-76. – (соавт. С.О. Ганина, Е.А. Коняхин, А.В. Щулькин, Е.Н. Якушева).

12. Оценка влияния женских половых гормонов на функционирование белка-транспортера гликопротеина-Р *in vitro* / А.В. Щулькин, И.В. Черных, Н.М. Попова [и др.] // Биомедицинская химия. – 2020. – Т. 66, № 6. – С. 444-449. – (соавт. **А.А. Слепнев**, Е.Н. Якушева).

Патенты

13. Патент № 2803336 с1 Российская Федерация Способ повышения количества белка резистентности рака молочной железы в эксперименте на клеточной линии гепатоцеллюлярной карциномы человека: № 2023105658 от 11.03.2023 / Н.М. Попова, **А.А. Слепнев**, Ю.В. Абаленихина [и др.]; заявитель ФГБОУ ВО РязГМУ Минздрава России.

14. Патент № 2830895 С1 Российская Федерация Способ снижения количества полипептида, транспортирующего органические анионы 1В1 (ОАТР1В1) № 2023105658 от 11.03.2023 / Е.Н. Якушева, **А.А. Слепнев**, А.В. Щулькин [и др.]; заявитель ФГБОУ ВО РязГМУ Минздрава России

Статьи и тезисы в других изданиях

15. Регуляция белка-транспортёра BCRP через прегнан Х рецептор (PXR) и конститутивный андростановый рецептор (CAR) под влиянием прогестерона/ Е.Д. Рокунов, П.Д. Ананьева, А.А. Сеидкулиева, А.В. Щулькин, Ю.В. Абаленихина, **А.А. Слепнев** // В книге: Тезисы VI Общероссийской научно-практической конференции акушеров-гинекологов «Оттовские чтения». – Москва, 2024. – С. 32-33.

16. Клеточная линия НЕРG2 как модель для изучения полипептидов, транспортирующих органические анионы ОАТР1В1 и ОАТР1В3/ Е.А. Коняхин, П.Д. Ананьева, **А.А. Слепнев**, П.Ю. Мыльников, С.О. Ганина, А.В. Щулькин, Е.Н. Якушева // В книге: Достижения современной фармакологической науки. Сборник материалов Всероссийской конференции молодых ученых, посвященной 100-летию со дня рождения профессора А.А. Никулина и 80-летию Рязанского государственного медицинского университета имени академика И.П. Павлова. – Рязань, 2023. – С. 33-35.

17. Механизмы регуляции полипептида, транспортирующего органические анионы, 1В1 (ОАТР1В1) под действием тестостерона/ **А.А. Слепнев**, А.В. Щулькин, Н.М. Попова, Ю.В. Абаленихина, Е.Н. Якушева // В книге: Сборник тезисов XXIV съезда физиологического общества им. И.П. Павлова. – Санкт-Петербург, 2023. – С. 500.

18. Роль орфанных рецепторов в регуляции белка резистентности рака молочной железы при воздействии тестостерона/ **А.А. Слепнев**, Н.М. Попова, А.А. Сеидкулиева, Ю.В. Абаленихина, А.В. Щулькин, Е.Н. Якушева // В

сборнике: Рецепторы и внутриклеточная сигнализация. Сборник статей Международной конференции под редакцией А.В. Бережнова, В.П. Зинченко. – Серпухов, 2023. – С. 421-425.

19. Методика тестирования лекарственных средств на принадлежность к субстратам и ингибиторам белка-транспортера BCRP на клетках линии Сасо-2 / Ю.С. Транова, **А.А. Слепнев**, И.В. Черных [и др.] // Разработка и регистрация лекарственных средств. – 2023. – Т. 12, № 2. – С. 87-94. – (соавт. А.В. Щулькин, П.Ю. Мыльников, Н.М. Попова, М.И. Поветко, Е.Н. Якушева).

20. Разработка и валидация методики количественного определения аторвастатина в клетках линии HepG2 методом высокоэффективной жидкостной хроматографии с масс-спектрометрическим детектированием / П.Д. Ерохина, П.Ю. Мыльников, С.О. Ганина [и др.] // Российский медико-биологический вестник имени академика И. П. Павлова. – 2022. – Т. 30, № 2. – С. 149-158. – (соавт. Е.А. Коняхин, А.В. Щулькин, **А.А. Слепнев**, Е.Н. Якушева).

21. Изучение влияния прогестерона на активность гликопротеина-Р *in vitro* / П.Д. Ерохина, Ю.В. Абаленихина, А.В. Щулькин, // Российский медико-биологический вестник имени академика И.П. Павлова. – 2020. – Т. 28, № 2. – С. 135-142. – (соавт. И.В. Черных, Н.М. Попова, **А.А. Слепнев**, Е.Н. Якушева).

22. Изучение влияния эстрадиола на активность гликопротеина-Р *in vitro* / П.Д. Ерохина, Ю.В. Абаленихина, А.В. Щулькин [и др.] // Наука молодых (Eruditio Juvenium). – 2020. – Т. 8, № 3. – С. 329-336. – (соавт. И.В. Черных, А.А. Котлярова, С.К. Правкин, **А.А. Слепнев**, Е.Н. Якушева).

23. Метод анализа принадлежности лекарственных веществ к субстратам и ингибиторам белка-транспортера гликопротеина-Р *in vitro* / Е.Н. Якушева, А.В. Щулькин, И.В. Черных [и др.] // Обзоры по клинической фармакологии и лекарственной терапии. – 2019. – Т. 17, № 1. – С. 71-78. – (соавт. Н.М. Попова, А.А. Котлярова, **А.А. Слепнев**).

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

ВЭЖХ-МС/МС – высокоэффективная жидкостная хроматография с tandemным масс-спектрометрическим детектированием

ПЦР – полимеразная цепная реакция

Pgp – гликопротеин-Р

BCRP – белок резистентности рака молочной железы

ОАТР1В1/ОАТР1В3 – полипептид, транспортирующий органические анионы 1В1/1В3

CAR – конститутивный андростановый рецептор

PXR -прегнан Х рецептор

FXR – фарнезоид Х рецептор

LXR α – печеночный Х рецептор альфа

CINPA – ингибитор CAR

TFCA – ингибитор LXR α

β -ХК – ингибитор FXR