

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ  
УЧРЕЖДЕНИЕ ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ  
«РЯЗАНСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ МЕДИЦИНСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ  
ИМЕНИ АКАДЕМИКА И.П. ПАВЛОВА»  
МИНИСТЕРСТВА ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

*На правах рукописи*

Слепнев Александр Александрович

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

1.5.4. Биохимия

Диссертация на соискание ученой степени  
доктора медицинских наук

Научный консультант:  
доктор медицинских наук,  
профессор  
Якушева Елена Николаевна

Рязань – 2025

## ОГЛАВЛЕНИЕ

<b>ВВЕДЕНИЕ</b> .....	<b>5</b>
<b>ГЛАВА I. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ</b> .....	<b>16</b>
1.1. Транспортные белки .....	16
1.1.1. Классификация транспортных белков .....	16
1.1.2. Р-гликопротеин: локализация, функции, регуляция .....	20
1.1.3. Белок резистентности рака молочной железы: локализация, функции, регуляция.....	22
1.1.4. Полипептид, транспортирующий органические анионы, 1В1: локализация, функции, регуляция .....	24
1.1.5. Полипептид, транспортирующий органические анионы, 1В3: локализация, функции, регуляция .....	25
1.2. Усыновленные рецепторы.....	27
1.2.1. Классификация ядерных рецепторов .....	27
1.2.2. Общая структура ядерных рецепторов .....	32
1.2.3. Конститутивный андростановый рецептор .....	33
1.2.4. Прегнан Х рецептор .....	34
1.2.5. Фарнезоидный Х рецептор.....	36
1.2.6. Печеночный Х рецептор.....	39
1.3. Влияние половых гормонов на изучаемые белки-транспортеры и усыновленные рецепторы.....	42
1.3.1. Влияние половых гормонов на Р-гликопротеин .....	42
1.3.2. Влияние половых гормонов на белок резистентности рака молочной железы... ..	45
1.3.3. Влияние половых гормонов на ОАТР1В1/ ОАТР1В3 .....	48
1.3.4. Влияние половых гормонов на конститутивный андростановый рецептор .	48
1.3.5. Влияние половых гормонов на прегнан Х рецептор .....	49
1.3.6. Влияние половых гормонов на фарнезоидный Х рецептор .....	49
1.3.7. Влияние половых гормонов на печеночный Х рецептор $\alpha$ .....	50
1.3.8. Заключение по обзору литературы.....	51

<b>ГЛАВА II. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ .....</b>	<b>53</b>
2.1. Объект экспериментальных исследований.....	53
2.2. Культивирование клеток .....	53
2.3. Дизайн исследования .....	54
2.3.1. Изучение влияния эстрадиола, прогестерона и тестостерона на активность Pgr, VCRP, OATP1B1, OATP1B3 .....	55
2.3.2. Изучение влияния эстрадиола, прогестерона и тестостерона на экспрессию генов, кодирующих Pgr, VCRP, OATP1B1, OATP1B3 и на относительное количество изучаемых белков-транспортеров .....	56
2.3.3. Изучение способности эстрадиола, прогестерона и тестостерона активировать CAR, PXR, FXR, LXR .....	56
2.3.4. Изучение роли CAR, PXR, FXR, LXR во влиянии эстрадиола, прогестерона и тестостерона на относительное количество Pgr, VCRP, OATP1B1, OATP1B3 ..	57
2.4. Определение экспрессии генов, кодирующих Pgr, VCRP, OATP1B1, OATP1B3.....	57
2.5. Определение относительного количества Pgr, VCRP, OATP1B1, OATP1B3 .	59
2.5.1. Получение тотальных клеточных лизатов.....	59
2.5.2. Проведение анализа вестерн-блот .....	60
2.6. Определение относительного количества CAR, PXR, FXR, LXRa в ядерной и цитоплазматической фракциях лизатов клеток .....	61
2.6.1. Получение тотальных клеточных лизатов.....	61
2.6.2. Проведение анализа вестерн-блот .....	61
2.7. Определение активности Pgr и VCRP .....	63
2.8. Определение активности OATP1B1/OATP1B3.....	64
2.9. Определение концентрации фексофенадина в лизате клеток .....	64
2.10. Определение концентрации сульфасалазина в лизате клеток.....	66
2.11. Определение концентрации аторвастатина в лизате клеток .....	67
2.12. Статистический анализ.....	69
<b>ГЛАВА III. РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ.....</b>	<b>70</b>

3.1. Влияние половых гормонов на активность Pgr, VCRP, OATP1B1, OATP1B3 при кратковременном воздействии (оценка прямого влияния гормонов на белки-транспортеры).....	70
3.2. Влияние половых гормонов на экспрессию генов, кодирующих Pgr, VCRP, OATP1B1, OATP1B3.....	77
3.3. Влияние половых гормонов на относительное количество Pgr, VCRP, OATP1B1, OATP1B3.....	84
3.4. Влияние половых гормонов на активность Pgr, VCRP, OATP1B1/OATP1B3 при воздействии 24 ч.....	95
3.5. Влияние половых гормонов на относительное количество CAR, PXR, FXR, LXR в ядерной фракции лизата клеток Caco-2 .....	98
3.6. Влияние половых гормонов на относительное количество CAR, PXR, FXR, LXR $\alpha$ в ядерной фракции лизата клеток HepG2 .....	103
3.7. Влияние ингибиторов усыновленных рецепторов на базальный уровень изучаемых белков транспортеров.....	108
3.8. Роль усыновленных рецепторов в регуляции Pgr половыми гормонами.....	110
3.9. Роль усыновленных рецепторов в регуляции VCRP половыми гормонами..	113
3.10. Роль усыновленных рецепторов в регуляции OATP1B1 половыми гормонами.....	119
3.11. Роль усыновленных рецепторов в регуляции OATP1B3 половыми гормонами... ..	123
<b>ОБСУЖДЕНИЕ.....</b>	<b>126</b>
<b>ЗАКЛЮЧЕНИЕ .....</b>	<b>139</b>
<b>ВЫВОДЫ.....</b>	<b>143</b>
<b>ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ.....</b>	<b>145</b>
<b>ПЕРСПЕКТИВЫ ДАЛЬНЕЙШЕЙ РАЗРАБОТКИ ТЕМЫ.....</b>	<b>146</b>
<b>СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ .....</b>	<b>147</b>
<b>СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ .....</b>	<b>150</b>

## ВВЕДЕНИЕ

### Актуальность темы исследования

Все белки-транспортеры могут быть отнесены к двум основным суперсемействам – АВС-транспортеры (англ.: ATP-binding cassette) и транспортеры растворенных веществ (англ.: solute carrier family, SLC) – SLC-транспортеры. При этом первые осуществляют трансмембранный перенос субстратов за счет энергии АТФ, а вторые – без ее использования [272].

Основными клинически значимыми представителями АВС-транспортеров 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) [106], а SLC-транспортеров – полипептид, транспортирующий органические анионы OATP1B1 и полипептид, транспортирующий органические анионы OATP1B3 (англ.: organic anion transporting polypeptide, OATP) [90].

Pgp и BCRP являются эффлюксными белками-транспортерами, то есть обеспечивают выведение веществ из клеток во внеклеточное пространство и биологические жидкости. Данные транспортеры 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 [254]. 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.) [20]. К субстратам BCRP относят противоопухолевые средства (метотрексат, митоксантрон), празозин, циметидин, глибенкламид, сульфасалазин, нитрофурантоин, розувастатин [186, 289, 321].

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) [106].

Функционирование белков-транспортеров может изменяться под влиянием различных веществ. Индукторы повышают их активность, а ингибиторы ее снижают [20, 136].

В ряде исследований изучалось влияние половых гормонов на функционирование Pgp и BCRP [329]. В опытах *in vivo* на самках кроликов показано, что эстрадиол и прогестерон стимулируют активность и количество Pgp [176]. В эксперименте *in vitro* выявлено, что  $17\beta$ -эстрадиол индуцирует экспрессию BCRP в клетках хориокарциномы плаценты человека BeWo [109, 256]. Установлено, что тестостерон не влияет на синтез BCRP в клетках BeWo, однако совместно с  $17\beta$ -эстрадиолом увеличивает количество белка и мРНК BCRP в два раза [329]. Выявлено, что эстриол, плацентарный лактоген и пролактин повышают количество BCRP в клетках BeWo, а хорионический гонадотропин человека не оказывает влияния на данный белок-транспортер [329]. 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 [331].

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 [54, 82, 293]. 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 [180]. В другом исследовании на клетках рака молочной железы, с учетом наличия/отсутствия эстрогенных рецепторов (англ.: estrogen receptor, ER), двух ER $\alpha$ <sup>+</sup> положительных (MCF-7 и T47-D) и двух ER<sup>-</sup> отрицательных (MDA-MB-231 и NCI/ADR-RES), было показано, что эстрадиол снижал уровень белка Pgp в ER $\alpha$ -положительных клеточных линиях [119].

В клеточной линии хориокарциномы плаценты человека JAR прогестерон снижал поглощение саквинавира – субстрата Pgp, а верапамил блокировал данный эффект [92]. В эксперименте на роговицах новозеландских кроликов выявлено, что тестостерон в концентрации 100 и 150 мкМ не влиял на опосредованный Pgp 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 [101]. Однако в другом исследовании тестостерон не влиял на уровень белка Pgp в культурах почечной ткани мышей и в эпителиальных клетках проксимальных канальцев почек человека [180].

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 [117]. 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 [256].

В линии клеток рака молочной железы человека MCF-7 лечение дегидротестостероном снизило уровни экспрессии гена *ABCG2*, кодирующего BCRP [65].

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 [4, 25, 40, 49, 50]. В работах была изучена активность Pgp при моделировании патологических состояний таких как: нарушения мозгового кровообращения [44], гипоксии [6], неврологические расстройства [33], патологии эндокринной системы [15].

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

## **Цель исследования**

Изучить влияние половых гормонов на функционирование клинически значимых белков-транспортёров (Р-гликопротеина, белка резистентности рака молочной железы, полипептидов, транспортирующих органические анионы 1В1 и 1В3) 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-транспортёров (Р-гликопротеина, белка резистентности рака молочной железы, полипептидов, транспортирующих органические анионы 1В1 и 1В3) при кратковременном воздействии.

2. Изучить влияние эстрадиола, прогестерона и тестостерона на экспрессию генов, количество белка и активность клинически значимых белков-транспортёров (Р-гликопротеина, белка резистентности рака молочной железы, полипептидов, транспортирующих органические анионы 1В1 и 1В3) 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 Х рецептора альфа) в регуляции белка резистентности рака молочной железы под действием половых гормонов.

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

печеночного X рецептора альфа) в регуляции полипептида, транспортирующего органические анионы 1В1 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 1В3 под действием половых гормонов.

### **Научная новизна**

В ходе выполнения работы впервые:

на клетках линии Сасо-2 изучено влияние эстрадиола, прогестерона и тестостерона на количество и активность белков-транспортеров Pgr и BCRP. Установлена роль усыновленных рецепторов PXR, CAR, FXR, LXR $\alpha$  в данном процессе;

на клетках линии НерG2 изучено влияние эстрадиола, прогестерона и тестостерона на количество и активность белков-транспортеров OATP1B1 и OATP1B3. Показана роль усыновленных рецепторов PXR, CAR, FXR, LXR $\alpha$  в данном процессе;

показано, что в большинстве случаев изменение количества транспортеров (Pgr, 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 $\alpha$ .

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 $\alpha$ . 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 $\alpha$ , 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- $\beta$ -холевая кислота, LXR $\alpha$  – 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 Pgp при этом не происходит, так как гестаген обладает негеномной (прямой) ингибирующей активностью по отношению к молекуле транспортера. Тестостерон снижает количество Pgp, 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 $\alpha$ . Прогестерон вызывает снижение количества OATP1B1.

4. Эстрадиол повышает уровень OATP1B3, действуя через FXR, тестостерон увеличивает количество данного белка-транспортера за счет влияния на LXR $\alpha$ . 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, посвященному 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.

## **Связь задач исследования с основным планом научно-исследовательских работ университета**

Диссертационная работа выполнена в соответствии с тематическим планом научно-исследовательских работ ФГБОУ ВО РязГМУ Минздрава России.

### **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.

## ГЛАВА I. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

### 1.1. Транспортные белки

#### 1.1.1. Классификация транспортных белков

Для нормальной жизнедеятельности клеток им необходимо поддерживать и контролировать постоянство своей внутренней среды. Достигается это с одной стороны свойствами билипидной клеточной мембраны, которая не проницаема для заряженных молекул, а с другой – функционированием специальных транспортных белков, которые обеспечивают определенным молекулам, таким как метаболиты и ионы, возможность проходить через липидный барьер – поступать или удаляться из клетки, контролируя таким образом уровни питательных и токсических веществ внутри клеток [211].

Все основные транспортные белки могут быть разделены на 3 основных суперсемейства [63, 71, 241]:

- 1) ионные каналы;
- 2) АТФ-зависимые насосы;
- 3) белки-переносчики растворенных веществ (англ.: solute carrier family, SLC SLC).

*Ионные каналы* осуществляют пассивный транспорт веществ (преимущественно ионов) по их электрохимическому и концентрационному градиенту. Этот транспорт происходит быстро, поскольку каналы не претерпевают радикальных конформационных изменений. Как следует из их названия, семейство ионных каналов транспортирует широкий спектр ионов через клеточные мембраны, поддерживая мембранный потенциал и играя решающую роль в возбуждении и передаче сигналов в клетках [271].

*АТФ-зависимые насосы* перемещают субстраты через мембраны против электрохимического градиента за счет энергии АТФ. Среди них выделяют 4 типа переносчиков [234]:

Р-тип – управляет транспортом ионов и липидов через клеточные мембраны,

используя значительные конформационные изменения, вызванные свободной энергией, высвобождаемой при гидролизе АТФ [209, 231];

F-тип – осуществляет синтез АТФ из АДФ во внутренней мембране митохондрий (АТФ-синтаза);

V-тип – транспортирует  $H^+$  через цитоплазматическую мембрану вакуолей растительных клеток и лизосом животных клеток [270];

Четвертый тип – АВС-транспортеры (англ.: ATP-binding cassette).

У человека описано 49 генов, кодирующих АВС-транспортеры, объединенных в семь подсемейств (обозначаемые А-G). Мутации в ряде генов могут приводить к развитию заболеваний. Например, мутации в гене АВСС7 ассоциируются с развитием муковисцидоза, а в гене АВСВ11 – с развитием семейного внутрипеченочного холестаза [86].

АВС-транспортеры являются в основном эффлюксными, то есть выводят субстраты из клеток [156]. Обычно они состоят из четырех доменов: двух трансмембранных доменов (англ.: transmembrane domain, TMD), которые действуют как канал для субстратов, и двух нуклеотидсвязывающих доменов (англ.: nucleotide-binding domains, NBD), которые присоединяют и гидролизуют АТФ (Рисунок 1).

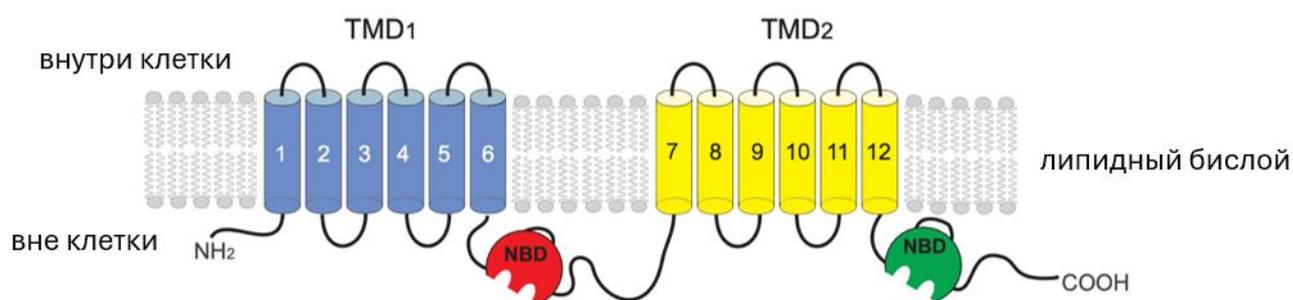


Рисунок 1 – Структура транспортера АВС (цит. по Dermauw W., 2014) [98]  
Примечание – TMD – трансмембранный домен; NBD – нуклеотидсвязывающий домен

В то время как трансмембранные домены имеют широкий спектр структур и аминокислотных последовательностей, нуклеотидсвязывающие домены демонстрируют консервативность последовательности [272]. Многие АВС-

транспортеры переносят лекарственные вещества и участвуют в формировании устойчивости к противоопухолевым препаратам [191, 265]. Из всех ABC-транспортеров самыми изученными и клинически значимыми являются Р-гликопротеин (Pgp, ABCB1-белок, MDR1-белок) и белок резистентности рака молочной железы (англ.: breast cancer resistance protein, BCRP, ABCG2-белок).

Суперсемейство SLC в настоящее время включает 458 транспортных белков, составляющих 65 семейств, которые транспортируют широкий спектр веществ через клеточные мембраны [241, 286, 304]. Эти семейства определены Комитетом по номенклатуре генов (англ.: Gene Nomenclature Committee, GNC) Организации генома человека (англ.: Human Genom Organization, HUGO) и организованы таким образом, что белки-члены в каждом семействе имеют не менее 20–25% сходства последовательностей по крайней мере с одним из других членов семейства. В среднем каждое семейство SLC состоит из семи членов, в то же время, восемь семейств содержат только по одному члену (SLC32, SLC40, SLC48, SLC50, SLC53, SLC61, SLC62 и SLC64), а самое большое семейство – SLC25, содержит 53 члена.

В целом, белки SLC транспортируют широкий спектр молекул, включая сахара, аминокислоты, витамины, нуклеотиды, металлы, неорганические ионы, органические анионы, олигопептиды и ксенобиотики (лекарственные вещества) [298]. Ряд SLC белков транспортируют несколько биомолекул, в то время как другие – транспортируют только одну биомолекулу, а третьи – являются «сиротами», для которых субстрат/субстраты не установлены. Считается, что до 30% белков SLC остаются такими «сиротами» [236].

Транспортеры суперсемейства SLC не используют энергию, высвобождаемую при гидролизе АТФ, для транспорта веществ против градиента их концентрации. Считается, что эти белки действуют как пассивные фасилитативные транспортеры или вторичные активные транспортеры [90].

Фасилитативный транспорт – это система транспорта, в которой SLC действует как простой посредник для пассивного перемещения соединения по его градиенту [288]. Фасилитативный транспорт относится к системам, в которых только одна молекула транспортируется в термодинамически выгодном

направлении. При вторичном активном транспорте транспортеры связывают прохождение двух или более веществ. Один субстрат движется по своему электрохимическому градиенту, что обеспечивает свободную энергию для управления транспортом другого субстрата(ов).

Таким образом, термодинамически выгодный транспорт одного вещества обеспечивает необходимую свободную энергию для транспортировки другого в неблагоприятном направлении. Во многих из этих случаев скорость транспорта пропорциональна электрохимическому градиенту связанного иона [91]. Такие вторичные активные транспортеры могут быть либо симпортерами, которые транспортируют свои субстраты в одном направлении, либо антипортерами, в которых субстраты пересекают мембрану в противоположных направлениях. Считается, что большинство вторичных активных транспортеров используют транспортный механизм «альтернирующего доступа», при котором домены белка располагаются так, чтобы иметь сайт связывания лиганда, доступный только с одной стороны мембраны в каждый момент времени, изменяя конформации для транспортировки своих субстратов путем смещения на другую сторону мембраны [205].

В основном SLC-транспортеры опосредуют проникновение веществ в клетки, то есть являются инфлюксными транспортерами, однако некоторые могут функционировать как эффлюксные транспортеры (например, переносчики лекарственных средств и токсинов (англ.: multidrug and toxin extrusion, MATEs)) или же опосредовать двунаправленный транспорт веществ [23, 286, 324].

Практически все SLC-транспортеры сходны по своему строению и состоят из 12 трансмембранных доменов (TMD). N- и C-концевые участки переносчика зафиксированы на цитоплазматической мембране [32] (Рисунок 2).

Ряд SLC-транспортеров помимо переноса эндогенных веществ, могут участвовать и в транспорте ксенобиотиков. Самыми изученными из них являются OATP1B1 и OATP1B3 (надсемейство OATP, семейство 1, подсемейство B) [144].

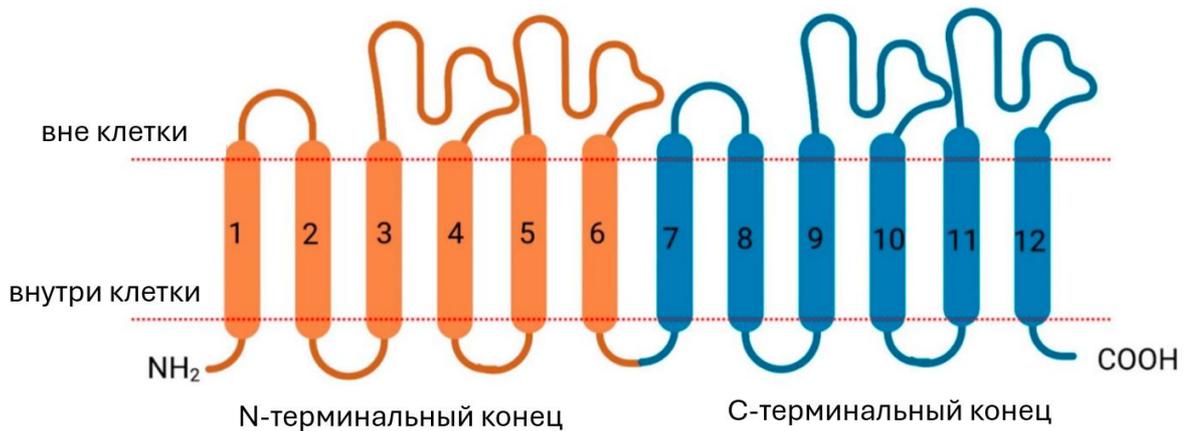


Рисунок 2 – Схематическое изображение вторичной структуры транспортеров SLC (цит. по: Nielsen M.M.K. et al, 2021) [221]

### 1.1.2. Р-гликопротеин: локализация, функции, регуляция

Р-гликопротеин (англ.: P-glycoprotein, Pgp/ABCB1), впервые был обнаружен Juliano R.L. и Ling V. в 1976 г [177] в клетках яичника китайского хомячка, устойчивых к цитостатикам. На данный момент он считается самым изученным ABC-транспортером.

Pgp представляет собой эффлюксный (удаляющий субстраты из клеток) белок плазматической мембраны массой 170 кДа [11, 188, 328].

Человеческий Pgp кодируется геном *MDR1* (*ABCB1*). У грызунов есть два гомолога Pgp, транспортирующих лекарственные препараты, Mdr1a (кодируется геном *Abcb1a*) и Mdr1b (кодируется геном *Abcb1b*), которые имеют приблизительно 85% аминокислотной идентичности друг с другом и > 80% аминокислотной идентичности с человеческим Pgp. Pgp состоит из двух гомологичных половин, каждая из которых имеет TMD и NBD. Два половинных транспортера имеют только 43% идентичности аминокислотной последовательности. Pgp экспортирует свой субстрат из клетки, используя энергию гидролиза АТФ. Стехиометрия составляет 0,3~3 молекулы АТФ на молекулу субстрата [123, 128, 326].

У млекопитающих Pgp локализуется в кишечнике, печени, почках, мозге, яичках, плаценте, что согласуется с его ролью в защите организма от ксенобиотиков (за счет ограничения их всасывания в желудочно-кишечном тракте

или выведении в печени и почках) и обеспечивает дополнительное ограничение проницаемости гематоэнцефалического, фетально-материнского и гемато-ретиального барьеров [81, 207].

Более того, Pgp также экспрессируется в митохондриальной мембране [153, 238] и ядре [153] MDR-позитивных клеток, где он удаляет противоопухолевые препараты из митохондрий или ядер в цитозоль, что также вносит вклад в развитие лекарственной устойчивости [3, 21].

Pgp содержит несколько участков связывания субстрата в домене связывания лиганда [35, 195, 291]. Благодаря этому он проявляет широкую субстратную специфичность и является переносчиком гидрофобных субстратов таких как химиотерапевтические препараты, ингибиторы протеазы ВИЧ, иммунодепрессанты, антиаритмические препараты, блокаторы кальциевых каналов, анальгетики, антигистаминные препараты, антибиотики, натуральные продукты, флуоресцентные красители и пестициды [41]. Существует несколько общих структурных характеристик субстратов Pgp. Единственной общей характеристикой, выявленной на данный момент во всех субстратах Pgp, является их амфипатическая природа. Это может быть связано с механизмом транслокации лекарственных веществ Pgp: было постулировано, что внутриклеточные субстраты Pgp сначала должны встраиваться во внутреннюю полусферу клеточной мембраны, прежде чем они будут «перевернуты» во внешнюю полусферу или, возможно, вытеснены непосредственно во внеклеточную среду Pgp. Только амфипатические молекулы могут иметь необходимые свойства встраивания в мембрану [280].

Известно, что экспрессия *MDR1*, а также многих ферментов, метаболизирующих лекарственные вещества, регулируется ядерными рецепторами, включая прегнан X рецептор (англ.: pregnane X receptor, PXR), конститутивный андростановый рецептор (англ.: constitutive androstane receptor, CAR) и фарнезоидный X рецептор (англ.: farnesoid X receptor, FXR). Данные рецепторы могут действовать напрямую (PXR) или косвенно (FXR через PXR) в ответ на хроническое введение ксенобиотиков, таких как рифампицин. По этой причине, если исследуемое вещество является субстратом Pgp ожидается

замедление его всасывания и ускорение выведения (за счет активации транспортера) при совместном введении с сильными активаторами PXR/CAR [109, 228]. Экспрессия *MDR1* регулируется эпигенетически, поскольку усиленное ацетилирование гистонов при ингибировании гистондеацетилаз модулирует уровни *MDR1* как в раковых, так и в незлокачественных клетках [336].

В гене *MDR1*, кодирующем Pgp, описан ряд полиморфизмов, приводящих к изменению количества и активности транспортера [190, 213].

### **1.1.3. Белок резистентности рака молочной железы: локализация, функции, регуляция**

BCRP был открыт в 1998 году в клетках рака молочной железы (MCF-7/AdrVp), которые проявляли лекарственную резистентность и характеризовались активным клеточным эффлюксом антрациклиновых противоопухолевых средств, но при этом не экспрессировали Pgp [51].

В настоящее время BCRP выявлен не только в опухолевых клетках, но и в ряде органов и тканей животных и человека, таких как тонкий и толстый кишечник, печень и почки [292], гистогематические барьеры (гематоплацентарный, гематоэнцефалический, гематотестикулярный, гематоофтальмический) [289].

В данных органах и тканях BCRP, как и Pgp выполняет защитную функцию ограничивая всасывание субстратов, ускоряя их выведение или защищая от их проникновения в забарьерные органы.

BCRP представляет собой мембранный белок массой 72 кДа, состоящий из 655 аминокислотных остатков [289]. Он содержит один нуклеотидсвязывающий домен (NBD) и один трансмембранный домен (TMD), состоящий из 6 трансмембранных сегментов (англ.: transmembrane, TM) [264].

BCRP может функционировать как гомодимер за счет образования межмолекулярных дисульфидных связей между остатками цистеина (Cys<sup>603</sup>) и как олигомер высокого порядка, например тетрамера [289].

BCRP обладает широкой субстратной специфичностью, осуществляя

транспорт из клеток эндогенных (флавоноиды, порфирины, ураты, стероидные гормоны и др.) и экзогенных веществ, в том числе многих лекарственных препаратов (статины, противоопухолевые, антисекреторные, антимикробные средства и др.) [107, 170]. Известно более 200 субстратов BCRP, однако точной связи между структурой вещества и его принадлежностью к субстратам белка-транспортера не установлено, при этом доказано, что он может переносить как липофильные, так и гидрофильные молекулы.

Выявлен ряд эндогенных субстратов BCRP. Известно, что данный белок-транспортер участвует в эффлюксе женских половых гормонов и их глюкуронидов [111]. Установлена роль BCRP в выведении уратов почками и кишечником, что обуславливает его значение в развитии подагры [107].

Экспрессия BCRP может регулироваться на уровне транскрипции [218, 295]. На сегодняшний день регуляторные элементы, идентифицированные в промоторе BCRP, включают элемент ответа на эстроген (англ.: estrogen response element, ERE), элемент ответа на прогестерон (англ.: progesterone response element, PRE), элемент ответа на гипоксию (англ.: hypoxia response element, HRE), элемент ответа на антиоксиданты (англ.: antioxidant response element, ARE), элемент ответа на арилуглеводороды (англ.: aryl hydrocarbon response element, AhRE) и элемент ответа на субъединицу активного ядерного фактора каппа В (англ.: Nuclear Factor Каппа В, NFκB) [70, 268].

Таким образом, ген *ABCG2* активируется в условиях гипоксии через фактор индуцируемый гипоксией 1α (англ.: hypoxia-inducible factor 1α, HIF-1α) [314], агонистами арильных углеводородных рецепторов через арильный углеводородный рецептор (англ.: aryl hydrocarbon receptor, AhR) [325]. Было также показано, что экспрессия BCRP индуцируется через рецептор, активируемый пролифераторами пероксисом гамма (англ.: peroxisome proliferator-activated Receptor γ, PPARγ) [237] или подавляется дексаметазоном, возможно, через глюкокортикоидный рецептор (англ.: glucocorticoid receptor, GR) [99].

Также сообщалось об эпигенетической регуляции гена *ABCG2*. В раковых линиях клеток, устойчивых к лекарственным препаратам, повышенные уровни

BCRP были связаны с гипометилированием или неметилированием CpG-островка [57, 317] и с гиперацетилированием гистонов промотора *ABCG2* [317].

Экспрессия BCRP может быть подавлена микроРНК путем связывания с нетранслируемыми областями (англ.: untranslated regions, 3'-UTR) гена *ABCG2* и отрицательной модуляцией стабильности транскрипта и трансляции белка [255]. Было идентифицировано несколько таких микроРНК, включая hsa-miR-519c, hsa-miR520h и hsa-miR328.

Посттрансляционная регуляция может влиять на транслокацию и экспрессию BCRP на поверхности клетки. Как было сказано ранее, эстрадиол снижает экспрессию BCRP в ER $\alpha$ -положительных раковых клетках за счет снижения синтеза и созревания белка BCRP [117] или в капиллярах мозга через негеномный путь [147].

#### **1.1.4. Полипептид, транспортирующий органические анионы, 1B1: локализация, функции, регуляция**

OATP1B1 впервые был обнаружен в печени тремя независимыми научными группами [54, 55, 161].

Этими же авторами было показано, что OATP1B1 является специфичным для печени белком, который локализован в синусоидальной (базолатеральной) мембране гепатоцитов и экспрессируется равномерно по всем долькам. OATP1B1 является инфлюксным транспортером, то есть обеспечивает проникновение субстратов внутрь клеток. OATP1B1 человека представляет собой гликопротеин, состоящий из 691 аминокислотного остатка, и кодируется геном *SLCO1B1*. Молекулярная масса транспортера составляет около 84 кДа [37, 55, 145].

OATP1B1, как и все представители надсемейства транспортёров органических анионов, состоит из 12 трансмембранных доменов (TMD) [260].

Несмотря на свое название, OATP1B1 обладает субстратной специфичностью, которая включает анионные, цвиттер-ионные и нейтральные липофильные молекулы. Он также транспортирует эндогенные вещества, включая

желчные кислоты, билирубин, копропорфирины I и III, конъюгаты глюкуронида и пептиды [54, 227].

Известно, что экспрессия OATP1B1 регулируется ядерными гормональными рецепторами FXR, ядерными факторами гепатоцитов (англ.: hepatocyte nuclear factor, HNF) HNF1 $\alpha$ , HNF3 $\beta$  и HNF4 $\alpha$ . Они также транскрипционно регулируют другие важные OATP, такие как OATP1B3 и OATP2B1 [126, 269].

### **1.1.5. Полипептид, транспортирующий органические анионы, 1B3: локализация, функции, регуляция**

OATP1B3 (ранее известный как OATP8 и LST-2), кодируется геном *SLCO1B3* и имеет 80% идентичности аминокислотной последовательности с OATP1B1. Данный транспортер в основном экспрессируется на синусоидальной (базолатеральной) мембране центрилобулярных гепатоцитов (т.е. тех, которые расположены вокруг центральной вены) человека. Считается, что он специфичен исключительно для печени; однако низкая экспрессия его мРНК также была зарегистрирована в простате, яичках, толстой кишке и некоторых других тканях, а также во многих типах опухолей [19, 229].

OATP1B3 – это интегральный мембранный белок, который, как предполагается, содержит 12 трансмембранных доменов.

OATP1B3 – является инфлюксным транспортером, то есть обеспечивает проникновение субстратов внутрь гепатоцитов. Обычно его считают однонаправленным транспортером с облегченной диффузией, хотя есть данные о двунаправленном транспорте. Механизм реализации транспортной активности OATP1B3 не известен, как и для многих других OATP [260].

OATP1B3 способствует поглощению гепатоцитами различных экзогенных и эндогенных соединений. Эндогенные субстраты OATP1B3 включают билирубин, копропорфирины I и III, желчные кислоты, конъюгированные стероиды, эйкозаноиды и гормоны щитовидной железы [55].

Считается, что одновременный и полный дефицит OATP1B1 и OATP1B3

вызывает развитие синдрома Ротора, при котором нарушается обратный захват печенью конъюгированного билирубина и клинически проявляется легкая гипербилирубинемия [93, 102].

ОАТР1В3 также транспортирует лекарственные препараты, являющиеся его субстратами, например, атрасентан, босентан, доцетаксел, дигоксин, эналаприл, эритромицин, фексофенадин, флувастатин, метотрексат, микофеноловую кислоту, глибенкламид, олмесартан, убаин, паклитаксел, питавастатин, правастатин, рифампицин, розувастатин, рифампицин, SN-38, телмисартан, валсартан. Следует отметить, что субстраты ОАТР1В3 и ОАТР1В1 часто совпадают.

Предполагалось, что нейропептидный гормон кишечника – холецистокинин транспортируется исключительно ОАТР1В3 [151], хотя эта точка зрения недавно была оспорена. Специфическими субстратами ОАТР1В3 (в пределах семейства ОАТР) могут являться доцетаксел, дигоксин, глибенкламид, глипизид [169] и грибной токсин аманитин [214].

Кларитромицин, циклоспорин, азитромицин, эритромицин, рифампицин, глибенкламид, глимепирид, натеглинид, рокситромицин и толбутамид были идентифицированы как ингибиторы ОАТР1В3, что позволяет предположить, что эти соединения могут взаимодействовать с субстратами ОАТР1В3 [224].

Механизмы регуляции ОАТР1В1/ОАТР1В3, как и других транспортеров ОАТР, в настоящее время активно изучаются [260].

Так, например, показано, что промотор ОАТР1В3 трансктивируется фарнезоид X рецептором [158], ядерным фактором гепатоцитов HNF1 $\alpha$  и фактором транскрипции, активируемым гормоном роста и пролактином (англ.: signal transducer and activator of transcription 5, STAT5) [158]. С другой стороны, транскрипция ОАТР1В3 может подавляться HNF 3 $\beta$  [303]. Также установлено, что фенобарбитал, активатор конститутивного андростанового рецептора, снижает экспрессию ОАТР1В3 в срезах печени человека [103].

## 1.2. Усыновленные рецепторы

### 1.2.1. Классификация ядерных рецепторов

Ядерные рецепторы (англ.: nuclear receptors, NR) – это суперсемейство лиганд-активируемых транскрипционных факторов [140, 185], участвующих в регуляции многих физиологических процессов, включая метаболизм, электролитный баланс, пролиферацию клеток, иммунный ответ, активность ферментов, развитие и размножение, а также в патогенезе многих патологических процессов, таких как рак, неврологические и психиатрические синдромы, иммуносупрессия, диабет, ревматоидный артрит, астма, синдромы гормонорезистентности, сердечно-сосудистые заболевания, метаболический синдром, преждевременное старение и др. [155, 178, 194, 202, 252].

Первый член этого семейства был клонирован в 1985 году. В настоящее время семейство включает в себя 48 представителей в организме человека [89, 309]. 10 из них до сих пор считаются «сиротскими» или орфанными рецепторами, так как их лиганды еще не идентифицированы [67, 331, 335].

В последние годы были обнаружены низкоаффинные лиганды для многих рецепторов, которые ранее считались орфанными. Впоследствии они были объединены в группу усыновленных (син. принятые) ядерных рецепторов, включающую 26 из 48 представителей семейства [82, 137]. Остальные 12 рецепторов используют в качестве эндогенных лигандов эндокринные гормоны, поэтому их относят к группе эндокринных ядерных рецепторов [104]

У человека всех представителей этого суперсемейства классифицируют на семь подсемейств (NR0 - NR6), что основано на их функциях и механизмах регуляции. Систематический обзор по основным характеристикам ядерных рецепторов (семейство, ген, лиганды) на основании отечественной и зарубежной литературы литературных представлен в Таблице 1.

Таблица 1 – Характеристика ядерных рецепторов (цит. по: Довжикова И.В., Андриевская И.А., 2019; Ивашкин В.Т., 2010; Смирнов А.Н., 2002; Weikum E.R., 2018) [12, 14, 36, 331]

Семейство	Полное название	Аббревиатура	Ген	Лиганды / Группа ядерных рецепторов
0B	Дозозависимая реверсия пола – врожденная Х-сцепленная гипоплазия надпочечников, ген 1	DAX1	<i>NR0B1</i>	Орфанные
	Короткий гетеро-димерный партнер	SHP	<i>NR0B2</i>	
1A	$\alpha$ -рецептор тиреоидных гормонов	TR $\alpha$	<i>THRA</i>	Тиреоидные гормоны / Эндокринные
	$\beta$ -рецептор тиреоидных гормонов	TR $\beta$	<i>THRB</i>	
1B	$\alpha$ -рецептор ретиноевой кислоты	RAR $\alpha$	<i>RARA</i>	Ретиноевая кислота / Эндокринные
	$\beta$ -рецептор ретиноевой кислоты	RAR $\beta$	<i>RARB</i>	
	$\gamma$ -рецептор ретиноевой кислоты	RAR $\gamma$	<i>RARG</i>	
1C	$\alpha$ -рецептор, активируемый пролифераторами пероксисом	PPAR $\alpha$	<i>PPARA</i>	Жирные кислоты / Усыновленные
	$\beta$ -рецептор, активируемый пролифераторами пероксисом	PPAR $\beta$	<i>PPARB</i>	
	$\gamma$ -рецептор, активируемый пролифераторами пероксисом	PPAR $\gamma$	<i>PPARG</i>	

1D	Reverse-Erb- $\alpha$	REV- ERB $\alpha$	<i>NR1D1</i>	Гем / Усыновленные
	Reverse-Erb- $\beta$	REV- ERB $\beta$	<i>NR1D2</i>	
1F	RAR-связанный орфанный рецептор- $\alpha$	ROR $\alpha$	<i>RORA</i>	Стероиды / Усыновленные
	RAR-связанный орфанный рецептор- $\beta$	ROR $\beta$	<i>RORB</i>	
	RAR-связанный орфанный рецептор- $\gamma$	ROR $\gamma$	<i>RORC</i>	
1H	Фарнезоидный X рецептор- $\alpha$	FXR $\alpha$	<i>NR1H4</i>	Желчные кислоты / Усыновленные
	Фарнезоидный X рецептор- $\beta$	FXR $\beta$	<i>NR1H5</i>	
	Печеночный X рецептор- $\alpha$ ( $\alpha$ - рецептор оксистеролов)	LXR $\alpha$	<i>NR1H3</i>	Оксистеролы / Усыновленные
	Печеночный X рецептор- $\beta$ ( $\beta$ - рецептор оксистеролов)	LXR $\beta$	<i>NR1H2</i>	
1I	Рецептор витамина D	VDR	<i>VDR</i>	1 $\alpha$ , 25- дигидрокси- витамин D3 / Эндокринные
	Прегнан X рецептор	PXR	<i>NR1I2</i>	Эндобиотики и ксенобиотики / Усыновленные
	Конститутивный андростановый рецептор	CAR	<i>NR1I3</i>	Ксенобиотики / Усыновленные

## Продолжение Таблицы 1

2A	Ядерный фактор гепатоцитов 4 $\alpha$	HNF4 $\alpha$	<i>HNF4A</i>	Жирные кислоты / Усыновленные
	Ядерный фактор гепатоцитов 4 $\gamma$	HNF4 $\gamma$	<i>HNF4G</i>	
2B	Ретиноидный X рецептор- $\alpha$	RXR $\alpha$	<i>RXRA</i>	9-цисретиновая кислота / Усыновленные
	Ретиноидный X рецептор- $\beta$	RXR $\beta$	<i>RXRB</i>	
	Ретиноидный X рецептор- $\gamma$	RXR $\gamma$	<i>RXRG</i>	
2C	Тестикулярный рецептор 2	TR 2	<i>NR2C1</i>	Орфанные  Полиненасыщенные жирные кислоты, тиазолидиндионы/ Усыновленные
	Тестикулярный рецептор 4	TR 4	<i>NR2C2</i>	
2E	Ядерный рецептор TLX	TLX	<i>NR2E1</i>	Орфанные
	Ядерный рецептор фоторецепторных клеток	PNR	<i>NR2E3</i>	
2F	Ранний промотор овальбумина цыпленка–транскрипционный фактор $\alpha$	COUP-TF $\alpha$	<i>NR2F1</i>	Орфанные
	Ранний промотор овальбумина цыпленка–транскрипционный фактор $\beta$	COUP-TF $\beta$	<i>NR2F2</i>	
	Ранний промотор овальбумина цыпленка–транскрипционный фактор $\gamma$	COUP-TF $\gamma$	<i>NR2F6</i>	
3A	Эстрогеновый рецептор- $\alpha$	ER $\alpha$	<i>ESR1</i>	Эстрогены / Эндокринные
	Эстрогеновый рецептор- $\beta$	ER $\beta$	<i>ESR2</i>	

## Продолжение Таблицы 1

3B	Эстроген-связанный рецептор- $\alpha$	ERR $\alpha$	ESRRR A	Фитоэстрогены, эстрогены, гидрокситамоксифен, диэтилстильбестрол/ Усыновленные
	Эстроген-связанный рецептор- $\beta$	ERR $\beta$	ESRRR B	
	Эстроген-связанный рецептор- $\gamma$	ERR $\gamma$	ESRRR G	
3C	Андрогеновый рецептор	AR	AR	Андрогены / Эндокринные
	Глюкокортикоидный рецептор	GR	NR3C1	Глюкокортикоиды / Эндокринные
	Минералокортикоидный рецептор	MR	NR3C2	Минералокортикоиды / Эндокринные
	Прогестероновый рецептор	PR	PGR	Прогестерон / Эндокринные
4A	Фактор роста нервов 1B	NGF1-B	NR4A1	Орфанные
	Связанный с Nurr1 фактор 1	NURR1	NR4A2	Ненасыщенные жирные кислоты / Усыновленные
	Орфанный рецептор нейронного происхождения 1	NOR-1	NR4A3	Орфанный
5A	Стероидогенный фактор 1	SF-1	NR5A1	Фосфолипиды / Усыновленные
	Гомолог-1 рецептора печени	LRH-1	NR5A2	
6A	Ядерный фактор половых клеток	GCNF	NR6A1	Орфанные

## 1.2.2. Общая структура ядерных рецепторов

Все ядерные рецепторы имеют общую белковую структуру, состоящую из следующих доменов: N-концевого, ДНК-связывающего (англ.: DNA binding domain, DBD), лиганд-связывающего (англ.: ligand binding domain, LBD), С-концевого доменов и шарнирного участка [310]. N-концевой домен содержит домен транскрипционной активаторной функции 1 (англ.: activator function, AF-1), отвечающий за слабую транскрипционную активность, не зависящую от лиганда [171]. DBD состоит из двух цинк-связывающих мотивов («цинковые пальцы»), каждый из которых включает в себя 4 остатка цистеина [129, 331]. DBD непосредственно взаимодействует с гормон-чувствительными элементами, что приводит к активации транскрипции генов [171, 307]. Шарнирный участок представляет собой короткую гибкую белковую структуру, соединяющую DBD и LBD [45, 233] (Рисунок 3).

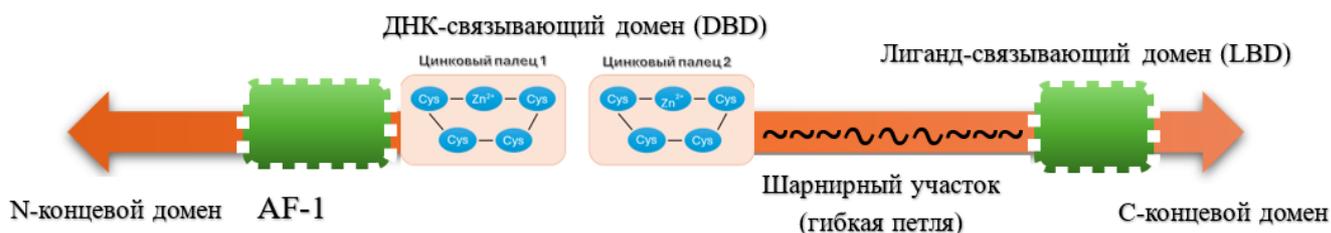


Рисунок 3 – Общая структура ядерных рецепторов

Примечание: AF-1 – домен активаторной функции 1 (англ.: activator function)

LBD – это сложный аллостерический сигнальный домен, который не только связывается с лигандами, но и напрямую взаимодействует с белками-корегуляторами [330]. Этот структурно консервативный домен обычно состоит из 11  $\alpha$ -спиралей и 4  $\beta$ -нитей, которые складываются в 3 параллельных слоя, образуя дополнительную  $\alpha$ -спираль, что способствует формированию гидрофобного лиганд-связывающего кармана (англ.: ligand binding pocket, LBP) [52]. LBD содержит AF-2, которая отвечает за сильную лиганд-зависимую транскрипционную активность ядерных рецепторов [61, 160, 216, 223]. Основные отличия всех известных ядерных рецепторов заключаются в структуре их лиганд-связывающих доменов [64].

### 1.2.3. Конститутивный андростановый рецептор

Конститутивный андростановый рецептор (CAR, NR1I3) человека (hCAR) впервые был выделен в 1994 году [253]. Позже было установлено, что он кодируется геном *NR1I3* [250, 315].

CAR локализован преимущественно в печени и кишечнике, однако низкая экспрессия была также выявлена в тканях мозга, сердца, надпочечников, яичек, простаты и почек [53].

В нормальных физиологических условиях CAR, как правило, находится в цитоплазме клетки [34]. Несмотря на это, CAR также может быть локализован в ядре и конститутивно активен в иммортализованных клеточных линиях [165, 251].

CAR активируется прямым (лиганд-зависимым) и непрямым (лиганд-независимым) способом. Независимо от механизма, активация CAR заключается в том, что под воздействием лигандов происходит дефосфорилирование CAR и диссоциация его цитоплазматических комплексов с HSP90 и с цитоплазматическим удерживающим белком CAR (англ.: cytoplasmic retention protein CAR, CCRP). Далее CAR транслоцируется в ядро, где гетеродимеризуется с ретиноидным X рецептором (англ.: retinoid X receptor, RXR $\alpha$ ), в результате чего образуется комплекс CAR/RXR $\alpha$  [18, 250, 300].

Установлено, что CAR участвует в регуляции экспрессии генов ферментов I и II фаз биотрансформации (цитохром (англ.: cytochrome, CYP) *CYP2C*, *CYP3A*, сульфотрансферазы, глюкуронозилтрансферазы, глутатион-S-трансферазы), генов белков-переносчиков лекарств (например, ген белка OATP2), а также в регуляции углеводного и липидного обменов, клеточной пролиферации, обмене билирубина и гема [82], в том числе в опухолевых клетках .

Лигандами CAR является большое количество веществ, причем они отличаются у человека и животных. К основным лигандам человеческого CAR относят: аторвастатин, карбамазепин, никардипин, СИТСО, фенитоин, нефазодон [85, 105, 157].

Описаны следующие способы регуляции CAR: транскрипционная регуляция

CAR, модификация гистонов, метилирование ДНК, регуляция длинными некодирующими РНК, посттрансляционная регуляция. Однако основным из них считается изменение экспрессии его гена. Одним из первых охарактеризованных элементов ответа CAR был фенобарбитал-чувствительный энхансерный модуль (англ.: phenobarbital responsive enhancer module, PBREM) в гене *Cyp2b10* мыши [79]. Соответствующие элементы ДНК были обнаружены в генах *CYP2B1/2* крысы и *CYP2B6* человека [312].

Активация глюкокортикоидных рецепторов (англ.: glucocorticoid receptor, GR) физиологическими концентрациями глюкокортикоидов приводит к увеличению экспрессии CAR. Субмикромольные концентрации дексаметазона увеличивают экспрессию CAR [100]. Кетоконазол и миконазол, два противогрибковых препарата, ингибируют экспрессию мРНК CAR посредством их антагонистического влияния на GR [182].

#### 1.2.4. Прегнан X рецептор

Впервые NR1I2 был клонирован в 1998 году и назван рецептором прегнана X (PXR) или рецептором, активируемым прегнаном (англ.: pregnane activated receptor, PAR) [334].

PXR экспрессируется преимущественно в печени, тонком кишечнике, толстой кишке, желчном пузыре и, в меньшей степени, в почках, легких, желудке, моноцитах периферической крови, надпочечниках, костном мозге, некоторых отделах головного мозга, тканях репродуктивных органов, молочной железе [313].

PXR у человека кодируется геном *NR1I2* [285].

PXR имеет классическое строение ядерных рецепторов [64, 334].

Вопрос о локализации PXR в клетке в его неактивной форме до сих пор остается открытым. Согласно Squires E.J. et al, 2004 [287] цитозольная локализация PXR преобладает над ядерной в печени мыши, а его связывание с лигандом прегненолоном-16-карбонитрилом (англ.: pregnenolone 16 $\alpha$ -carbonitrile, PCN) приводит к ядерной транслокации комплекса лиганд-PXR [287].

В ходе исследований, проведенных японскими учеными в 2017 году на клеточной линии гепатокарциномы человека HepG2, была установлена преимущественно ядерная локализация PXR [173]. В то же время в 3D-культуре этих клеток была определена цитозольная локализация PXR, способного транслоцироваться в ядро после инкубации с рифампицином [10, 173, 261].

После связывания с лигандом PXR транслоцируется в ядро, где гетеродимеризуется с ретиноидным X рецептором  $\alpha$  (англ.: retinoid X receptor, RXR $\alpha$ ), образуя комплекс PXR-RXR $\alpha$ . Далее этот комплекс коммутирует с элементами ксенобиотического (англ.: xenobiotic response element, XREs) и/или гормонального ответа (англ.: element hormonal response, HREs), изменяет статус корепрессоров и коактиваторов, например, коактиваторов стероидных рецепторов (англ.: steroid receptor coactivator, SRC-1 и SRC-3), которые реструктурируют хроматин посредством гистоновых ацетилтрансфераз [152, 285]. Впоследствии активированный комплекс PXR-RXR $\alpha$  регулирует экспрессию целевого гена [56].

PXR регулирует экспрессию генов ферментов I (изоферменты цитохрома P450, например CYP3A4) и II (например, сульфотрансфераза, глюкуронилтрансфераза) фазы биотрансформации [72, 308], а также переносчиков лекарственных веществ Pgp, ABCG2, OATP2, транспортера органических катионов (англ.: organic cation transporters, OCT1) [198, 285].

Известно, что активация PXR в гепатоцитах способна усиливать регенерацию печени и даже приводить к гепатомегалии [245].

Стимуляция PXR прегненолоном-16-карбонитрилом индуцирует пролиферацию клеток рака молочной железы [198]. Кроме того, было показано, что сверхэкспрессия PXR в этих клетках приводит к повышению промоторной активности и уровня белков, ассоциированных с множественной лекарственной устойчивостью (англ.: multidrug resistance-associated protein, MRP1) и BCRP (ABCG2), которые отвечают за выведение ксенобиотиков из клеток в межклеточное пространство [46, 108, 206]. Регуляция PXR может осуществляться следующим механизмами: транскрипционная регуляция гена *NR1I2*, микроРНК-опосредованная регуляция, метилирование ДНК, фосфорилирование,

убиквитирование и SUMO-илирование [319].

Первые исследования, направленные на изучение молекулярных механизмов регуляции *NR1I2*, позволили предположить о возможном взаимодействии между GR и PXR. Так, лиганд GR дексаметазон усиливает транскрипцию *NR1I2*, которая частично ингибировалась антагонистом GR – мифепристоном [95,100, 297].

Также была описана двойственная регуляция экспрессии PXR глюкокортикоидами:

- 1) опосредованная GR трансактивация промотора *NR1I2*;
- 2) стабилизация мРНК PXR через её 3'-нетранслируемую область (3'-НТО), что вероятно связано с GR-опосредованным снижением экспрессии miR-18a-5p [297].

PXR способен взаимодействовать с широким спектром лигандов, среди которых есть как эндобиотики, такие как желчные кислоты и их предшественники, прогестерон, прегненолон, 17-гидроксипрегненолон, холестерин и его метаболиты и литохолевая кислота, а также широкий спектр ксенобиотиков: рифампицин, гиперфорин, дексаметазон [257, 311, 320, 337].

### 1.2.5. Фарнезоидный X рецептор

Первоначально FXR был идентифицирован как ядерный рецептор, активируемый метаболитами фарнезола (ациклический сесквитерпеновый спирт) [163]. Более поздние исследования показали, что FXR в первую очередь является рецептором желчных кислот [162, 203]. FXR активируется специфическими метаболитами желчных кислот, включая хенодезоксихолевую кислоту, холевую кислоту, дезоксихолевую кислоту и литохолевую кислоту, также их глициновые и таурин-конъюгированные метаболиты [113, 306].

У млекопитающих выделяют две изоформы FXR – FXRa и FXRb [132]. FXRb – это псевдоген у людей и приматов, но кодирует функциональный рецептор у других видов. FXR кодируется геном *NR1H4* [323].

FXR имеет классическую организацию ядерного рецептора (NR): лиганд-

независимый домен транскрипционной активации (AF1), основной ДНК-связывающий домен (DBD), шарнирная область, С-концевой лиганд-связывающий домен (LBD) и лиганд-зависимый домен функции активации (AF2) [127, 331].

FXR регулирует метаболизм желчных кислот, углеводов и липидов [5, 39, 131].

После активации FXR связывается гетеродимерно с рецептором ретиноевой кислоты X (RXR) и индуцирует экспрессию гена малого гетеродимерного партнера (англ.: small heterodimeric partner, SHP), что приводит к транскрипционной репрессии ферментов, участвующих в синтезе холестерина – 7 $\alpha$ -монооксигеназы (CYP7A1) и гомолога рецептора печени 1 (англ.: homologue of the liver receptor, LRH-1) [125]. FXR также ингибирует экспрессию CYP7A1 и стерол-12 $\alpha$ -гидроксилазы (CYP8B1) через путь рецептора фактора роста фибробластов 4 (англ.: fibroblast growth factor receptor, FGFR4) в гепатоцитах [75, 149, 168].

Пути FXR/SHP и FXR/FGF19/FGFR4 представляют собой основные отрицательные регуляторы синтеза желчных кислот. FXR ингибирует полипептид котранспорта таурохолата натрия (англ.: Na<sup>+</sup>-Taurocholate Cotransporting Polypeptide, NTCP) через SHP-зависимый механизм, тем самым подавляя поглощение желчных кислот печенью [196]. FXR повышает экспрессию гена эффлюксного переносчика желчных солей (англ.: bile salt export pump, BSEP) и белка множественной лекарственной устойчивости-3 (англ.: multidrug resistance protein 1, MDR3) и увеличивает отток желчных кислот из печени в просвет канальцев [42, 43, 166]. FXR также увеличивает экспрессию транспортера органических растворенных веществ альфа/бета (OSTa/b), который увеличивает отток желчных кислот из печени в воротную вену [152, 240]. Кроме того, FXR регулирует ключевые ферменты, участвующие в конъюгации и детоксикации желчных кислот [166]. Подводя итог, можно сказать, что FXR тесно связан с метаболическими процессами синтеза, транспорта и реабсорбции желчных кислот [114, 130]. Снижение функции FXR из-за мутаций NR1H4 (p.R176\*, Tyr139\_Asn140insLys) вызывает тяжелый прогрессирующий семейный внутрипеченочный холестаз с низкой активностью гамма-глутамилтрансферазы

[217]. Как в экстра-, так и в интрапеченочных моделях холестаза активация FXR приводит к уменьшению холестаза для защиты печени от высокой цитотоксичности желчных кислот [175].

У людей можно выделить два основных семейства желчных кислот. Первичные желчные кислоты, холевая кислота (ХК) и хенодезоксихолевая кислота (ХДХК), вырабатываются из холестерина [13]. Вторичные желчные кислоты, литохолевая кислота (ЛХК) и дезоксихолевая кислота (ДХК) вырабатываются из ХК и ХДХК соответственно [74]. Эффективность желчных кислот в активации FXR ранжируется следующим образом: ХДХК > ДХК > ЛХК > ХК [113]. Желчные кислоты могут функционировать как сигнальные молекулы для регулирования собственного синтеза и влиять на различные биологические и патофизиологические процессы, такие как регенерация печени, проапоптотические и провоспалительные функции [210, 243].

Учитывая потенциал лигандов FXR как эффективного подхода к лечению заболеваний печени, связанных с желчными кислотами, в настоящее время разрабатывается большое количество синтетических агонистов FXR для таких заболеваний печени, как неалкогольный стеатогепатит и первичный билиарный холангит [110]. Синтетические агонисты FXR включают стероидные и нестероидные лиганды [94, 124].

Антагонисты FXR оказались полезными в животных моделях холестаза и гиперхолестеринемии, а также при раке поджелудочной железы и толстой кишки [139, 249]. Антагонисты FXR могут использоваться для лечения диабета 2 типа или других метаболических заболеваний [78].

А и b-мурихолевые кислоты (англ.: muricholic acid, MCA), образующиеся в печени из хенодезоксихолевой кислоты, являются первичными желчными кислотами и антагонистами FXR [141]. Повышенный уровень тауро-b-MCA ингибирует экспрессию FGF15 и синтез церамидов FXR [215]. Gly-MCA является потенциальным кандидатом для лечения метаболических заболеваний благодаря его селективному ингибированию FXR кишечника, а не FXR печени [172]. Гуггулстерон является первым примером неселективного естественного

антагониста FXR [53]. Гутгулстерон снижал активацию FXR, вызванную ХДХК, со значениями полумаксимальной ингибирующей концентрации (англ.: half maximal inhibitory concentration, IC50) 15–17 мМ [138]. Гутгулстерон когда-то считался потенциально эффективным средством лечения для пациентов с генотипом 1 вируса гепатита С, которые плохо реагировали на терапию первой линии (NCT01492998) [115].

### 1.2.6. Печеночный X рецептор

LXR, впервые извлеченный из печени Willy P.J. et al., 1995, изначально был идентифицирован как орфанный рецептор [197]. В 1996 году Janowski В.А. было высказано предположение, что оксистеролы, монооксигенированные производные холестерина являются субстратами LXR [193, 235].

Изоформа LXR $\alpha$  (также известный как NR1H3) была открыта двумя отдельными группами [69, 197], в то время как другие группы ученых идентифицировали LXR $\beta$  (также известный как NR1H2) [219, 273].

LXR $\alpha$  и LXR $\beta$  расположены на коротком 11 (11p11.2) и длинном плече (19q13.3) хромосомы 19 соответственно [193].

Человеческие LXR $\alpha$  и LXR $\beta$  состоят из 447 и 460 аминокислот соответственно [235]. Эти два LXR нельзя формально считать истинными изоформами, поскольку они кодируются двумя разными генами, и имеют более 78% гомологии последовательностей в их полноразмерных ДНК и лиганд-связывающих доменах [226].

Распределение LXR $\alpha$  и LXR $\beta$  в тканях чрезвычайно различно. LXR $\alpha$  наиболее сильно представлен в макрофагах, а также в ткани печени, жировой ткани, почках и надпочечниках, в то время как LXR $\beta$  экспрессируется повсеместно, что предполагает различные механизмы регуляции физиологических функций этих двух рецепторов [48, 318]. Многочисленные исследования продемонстрировали, что LXR являются ключевыми сенсорами внутриклеточных уровней холестерина, которые запускают ряд адаптивных механизмов в ответ на перегрузку

холестерином [179, 267].

Кроме того, вклад LXR $\alpha$  и LXR $\beta$  в регуляцию липидного обмена также различен. Было показано, что LXR $\alpha$  вносит более высокий вклад в регуляцию транспорта холестерина, что может замедлять образование пенистых клеток и развитие атеросклероза, тогда как LXR $\beta$  играет важную роль в жировом обмене [192, 208]. Однако механизмы, которые контролируют экспрессию и функцию этих двух изоформ, до сих пор неясны.

Следовательно, LXR $\alpha$ , по-видимому, играет центральную роль в поддержании гомеостаза холестерина в печени. LXR $\beta$ , в то же время, участвует в регуляции жирового обмена, в частности, связанного с сопротивлением набору веса, поскольку масса тела и количество перигонадного жира у мышей LXR $\beta$ <sup>-/-</sup> ниже, чем у мышей дикого типа на той же диете [199].

Более того, ряд исследований выявил важную роль LXR в модуляции воспаления путем регулирования экспрессии различных воспалительных генов в макрофагах [201, 222].

Функционирование LXR основано на их гетеродимеризации с другими членами семейства ядерных рецепторов, в частности с ретиноидным X рецептором (RXR). Промоторы некоторых генов имеют специфические последовательности ДНК, которые связываются с LXR, называемые элементами ответа LXR (англ.: response elements LXR, LXRE) [69]. Активированные LXR связываются с LXRE, расположенными в регуляторных областях целевых генов, и модулируют их транскрипцию. Когда димер LXR-RXR не связывается с лигандом, он связывается с промоторной областью целевых генов и взаимодействует с сосуществующими факторами, такими как ядерный рецепторный корепрессор (англ.: nuclear receptor corepressor, NcoR)/медиатор подавления ретиноевой кислоты и тиреоидного рецептора (англ.: mediator of retinoic acid and thyroid receptor suppression, SMRT), тем самым ингибируя транскрипцию и активацию целевых генов. Однако, как только LXR активируются своими лигандами, корепрессор диссоциирует, и коактиватор ядерного рецептора привлекается к промоторам, что приводит к транскрипционной активации целевых генов.

LXR считаются сенсорами гомеостаза холестерина. Транскрипционная активность LXR индуцируется повышенным уровнем холестерина. Активация LXR способствует оттоку холестерина в макрофагах, тем самым поддерживая баланс внутриклеточного метаболизма холестерина. Удаление холестерина из тканей, периферических по отношению к печени, с последующей секрецией желчью и последующим удалением через фекалии — это процесс, известный как обратный транспорт холестерина. LXR регулирует обратный транспорт холестерина в основном путем изменения экспрессии членов суперсемейства мембранных транспортеров, а именно ABCA1, ABCG1, ABCG5 и ABCG8; аполипопротеинов внеклеточных рецепторов холестерина, включая ApoE. ABCA1 и ABCG1 являются интегральными мембранными транспортерами и играют важную роль в генерации зарождающихся липопротеинов высокой плотности (ЛПВП) и гомеостазе холестерина. LXR $\alpha$  является основным транскрипционным регулятором ABCA1 и ABCG1 в макрофагах, который в основном ограничивает накопление холестерина в макрофагах и других периферических клетках за счет увеличения экспрессии ABCA1 и ABCG1 [338].

LXR также являются критически важными регуляторами экспрессии ApoE. Уровень ApoE в макрофагах и адипоцитах регулируется LXR, что демонстрирует, что активация LXR ApoE является тканеспецифичной [200].

LXR $\alpha$  является основной изоформой, которая регулирует гомеостаз холестерина. Подавление LXR $\beta$  не влияет на экспрессию целевых генов LXR, таких как ABCA1 и ABCG1. Когда LXR $\alpha$  не активен, LXR $\beta$  не может поддерживать максимальный уровень оттока холестерина в первичных макрофагах человека. Hong C. et al. (2012) доказали, что удаление LXR $\alpha$ , но не LXR $\beta$ , может привести к заметному увеличению накопления периферического холестерина, иллюстрируя, что LXR $\alpha$  необходим для максимального обратного транспорта холестерина у мышей с нокаутом ApoE [198].

Помимо связывания лиганда, активность LXR регулируется посттрансляционной модификацией. Посттрансляционная модификация является механизмом, с помощью которого модулируется активность и функция ядерных

рецепторов. Модификация белка LXR $\alpha$  оказывает важное влияние на его активность и функцию, поэтому понимание посттрансляционной модификации LXR $\alpha$ , несомненно, имеет большое значение для применения LXR $\alpha$  в таргетной терапии [84].

### 1.3. Влияние половых гормонов на изучаемые белки-транспортеры и усыновленные рецепторы

#### 1.3.1. Влияние половых гормонов на Р-гликопротеин

В ряде исследований были оценены половые различия и влияние половых гормонов на количество белка, экспрессию гена и активность Pgp [ли].

Уровень Pgp в почках мышей показал примерно в 1,5 раза более высокий уровень у самок, чем у самцов [180].

На мышах линии C57BL/6 выявлено, что ген *mdr1b* имеет более высокую экспрессию у самок, чем у самцов, в то время как в мозге экспрессия была выше у самцов. Кроме того, экспрессия гена *mdr1a* в почках была выше у самок по сравнению с самцами мышей [96].

В барьере между кровью и спинномозговой жидкостью гены *mdr1a* и *mdr1b* не показали различий в экспрессии между самцами и самками крыс, и их экспрессия не зависела от женских или мужских половых гормонов [68, 278].

У беременных самок мышей C75BL, которым в течение 4 дней вводили 17 $\alpha$ -этинилэстрадиол (агонист рецепторов эстрогена) было выявлено увеличение мРНК *mdr1a* и белка Pgp в плаценте. С другой стороны, 17 $\alpha$ -этинилэстрадиол не показывал существенного влияния на экспрессию гена *mdr1b* в плаценте. Введение 17 $\alpha$ -этинилэстрадиола также снизило транспорт дигоксина – субстрата Pgp от матери к плоду [301].

В почках 17 $\beta$ -эстрадиол повышал экспрессию гена *mdr1b* и уровень белка Pgp в культурах почечной ткани мышей [180]. Кроме того, Cui et al. показали, что после гонадэктомии экспрессия гена *mdr1a* увеличивалась у самцов и снижалась у самок мышей [96].

В клеточных линиях NCI-ADR-RES и плацентарных JAR эстрадиол дозозависимо приводил к повышению уровня белка Pgp. В том же исследовании было показано, что эстрадиол снижал поглощение саквинавира-субстрата Pgp в клеточной линии JAR. Этот эффект блокировался верапамилом, ингибитором Pgp [92]. В человеческих цитотрофобластах эстрадиол повышал экспрессию белка Pgp и уровень его мРНК. Эстрадиол также вызывал снижение внутриклеточного накопления дигоксина [120].

Кроме того, эстрадиол в клетках аденокарциномы толстой кишки LS-180 приводил к повышению экспрессии гена *MDR1* и увеличивал активность Pgp, оцениваемую по эффлюксу родамина 123 [58].

В человеческих эпителиальных клетках проксимальных почечных канальцев эстрадиол повышал экспрессию мРНК, белка Pgp и активность транспортера [180].

При изучении механизмов влияния эстрадиола на *MDR1* было высказано предположение, что оно может осуществляться через оба ядерных рецептора эстрогена (англ.: the estrogen receptor, ER). В клетках Caco-2, которые экспрессируют только ER $\beta$  [230], введение 17 $\alpha$ -этинилэстрадиола увеличивает экспрессию мРНК и белка Pgp, а также его активность. Предварительная обработка клеток Caco-2 антагонистом рецептора эстрогена – ICI, предотвращала повышение экспрессии *MDR1*, вызванное 17 $\alpha$ -этинилэстрадиолом [27, 29, 259].

Другое исследование с четырьмя линиями клеток рака молочной железы, двумя ER $\alpha$ + положительными (MCF-7 и T47-D) и двумя ER – отрицательными (MDA-MB-231 и NCI/ADR-RES), показало, что эстрадиол снижает уровень белка Pgp в ER $\alpha$ -положительных клеточных линиях [118].

При обработке эндотелиальных клеток микрососудов человеческого мозга 5 $\alpha$ -андростан-3 $\beta$ ,17 $\beta$ -дионом, продемонстрировано снижение уровня Pgp. Тем не менее, предварительная обработка ICI предотвращала эффект 5 $\alpha$ -андростан-3 $\beta$ ,17 $\beta$ -диола [299]. 5 $\alpha$ -андростан-3 $\beta$ ,17 $\beta$ -диол является метаболитом андрогена, который является полным агонистом ER $\beta$  и связывается с ER $\alpha$  с низким сродством. В гематоэнцефалическом барьере ER $\beta$  экспрессируется в большей степени, чем ER $\alpha$  [164]. Таким образом, ER $\beta$  может быть способен модулировать экспрессию

*MDR1* в гематоэнцефалическом барьере.

В клетках Caco-2 эстрадиол активировал ER $\beta$  и повышал экспрессию *MDR1*, в отличие от снижения экспрессии, наблюдаемого в клетках линии hBMES.

Возможное объяснение выявленных отличий может заключаться в различных взаимодействиях ER $\beta$  с другими факторами транскрипции и в привлечении ER $\beta$  различных корегуляторов хроматина в этих двух типах клеток, что подчеркивает гипотезу о тканезависимой регуляции эстрогенами.

В клеточной линии JAR прогестерон снижал поглощение саквинавира – субстрата Pgp, а верапамил блокировал данный эффект [92].

В ряде исследований изучалось влияние тестостерона на Pgp. Было показано, что тестостерон не изменяет уровень белка Pgp в культурах почечной ткани мышей и в эпителиальных клетках проксимальных канальцев почек человека [180].

В эксперименте на роговицах новозеландских кроликов было обнаружено, что тестостерон в концентрациях 100 и 150 мкМ не влиял на опосредованный Pgp транспорт эритромицина через роговицу, однако в концентрациях 250 и 500 мкМ ингибировал активность белка-транспортера, при этом IC<sub>50</sub> составила 241±27,6 мкМ [101].

В эксперименте на культуре клеток 2780AD (карцинома яичника человека, вариант резистентный к лекарственной терапии) установлено, что тестостерон в концентрациях 50-150 мкМ ингибировал активность Pgp, оцениваемую по эффлюксу субстрата белка-транспортера – даунорубицина [327].

В исследовании на линии клеток, резистентных к винбластину (англ.: Vinca alkaloid, VBL, VBL-резистентных клеточных линий, J7.V1-1), выявлено, что тестостерон в концентрации 50 мкМ уменьшал содержание белка-транспортера в мембранах микросом на 45% [51].

Гонадэктомия самцов мышей увеличивала экспрессию генов *mdr1a* и *mdr1b* в почках, а последующая гормональная терапия дигидротестостероном возвращала уровни экспрессии *mdr1a* и *mdr1b*, наблюдаемым у контрольных мышей [96].

### 1.3.2. Влияние половых гормонов на белок резистентности рака молочной железы

В ряде работ выявлены половые различия в количестве и активности BCRP в некоторых тканях. Например, экспрессия гена *Abcg2*, кодирующего Bcrp, в гардеровой железе (железе мигательной перепонки) выше у самок по сравнению с самцами хомяков [121]. Экспрессия гена *ABCG2* в желудочно-кишечном тракте человека одинакова у мужчин и женщин [248]. Кроме того, установлены половые различия в мозге крысы и печени мыши. В мозге крысы экспрессия мРНК *Abcg2* выше у самок по сравнению с самцами. Напротив, в печени мыши экспрессия *Abcg2* (мРНК) выше у самцов [316]. Это указывает на возможную регуляцию BCRP половыми гормонами.

Обработка клеток MCF-7, трансфицированных плазмидой, содержащей ген *ABCG2*, эстрадиолом повысила экспрессию мРНК и белка BCRP. Тамоксифен, антиэстрогенное соединение, подавлял индукцию, вызванную эстрадиолом. Анализы сдвига электрофоретической подвижности, проведенные с ядерными экстрактами клеток MCF-7, которые содержат эстрогеновый рецептор (англ.: estrogen receptor, ER) (ER $\alpha$ -положительные), параллельно с ядерными экстрактами MDA-MB-231 ER $\alpha$ -отрицательных клеток, выявили сдвиг полосы, возникающий в результате связывания ER $\alpha$  с зондом, содержащим промотор гена, не наблюдаемый в клетках MDA-MB-231 [2, 57].

Обработка эстрадиолом клеток MCF-7 снижала уровень белка BCRP. Напротив, в клетках A549 (не содержащих рецепторов эстрогена) эстрадиол не оказывал существенного влияния на данный показатель [117]. Эти противоречивые эффекты на регуляцию BCRP на клетках MCF-7 могут быть связаны с различной продолжительностью воздействия эстрадиолом.

Кроме того, в исследовании, где ER $\alpha$ -отрицательная линия клеток человека MDA-MB-453 была трансфицирована плазмидами, содержащими гены *ABCG2* и *ER $\beta$* , обработка эстрадиолом повысила экспрессию мРНК и белка BCRP. Тамоксифен подавлял эффекты, вызванные эстрадиолом. В том же исследовании

эстрадиол также повысил экспрессию мРНК и белка BCRP в клетках MVA-MV-468. Также, в этой клеточной линии подавление гена *Erb* предотвратило повышение уровня BCRP (мРНК и белка), вызванное эстрадиолом [146, 189].

Обработка клеток человеческой плаценты BeWo эстриолом увеличила экспрессию мРНК и белка BCRP, а ICI - антагонист рецептора эстрогена блокировал эти эффекты [329]. Показано, что эстриол имеет более высокое сродство к ER $\beta$ , чем к ER $\alpha$  [139]. В другом исследовании выявлено, что обработка клеток BeWo эстрадиолом подавила экспрессию белка BCRP, а ICI блокировал данный эффект. Более того, в том же исследовании было показано, что эстрадиол в клетках BeWo подавлял ген *Erb* и не влияет на экспрессию гена *Era* [256].

Обработка клеток T47D, трансфицированных репортерной плазмидой, содержащей ген люциферазы под промотором гена *BCRP*, прогестероном увеличила флуоресценцию люциферазы. RU486, антагонист прогестероновых рецепторов, блокировал эффекты, вызванные прогестероном. Кроме того, обработка прогестероном в присутствии мифрамицина А, блокатора Sp1, не оказала существенного влияния на флуоресценцию люциферазы [264]. Выявленная совместная иммунопреципитация Sp1 и прогестеронового рецептора (англ.: progesterone receptor, PR), указывает на взаимодействие между двумя белками [247, 260].

Полученные данные свидетельствуют о том, что в клетках T47D прогестероновый рецептор регулирует экспрессию гена *Abcg2* через косвенный геномный сигнальный механизм. Прогестероновый рецептор взаимодействует с промотором гена *Abcg2* путем связывания с фактором транскрипции Sp1. Обработка клеток BeWo прогестероном увеличила экспрессию белка BCRP, но RU486 не устранил эффект, вызванный прогестероном [135, 256]. Это предполагает передачу сигнала через мембранный прогестероновый рецептор и подчеркивает гипотезу о тканезависимой регуляции BCRP прогестероном.

В клеточной линии BeWo обработка прогестероном снизила экспрессию гена *BCRP* [122]. Но, в то же время, в другом исследовании, обработка клеток BeWo как прогестероном, так и эстрадиолом вызвала повышение экспрессии белка BCRP

выше, чем при использовании только прогестерона. ICI и RU486 подавляли эффекты, вызванные обоими половыми стероидными гормонами [256].

Обработка изолированных мозговых капилляров самок и самцов крыс эстрадиолом снизила уровни экспрессии BCRP (мРНК и белка) [147].

В исследовании *in vivo*, при введении эстрадиола мышам, показано снижение уровня белка BCRP в мозговых капиллярах [147].

Капилляры мозга крыс, обработанные эстрадиолом инкубировали с BODIPY-празозином, субстратом BCRP, и флуоресценцию просвета измеряли с помощью конфокальной микроскопии. Обработка эстрадиолом снижала активность BCRP в капиллярах мозга крысы [147].

Аналогичные результаты были получены при обработке эндотелиальных клеток мозга крысы  $17\alpha$ -этинилэстрадиолом [220]. Обработка эстрадиолом капилляров мозга, выделенных от мышей ER $\alpha$ КО, показала, что эстрадиол снизил экспрессию и активность белка BCRP. Однако та же обработка эстрадиолом не показала значительных эффектов на экспрессию и активность белка BCRP в капиллярах мозга, выделенных от мышей ER $\beta$ КО [147, 148]. Капилляры мозга крысы также инкубировали с селективными агонистами ER $\alpha$  и ER $\beta$ , пропилипиразолтриолом (англ.: propylpyrazoltriol, PPT) и диарилпропионитрилом (англ.: diarylpropionitrile, DNP) соответственно. DNP снизил уровень белка BCRP и активность в капиллярах мозга, в то время как PPT не оказал значительного влияния на уровень белка BCRP или его активность. Капилляры мозга крыс также обрабатывались антагонистом ER $\alpha$  MPP или ICI. MPP не влиял на подавление активности BCRP, вызванное эстрадиолом, в то время как ICI предотвращал подавление экспрессии и активности белка BCRP в капиллярах мозга крыс при обработке эстрадиолом.

Данные о регуляции BCRP эстрогенами и прогестероном предполагают тканезависимую регуляцию BCRP этими двумя гормонами.

В линии клеток рака молочной железы человека MCF-7 лечение дегидротестостероном снизило уровни экспрессии гена ABCG2 [65].

У грызунов гонадэктомия самцов хомяков увеличила экспрессию гена *Abcg2*

в гардеровой железе [121]. Кроме того, гонадэктомия у самцов мышей не оказала никакого влияния на экспрессию *Abcg2* в почках, но снизила экспрессию *Abcg2* в печени самцов мышей. Введение дегидротестостерона увеличило экспрессию гена *Abcg2* в печени гонадэктомированных мышей-самцов. Что касается самок мышей, гонадэктомия увеличила экспрессию *Abcg2* в почках, а введение дегидротестостерона увеличило экспрессию гена *Abcg2* в печени овариэктомированных мышей-самок [316].

### 1.3.3. Влияние половых гормонов на OATP1B1/ OATP1B3

Влияние половых гормонов на OATP1B1/ OATP1B3 в доступной литературе обнаружить не удалось. Единичные исследования оценивали половые различия в активности и экспрессии, а также влияние половых гормонов на другие транспортеры суперсемейства SLC.

Например, показано, что в почках экспрессия OATP1 (OATP1A2) стимулируется тестостероном и слабо ингибируется эстрогеном. Это объясняет гендерные различия в экскреции с мочой глюкуронидированных стероидов в качестве субстратов OATP1 [262].

В печени самцов мышей преобладает *Oatp1a1*, а у самок выше экспрессия *Oatp1a4*. В почках у самок преобладают *Oatp1a1* и *Oatp3a1* [112].

Экспрессия генов *SLC3A1* в печени в 2,35 раза, а *SLC10A1* в 1,48 раза выше у женщин, а *SLC13A1* в 1,57 раза выше у мужчин [277].

### 1.3.4. Влияние половых гормонов на конститутивный андростановый рецептор

CAR важен для половых различий в экспрессии генов *CYP2b*, которые более высоко экспрессированы и более активны у женщин, чем у мужчин [161]. Самцы, по-видимому, менее чувствительны, чем самки к активаторам CAR. Например, нонилфенол индуцирует целевые гены CAR *cyp2b10*, *cyp2c29* и *cyp3a11* только у самок [279]. Транскрипционная активность CAR у самцов, по-видимому, частично

нейтрализуется относительно высокими физиологическими уровнями андрогенов. Например, мощный лиганд CAR ТСРОВОР вызвал выраженную пролиферацию гепатоцитов у самок, но в меньшей степени у самцов мышей [276].

В опытах *in vitro* на клеточной линии гепатоцеллюлярной карциномы человека HepG2 установлено, что  $17\beta$ -эстрадиол и эстрон в концентрации 10 мкМ активировали экспрессию CAR [181].

На линии клеток гепатоцеллюлярной карциномы человека HepG2, трансфицированных экспрессионной плазмидой mCAR и показывающих высокую конститутивную экспрессию mCAR с активацией энхансерного элемента NR1, выявлено, что эстрадиол повышал экспрессию CAR, а тестостерон и прогестерон ее подавляли [181].

### 1.3.5. Влияние половых гормонов на прегнан X рецептор

Активация PXR прегненолон- $16\alpha$ -карбонитрилом индуцировала специфичную для самок мРНК *сур3а44* у самцов мышей, а у самок индукция не была обнаружена [134]. Однако у мышей PXR-CAR с двойным нулевым уровнем введение литохолевой кислоты вызывало выраженный холестаза у самцов, но не у самок. Более того, он был связан с подавлением транспортеров желчных кислот в печени самцов [244].

В эксперименте на клетках CV-1, трансфицированных транскрипционным фактором PXR, выявлено, что прогестерон в концентрациях  $10^{-7}$ - $10^{-4}$  М стимулировал экспрессию PXR [66].

На клетках CV-1, котрансфицированных репортерным геном tk(MH100)4-luc и химерным рецептором, состоящим из ДНК-связывающего домена GAL4 и домена связывания PXR-лиганда, было показано, что эстрадиол, прогестерон и дигидротестостерон активируют PXR [293].

### 1.3.6. Влияние половых гормонов на фарнезоидный X рецептор

Wang S. et al., 2006 идентифицировали андростерон как новый естественный

лиганд FXR [256].

Андростерон – стероидный гормон без известной биологической активности. Он является основным продуктом распада тестостерона, и его концентрация в кровотоке отражает синтез мужских стероидных гормонов [62]. Андростерон, по-видимому, не имеет сродства к андрогеновым рецепторам и, следовательно, не модулирует биологическую активность этого рецептора. Однако метаболиты андрогенов, такие как андростерон, могут иметь биологическую активность посредством связывания с другими ядерными рецепторами, как показано для FXR.

Таким образом, эти наблюдения предполагают биологическую роль андростерона посредством активации FXR либо на репродуктивные функции, либо на метаболические пути, регулируемые FXR. Андростерон может активировать FXR в органах, которые одновременно вырабатывают тестостерон и экспрессируют FXR, но также и в других тканях, поскольку концентрация неконъюгированного андростерона в плазме достигает 0,5–1,5 нМ у мужчин [333].

Помимо этого, на мышцах C57BL6 было показано, что 3 $\beta$ -сульфатированный метаболит прогестерона эпиаллопрегнанолон сульфат, предотвращал индукцию FXR вызванную холевой кислотой, что свидетельствует об ингибировании FXR под действием метаболита гестагена [174].

Liu X. et al, 2018 выдвинули гипотезу, что FXR, вероятно, является регулятором метаболизма эстрогена в печени. В клиническом исследовании повышенные уровни эстрогена были отмечены у пациентов с более высокими уровнями желчных кислот, особенно у пациентов с холестазом. Интересно, что в моделях мышей с перевязанными желчными протоками уровни эстрогена были аналогичным образом повышены, а делеция FXR привела к более низким уровням эстрадиола [331].

### **1.3.7. Влияние половых гормонов на печеночный X рецептор $\alpha$**

На крысах Sprague-Dawley было установлено, что после овариэктомии уровень LXR $\alpha$  значительно снижался, а введение эстрадиола увеличивало уровень

данного рецептора в печени [302].

На моноцитах человека, дифференцированных в макрофаги (клеточная линия THP-1), было показано, что тестостерон (1–10 нМ, 24–72 ч) увеличивал экспрессию гена и количества белка LXR $\alpha$  [184].

В единичных исследованиях были оценены половые особенности функционирования LXR. Когда самцов и самок мышей с двойным нокаутом LXR $\alpha\beta$ <sup>-/-</sup> подвергали воздействию высокожирной диеты, была выявлена схожая резистентность при развитии ожирения [274], что указывает на одинаковое функционирование LXR у обоих полов. Однако активация LXR $\alpha$  увеличивала выведение желчных кислот с мочой у самок, что, по-видимому, придавало специфическую для самок резистентность к гепатотоксичности, вызванной литохолевой кислотой, и холестазу, вызванному перевязкой желчных протоков. Эти эффекты не были заметны у самцов [60].

Интересно, что прогрессирующее возрастное ухудшение фертильности наблюдается как у самок, так и у самцов мышей с нокаутом LXR. Экспериментальные исследования показывают, что натуральные или синтетические агонисты LXR также могут эффективно лечить некоторые репродуктивные патологии, такие как бесплодие, нарушение сократимости матки, гормонозависимые виды рака и резистентность к инсулину. Побочные эффекты агонистов LXR включают нарушение инвазии трофобласта, чрезмерный трансплацентарный транспорт холестерина от матери к плоду, приводящий к гиперхолестеринемии плода, и усиление дефицита эстрогена после менопаузы [73, 142].

### 1.3.8. Заключение по обзору литературы

Белки-транспортёры Pgp, BCRP, OATP1B1/OATP1B3 играют важную роль в трансмембранном переносе как эндогенных, так и экзогенных веществ, в том числе и лекарственных препаратов. Различные факторы и вещества могут влиять на их активность, что может изменять транспорт их субстратов, и как следствие

воздействовать на биохимические процессы в организме. Поэтому, механизмы регуляции белков-транспортеров Pgp, BCRP, OATP1B1/OATP1B3 активно изучаются в настоящее время.

При оценке влияния половых гормонов на функционирование Pgp были получены противоречивые результаты. В большинстве из них выявлено индуцирующее действие эстрадиола и ингибирующее действие тестостерона. Роль усыновленных рецепторов CAR, PXR, FXR и LXR $\alpha$  в данном процессе не анализировалась. При изучении влияния половых гормонов на функционирование BCRP были получены противоречивые результаты, которые сильно зависели от типа ткани, а роль усыновленных рецепторов CAR, PXR, FXR и LXR $\alpha$  в данном процессе также не оценивалась. Влияние половых гормонов на функционирование OATP1B1/ OATP1B3, как и роль усыновленных рецепторов CAR, PXR, FXR и LXR $\alpha$  в данном процессе на настоящий момент не исследовалась.

Все вышеперечисленное обуславливает актуальность выполнения диссертационного исследования (Рисунок 4).

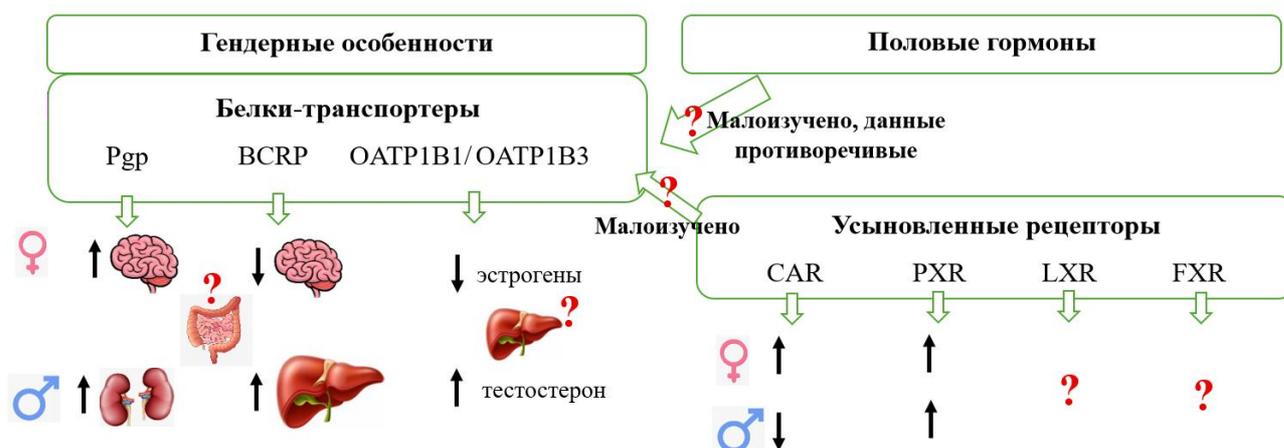


Рисунок 4 – Гендерные различия в регуляции белков-транспортеров и усыновленных рецепторов: перспективы изучения

## ГЛАВА II. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

### 2.1. Объект экспериментальных исследований

Исследование выполнено на линии клеток аденокарциномы ободочной кишки человека Caco-2 и линии клеток HepG2 (гепатоцеллюлярная карцинома человека), которые были получены из коллекции клеточных линий ФГБУН ИНЦ РАН (Санкт-Петербург).

Линия клеток Caco-2 широко используется для изучения функционирования и механизмов регуляции белков-транспортеров Pgp и BCRP [327], а линия клеток HepG2 – для изучения функционирования и механизмов регуляции транспортеров OATP1B1/OATP1B3 [80].

### 2.2. Культивирование клеток

Клетки линий Caco-2 и HepG2 культивировали при 37<sup>0</sup>C и 5% содержании CO<sub>2</sub> в Дульбекко модифицированной среде Игла (англ.: Dulbecco's Modified Eagle Medium, DMEM) с высоким содержанием глюкозы (4500 мг/л) («Sigma-Aldrich», Германия), содержащей L-глутамин (4 мМ) («Sigma-Aldrich», Германия), 15% эмбриональной бычьей сыворотки («Sigma-Aldrich», Германия), 100 ЕД/мл и 100 мкг/мл пенициллина и стрептомицина («Sigma-Aldrich», Германия) соответственно. После достижения 70-90% конфлюентности клетки снимали с фласка добавлением раствора трипсин-ЭДТА (0,25% трипсина и 0,2% ЭДТА, «Sigma-Aldrich», Германия) и высеивали в 24-луночные или 6-луночные планшеты («Corning», США) [17, 22].

Клетки Caco-2 культивировали в течение 21 сут, когда происходит их спонтанная дифференцировка в поляризованные энтероцитоподобные клетки, гиперэкспрессирующие Pgp и BCRP [154]. Клетки линии HepG2 использовали в экспериментах при достижении монослоя.

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

### 2.3. Дизайн исследования

В ходе исследования были сформированы следующие группы (Рисунок 5):

*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-транспортёры);

*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 Pgp, BCRP, OATP1B1, OATP1B3.

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

*Пятая группа* – изучение способности эстрадиола, прогестерона и тестостерона активировать CAR, PXR, FXR, LXRa.

*Шестая группа* – изучение роли CAR, PXR, FXR, LXRa во влиянии эстрадиола, прогестерона и тестостерона на относительное количество Pgp, BCRP, OATP1B1, OATP1B3.



Рисунок 5 – Дизайн исследования

### **2.3.1. 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) к клеткам добавляли гормоны в концентрациях 1 нМ, 10 нМ, 100 нМ, 1 мкМ, 10 мкМ, 100 мкМ: эстрадиол / прогестерон / тестостерон («Sigma Aldrich», США) 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 транспортёров (Pgr и BCRP – эффлюксные; OATP1B1/OATP1B3 – инфлюксные) и достаточна для того, чтобы молекула тестируемого вещества могла соединиться с транспортёром и изменить его активность [207]. В качестве классических ингибиторов транспортёров (для подтверждения адекватности методики) использовали кетоконазол – ингибитор Pgr, кверцетин – ингибитор BCRP, рифампицин (все компоненты «Sigma Aldrich», США) – ингибитор OATP1B1/ OATP1B3. При оценке длительного влияния половых гормонов на активность транспортёров (в течение 24 ч) дополнительную преинкубацию не проводили, а сразу оценивали транспорт их субстратов.

### **2.3.2. Изучение влияния эстрадиола, прогестерона и тестостерона на экспрессию генов, кодирующих Pgr, BCRP, OATP1B1, OATP1B3 и на относительное количество изучаемых белков-транспортеров**

Клетки линии Caco-2 (при изучении Pgr и BCRP) и клетки линии HepG2 (при изучении OATP1B1/OATP1B3) культивировали в 6-луночных планшетах. При достижении монослоя (клетки линии HepG2) или при достижении монослоя и инкубации в течение 21 сут (клетки линии Caco-2) к клеткам добавляли эстрадиол (1 нМ, 10 нМ, 100 нМ, 1 мкМ, 10 мкМ, 100 мкМ), прогестерон (1 нМ, 10 нМ, 100 нМ, 1 мкМ, 10 мкМ, 100 мкМ), тестостерон (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 снимали с лунок и анализировали экспрессию генов, кодирующих Pgr, BCRP, OATP1B1, OATP1B3 методом ПЦР в реальном времени и относительное количество изучаемых белков-транспортеров методом вестерн-блот.

### **2.3.3. Изучение способности эстрадиола, прогестерона и тестостерона активировать CAR, PXR, FXR, LXR**

Клетки линии Caco-2 (при изучении Pgr и BCRP) и клетки линии HepG2 (при изучении OATP1B1/OATP1B3) культивировали в 6 луночных планшетах. При достижении монослоя (клетки линии HepG2) или при достижении монослоя и инкубации в течение 21 сут (клетки линии Caco-2) к клеткам добавляли эстрадиол (1, 10, 100 мкМ), или прогестерон (1, 10, 100 мкМ), или тестостерон (1, 10, 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 снимали с лунок и анализировали относительное количество изучаемых усыновленных рецепторов CAR, PXR, FXR, LXR в цитоплазматической и мембранной фракциях клеток

методом вестерн-блот.

#### **2.3.4. Изучение роли CAR, PXR, FXR, LXR 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. При достижении монослоя (клетки линии HepG2) или при достижении монослоя и инкубации в течение 21 сут (клетки линии Caco-2) для оценки роли усыновленных рецепторов (FXR, CAR, PXR, LXR $\alpha$ ) во влиянии половых гормонов на относительное количество изучаемых белков-транспортеров совместно с половыми гормонами к клеткам добавляли ингибитор CAR - 5-[(Диэтиламино)ацетил]-10,11-дигидро-5H-добензо[b,f]азепин-3-ил]этиловый эфир карбаминовой кислоты (CINPA 1, «Tocris», Великобритания) 10 мкМ [85], ингибитор PXR – кетоконазол 10 мкМ («Sigma Aldrich», Германия) [83], ингибитор FXR – тауро- $\beta$ -холевая кислота в концентрации 200 мкМ ( $\beta$ -ТА, «Sigma Aldrich», США) [141], ингибитор LXR $\alpha$  – 3-(3,4-Диметоксифенил)-N-[4-(трифлуорометил)фенил]-2-пропенамид, N-(4-Трифлуорометилфенил) 3,4-диметоксициннамамид (TFCA, «Sigma Aldrich», США) 30 мкМ [88]. В контрольные лунки добавляли питательную среду, содержащую этанол (растворитель тестируемых веществ) в конечной концентрации 0,0001%. После окончания инкубации клетки снимали с лунок и анализировали относительное количество изучаемых белков-транспортеров методом вестерн-блот.

#### **2.4. Определение экспрессии генов, кодирующих Pgr, BCRP, OATP1B1, OATP1B3**

Экспрессию генов *MDR1*, *ABCG2*, *SLCO1B1* и *SLCO1B3*, кодирующих Pgr, BCRP, OATP1B1, OATP1B3 соответственно в клетках Caco-2 (Pgr и BCRP,) и

НерG2 (OATP1B1 и OATP1B3) анализировали методом полимеразной цепной реакции в реальном времени. Для этого клетки культивировали в 6-луночных планшетах (Corning, США), а после воздействия тестируемых веществ в течение 24 ч во всех изучаемых дозах механически снимали с лунок скребком, трижды промывали в фосфатно-солевом буфере и центрифугировали в течение 5 мин при 3000 об/мин.

Суммарную РНК выделяли с использованием набора RNeasy Mini Kit (QIAGEN, Германия) в соответствии с инструкцией производителя.

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×) для проведения ОТ-ПЦР в реальном времени с SYBR Green I» (Биолабмикс, Россия). Обратная транскрипция проводилась при температуре 45°C, время инкубации составило 10 минут, количество циклов – 1. Этот этап необходим для синтеза цепей кДНК. 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 прямых и обратных праймеров были подобраны с помощью программы DNASTAR Lasregene, PrimerSelect (Таблица 2).

Таблица 2 – Праймеры, использованные в работе (Евроген, Россия)

<i>Для MDR1</i>	
Прямой праймер	5'-СТТСТТТГСТССТССАТТГС-3'
Обратный праймер	5'-ССГСТГТТСТГТТТСТТТАГ-3'
<i>Для ABCG2</i>	
Прямой праймер	5'-СТГТСТАСТСТТТГСТСАГСТТС-3'
Обратный праймер	5'-ГСТСАГТТААСТССТГТААГТГС-3'
<i>Для SLCO1B1</i>	
Прямой праймер	5'-GGTGAATGCCCAAGAGATGATG-3'
Обратный праймер	5'-TGGAAACCCAGTGCA AGTGATT-3'
<i>Для SLCO1B3</i>	
Прямой праймер	5'-GAAGGGTСТАСТТGGGСТТАТСТ-3'
Обратный праймер	5'-CGATGCСТТGGTATСТТТТСТТТ-3'
<i>Для GAPDH</i>	
Прямой праймер	5'-GTCCСТСТГАСТТСААСАГСГ-3'
Обратный праймер	5'-ACCACCСТГТТГСТГТАГССАА-3'

## 2.5. Определение относительного количества Pgp, BCRP, OATP1B1, OATP1B3

### 2.5.1. Получение тотальных клеточных лизатов

Клетки культивировали в 6-луночных планшетах. 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 (4-(2-аминоэтилбензенсульфонил) фторида

гидрохлорид (AEBSF) 2 мМ, апротинин 0,3 мкМ, бестатин 130 мкМ, ЭДТА 1мМ, *транс*-эпоксисукцинил-L-лейциламидо(4гуанидино)бутан (E-64) 14 мкМ, лейпептин 1 мкМ, «Sigma-Aldrich», Германия) в течение 30 минут при +4 °С и постоянном перемешивании из расчета  $10^7$  клеток на 100 мкл буфера. Полученный лизат центрифугировали при 5000 g (СМ-50, «Eppendorf», Германия). Супернатант использовали для выполнения биохимических анализов.

### 2.5.2. Проведение анализа вестерн-блот

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°С. 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 [28].

Белки на мембране блокировали 1% раствором Casein Blocker («Bio-Rad», США), содержащим 0,1% Tween-20 («Sigma», 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°С. 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).

## **2.6. Определение относительного количества CAR, PXR, FXR, LXRA в ядерной и цитоплазматической фракциях лизатов клеток**

### **2.6.1. Получение тотальных клеточных лизатов**

Клетки культивировали в 6-луночных планшетах. После окончания экспозиции клетки снимали с лунок раствором трипсин-ЭДТА (0,25% трипсина и 0,2% ЭДТА, «Sigma-Aldrich», Германия), трижды промывали раствором фосфатного буфера («BioRad», США). Выделение ядерной и цитоплазматической фракции лизата клеток осуществляли с помощью набора Protein Extraction Kit (Cytoplasmic Nuclear), («Bio-Rad», США).

### **2.6.2. Проведение анализа вестерн-блот**

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, LXRα проводили с использованием первичных кроличьих поликлональных 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, LXRα оценивали относительно содержания белка домашнего хозяйства глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназы (GAPDH).

## 2.7. Определение активности Pgp и BCRP

Функциональную активность Pgp или BCRP анализировали по оценке накопления внутри клеток Caco-2 их маркерных субстратов фексофенадина или сульфасалазина соответственно. Количественный анализ веществ в лизате клеток выполняли с применением разработанной и валидированной методики ВЭЖХ-МС/МС [31].

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 ДМСО 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).

Для подтверждения адекватности транспортной модели использовали классические ингибиторы для Pgp – кетоконазол, для BCRP – кверцетин в концентрациях 1, 10, 100 нМ и 1, 10, 100 мкМ.

## 2.8. Определение активности OATP1B1/OATP1B3

Активность OATP1B1/OATP1B3 оценивали по проникновению в клетки субстрата транспортеров – аторвастатина («Sigma-Aldrich», Германия) в концентрации 1 мкМ в транспортной среде (раствор Хэнкса («ПанЭко», Россия), забуференной 25 mM HEPES при pH 7,4 («Sigma-Aldrich», Германия) с содержанием 1% ДМСО («ПанЭко», Россия)) [30].

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

Адекватность транспортной модели подтверждали использованием классического ингибитора OATP1B1/B3 – рифампицина в концентрациях 1, 10, 100 нМ и 1, 10, 100 мкМ.

## 2.9. Определение концентрации фексофенадина в лизате клеток

Концентрацию фексофенадина в лизате клеток анализировали методом ВЭЖХ-МС/МС на высокоэффективном жидкостном хроматографе «Ultimate 3000» («ThermoFisher», США) с тандемным масс-селективным детектором TSQ Fortis («ThermoFisher», США), градиентным насосом, дегазатором и автосемплером [24].

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 г 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.

Скорость потока подвижной фазы составила 0,3 мл/мин, объем вводимой пробы – 20 мкл. В работе был применен градиентный режим элюирования. Профиль градиента представлен в Таблице 3.

Таблица 3 – Соотношение компонентов подвижной фазы по объему в зависимости от времени хроматографического анализа

Время, мин	Водный 0,1%-й раствор муравьиной кислоты	Ацетонитрил
0	75%	25%
0,2	30%	70%
6	1%	99%
8	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 атмосферном давлении. Напряжение спрея составило 3500 В; скорость потока оболочечного газа (sheath gas) равнялась 50 отн.ед. (Arb), вспомогательного газа (aux gas) – 10 отн.ед. (Arb), продувочного газа (sweep gas) – 1 отн.ед. (Arb), температура трубки для переноса ионов – 300°C, температура испарителя – 350°C.

Для детектирования фексофенадина использовали следующие переходы

масс: 502,3 m/z → 171,0 m/z при энергии столкновения 37 В, 502,3 m/z → 466,2 m/z при энергии столкновения 27 В и 502,3 m/z → 484,2 m/z при энергии столкновения 22 В, фрагментация источника 5, CID gas 1,5 мТорр. Переходы масс для внутреннего стандарта (амантадина): 152,1 m/z → 79,08 m/z при энергии столкновения 33 В и 152,1 m/z → 135,08 m/z при энергии столкновения 17 В.

Количественный анализ фексофенадина проводили по дочернему иону с наибольшей интенсивностью сигнала с m/z 466,2; анализ амантадина – по дочернему иону с m/z 135,08.

Аналитический диапазон методики составил 0,5-50 нг/мл.

## **2.10. Определение концентрации сульфасалазина в лизате клеток**

Концентрацию сульфасалазина 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.

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. Применяли градиентный режим элюирования (таблица 4). Время удерживания сульфасалазина составило в среднем 3,18 мин, валсартана – 3,49 мин. Длительность анализа – 8 мин.

Условия детектирования были следующими: ионизацию молекул проводили электроспреем в режиме негативной ионизации (Н-ESI) (высокотемпературный электроспрей) при атмосферном давлении, напряжение 2500 В, температура ион-

транспортирующего капилляра – 300°C, температура испарителя – 350°C, вспомогательный газ – азот, оболочечный газ (Sheath gas) – 50 отн.ед. (Arb), вспомогательный газ (Aux gas) – 10 отн.ед. (Arb), продувочный газ (Sweep gas) – 1 отн.ед. (Arb), режим – мониторинг множественных реакций (MRM). Используемые MRM переходы для детектирования веществ: сульфасалазин  $m/z$  397,1 → 197,1;  $m/z$  397,1 → 289,1, энергия столкновения 24 В, напряжение линз 57 В; валсартан  $m/z$  434,2 → 179,1;  $m/z$  434,2 → 350,2, энергия столкновения 26 В, напряжение линз 104 В.

Таблица 4 – Соотношение компонентов подвижной фазы по объему в зависимости от времени хроматографического анализа

Время, мин	Водный 0,1%-й раствор муравьиной кислоты	Метанол
0,0	60%	40%
0,3	15%	85%
4	1%	99%
6	60%	40%
10	60%	40%

Для количественного анализа использовались дочерние ионы – 197,1 и 179,1 соответственно для целевого вещества и внутреннего стандарта.

В качестве фрагментирующего газа использовали аргон при давлении 2 mTorr (мТорр), фрагментация в источнике составила 10 В. Аналитический диапазон методики составил 5-5000 нг/мл.

### 2.11. Определение концентрации аторвастатина в лизате клеток

Концентрацию аторвастатина в лизате клеток анализировали методом высокоэффективной жидкостной хроматографии с тандемным масс-спектрометрическим детектированием (ВЭЖХ-МС/МС). Анализ был выполнен на высокоэффективном жидкостном хроматографе «Ultimate 3000» («ThermoFisher»,

США) с tandemным масс-селективным детектором TSQ Fortis («ThermoFisher», США), градиентным насосом, дегазатором и автосемплером.

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. Профиль градиента представлен в Таблице 5.

Таблица 5 – Соотношение компонентов подвижной фазы по объему в зависимости от времени, прошедшего с начала хроматографического анализа

Время, мин	Раствор 0,1%-муравьиной кислоты	Ацетонитрил
0,0	35%	65%
0,3	35%	65%
0,6	5%	95%
5,0	5%	95%
5,05	35%	65%
8,0	35%	65%

Молекулы ионизировали в режиме положительной ионизации на электроспрее при атмосферном давлении. Напряжение спрея составило 3500 В.

Детектирование вещества проводилось в следующем режиме: оболочечный газ (sheath gas) – 50 отн.ед. (Arb), вспомогательный газ (aux gas) – 10 отн.ед. (Arb),

продувочный газ (sweep gas) – 1 отн.ед. (Arb), температурный режим трубки для переноса ионов 300°C, температура испарителя составляла 350°C.

В качестве внутреннего стандарта использовали валсартан. Детектирование веществ осуществлялось по нижеприведенным условиям: аторвастатин – положительный режим ионизации, 559,30 m/z → 466,20 m/z, энергия столкновения – 17 В, фрагментация источника – 0, CID gas (collision-induced dissociation gas) – 2 мТорр; 559,30 m/z → 440,20 m/z, энергия столкновения 32 В, фрагментация источника – 0, CID gas – 2 мТорр; валсартан 436,2 m/z → 206,3\* m/z (использовался для количественного анализа), энергия столкновения – 27 В, фрагментация источника – 0, CID gas (collision-induced dissociation gas) – 2 мТорр; 436,2 m/z → 234,9 m/z, энергия столкновения – 18 В, напряжение линз 104 В, фрагментация источника – 0, CID gas (collision-induced dissociation gas) – 2 мТорр. Скорость потока – 0,3 мл/мин, пробы вводили в хроматограф в объеме 2 мкл. Анализ проводили в течение 10 мин. При данных условиях время удерживания аторвастатина составило 4,53 мин, валсартана – 4,45 мин. Аналитический диапазон методики составил 0,5-200 нмоль/л.

## 2.12. Статистический анализ

Полученные результаты анализировали с помощью программ StatSoft Statistica 13,0, Microsoft Excel, GraphPad Prism8. Статистическую значимость различий оценивали дисперсионном 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.

## ГЛАВА III. РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

### 3.1. Влияние половых гормонов на активность Pgr, VCRP, OATP1B1, OATP1B3 при кратковременном воздействии (оценка прямого влияния гормонов на белки-транспортёры)

Продолжительность кратковременного воздействия тестируемых половых гормонов в экспериментах *in vitro* составила 30 мин в опытах на клетках Caco-2 и 15 мин - на клетках HepG2, что позволяет оценить прямое влияние изучаемых веществ на активность белков-транспортёров.

Активность Pgr оценивали по проникновению в клетки Caco-2 его субстрата фексофенадина в конечной концентрации в транспортной среде 150 мкМ.

Адекватность транспортной модели подтверждали в эксперименте с использованием классического ингибитора Pgr – кетоконазола. Кетоконазол в выбранной модельной системе в концентрациях 1, 10 и 100 мкМ увеличивал внутриклеточное накопление субстрата данного транспортёра на 47,17% ( $p=0,02$ ), 98,49% ( $p<0,001$ ) и 201,61% ( $p<0,001$ ) соответственно (Таблица 6). При этом  $IC_{50}$  кетоконазола составила 13,17 мкМ (Рисунок 6).

Таблица 6 – Влияние кетоконазола при длительности воздействия 30 мин на концентрацию фексофенадина в лизате клеток Caco-2 (нг/мг белка)

Концентрации кетоконазола	Концентрации фексофенадина
Контроль	128,81±22,43
1 нМ	132,75±6,60
10 нМ	139,90±15,69
100 нМ	165,30±26,11
1 мкМ	189,57±11,51*
10 мкМ	255,67±25,89***
100 мкМ	388,50±32,22***

Примечание – \* -  $p<0,05$ , \*\* -  $p<0,01$ , \*\*\* -  $p<0,001$  – статистически значимые различия по сравнению с показателями контроля

Полученные результаты свидетельствуют об ингибировании активности Pgr (так как снижается выведение его субстрата – фексофенадина из клеток и увеличивается его накопление в клетках), что подтверждает адекватность выбранной модельной системы.

При изучении влияния половых гормонов на активность Pgr при кратковременном воздействии были получены следующие результаты (Таблица 7).

Эстрадиол во всех протестированных концентрациях (1 нМ – 100 мкМ) достоверно не изменял проникновение фексофенадина внутрь клеток линии Сасо-2, что свидетельствует о том, что изученный эстроген не влияет на активность Pgr напрямую (Таблица 7).

Таблица 7 – Влияние половых гормонов при длительности воздействия 30 мин на концентрацию фексофенадина в лизате клеток Сасо-2 (нг/мг белка)

Концентрации гормонов	Концентрации фексофенадина		
	Эстрадиол	Прогестерон	Тестостерон
Контроль	132,67±21,13	122,23±10,82	126,06±25,76
1 нМ	124,23±11,40	131,45±11,36	131,77±16,08
10 нМ	137,19±10,90	132,71±9,58	118,57±10,50
100 нМ	143,13±16,51	144,97±12,33	147,05±20,71
1 мкМ	149,65±34,47	153,67±3,94*	134,51±7,01
10 мкМ	142,86±13,93	186,88±18,56***	175,73±21,17*
100 мкМ	148,88±14,91	206,68±11,16***	195,62±25,83***

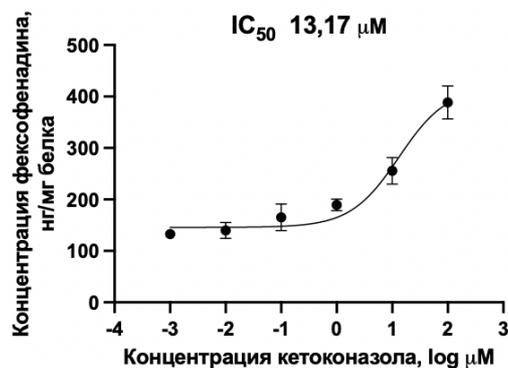
Примечание – \* - p<0,05, \*\* - p<0,01, \*\*\* - p<0,001 – статистически значимые различия по сравнению с показателями контроля

Прогестерон в концентрации 1 мкМ вызывал увеличение проникновения фексофенадина в клетки Сасо-2 на 25,72% (p=0,03), в концентрации 10 мкМ – на 52,89% (p<0,001), в концентрации 100 мкМ – на 69,09% (p<0,001), что характеризует ингибирование активности Pgr (Таблица 7). Показатель IC<sub>50</sub> прогестерона составил 2,59 мкМ (Рисунок 6).

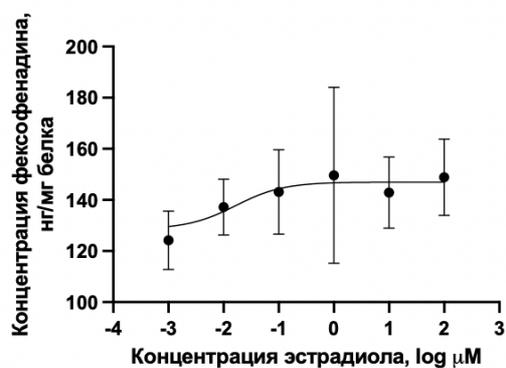
Протестированный аналогичным образом, тестостерон вызывал увеличение

проникновения фексофенадина внутрь клеток Сасо-2 в концентрациях 10 и 100 мкМ на 39,40% ( $p=0,03$ ) и 55,18% ( $p<0,001$ ) соответственно (Таблица 7). При этом  $IC_{50}$  тестостерона составила 5,95 мкМ (Рисунок 6).

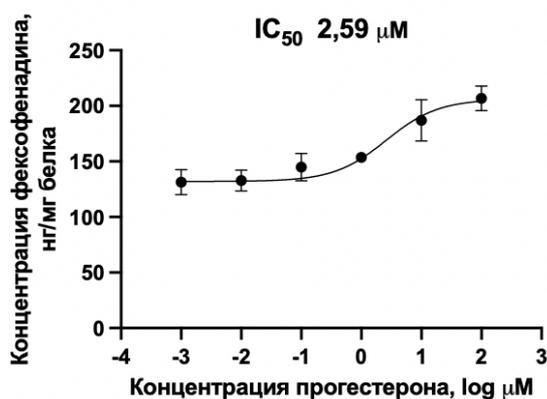
А



Б



В



Г

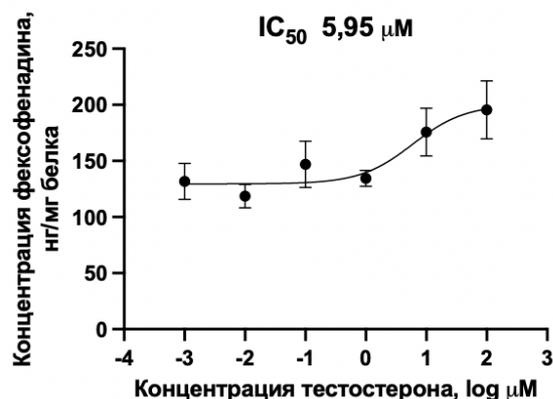


Рисунок 6 –  $IC_{50}$  кетоконазола (А), эстрадиола (Б), прогестерона (В) и тестостерона (Г), рассчитанные по влиянию на проникновение фексофенадина внутрь клеток Сасо-2

Активность BCRP оценивали по проникновению в клетки Сасо-2 его субстрата сульфасалазина в конечной концентрации в транспортной среде 50 мкМ.

Адекватность транспортной модели подтверждали в эксперименте с использованием классического ингибитора BCRP – кверцетина. Кверцетин в выбранной модельной системе в концентрациях 1, 10 и 100 мкМ увеличивал накопление субстрата данного транспортера на 39,36% ( $p=0,047$ ), 58,80% ( $p=0,003$ ) и 98,14% ( $p<0,001$ ) соответственно (Таблица 8). Показатель  $IC_{50}$  кверцетина

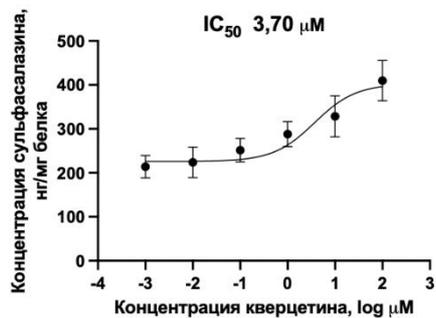
составил 3,70 мкМ (Рисунок 7).

Таблица 8 – Влияние кверцетина при длительности воздействия 30 мин на концентрацию сульфасалазина в лизате клеток Сасо-2 (нг/мг белка)

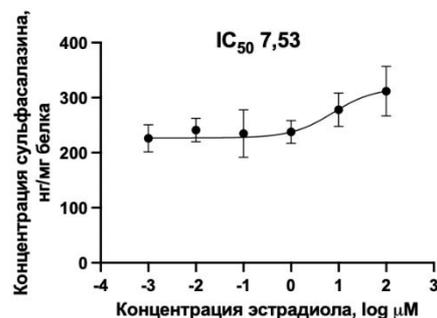
Концентрации кверцетина	Концентрации сульфасалазина
Контроль	206,89±19,50
1 нМ	213,85±25,68
10 нМ	223,91±34,50
100 нМ	251,37±26,68
1 мкМ	288,32±28,38*
10 мкМ	328,54±46,50**
100 мкМ	409,94±46,07***

Примечание – \* -  $p < 0,05$ , \*\* -  $p < 0,01$ , \*\*\* -  $p < 0,001$  – статистически значимые различия по сравнению с показателями контроля

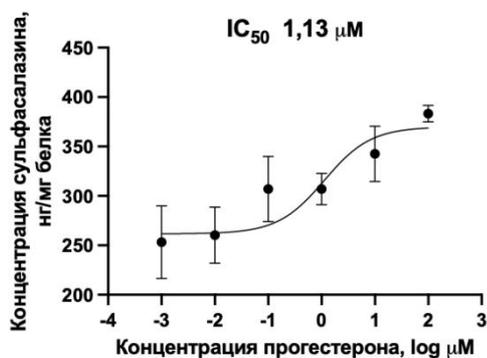
А



Б



В



Г

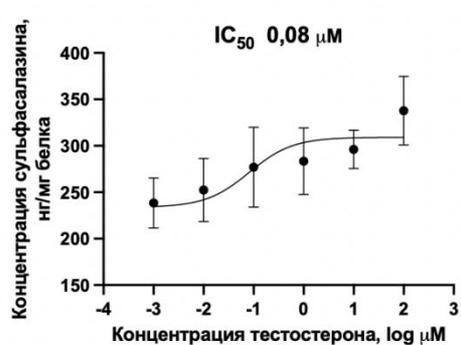


Рисунок 7 –  $IC_{50}$  кверцетина (А), эстрадиола (Б), прогестерона (В) и тестостерона (Г), рассчитанные по влиянию на проникновение сульфасалазина внутрь клеток Сасо-2

Полученные результаты свидетельствуют об ингибировании активности BCRP, поскольку выявлено снижение выведения его субстрата – сульфасалазина из клеток и увеличение его накопления в клетках, что подтверждает адекватность выбранной модельной системы.

При изучении влияния половых гормонов на активность BCRP при кратковременном воздействии (оценка прямого влияния гормонов на белки транспортеры) были получены следующие результаты.

Эстрадиол в концентрации 100 мкМ увеличивал концентрацию сульфасалазина в лизате клеток Caco-2 на 50,8% ( $p=0,01$ ) (Таблица 9).

Прогестерон в концентрациях 100 нМ, 1 мкМ, 10 мкМ и 100 мкМ вызывал увеличение проникновения сульфасалазина в клетки Caco-2 на 26,15% ( $p=0,04$ ), 26,18% ( $p=0,04$ ), 40,81% ( $p=0,001$ ) и 57,45% ( $p<0,001$ ) по сравнению с контролем соответственно (Таблица 9). Показатель  $IC_{50}$  прогестерона составил 1,13 мкМ (Рисунок 7).

Тестостерон в концентрациях 10 и 100 мкМ приводил к увеличению проникновения сульфасалазина внутрь клеток Caco-2 на 33,70% ( $p=0,05$ ) и 52,43% ( $p=0,0028$ ) соответственно (Таблица 9).

Таблица 9 – Влияние половых гормонов при длительности воздействия 30 мин на концентрацию сульфасалазина в лизате клеток Caco-2 (нг/мг белка)

Концентрации гормонов	Концентрации сульфасалазина		
	Эстрадиол	Прогестерон	Тестостерон
Контроль	206,79±33,28	243,36±20,37	221,56±19,38
1 нМ	226,20±24,67	253,19±36,70	238,39±26,83
10 нМ	241,25±21,55	260,31±28,24	252,31±34,04
100 нМ	234,71±43,13	307,00±32,91*	276,92±43,07
1 мкМ	237,96±20,86	307,14±15,96*	283,47±35,82
10 мкМ	278,27±30,39	342,66±27,88***	296,23±20,66*
100 мкМ	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

Учитывая очень близкую субстратную специфичность OATP1B1/OATP1B3, влияние половых гормонов на их активность оценивали совместно по анализу проникновения аторвастатина внутрь клеток HepG2.

Вначале изучили влияние классического ингибитора OATP1B1/OATP1B3 рифампицина на проникновение аторвастатина в клетки, чтобы подтвердить адекватность выбранной транспортной модели (Таблица 10).

Классический ингибитор OATP1B1/OATP1B3 – рифампицин в выбранной модельной системе в концентрациях 10 и 100 мкМ снижал накопление субстрата данных транспортеров на 28,58% ( $p=0,045$ ) и на 42,49% ( $p=0,003$ ) по сравнению с контролем соответственно (Таблица 10). При этом  $IC_{50}$  рифампицина составила 3,17 мкМ (Рисунок 8).

Таблица 10 – Влияние рифампицина при длительности воздействия 15 мин на концентрацию аторвастатина в лизате клеток HepG2 (нг/мг белка)

Концентрации рифампицина	Концентрации аторвастатина
Контроль	13,01±1,74
1 нМ	12,57±1,66
10 нМ	11,20±1,20
100 нМ	11,58±0,96
1 мкМ	10,58±1,32
10 мкМ	9,28±1,06*
100 мкМ	7,48±2,35**

Примечание – \* -  $p<0,05$ , \*\* -  $p<0,01$ , \*\*\* -  $p<0,001$  – статистически значимые различия по сравнению с показателями контроля

Полученные результаты характеризуют ингибирование активности OATP1B1/OATP1B3 (инфлюксных транспортеров) поскольку снижается проникновение их субстрата аторвастатина внутрь клеток, что подтверждает адекватность выбранной модельной системы.

При изучении влияния половых гормонов на активность OATP1B1/OATP1B3 при кратковременном воздействии (оценка прямого влияния гормонов на белки транспортеры) были получены следующие результаты.

Эстрадиол в концентрации 100 мкМ снижал содержание аторвастатина в лизате клеток HepG2 на 38,88% ( $p=0,023$ ) (Таблица 11).

Прогестерон в концентрациях 1 мкМ, 10 мкМ и 100 мкМ уменьшал концентрацию аторвастатина в клетках HepG2 на 28,79% ( $p=0,031$ ), 30,25% ( $p=0,023$ ) и 44,99% ( $p=0,01$ ) соответственно (Таблица 11). Показатель  $IC_{50}$  прогестерона составил 0,03 мкМ (Рисунок 8).

Тестостерон во всех протестированных концентрациях достоверно не влиял на проникновение аторвастатина внутрь клеток, только в концентрации 100 мкМ отмечалась тенденция к ее снижению на 24,85% ( $p=0,088$ ) (Таблица 11).

Таблица 11 – Влияние половых гормонов при длительности воздействия 15 мин на концентрацию аторвастатина в лизате клеток HepG2 (нг/мг белка)

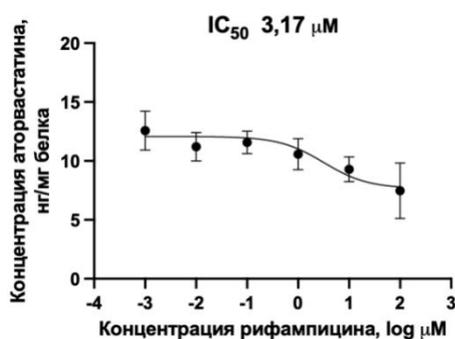
Концентрации гормонов	Концентрации аторвастатина		
	Эстрадиол	Прогестерон	Тестостерон
Контроль	13,01±1,74	11,89±1,58	11,27±1,57
1 нМ	11,84±0,98	12,86±1,22	10,42±0,96
10 нМ	9,47±2,36	10,64±1,36	12,09±1,85
100 нМ	11,41±2,55	9,24±1,51	12,20±1,36
1 мкМ	9,93±1,73	8,47±1,31*	11,39±0,63
10 мкМ	9,14±2,24#	8,29±1,00*	10,75±1,58
100 мкМ	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

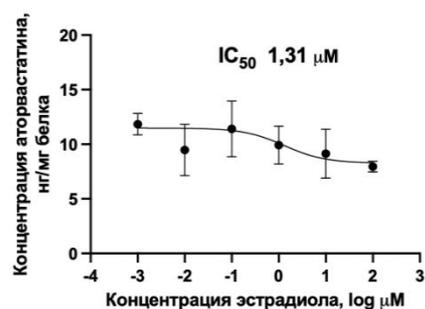
Таким образом, эстрадиол оказывает прямое ингибирующее действие на активность BCRP, OATP1B1, OATP1B3 только в максимальной концентрации - 100 мкМ. Прогестерон ингибирует Pgp в концентрациях 10 и 100 мкМ, BCRP в диапазоне изученных концентраций от 100 нМ до 100 мкМ, OATP1B1, OATP1B3 в концентрациях от 1 до 100 мкМ. Тестостерон ингибирует только АТФ-зависимые транспортеры – Pgp и BCRP в концентрациях 10 и 100 мкМ. Минимальная концентрация полумаксимального ингибирования  $IC_{50}$ , рассчитанная по влиянию

на проникновение фексофенадина внутрь клеток Сасо-2, определяется для прогестерона ( $IC_{50}$  - 2,59 мкМ); наименьшая  $IC_{50}$ , рассчитанная по влиянию на проникновение сульфасалазина внутрь клеток Сасо-2, установлена для тестостерона ( $IC_{50}$  - 0,08 мкМ); минимальная  $IC_{50}$ , рассчитанная по влиянию на проникновение аторвастатина внутрь клеток НерG2 зафиксирована для прогестерона ( $IC_{50}$  - 0,03 мкМ).

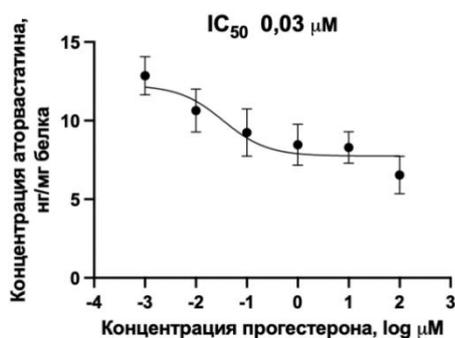
А



Б



В



Г

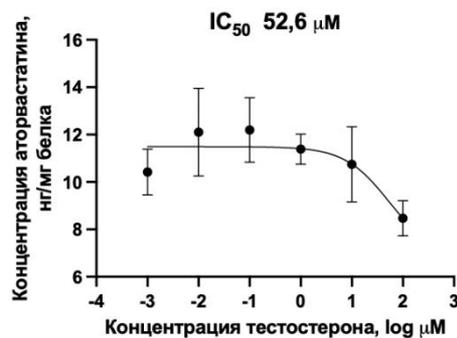


Рисунок 8 –  $IC_{50}$  рифампицина (А), эстрадиола (Б), прогестерона (В) и тестостерона (Г), рассчитанные по влиянию на проникновение аторвастатина внутрь клеток НерG2

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

Влияние половых гормонов на экспрессию генов, кодирующих Pgp, BCRP, OATP1B1, OATP1B3 изучали на клетках линии Сасо-2 и НерG2 при длительности инкубации 24 ч. На клетках линии Сасо-2 при экспозиции 24 ч эстрадиол в концентрации 1 мкМ вызывал повышение экспрессии гена *MDR1* на 78,9%

( $p=0,047$ ), в концентрации 10 мкМ – на 94,2% ( $p=0,016$ ), в концентрации 100 мкМ – на 101,5% ( $p=0,0096$ ) (Рисунок 9).

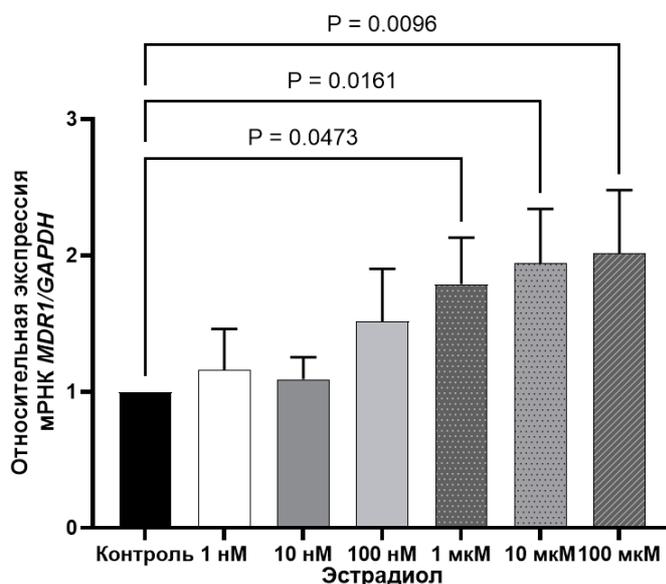


Рисунок 9 – Относительная экспрессия мРНК *MDR1* в клетках линии Сасо-2 при воздействии эстрадиола, среднее $\pm$ SD ( $n=3$  в каждой серии)

Прогестерон в концентрации 10 мкМ повышал экспрессию *MDR1* на 65,1% ( $p=0,04$ ), в концентрации 100 мкМ – на 81,8% ( $p=0,009$ ) (Рисунок 10).

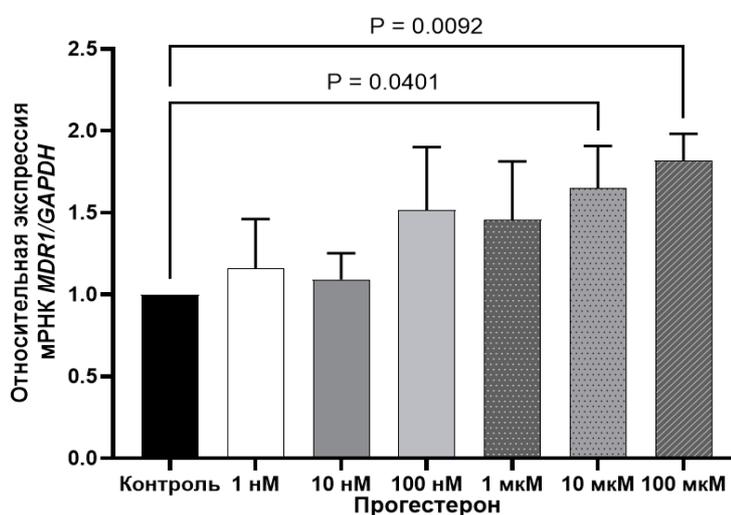


Рисунок 10 – Относительная экспрессия мРНК *MDR1* в клетках линии Сасо-2 при воздействии прогестерона, среднее $\pm$ SD ( $n=3$  в каждой серии)

В отличие от женских половых гормонов, тестостерон в концентрациях 10 и 100 мкМ вызывал снижение уровня мРНК *MDR1* на 43,4% ( $p=0,039$ ) и на 45,3% ( $p=0,03$ ) соответственно (Рисунок 11).

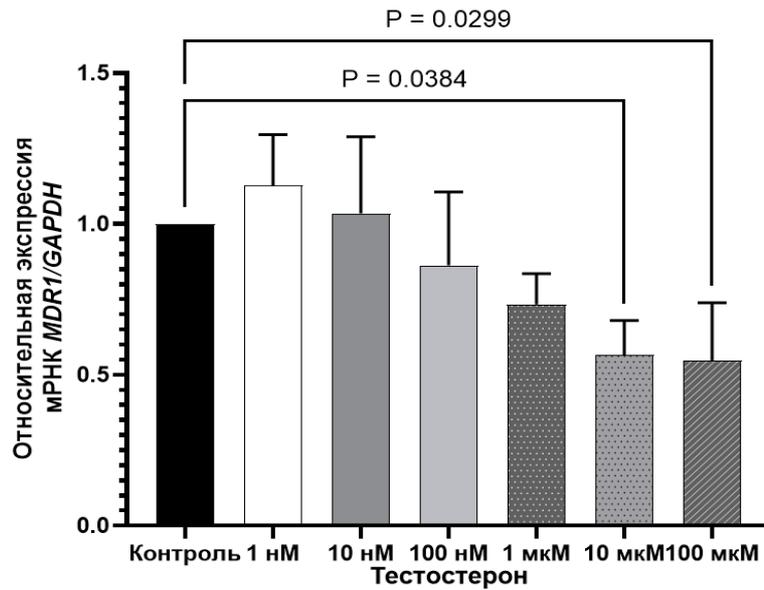


Рисунок 11 – Относительная экспрессия мРНК *MDR1* в клетках линии *Caco-2* при воздействии тестостерона, среднее $\pm$ SD (n=3 в каждой серии)

Воздействие эстрадиола в концентрациях 100 нМ, 1, 10 и 100 мкМ в течение 24 ч увеличивало экспрессию гена *ABCG2*, кодирующего BCRP, в клетках линии *Caco-2* на 56,8% (p=0,0012), 54,4% (p=0,0017), 67,0% (p=0,0002) и 53,2% (p=0,0021) соответственно (Рисунок 12).

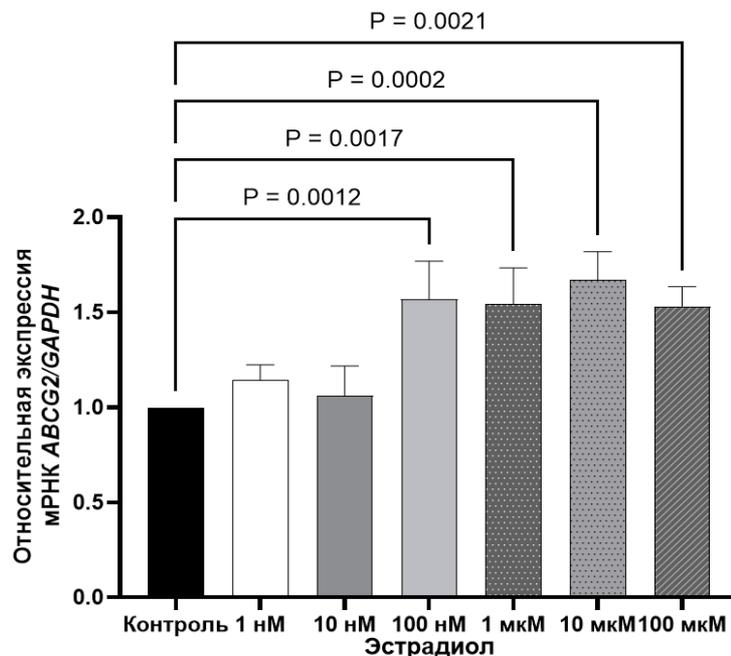


Рисунок 12 – Относительная экспрессия мРНК *ABCG2* в клетках линии *Caco-2* при воздействии эстрадиола, среднее $\pm$ SD (n=3 в каждой серии)

Инкубирование клеток линии Сасо-2 с прогестероном приводило к повышению мРНК гена *ABCG2* в концентрации гормона 10 мкМ на 76,3% ( $p=0,0113$ ), в концентрации 100 мкМ – на 107,4% ( $p=0,0007$ ) (Рисунок 13).

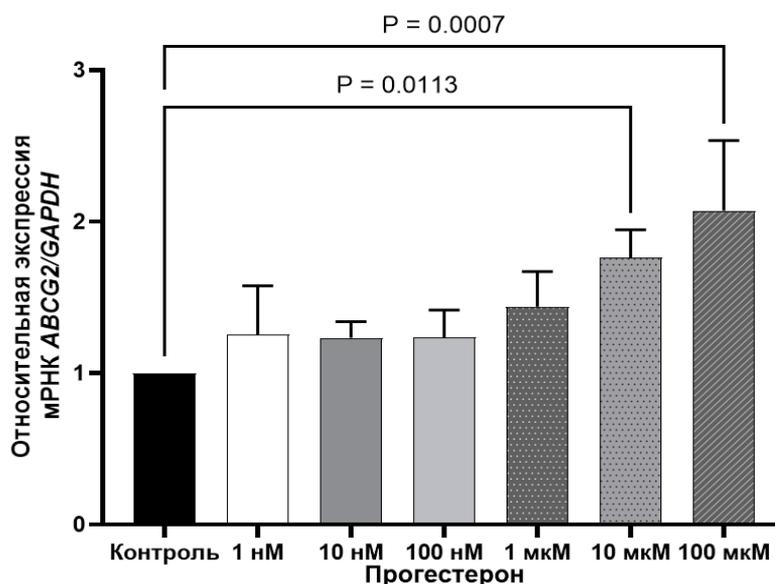


Рисунок 13 – Относительная экспрессия мРНК *ABCG2* в клетках линии Сасо-2 при воздействии прогестерона, среднее $\pm$ SD ( $n=3$  в каждой серии)

Тестостерон в концентрации 1 мкМ повышал экспрессию гена *ABCG2* на 76,7% ( $p=0,034$ ), в концентрации 10 мкМ – на 86,4% ( $p=0,016$ ), в концентрации 100 мкМ – на 90,8% ( $p=0,011$ ) (Рисунок 14).

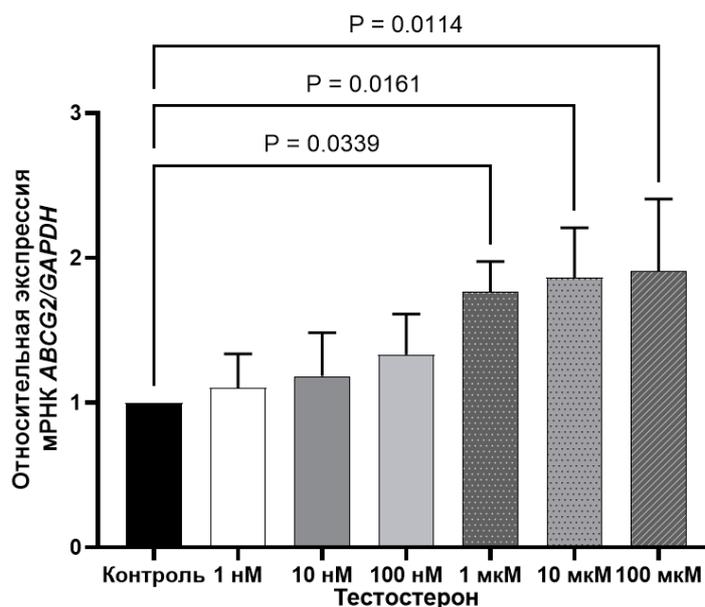


Рисунок 14 – Относительная экспрессия мРНК *ABCG2* в клетках линии Сасо-2 при воздействии тестостерона, среднее $\pm$ SD ( $n=3$  в каждой серии)

Влияние эстрадиола в концентрациях 10 и 100 мкМ в течение 24 ч увеличивало экспрессию гена *SLCO1B1*, кодирующего OATP1B1, в клетках линии НерG2 на 50,9% ( $p=0,027$ ) и 60,2% ( $p=0,009$ ) соответственно (Рисунок 15).

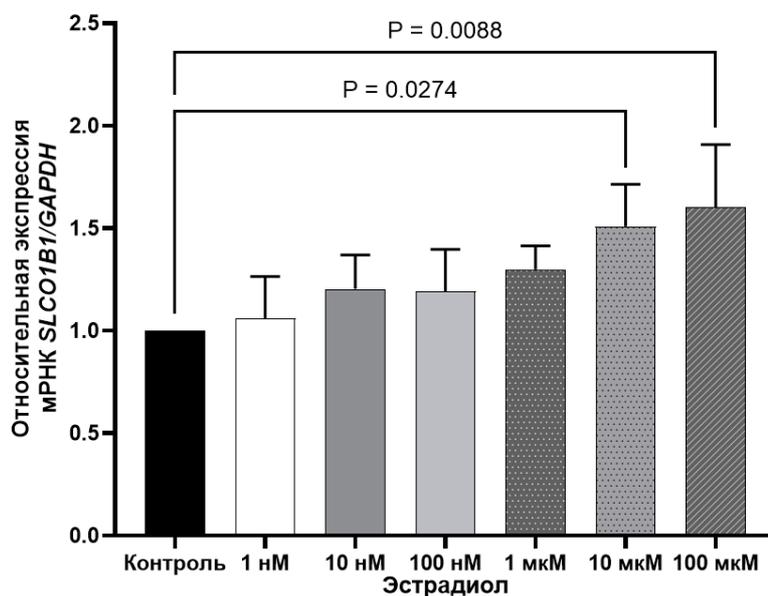


Рисунок 15 – Относительная экспрессия мРНК *SLCO1B1* в клетках линии НерG2 при воздействии эстрадиола, среднее±SD ( $n=3$  в каждой серии)

При инкубации клеток линии НерG2 с прогестероном в концентрации 100 мкМ в течение 24 ч отмечалась тенденция к снижению уровня мРНК *SLCO1B1* на 34,8% ( $p=0,0675$ ) (Рисунок 16).

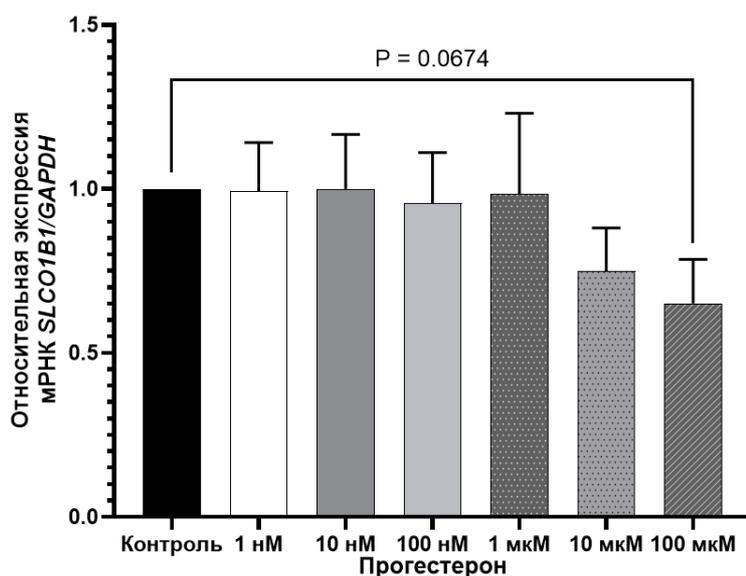


Рисунок 16 – Относительная экспрессия мРНК *SLCO1B1* в клетках линии НерG2 при воздействии прогестерона, среднее±SD ( $n=3$  в каждой серии)

Тестостерон в концентрации 1 мкМ повышал экспрессию гена *SLCO1B1* на 53,2% ( $p=0,014$ ), в концентрации 10 мкМ – на 62,7% ( $p=0,004$ ), в концентрации 100 мкМ – на 66,7% ( $p=0,0026$ ) (Рисунок 17).

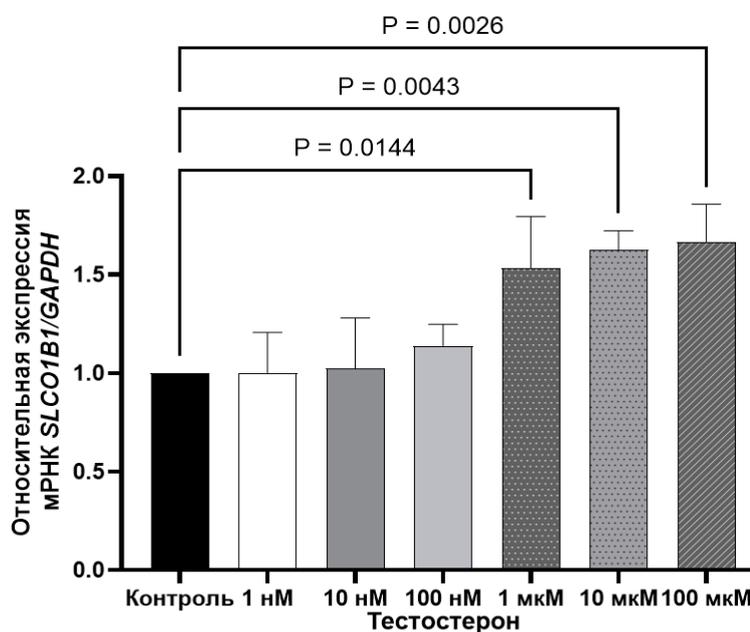


Рисунок 17 – Относительная экспрессия мРНК *SLCO1B1* в клетках линии HepG2 при воздействии тестостерона, среднее $\pm$ SD ( $n=3$  в каждой серии)

Эстрадиол при длительности воздействия 24 ч в концентрациях 1, 10 и 100 мкМ повышал экспрессию гена *SLCO1B3* на 80,3% ( $p=0,0021$ ), 115,6% ( $p<0,0001$ ) и 115,5% ( $p<0,0001$ ) соответственно (Рисунок 18).

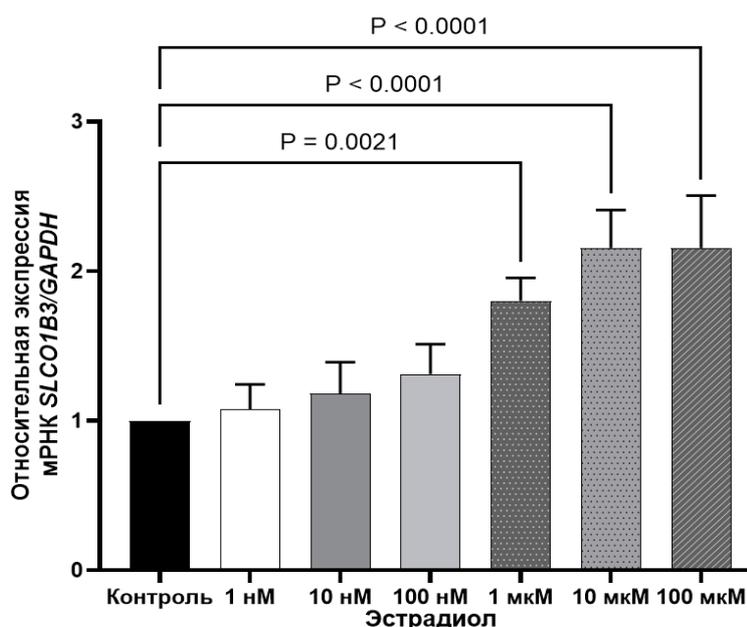


Рисунок 18 – Относительная экспрессия мРНК *SLCO1B3* в клетках линии HepG2 при воздействии эстрадиола, среднее $\pm$ SD ( $n=3$  в каждой серии)

Прогестерон во всех протестированных концентрациях статистически значимо не влиял на экспрессию гена *SLCO1B3* (Рисунок 19).

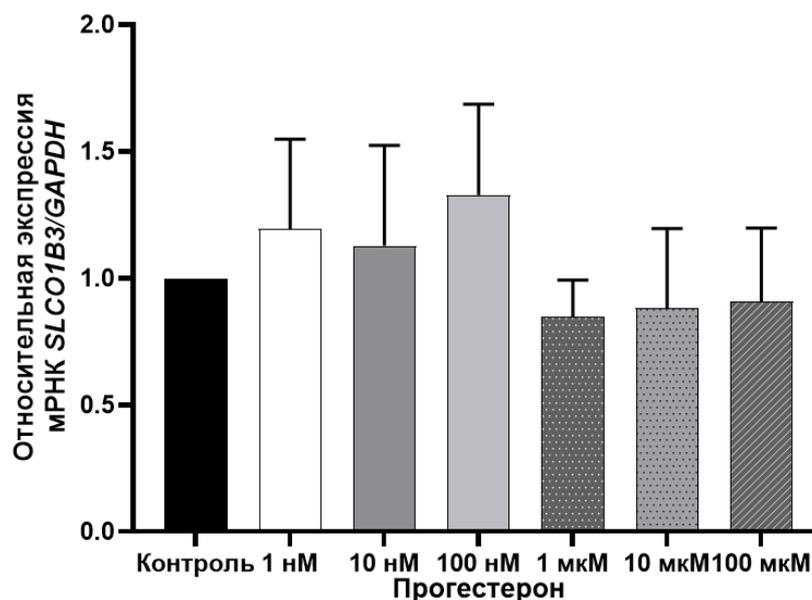


Рисунок 19 – Относительная экспрессия мРНК *SLCO1B3* в клетках линии HepG2 при воздействии прогестерона, среднее±SD (n=3 в каждой серии)

Тестостерон в концентрациях 1, 10 и 100 мкМ увеличивал экспрессию *SLCO1B3* на 53,2% (p=0,0297), 62,7% (p=0,007) и 66,7% (p=0,032) соответственно по сравнению с контролем (Рисунок 20).

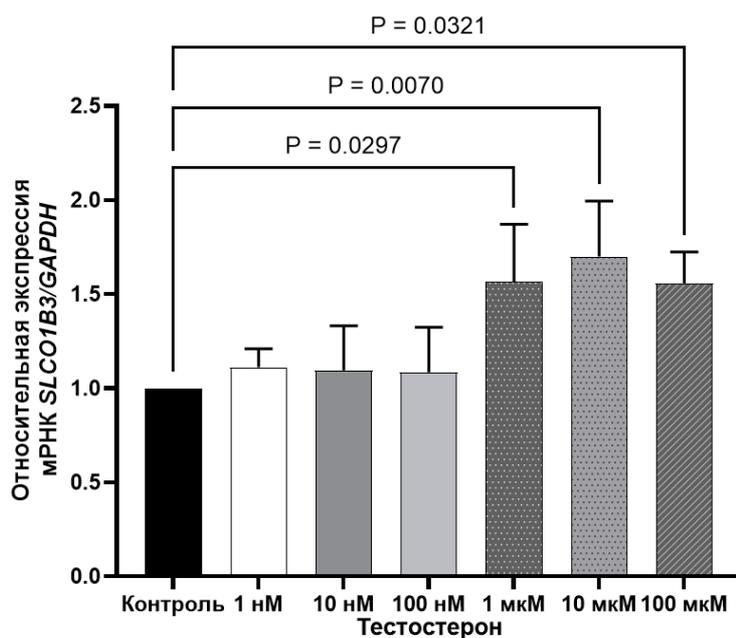


Рисунок 20 – Относительная экспрессия мРНК *SLCO1B3* в клетках линии HepG2 при воздействии тестостерона, среднее±SD (n=3 в каждой серии)

Таким образом, эстрадиол при длительности воздействия 24 ч повышает экспрессию гена *MDR1*, кодирующего Pgp, в концентрациях 1-100 мкМ, экспрессию гена *ABCG2*, кодирующего BCRP, в концентрациях 100 нМ, 1, 10 и 100 мкМ в клетках линии Caco-2 и увеличивает экспрессию гена *SLCO1B1*, кодирующего OATP1B1, в концентрациях 10 и 100 мкМ и экспрессию гена *SLCO1B3*, кодирующего OATP1B3, в концентрациях 1, 10 и 100 мкМ в клетках линии HepG2. Прогестерон при длительности воздействия 24 ч повышает экспрессию генов *MDR1* и *ABCG2* в клетках линии Caco-2 в концентрациях 10-100 мкМ, вызывает тенденцию к снижению экспрессии гена *SLCO1B1* в концентрации 100 мкМ, не влияет на экспрессию гена *SLCO1B3* в клетках линии HepG2. Тестостерон в аналогичных условиях эксперимента в концентрациях 10 и 100 мкМ снижает уровень мРНК гена *MDR1*, повышает экспрессию гена *ABCG2* в диапазоне концентраций 1-100 мкМ, увеличивает экспрессию генов *SLCO1B1* и *SLCO1B3* в концентрациях 1, 10 и 100 мкМ.

### **3.3. Влияние половых гормонов на относительное количество Pgp, BCRP, OATP1B1, OATP1B3**

В данной главе представлены экспериментальные данные, полученные в ходе изучения влияния эстрадиола, прогестерона и тестостерона на относительное количество белков-транспортеров: Pgp, BCRP, а также OATP1B1 и OATP1B3.

В соответствии с дизайном работы результаты структурированы по группам эксперимента.

Исследование было выполнено на двух общепризнанных клеточных моделях: линии клеток аденокарциномы ободочной кишки человека Caco-2 и линии клеток гепатоцеллюлярной карциномы человека HepG2. Влияние половых гормонов при длительности инкубации в течение 24 ч на относительное количество белков-транспортеров Pgp, BCRP, OATP1B1, OATP1B3 оценивали методом вестерн-блот.

Все эксперименты были выполнены в трех независимых повторностях (n=3),

а полученные данные статистически обработаны.

Все изученные половые гормоны (эстрадиол, прогестерон, тестостерон) в концентрациях 1-100 нМ при длительности воздействия 24 ч достоверно не влияли на относительное количество Pgr в клетках линии Сасо-2 (Рисунок 21).

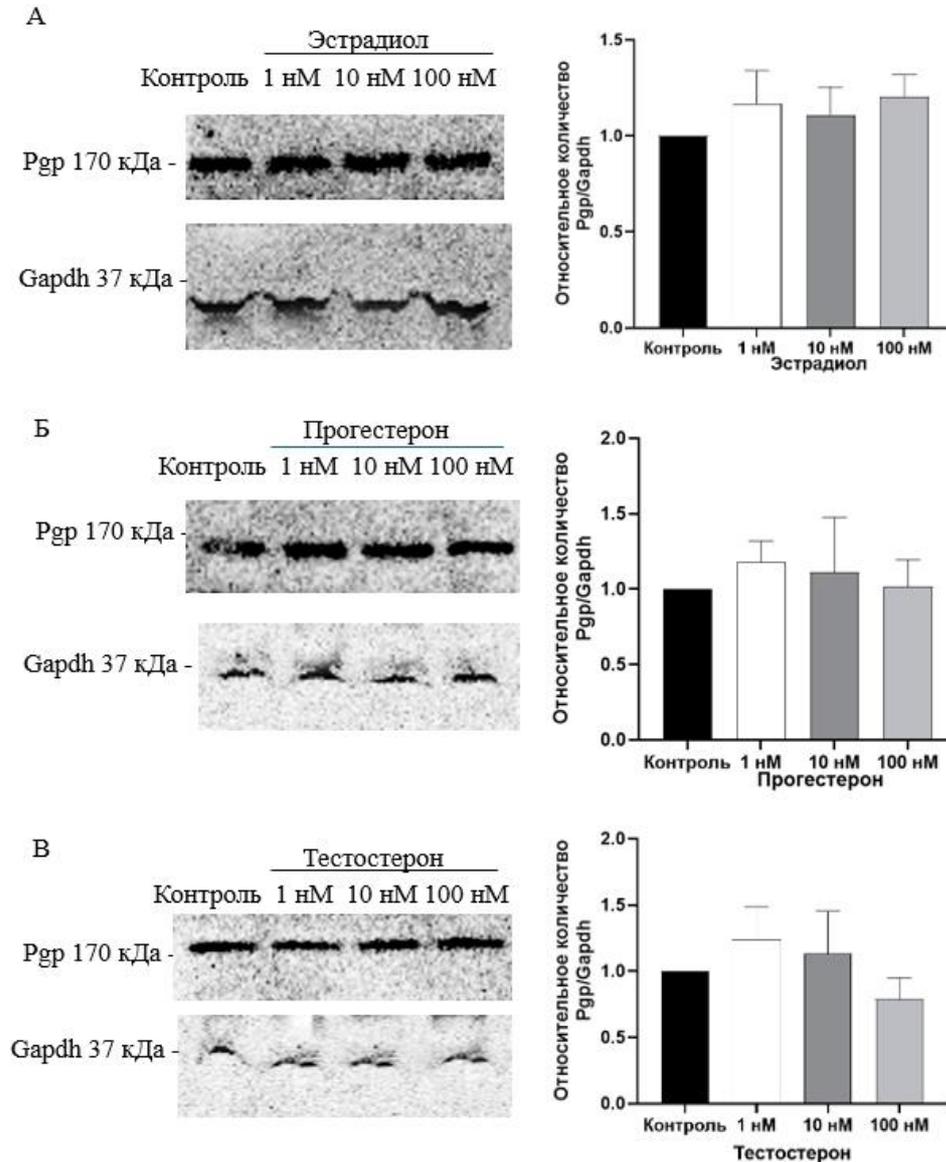


Рисунок 21 – Влияние половых гормонов (1-100 нМ) на уровень белка Pgr (вестерн-блот анализ) в клеточной линии Сасо-2

Эстрадиол при длительности воздействия 24 ч в концентрации 1 мкМ достоверно не влиял на количество Pgr, а в концентрациях 10 и 100 мкМ повышал уровень Pgr на 50,7% ( $p=0,019$ ) и на 66,3% ( $p=0,0045$ ) соответственно по сравнению с показателями контроля (Рисунок 22А).

Прогестерон при длительности воздействия 24 ч достоверно не влиял на уровень Pgr в концентрациях 1-10 мкМ, а в концентрации 100 мкМ увеличивал его на 123,7% ( $p=0,0076$ ) (Рисунок 22Б).

Воздействие тестостерона на клетки линии Сасо-2 в течение 24 ч в концентрации 1 мкМ приводило к снижению уровня Pgr на 32,3% ( $p=0,04$ ), в концентрациях 10 мкМ и 100 мкМ на 43,5% ( $p=0,009$ ) и 33,7% ( $p=0,033$ ) соответственно по сравнению с контролем (Рисунок 22В).

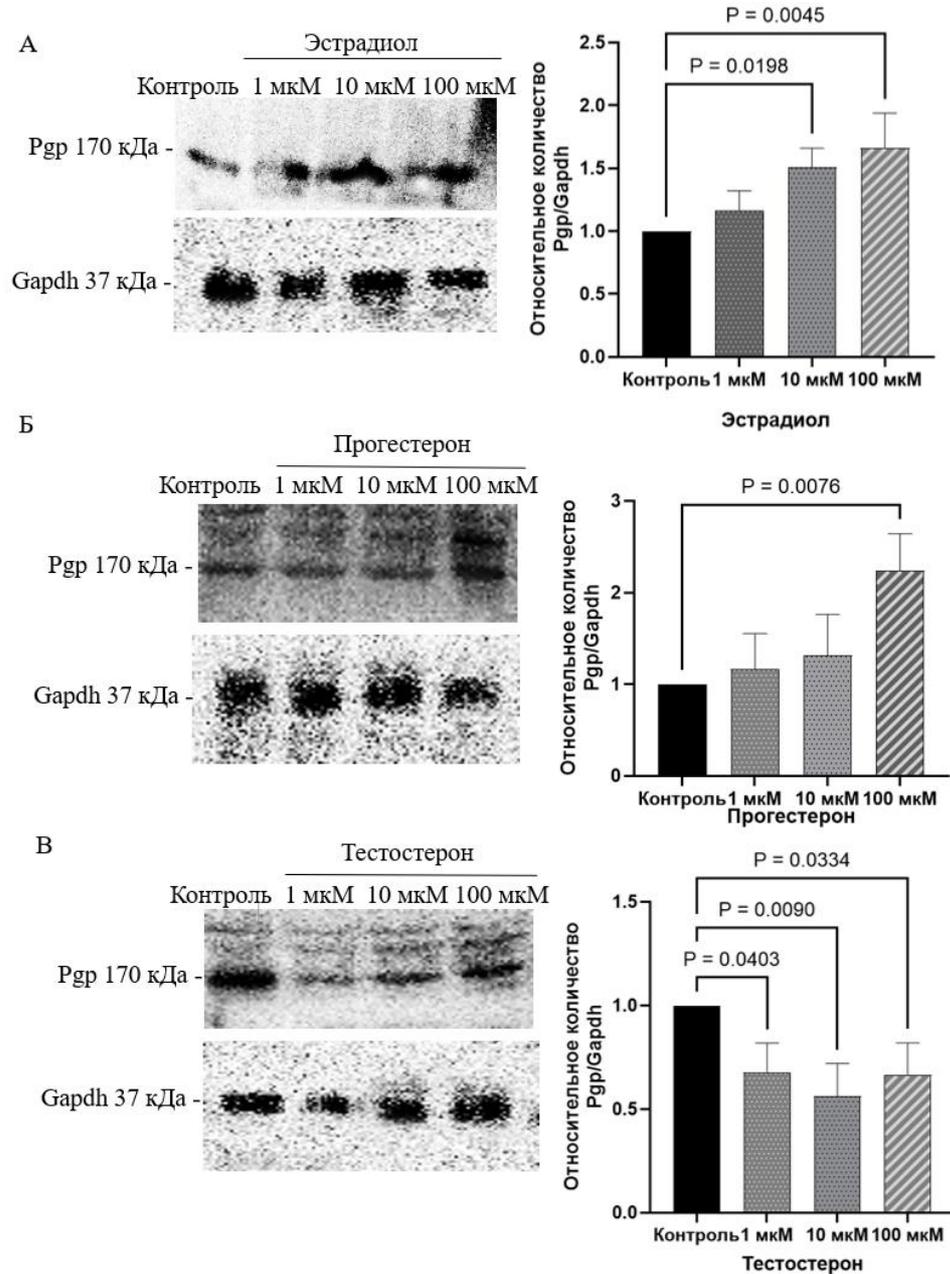


Рисунок 22 – Влияние половых гормонов (1-100 мкМ) на уровень белка Pgr (вестерн-блот анализ) в клеточной линии Сасо-2

Эстрадиол в концентрациях 1-10 нМ, прогестерон и тестостерон в концентрациях 1-100 нМ при длительности инкубации 24 ч статистически значимо не влияли на относительное количество ВСРР, уровень белка – транспортера не отличался от значений контроля (Рисунок 23).

Воздействие эстрадиола в концентрациях 100 нМ, 1 мкМ, 10 мкМ и 100 мкМ в течение 24 ч увеличивало относительное количество ВСРР на 34,4% ( $p=0,03$ ), 126,2%, 152,0% и 95,7% ( $p<0,0001$  для каждой серии) соответственно по сравнению с контролем (Рисунки 23А и 24А).

Инкубирование клеток линии Сасо-2 с прогестероном в концентрациях 1, 10 и 100 мкМ приводило к повышению уровня ВСРР на 151,4%, 114,9% и 90,3% ( $p<0,0001$  для каждой серии) относительно значений контроля (Рисунок 24Б).

При инкубации клеток с тестостероном в концентрациях 1, 10 и 100 мкМ также отмечалось увеличение относительного количества ВСРР на 129,5%, 130,2% и 88,5% ( $p<0,01$  для каждой серии) относительно контрольных значений (Рисунок 24В).

Половые гормоны (эстрадиол, прогестерон, тестостерон) в концентрациях 1-100 нМ при длительности воздействия 24 ч достоверно не влияли на относительное количество ОАТР1В1 в клетках линии НерG2 (Рисунок 25).

Инкубирование клеток линии НерG2 с эстрадиолом в концентрации 1 мкМ не влияло на количество ОАТР1В1 и увеличивало его при использовании гормона в концентрациях 10 и 100 мкМ на 40,8% ( $p=0,002$ ) и 31,3% ( $p=0,007$ ) соответственно по отношению к значениям контроля (Рисунок 26А).

Прогестерон в концентрации 1 мкМ не влиял на относительное количество ОАТР1В1, а в концентрациях 10 и 100 мкМ вызывал его снижение на 24,9% ( $p=0,003$ ) и 27,2% ( $p=0,002$ ) соответственно по сравнению с контролем (Рисунок 26Б).

Инкубирование клеток линии НерG2 с тестостероном в концентрациях 1, 10 и 100 мкМ в течение 24 ч приводило к повышению относительного количества ОАТР1В1 на 84,5%, 98,5% и 102,3% соответственно ( $p<0,0001$  для каждой группы) по сравнению с показателями контроля (Рисунок 26В).

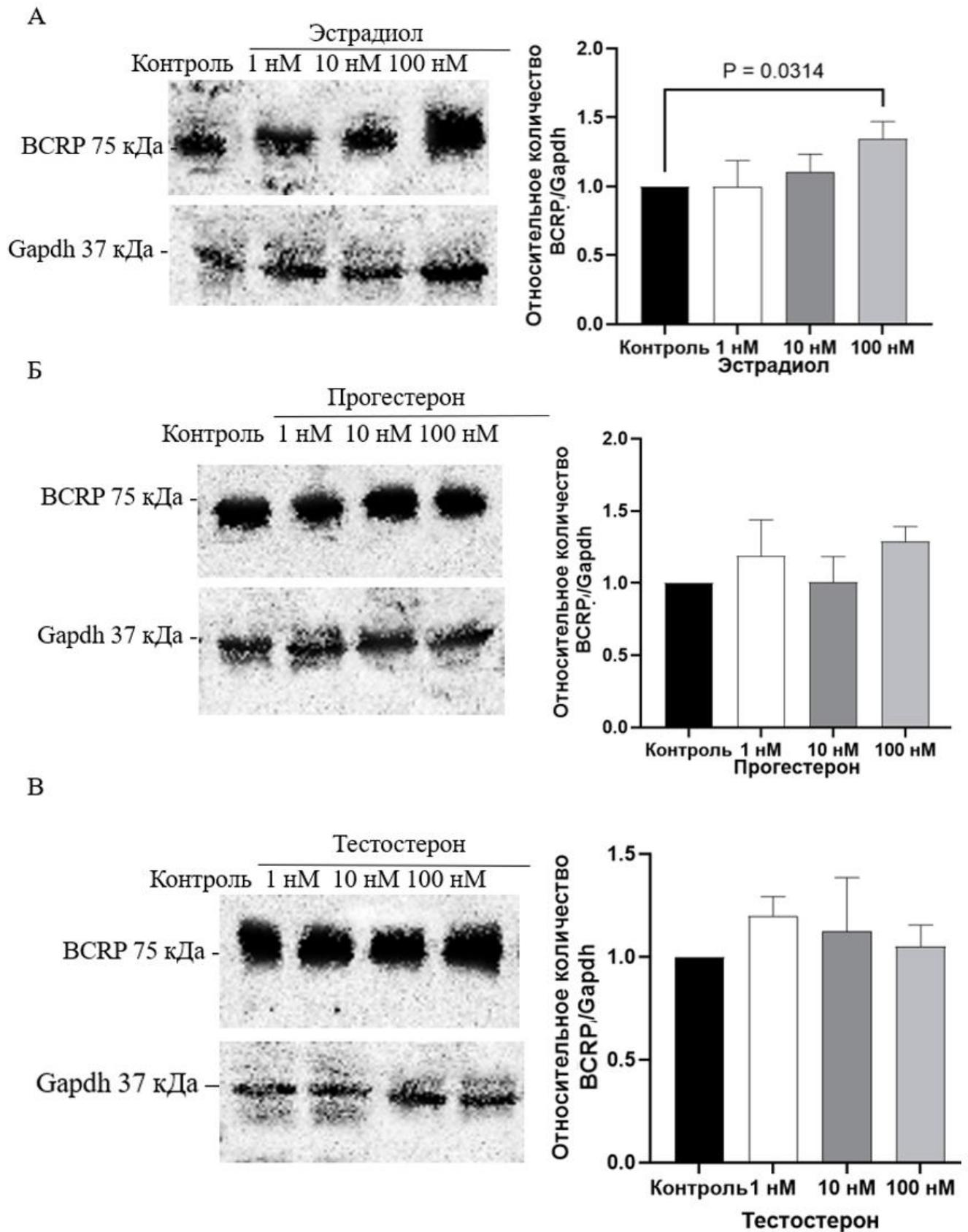
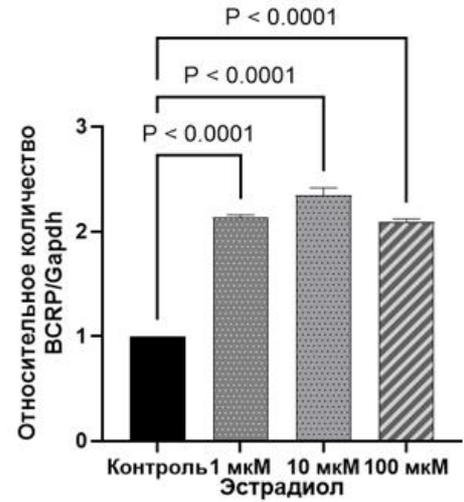
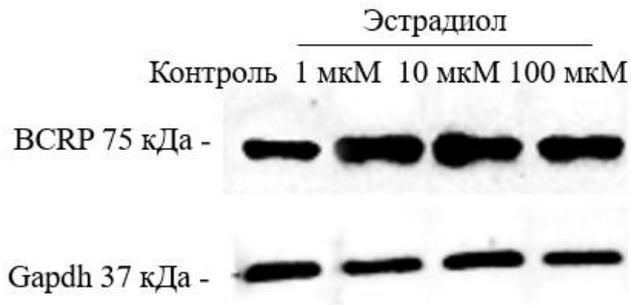
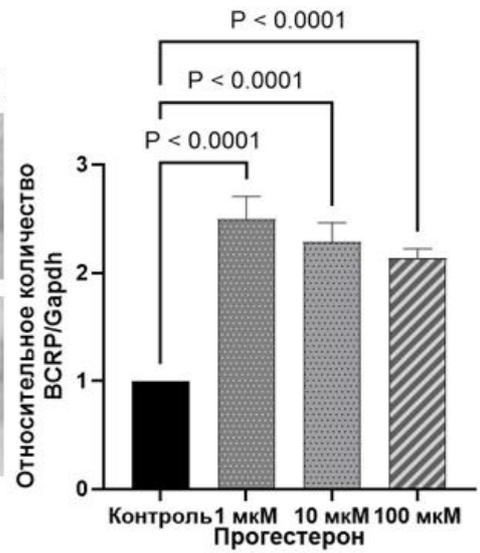
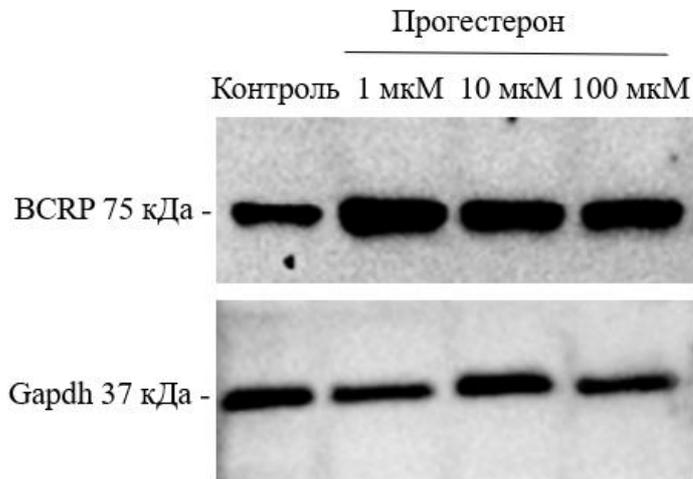


Рисунок 23 – Влияние половых гормонов (1-100 нМ) на уровень белка BCRP (вестерн-блот анализ) в клеточной линии Caco-2

А



Б



В

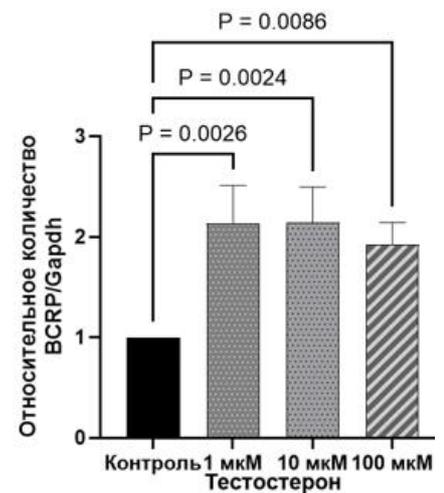
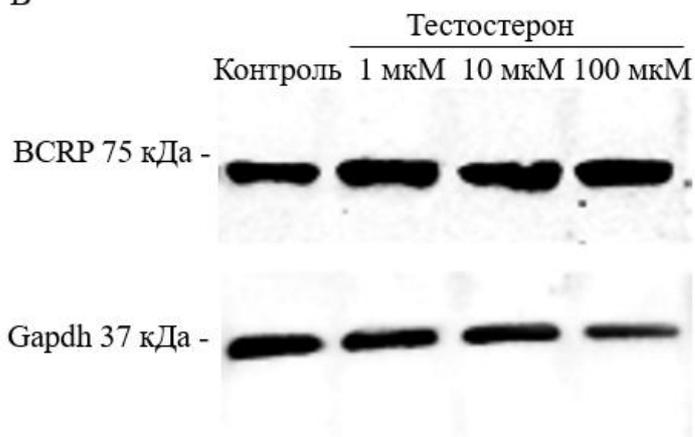


Рисунок 24 – Влияние половых гормонов (1-100 мкМ) на уровень белка BCRP (вестерн-блот анализ) в клеточной линии Caco-2

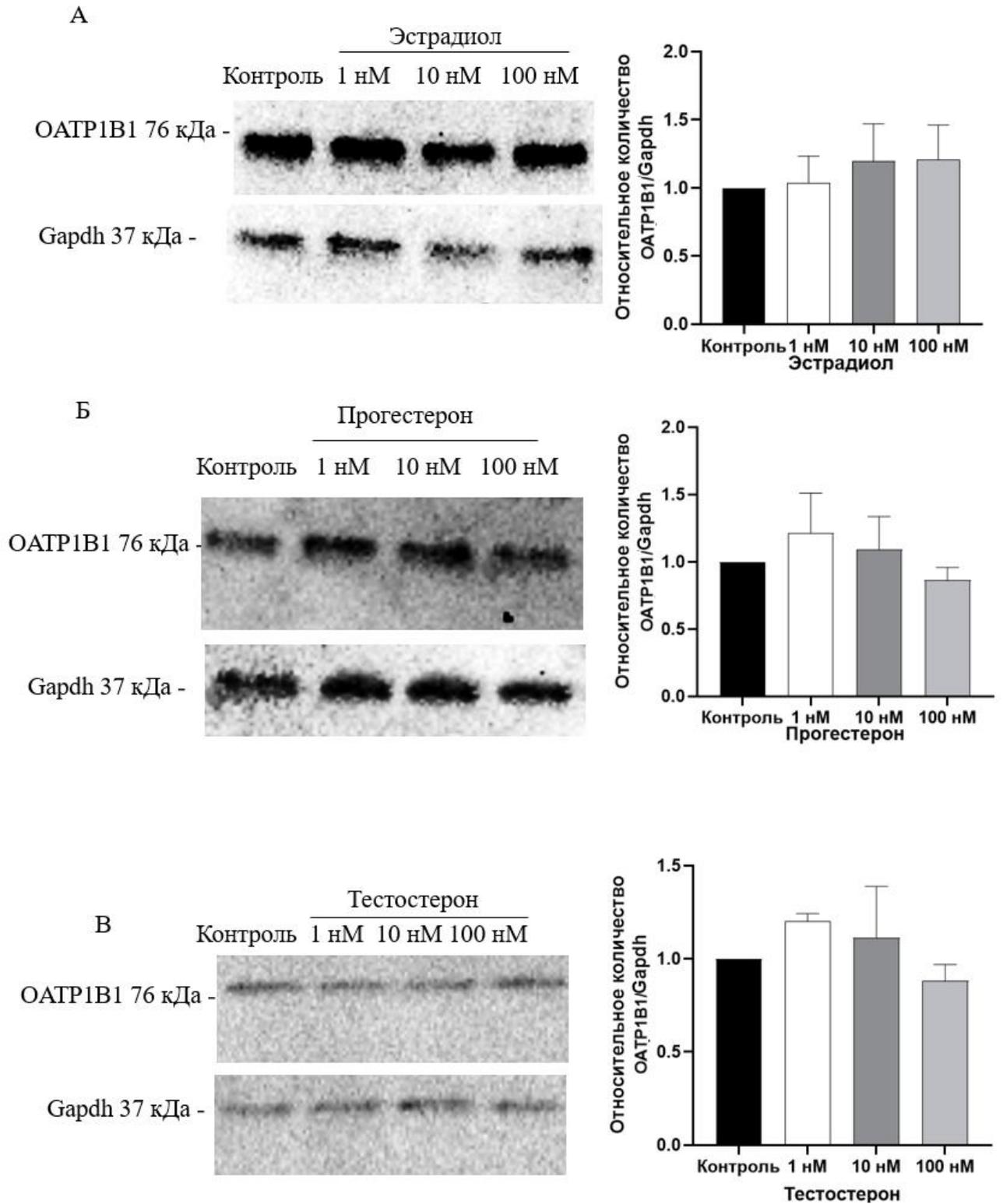


Рисунок 25 – Влияние половых гормонов (1-100 нМ) на уровень белка ОАТР1В1 (вестерн-блот анализ) в клеточной линии НерG2

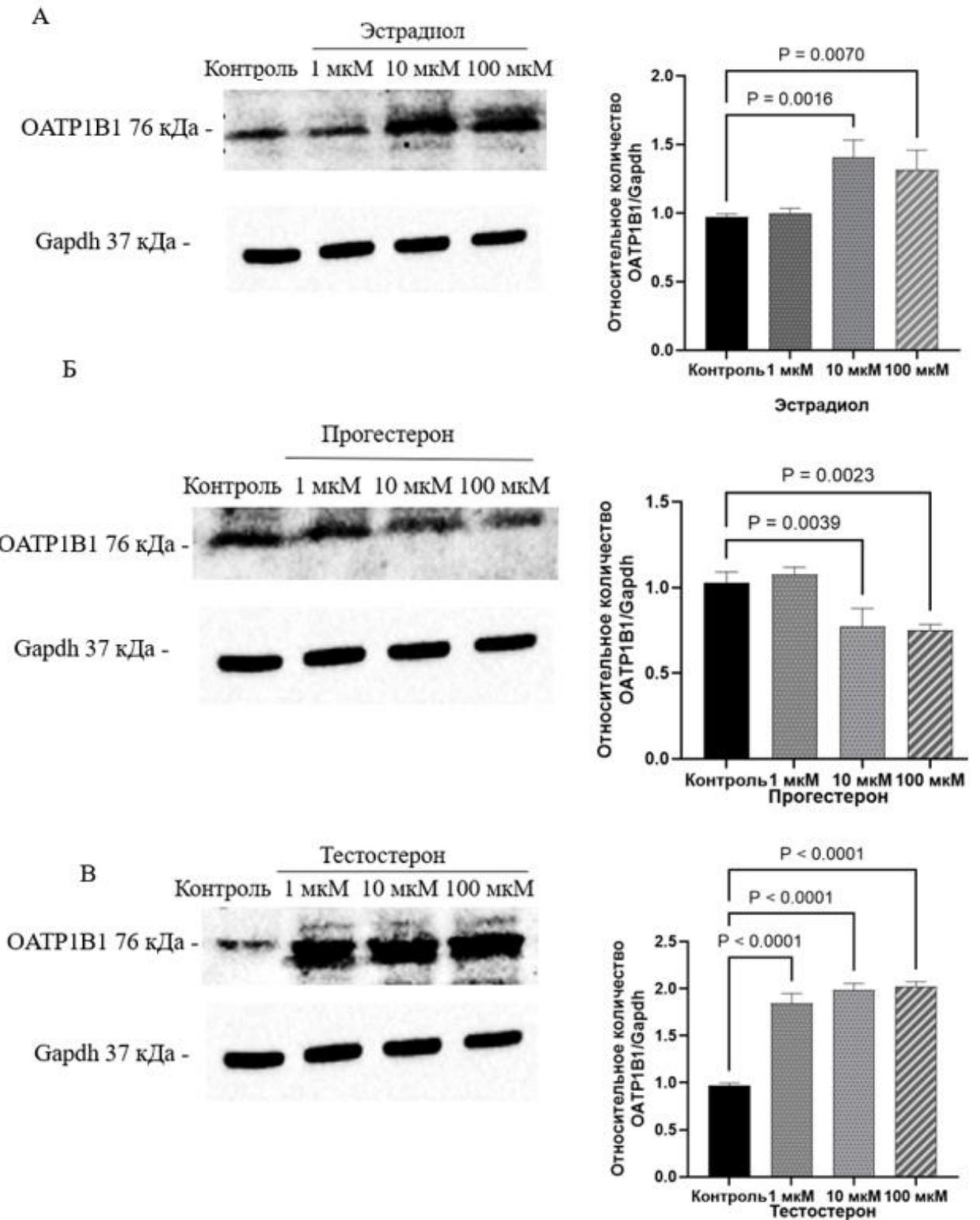


Рисунок 26 – Влияние половых гормонов (1-100 мкМ) на уровень белка ОАТР1В1 (вестерн-блот анализ) в клеточной линии НерG2

Половые гормоны (эстрадиол, прогестерон, тестостерон) в концентрациях 1-100 нМ при длительности воздействия 24 ч достоверно не влияли на относительное количество ОАТР1В3 в клетках линии НерG2 (Рисунок 27).

Эстрадиол в концентрации 1 мкМ значимо не влиял на относительное количество ОАТР1В3, а в концентрациях 10 и 100 мкМ повышал его на 83,4% и 101,4% ( $p < 0,05$ ) соответственно по сравнению с контролем (Рисунок 28А).

Прогестерон во всех протестированных концентрациях достоверного эффекта на уровень ОАТР1В3 не оказывал (Рисунок 28Б).

Тестостерон в концентрациях 1, 10 и 100 мкМ увеличивал относительное количество ОАТР1В3 на 94,1%, 120,8% и 131,6% ( $p < 0,05$ ) соответственно по сравнению со значениями контроля (Рисунок 28В).

Таким образом, эстрадиол при длительности воздействия 24 ч на клетки линии Сасо-2 в концентрациях 10 и 100 мкМ повышает уровень Pgp, прогестерон увеличивает его в концентрации 100 мкМ, напротив, тестостерон снижает относительное количество Pgp в диапазоне концентраций от 1 до 100 мкМ.

Воздействие всех изученных половых гормонов в течение 24 ч приводит к повышению относительного количества BCRP в клетках линии Сасо-2: эстрадиол увеличивает уровень белка-транспортера в наибольшем диапазоне концентраций – 100 нМ – 100 мкМ, прогестерон и тестостерон в интервале 1 – 100 мкМ.

Эстрадиол при инкубации в течение 24 ч увеличивает количество ОАТР1В1 в клетках линии НерG2 в концентрациях 10 и 100 мкМ. Прогестерон в концентрациях 10 и 100 мкМ снижает уровень белка-транспортера. Тестостерон повышает относительное количество ОАТР1В1 в концентрациях 1, 10 и 100 мкМ.

Эстрадиол в клетках линии НерG2 повышает уровень ОАТР1В3 в концентрациях 10 и 100 мкМ, тестостерон – в концентрациях 1, 10 и 100 мкМ, в свою очередь прогестерон на количество транспортера не влияет.

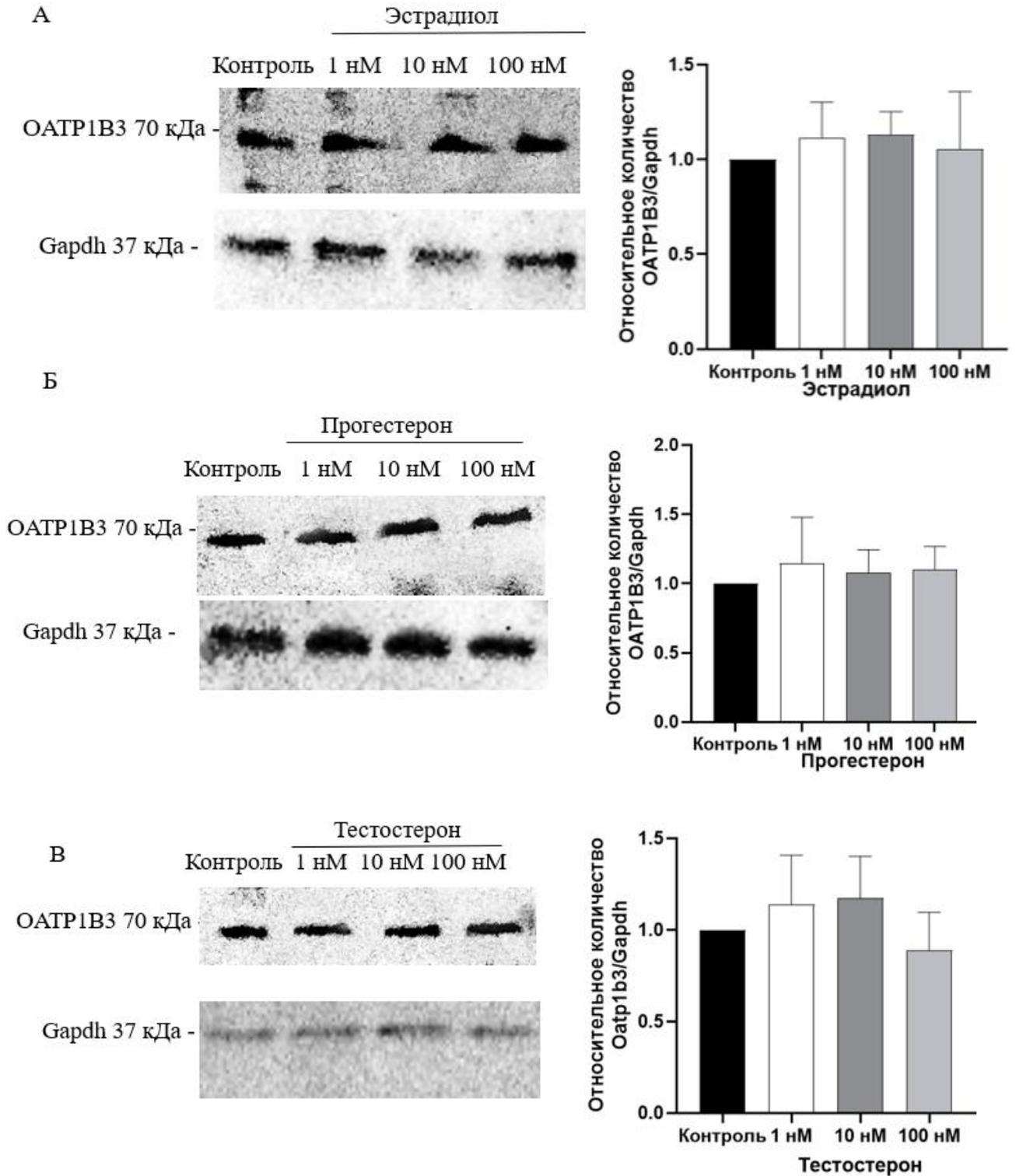


Рисунок 27 – Влияние половых гормонов (1-100 нМ) на уровень белка ОАТР1В3 (вестерн-блот анализ) в клеточной линии НерG2

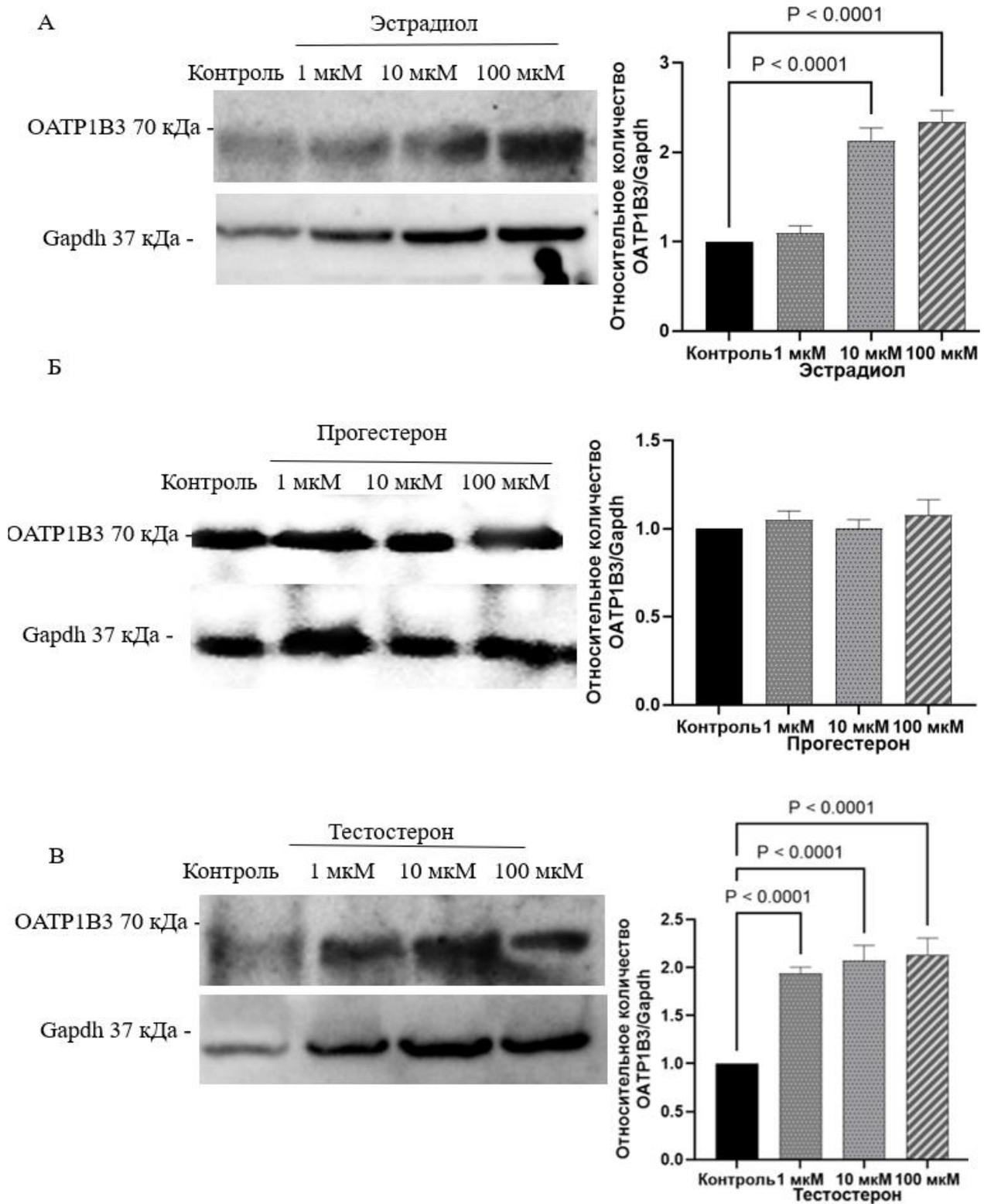


Рисунок 28 – Влияние половых гормонов (1-100 мкМ) на уровень белка ОАТР1В3 (вестерн-блот анализ) в клеточной линии HepG2

### 3.4. Влияние половых гормонов на активность Pgr, BCRP, OATP1B1/OATP1B3 при воздействии 24 ч

На следующем этапе исследования оценивали как изменение количества изучаемых белков-транспортеров влияет на их активность. Активность Pgr, BCRP, OATP1B1/OATP1B3 оценивали по проникновению их субстратов (фексофенадина, сульфасалазина и аторвастатина) внутрь клеток Caco-2 и HepG2 соответственно.

При изучении активности Pgr были получены следующие результаты (Таблица 12).

Таблица 12 – Влияние половых гормонов на концентрацию фексофенадина в лизате клеток Caco-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

Инкубация клеток Caco-2 с эстрадиолом в течение 24 ч приводила к снижению концентрации фексофенадина в клетке по отношению к контролю при концентрации гормона 10 мкМ – на 42,83% ( $p=0,03$ ), при концентрации 100 мкМ – на 43,3% ( $p=0,03$ ). Полученные результаты свидетельствуют о повышении активности Pgr.

Прогестерон во всех протестированных концентрациях достоверно не влиял на проникновение фексофенадина в клетки Caco-2.

Тестостерон в концентрациях 1, 10 и 100 мкМ вызывал увеличение концентрации фексофенадина в клетках Caco-2 на 51,52% ( $p=0,05$ ), 75,55% ( $p=0,01$ ) и 101,31% ( $p < 0,001$ ) соответственно по сравнению с контролем. Повышение концентрации фексофенадина внутри клеток свидетельствуют о снижении

активности Pgr при инкубации с тестостероном в течение 24 ч.

При изучении активности BCRP были получены следующие результаты (Таблица 13).

Таблица 13 – Влияние половых гормонов на концентрацию сульфасалазина в лизате клеток Caco-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

Эстрадиол в концентрации 1 мкМ и длительности инкубации 24 ч вызывал снижение концентрации сульфасалазина внутри клеток Caco-2 на 24,45% ( $p=0,039$ ) по сравнению с контролем. Полученные результаты свидетельствуют о повышении активности белка-транспортера.

Эстрадиол в остальных концентрациях 10-100 мкМ, а также прогестерон и тестостерон во всех изученных концентрациях достоверного эффекта на проникновение сульфасалазина в клетки не оказали.

При изучении активности OATP1B1/OATP1B3 были получены следующие результаты (Таблица 14).

Эстрадиол в концентрации 10 мкМ увеличивал содержание аторвастатина в клетках HepG2 на 22,29% ( $p=0,021$ ), а в концентрации 100 мкМ – на 24,1% ( $p=0,014$ ) по сравнению с контролем соответственно. Полученные результаты характеризуют повышение активности транспортеров OATP1B1/OATP1B3.

Прогестерон в концентрации 10 мкМ уменьшал содержание аторвастатина внутри клеток на 29,8% ( $p=0,018$ ), в концентрации 100 мкМ – на 45,48% ( $p=0,0016$ ), что свидетельствует о снижении активности изучаемых транспортеров.

Тестостерон в концентрациях 1, 10 и 100 мкМ вызывал повышение

внутриклеточного уровня аторвастатина на 24,37% ( $p=0,05$ ), 31,44% ( $p=0,017$ ) и 22,26% ( $p=0,08$ ) соответственно по отношению к контролю.

Таблица 14 – Влияние половых гормонов на концентрацию аторвастатина в лизате клеток HepG2 (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 – # -  $p<0,1$ , \* -  $p\leq 0,05$ , \*\* -  $p<0,01$ , \*\*\* -  $p<0,001$  – статистически значимые различия по сравнению с показателями контроля

Таким образом, эстрадиол в концентрациях 10 и 100 мкМ при инкубации клеток Сасо-2 в течение 24 ч снижает уровень фексофенадина в клетках, что свидетельствует о повышении активности Pgp. Прогестерон не влияет на проникновение фексофенадина в клетки Сасо-2. Тестостерон в концентрациях 1, 10 и 100 мкМ увеличивает концентрацию фексофенадина в клетках, что характеризует снижение активности Pgp.

Эстрадиол снижает проникновение субстрата ВССР сульфасалазина в клетки Сасо-2 только в концентрации 1 мкМ, что характеризует повышение активности транспортера. Прогестерон и тестостерон во всех изученных концентрациях не влияют на уровень сульфасалазина внутри клетки.

Эстрадиол увеличивает содержание аторвастатина в клетках HepG2 в концентрациях 10 и 100 мкМ, тестостерон – в концентрациях 1, 10 и 100 мкМ, что указывает на повышение активности транспортеров OATP1B1/OATP1B3. Прогестерон в концентрациях 10 и 100 мкМ уменьшает уровень аторвастатина в клетках, что свидетельствует о снижении активности изучаемых транспортеров.

### **3.5. Влияние половых гормонов на относительное количество CAR, PXR, FXR, LXR в ядерной фракции лизата клеток Caco-2**

На следующем этапе исследования оценивалась влияние половых гормонов на активацию рецепторов CAR, PXR, FXR, LXR $\alpha$ . Для этого методом вестерн-блот анализировали относительное количество данных рецепторов в ядерной фракции лизатов клеток Caco-2 (раздел 3.5) и HepG2 (раздел 3.6) при экспозиции гормонов в течение 24 часов в дозах 1-100 мкМ. На клетках Caco-2 были получены следующие результаты. Эстрадиол в концентрациях 10 и 100 мкМ повышал уровень CAR в ядерной фракции лизата клеток на 51,1% ( $p=0,035$ ) и 59,3% ( $p=0,017$ ) соответственно, а в концентрации 1 мкМ вызывал тенденцию к его повышению на 40,4% ( $p=0,093$ ) (Рисунок 29А). Прогестерон достоверно не влиял на уровень CAR в ядре во всех протестированных концентрациях (Рисунок 29Б). В то же время тестостерон в концентрации 100 мкМ вызывал тенденцию к снижению содержания CAR в ядерной фракции клеток Caco-2 на 34,7% ( $p=0,078$ ) (Рисунок 29В).

Эстрадиол во всех концентрациях 1, 10 и 100 мкМ вызывал повышение уровня PXR в ядерной фракции лизата клеток на 43,4% ( $p=0,04$ ), 58,6% ( $p=0,009$ ) и 47,3% ( $p=0,028$ ) соответственно (Рисунок 30А). Прогестерон в концентрациях 10 и 100 мкМ также увеличивал содержание PXR на 54,6% ( $p=0,04$ ) и 58,1% ( $p=0,03$ ) соответственно (Рисунок 30Б). Тестостерон в концентрации 10 мкМ увеличивал количество PXR на 57,0% ( $p=0,028$ ), а также вызывал тенденцию к его увеличению в концентрации 1 мкМ на 42,8% ( $p=0,09$ ) и в концентрации 100 мкМ на 45,3% ( $p=0,077$ ) (Рисунок 30В). Эстрадиол достоверно не влиял на уровень FXR в ядерной фракции клеток во всех протестированных концентрациях (Рисунок 31А). Прогестерон в концентрации 1 мкМ увеличивал FXR на 44,6% ( $p=0,0063$ ), в концентрации 10 мкМ – на 46,9% ( $p=0,0047$ ), в концентрации 100 мкМ – на 44,8% ( $p=0,0062$ ) по сравнению с контролем (Рисунок 31Б). Тестостерон достоверно влиял на содержание FXR только в одной концентрации 10 мкМ, увеличивая его на 61,7% ( $p=0,035$ ) по сравнению с контролем (Рисунок 31В).

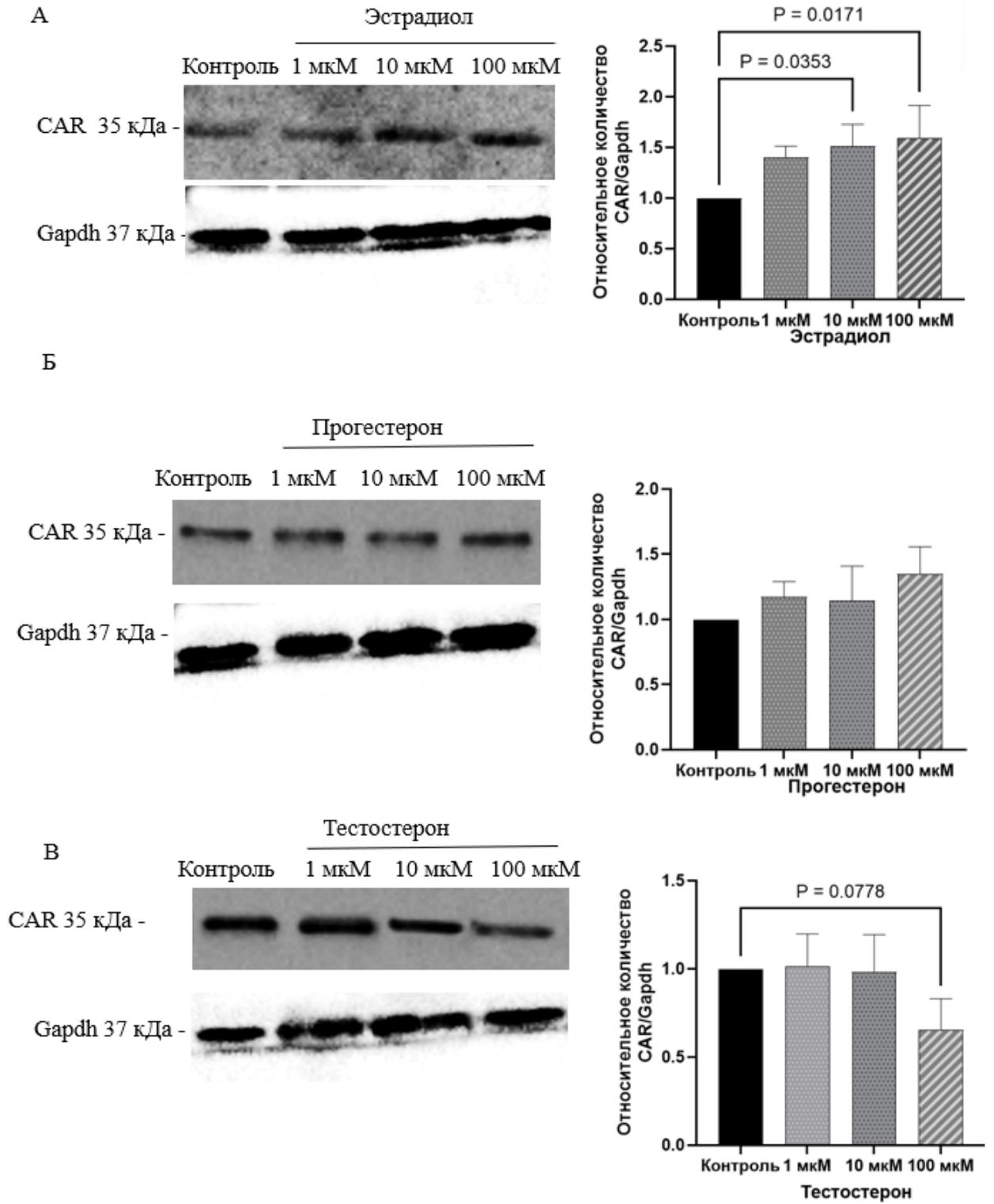


Рисунок 29 – Влияние половых гормонов (1-100 мкМ) на уровень CAR в ядерной фракции клеток Caco-2

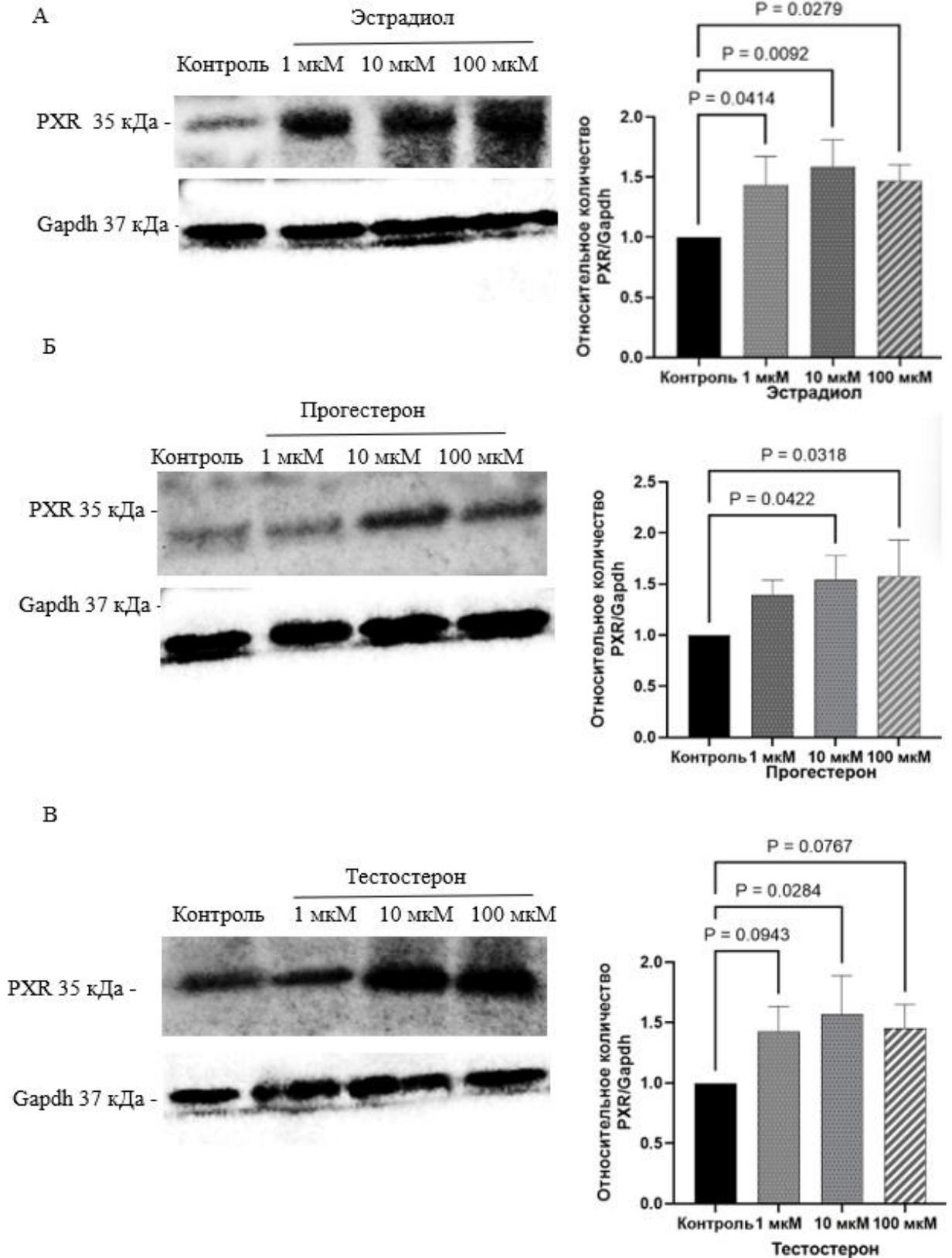


Рисунок 30 – Влияние половых гормонов (1-100 мкМ) на уровень PXR в ядерной фракции клеток Сасо-2

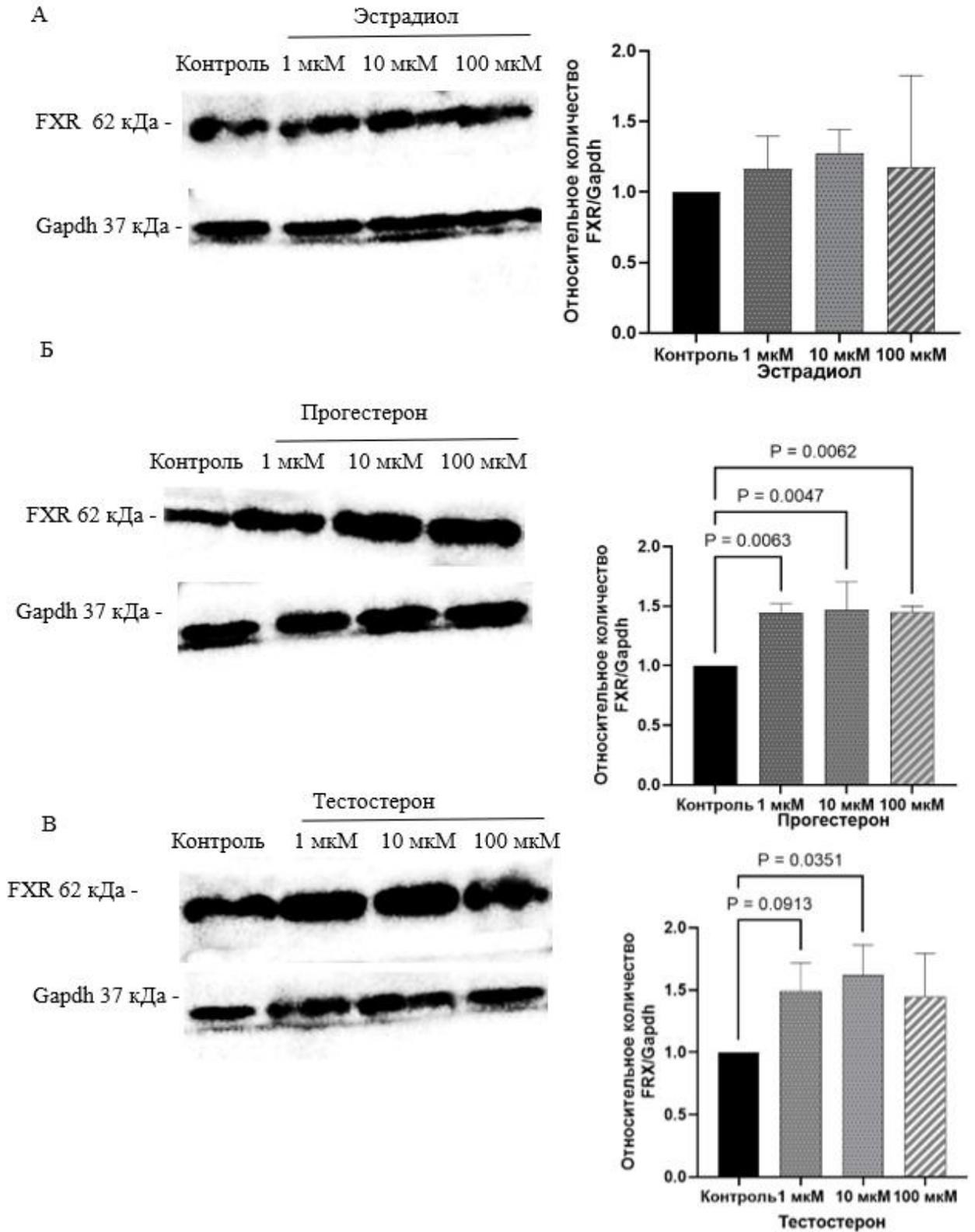


Рисунок 31 – Влияние половых гормонов (1-100 мкМ) на уровень FXR в ядерной фракции клеток Caco-2

Изученные половые гормоны (эстрадиол, прогестерон и тестостерон) во всех протестированных концентрациях достоверно не влияли на уровень LXR $\alpha$  в

ядерной фракции лизата клеток Сасо-2 (Рисунок 32).

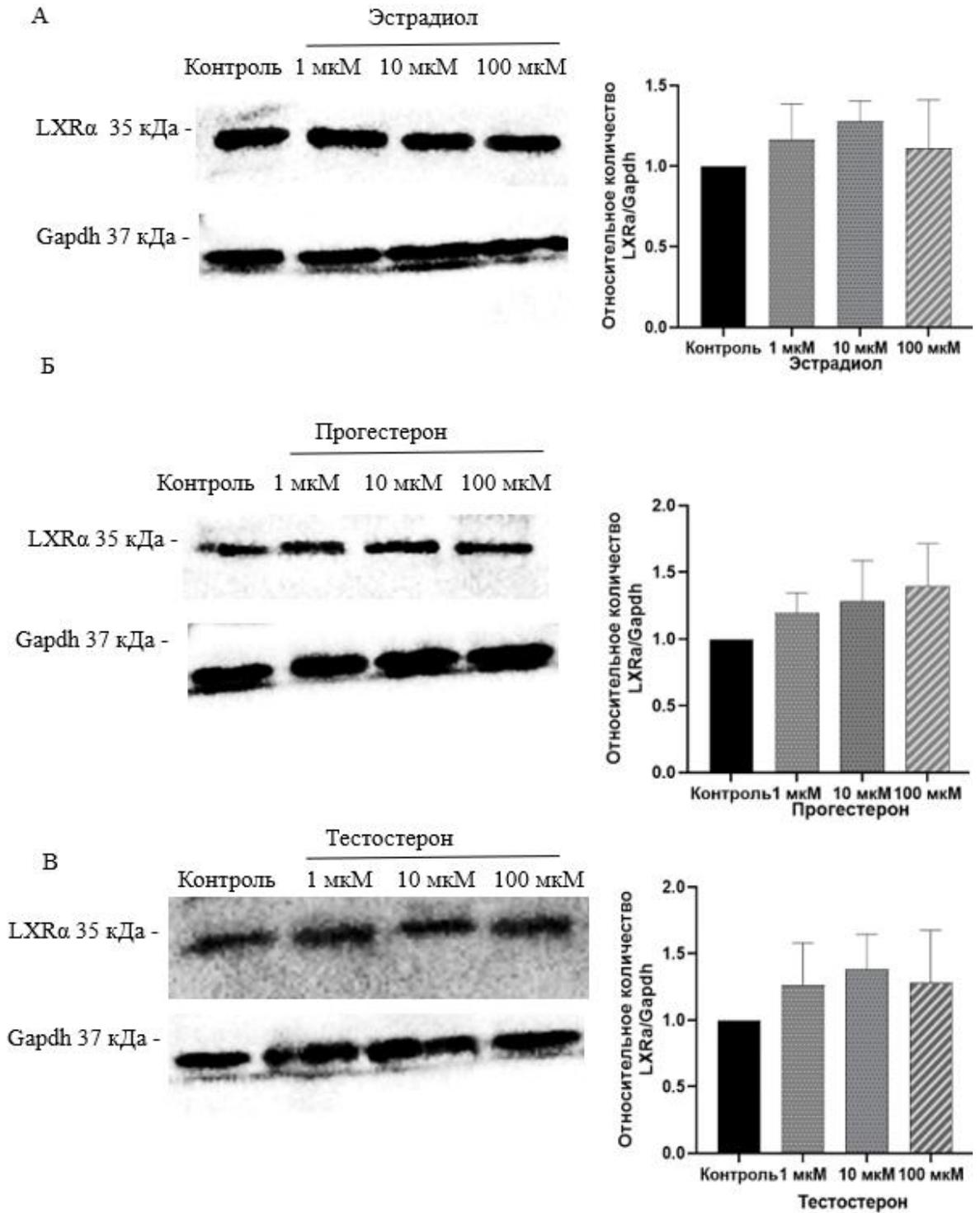


Рисунок 32 – Влияние половых гормонов (1-100 мкМ) на уровень LXR $\alpha$  в ядерной фракции клеток Сасо-2

Таким образом, эстрадиол повышает уровень CAR (концентрации 10 и 100 мкМ) и PXR (1, 10 и 100 мкМ) в ядерной фракции лизата клеток Сасо-2, прогестерон увеличивает содержание PXR (10 и 100 мкМ) и FXR (1, 10, 100 мкМ),

тестостерон повышает количество PXR и FXR (10 мкМ).

### **3.6. Влияние половых гормонов на относительное количество CAR, PXR, FXR, LXR $\alpha$ в ядерной фракции лизата клеток HepG2**

На клетках HepG2 были получены следующие результаты.

Эстрадиол в концентрациях 10 и 100 мкМ повышал уровень CAR на 30% ( $p=0,003$ ) и 36,4% ( $p=0,0001$ ) соответственно (Рисунок 33 А). Прогестерон не влиял на экспрессию CAR в клетках HepG2 (Рисунок 33Б). Тестостерон в концентрации 1 мкМ не влиял на уровень CAR, в концентрациях 10 и 100 мкМ снижал его на 31,9% ( $p=0,0004$ ) и 37,1% ( $p=0,0002$ ) соответственно (Рисунок 33В).

Эстрадиол в концентрациях 1, 10 и 100 мкМ не влиял на уровень PXR в клетках HepG2 (Рисунок 34А). Прогестерон в концентрациях 10 и 100 мкМ повышал уровень PXR на 53% ( $p<0,0001$ ) и 57,6% ( $p<0,0001$ ) соответственно (Рисунок 34Б). Тестостерон увеличивал уровень PXR на 116,3% и 88,5% ( $p<0,0001$  для обеих групп) в концентрациях 10 и 100 мкМ соответственно (Рисунок 34В).

Эстрадиол в концентрациях 1, 10 и 100 мкМ повышал уровень FXR на 26,2% ( $p=0,05$ ), 37,3% ( $p=0,03$ ) и 64,4% ( $p=0,0007$ ) соответственно (Рисунок 35А). Прогестерон в концентрациях 1 и 10 мкМ повышал уровень FXR на 162,5% ( $p<0,0001$ ) и 128,8% ( $p<0,0001$ ) соответственно (Рисунок 35Б). Тестостерон в концентрациях 1, 10 и 100 мкМ приводил к повышению уровня FXR на 207% ( $p<0,0001$ ), 195,1% ( $p<0,0001$ ) и 60,7% ( $p=0,008$ ) соответственно (Рисунок 35В).

Эстрадиол не влиял на уровень LXR $\alpha$  при всех протестированных концентрациях (Рисунок 36А). Прогестерон в концентрациях 1 и 10 мкМ вызывал повышение уровня LXR $\alpha$  на 75,2% ( $p<0,00001$ ) и 159,6% ( $p<0,0001$ ) соответственно (Рисунок 36Б), тестостерон повышал уровень LXR $\alpha$  только в концентрации 10 мкМ на 39,8% ( $p<0,0096$ ) (Рисунок 36В).

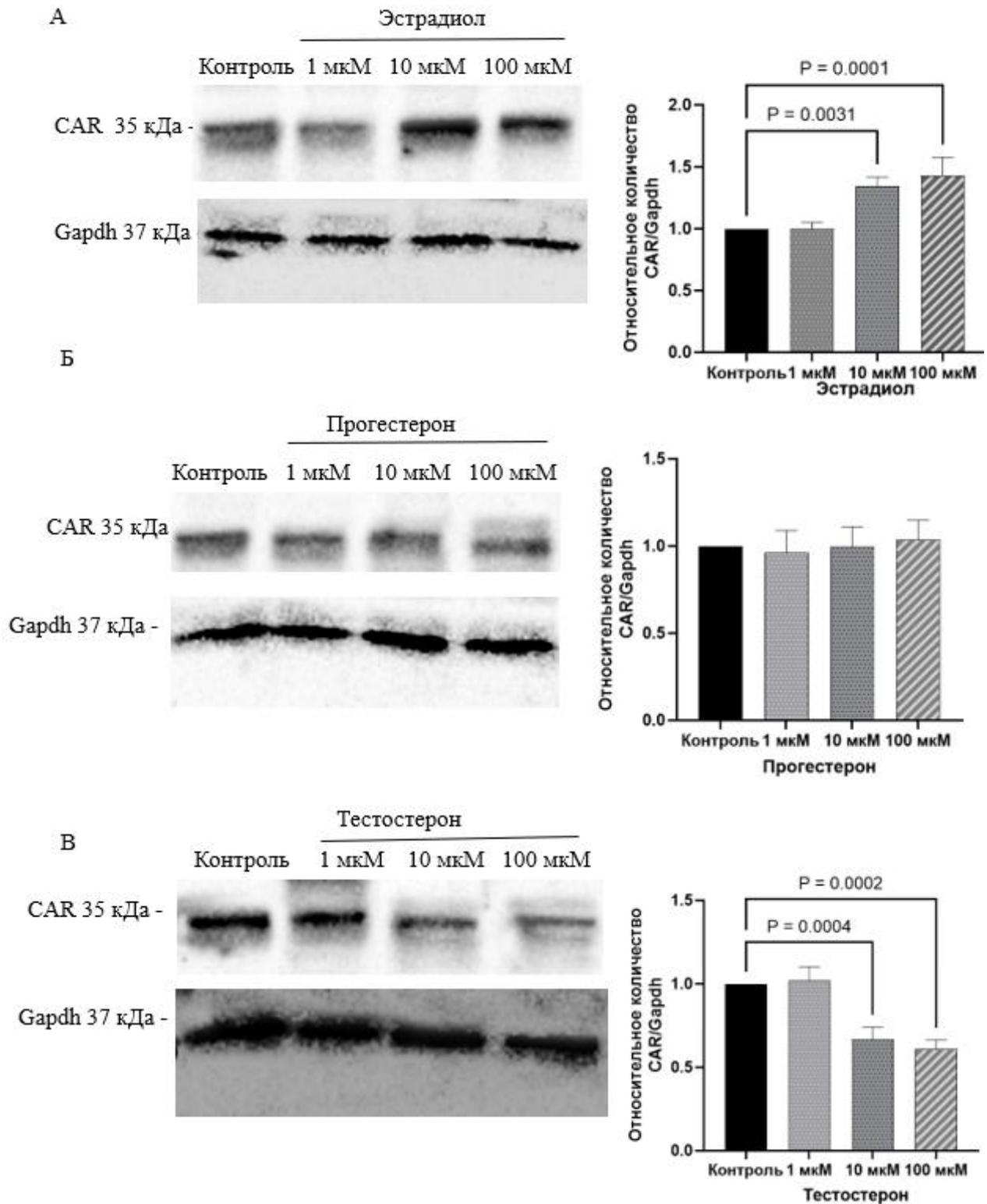


Рисунок 33 – Влияние половых гормонов (1-100 мкМ) на уровень CAR в ядерной фракции клеток HepG2

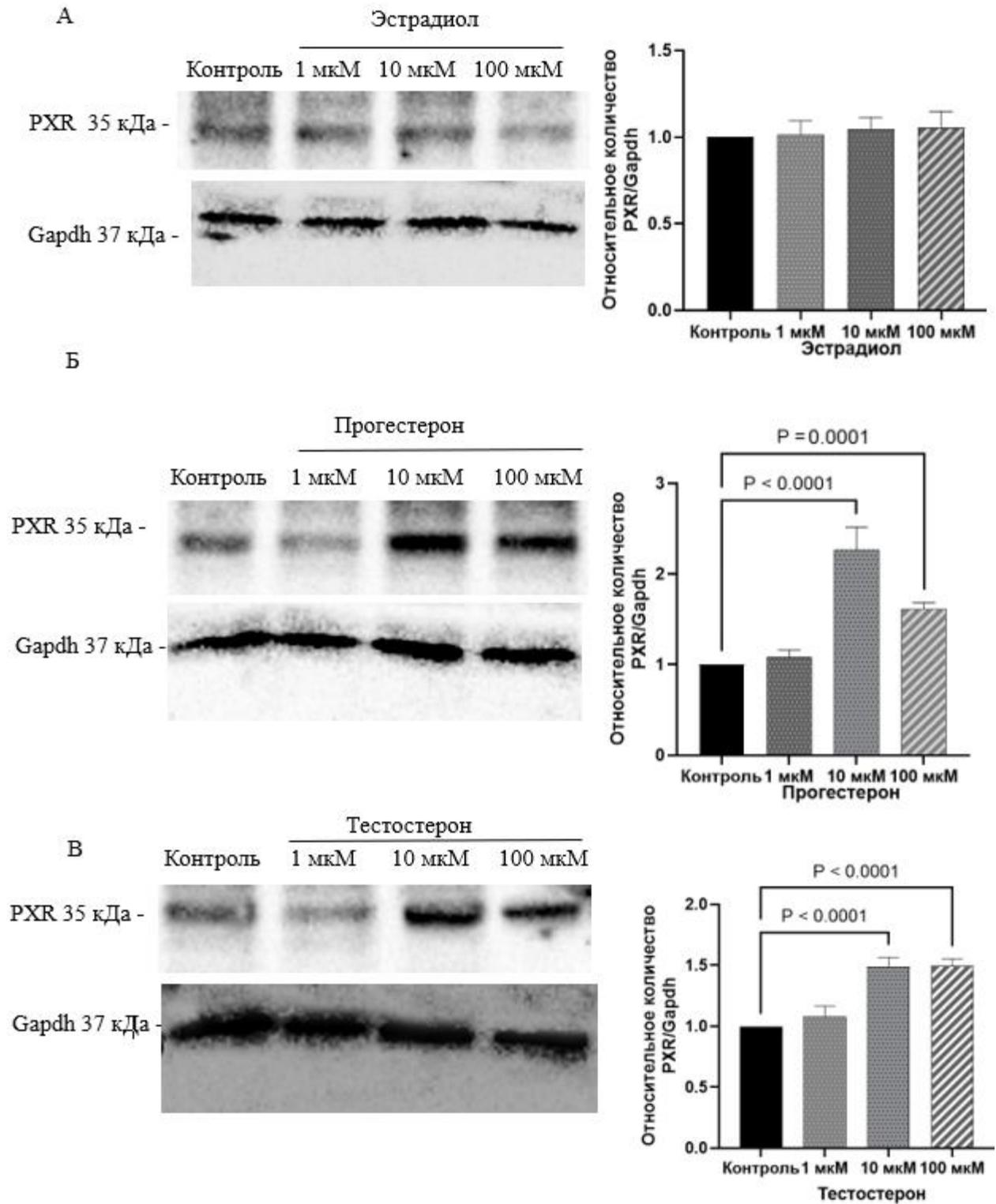


Рисунок 34 – Влияние половых гормонов (1-100 мкМ) на уровень PXR в ядерной фракции клеток HepG2

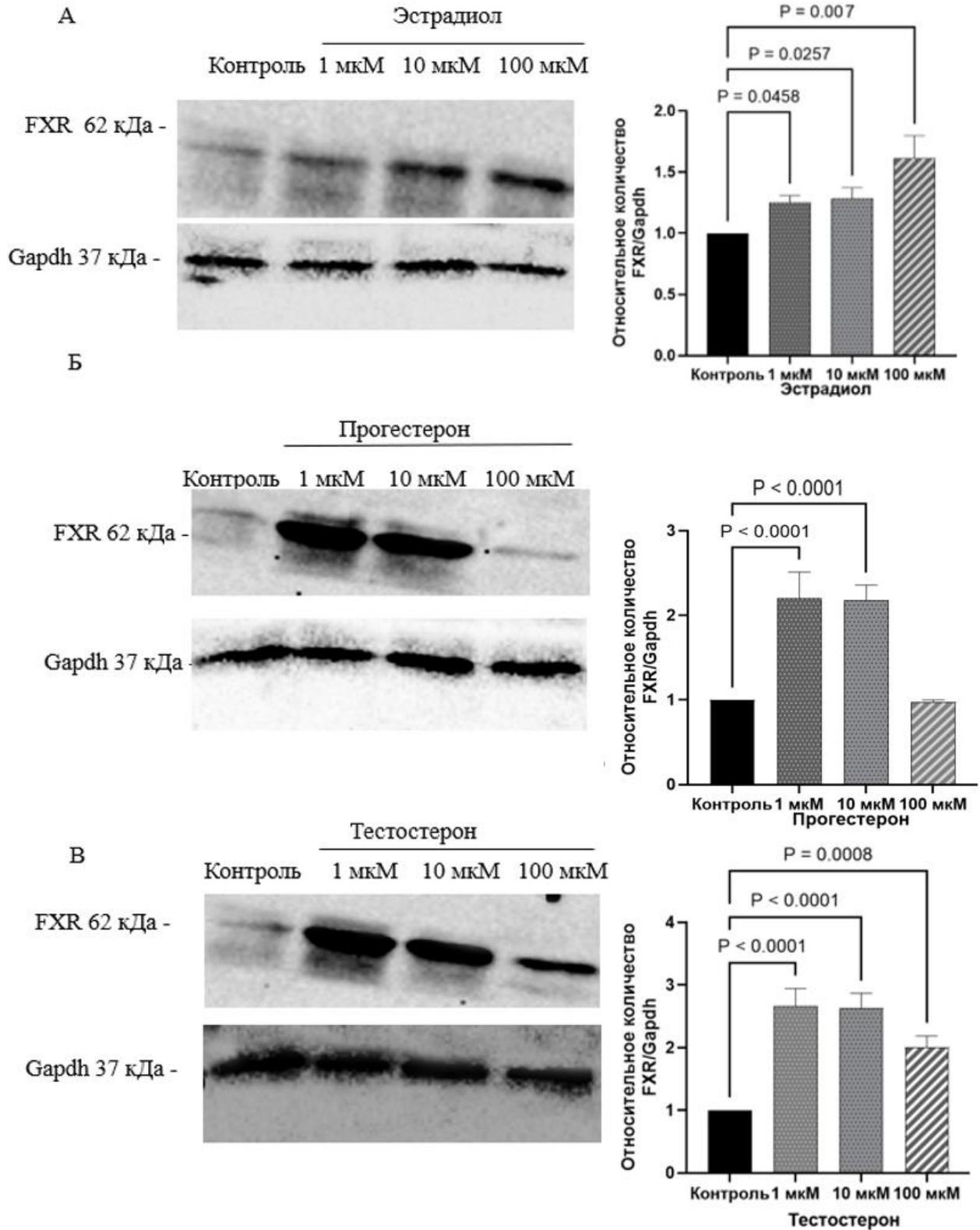


Рисунок 35 – Влияние половых гормонов (1-100 мкМ) на уровень FXR в ядерной фракции клеток HepG2

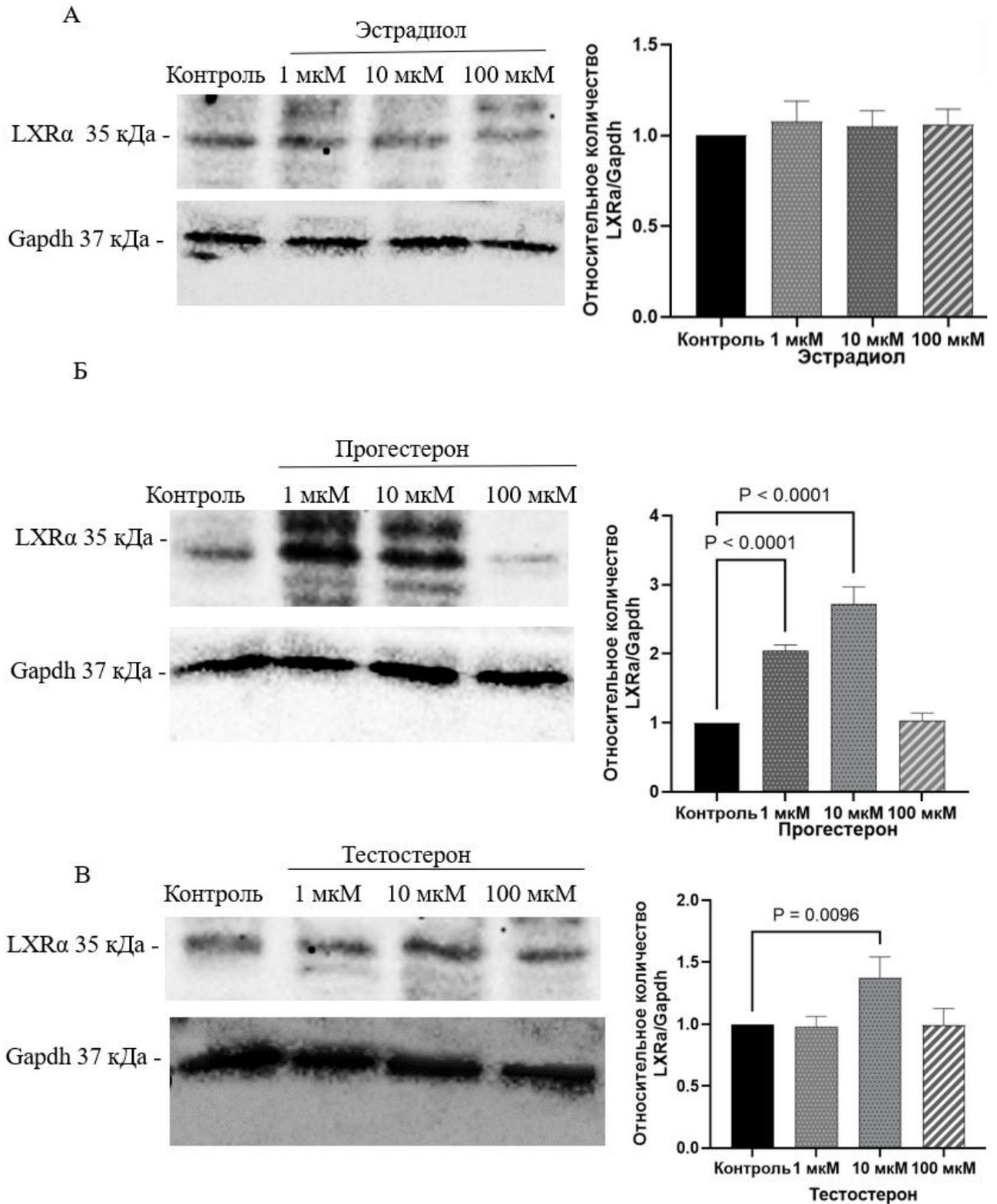


Рисунок 36 – Влияние половых гормонов (1-100 мкМ) на уровень LXR $\alpha$  в ядерной фракции клеток НерG2

Таким образом, эстрадиол в ядерной фракции лизата клеток НерG2 повышает уровень CAR (концентрации 10 и 100 мкМ) и FXR (1, 10 и 100 мкМ), прогестерон

увеличивает содержание PXR (концентрации 10 и 100 мкМ), FXR (1 и 10 мкМ), LXR $\alpha$  (1 и 10 мкМ), тестостерон снижает количество CAR (концентрации 10 и 100 мкМ), увеличивает количество PXR (10 и 100 мкМ), FXR (1, 10 и 100 мкМ) и LXR $\alpha$  (10 мкМ).

### **3.7. Влияние ингибиторов усыновленных рецепторов на базальный уровень изучаемых белков транспортеров**

Для оценки роли усыновленных рецепторов (CAR, PXR, FXR, LXR $\alpha$ ) во влиянии половых гормонов на изучаемые белки-транспортеры применяли специфические ингибиторы данных рецепторов.

Вначале оценивали влияние ингибиторов усыновленных рецепторов (CINPA 1 – ингибитор CAR, кетоконазол – ингибитор PXR, TFCA – ингибитор LXR $\alpha$ ,  $\beta$ -ХК – ингибитор FXR) на базальный уровень изучаемых белков транспортеров.

Ингибитор CAR – CINPA 1 снижал относительное количество Pgr на 38,7% ( $p=0,048$ ) по сравнению с контролем в клетках линии Caco-2. Остальные ингибиторы статистически значимого влияния на уровень Pgr не оказали (Рисунок 37А).

Все ингибиторы изучаемых усыновленных рецепторов (CAR, PXR, FXR, LXR $\alpha$ ) статистически значимо не влияли на содержание BCRP в клетках линии Caco-2 (Рисунок 37Б).

Оценка влияния ингибиторов усыновленных рецепторов CAR, PXR, FXR, LXR $\alpha$  на количество транспортеров OATP1B1 и OATP1B3 в клетках HepG2 показала отсутствие статистически значимого эффекта (Рисунок 37В, Г).

Таким образом, ингибитор CAR – CINPA 1 снижает относительное количество Pgr по сравнению с контролем. Остальные ингибиторы усыновленных рецепторов значимого влияния на уровень изучаемых транспортеров не оказывают.

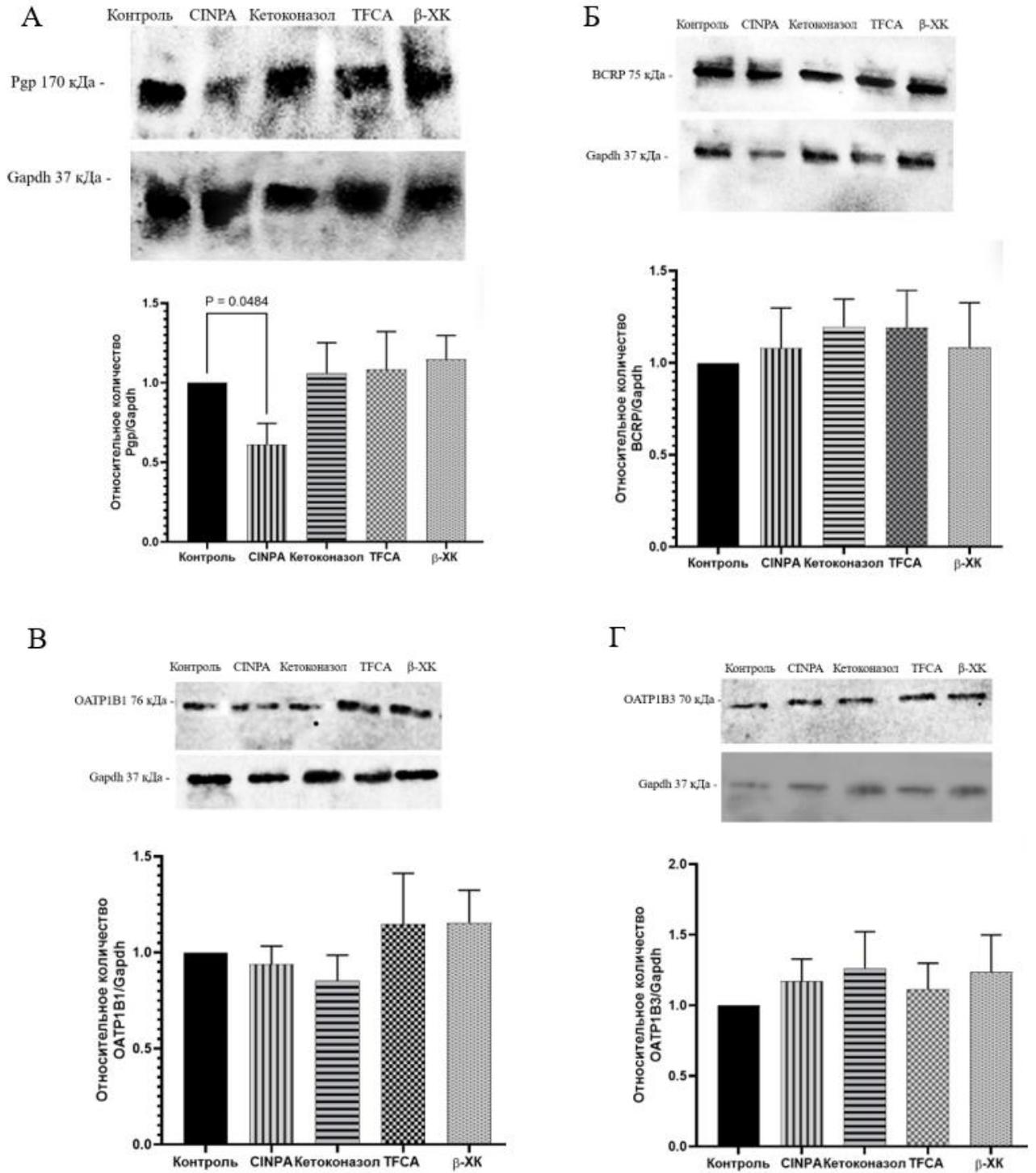


Рисунок 37 – Влияние ингибиторов усыновленных рецепторов (CAR, PXR, FXR, LXRA) на уровень Pgr (А), BCRP (Б), ОАТР1В1 (В), ОАТР1В3 (Г) в клетках Сасо-2

Примечание – CINPA1 – ингибитор CAR, кетоконазол – ингибитор PXR, TFCA – ингибитор LXR $\alpha$ ,  $\beta$ -ХК – ингибитор FXR

### 3.8. Роль усыновленных рецепторов в регуляции Pgr половыми гормонами

При оценке роли CAR, PXR, FXR, LXR $\alpha$  в механизмах регуляции Pgr в клетках линии Caco-2 были получены следующие результаты (Рисунок 38).

Эстрадиол в концентрации 10 и 100 мкМ вызывал повышение относительного количества Pgr на 67,1% ( $p=0,014$ ) и на 71,63% ( $p=0,0024$ ).

Ингибитор CAR CINPA 1 нивелировал индуцирующее действие эстрогена на уровень Pgr: количество белка-транспортера при комбинировании CINPA 1 с эстрадиолом достоверно не отличалось от значений контроля.

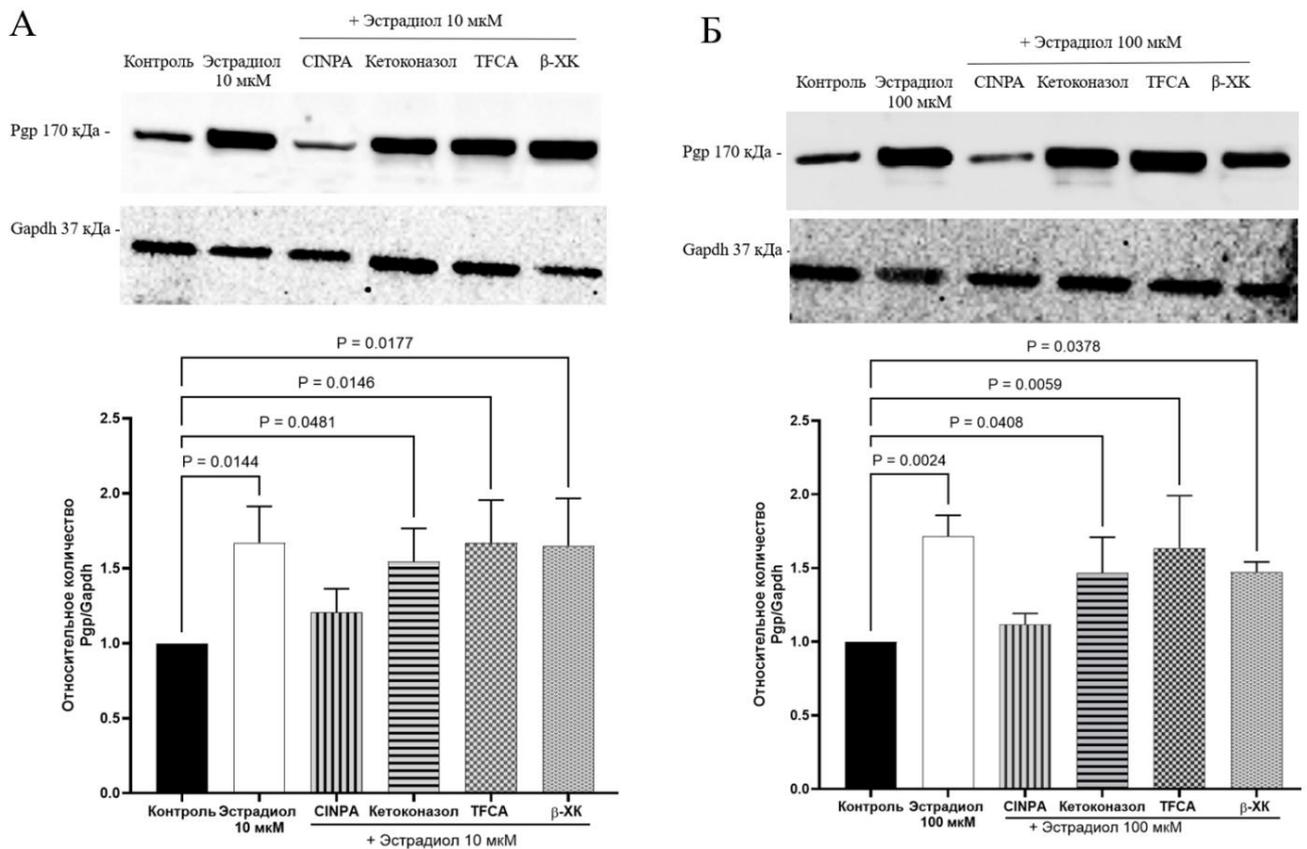


Рисунок 38 – Влияние ингибиторов усыновленных рецепторов на индуцирующее действие эстрадиола на уровень Pgr

Примечание – CINPA – ингибитор CAR, кетоконазол – ингибитор PXR, TFCA – ингибитор LXR $\alpha$ , β-ХК – ингибитор FXR

В то же время ингибитор PXR – кетоконазол, ингибитор FXR – тауро-β-холевая кислота и ингибитор LXR $\alpha$  – TFCA существенно не влияли на способность эстрадиола повышать уровень белка-транспортера: количество Pgr при

воздействии комбинации ингибитор (перечисленные выше)-эстрадиол превышало значения контроля при концентрации эстрадиола 10 мкМ на 54,5% ( $p=0,048$ ), 65,0% ( $p=0,018$ ), 67,0% ( $p=0,015$ ) (Рисунок 38А) и при концентрации эстрадиола 100 мкМ на 46,7% ( $p=0,041$ ), 47,3% ( $p=0,038$ ), 63,6% ( $p=0,006$ ) (Рисунок 38Б) соответственно.

Прогестерон в концентрации 100 мкМ повышал уровень Pgr на 95,7% ( $p=0,0008$ ). Кетоконазол и CINPA 1 нивелировали индуцирующее действие прогестерона на количество Pgr: уровень белка-транспортера при совместном применении кетоконазола и прогестерона, CINPA1 и прогестерона статистически значимо не отличался от показателей контроля. В то же время ингибиторы FXR и LXR $\alpha$  существенного влияния на индуцирующее действие прогестерона не оказали, относительное количество Pgr превышало в данных сериях показатели контроля на 77,9% ( $p=0,004$ ) и 61,7% ( $p=0,019$ ) соответственно (Рисунок 39).

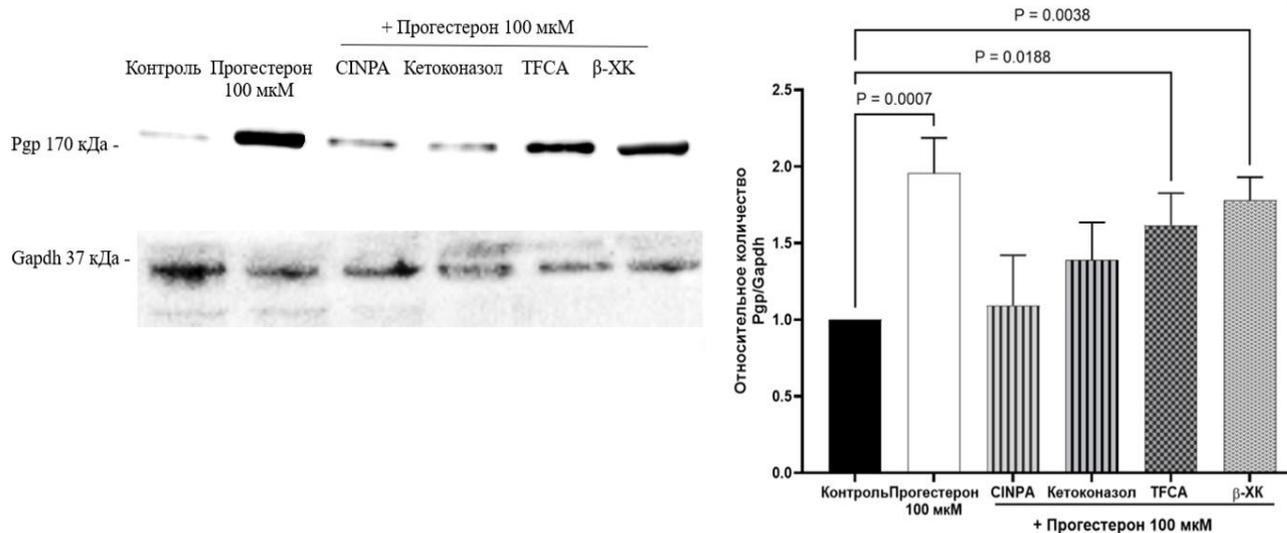


Рисунок 39 – Влияние ингибиторов усыновленных рецепторов на индуцирующее действие прогестерона на уровень Pgr

Примечание – CINPA – ингибитор CAR, кетоконазол – ингибитор PXR, TFCA – ингибитор LXR $\alpha$ ,  $\beta$ -ХК – ингибитор FXR

Тестостерон в концентрациях 10 и 100 мкМ вызывал снижение уровня Pgr на 45,2% ( $p=0,016$ ) и 39,4% ( $p=0,049$ ) соответственно. Применение всех ингибиторов (рецепторов CAR, PXR, FXR и LXR $\alpha$ ) не влияло на подавляющее

действие тестостерона на уровень Pgr, так при концентрации андрогена 10 мкМ относительное количество Pgr снижалось на 39,1% ( $p=0,038$ ), 44,4% ( $p=0,018$ ), 43,7% ( $p=0,02$ ) и 38,7% ( $p=0,04$ ) при применении CINPA 1, кетоконазола,  $\beta$ -ХК и TFCA, при концентрации 100 мкМ – на 47,2% ( $p=0,018$ ), 46,2% ( $p=0,02$ ), 44,6% ( $p=0,025$ ) и 45,7% ( $p=0,021$ ) по сравнению с контролем соответственно (Рисунок 40).

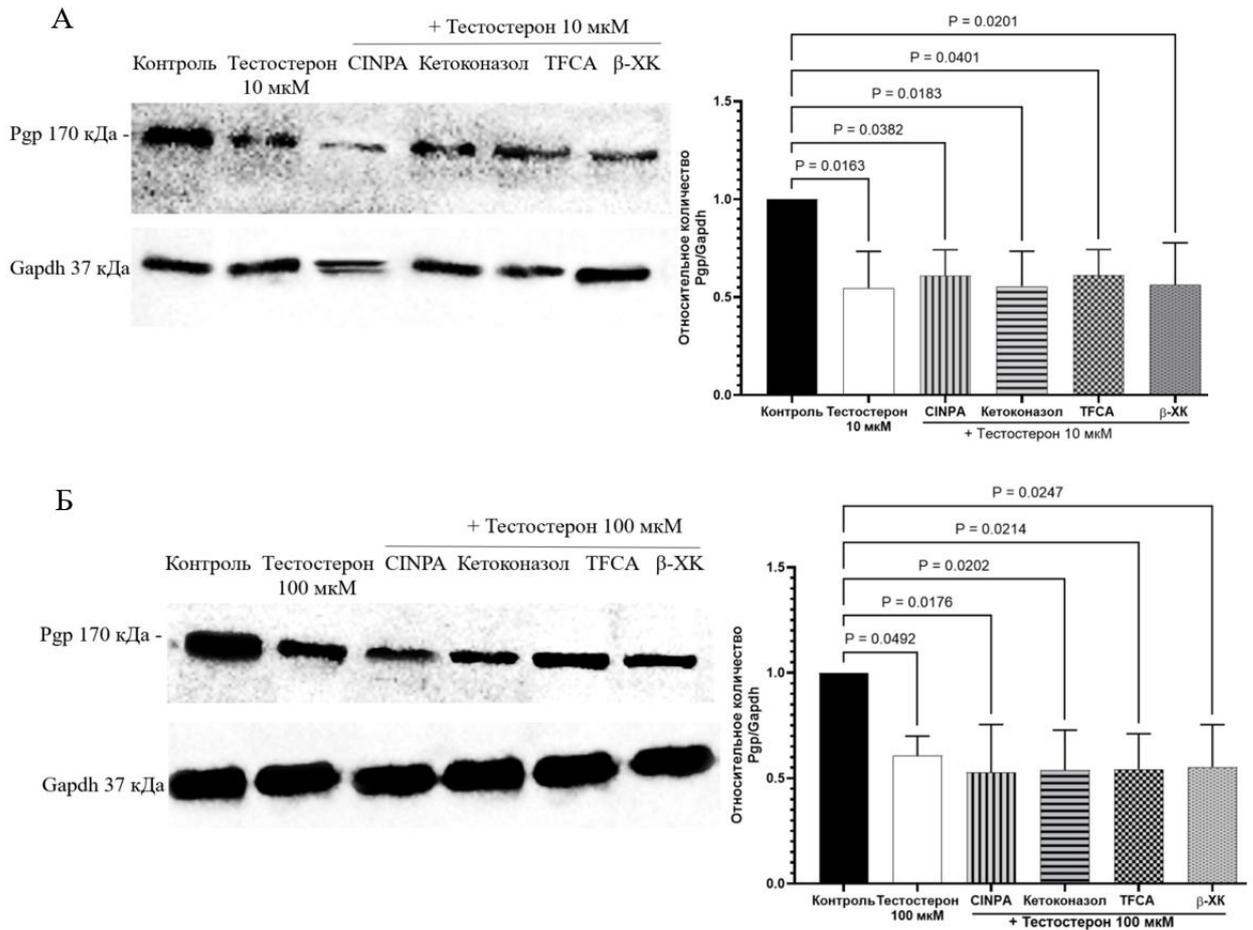


Рисунок 40 – Влияние ингибиторов усыновленных рецепторов на подавляющее действие тестостерона на уровень Pgr

Примечание: CINPA – ингибитор CAR, кетоконазол – ингибитор PXR, TFCA – ингибитор LXR $\alpha$ ,  $\beta$ -ХК – ингибитор FXR

Таким образом, ингибитор CAR CINPA 1 нивелирует индуцирующее действие эстрадиола (10 и 100 мкМ) на количество Pgr, ингибитор PXR - кетоконазол и ингибитор CAR CINPA 1 компенсируют индуцирующее действие прогестерона (100 мкМ) на количество Pgr, что свидетельствует о роли указанных

ядерных рецепторов в регуляции синтеза данного белка-транспортера.

### **3.9. Роль усыновленных рецепторов в регуляции VCRP половыми гормонами**

При оценке роли CAR, PXR, FXR, LXR $\alpha$  в механизмах регуляции VCRP в клетках линии Caco-2 были получены следующие результаты.

Эстрадиол в концентрации 1 мкМ вызывал увеличение относительного количества VCRP в клетках Caco-2 на 102,7% ( $p=0,001$ ), в концентрации 10 мкМ – на 119,3% ( $p=0,0003$ ), в концентрации 100 мкМ – на 122,1% ( $p=0,004$ ) по сравнению с контролем соответственно.

При концентрации эстрадиола 1 мкМ ингибирование всех изучаемых усыновленных рецепторов не влияло на индуцирующее действие эстрогена: при комбинации эстрадиола с CINPA 1 уровень VCRP увеличивался на 61,1% ( $p=0,0376$ ), при комбинации эстрадиола с кетоконазолом – на 60,4% ( $p=0,04$ ), при комбинации эстрадиолом с тауро- $\beta$ -холевой кислотой – на 112,2% ( $p<0,001$ ), при комбинации эстрадиола с TFCA – на 96,6% ( $p=0,0017$ ) по сравнению с контролем (Рисунок 41А).

При концентрации эстрадиола 10 мкМ ингибитор CAR – CINPA1 и ингибитор PXR – кетоконазол вызывали снижение количества VCRP в клетках линии Caco-2: при воздействии эстрадиола в концентрации 10 мкМ на 25,5% ( $p=0,075$ ) и 25,7% ( $p=0,072$ ) соответственно по сравнению с изолированным применением эстрогена, однако уровень транспортера оставался повышенным относительно контроля на 63,3% ( $p=0,038$ ) и 62,9% ( $p=0,039$ ) соответственно (Рисунок 41Б).

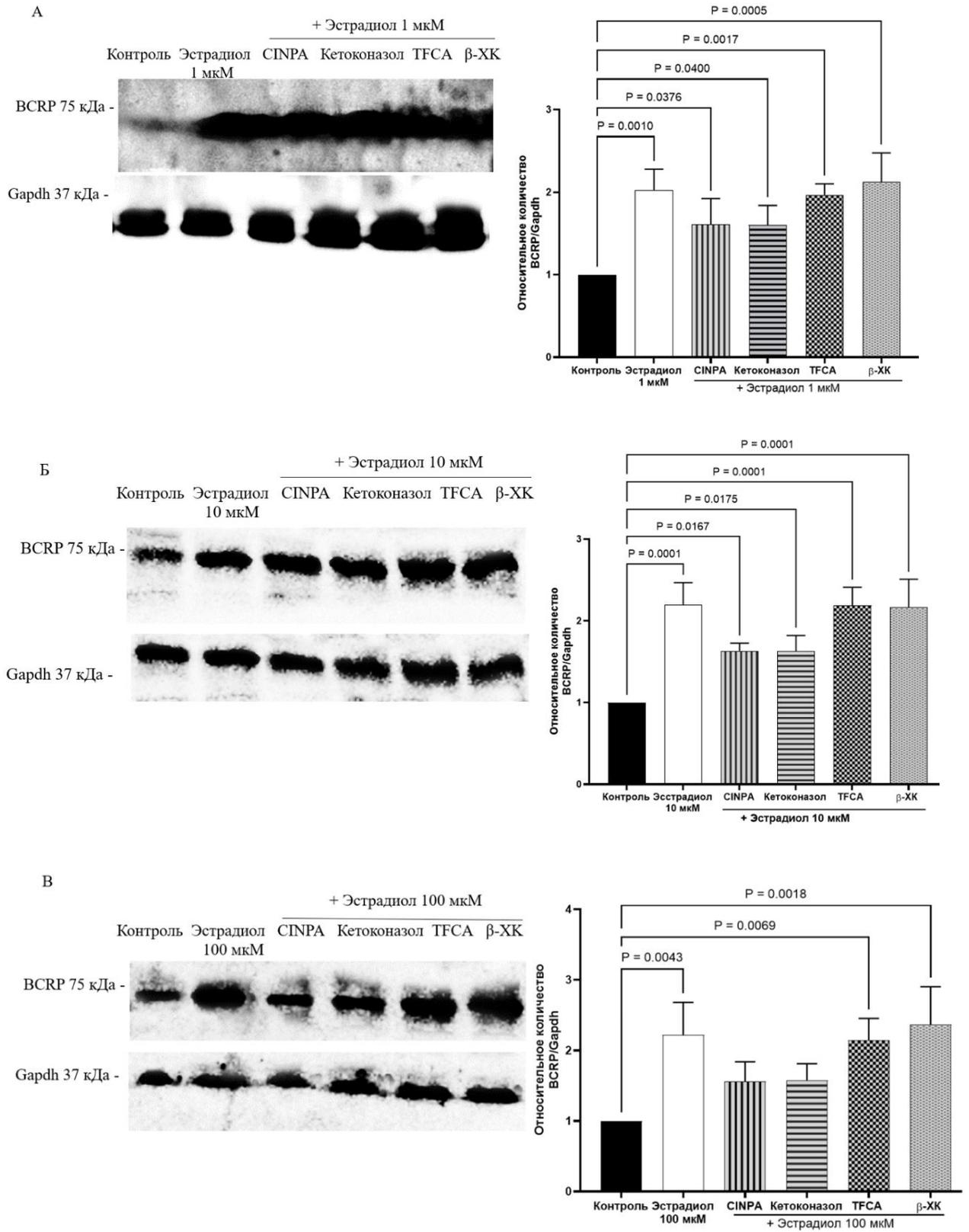


Рисунок 41 – Влияние ингибиторов усыновленных рецепторов на индуцирующее действие эстрадиола на уровень BCRP

Примечание: CINPA – ингибитор CAR, кетоконазол – ингибитор PXR, TFCA – ингибитор LXRα, β-ХК – ингибитор FXR

Ингибитор LXR $\alpha$  – TFCA и ингибитор FXR – тауро- $\beta$ -холевая кислота достоверного эффекта на индуцирующее действие эстрадиола (10 мкМ) не оказали, относительное количество BCRP превышало показатели контроля на 118,9% ( $p < 0,001$ ) и 116,5% ( $p < 0,001$ ) соответственно и значимо от серии изолированного применения гормона не отличалось (Рисунок 41Б).

При концентрации эстрадиола 100 мкМ ингибитор CAR – CINPA1 и ингибитор PXR – кетоконазол предотвращали повышение относительного количества BCRP, оно достоверно не отличалось от показателей контроля.

Ингибитор LXR $\alpha$  – TFCA и ингибитор FXR – тауро- $\beta$ -холевая кислота значимого эффекта на индуцирующее действие эстрадиола (100 мкМ) не оказали, относительное количество BCRP превышало показатели контроля на 114,4% ( $p = 0,0069$ ) и на 136,6% ( $p = 0,0018$ ) соответственно (Рисунок 41В).

Прогестерон в клетках линии Сасо-2 в концентрациях 1, 10 и 100 мкМ повышал относительное количество BCRP на 126,0% ( $p < 0,001$ ), 101,0% ( $p = 0,02$ ) и 99,9% ( $p < 0,001$ ) соответственно.

При концентрации прогестерона 1 мкМ ингибитор PXR кетоконазол предотвращал повышение количества BCRP по сравнению с контролем, а ингибиторы других усыновленных рецепторов CINPA 1, тауро- $\beta$ -холевая кислота и TFCA существенного эффекта на действие прогестерона не оказали – уровень BCRP превышал показатели контроля на 85,4% ( $p = 0,01$ ), 69,7% ( $p = 0,036$ ) и 99,9% ( $p = 0,003$ ) соответственно для каждой серии (Рисунок 42А).

При концентрации прогестерона 10 мкМ ингибитор PXR – кетоконазол и ингибитор FXR - тауро- $\beta$ -холевая кислота препятствовали повышению уровня BCRP под действием прогестерона, его относительное количество достоверно не отличалось от показателей контроля.

Ингибитор CAR – CINPA1 и ингибитор LXR $\alpha$  – TFCA значимого эффекта на индуцирующее действие прогестерона (10 мкМ) не оказали, относительное количество BCRP превышало показатели контроля соответственно на 87,4% ( $p = 0,048$ ) и 92,7% ( $p = 0,035$ ) (Рисунок 42Б).

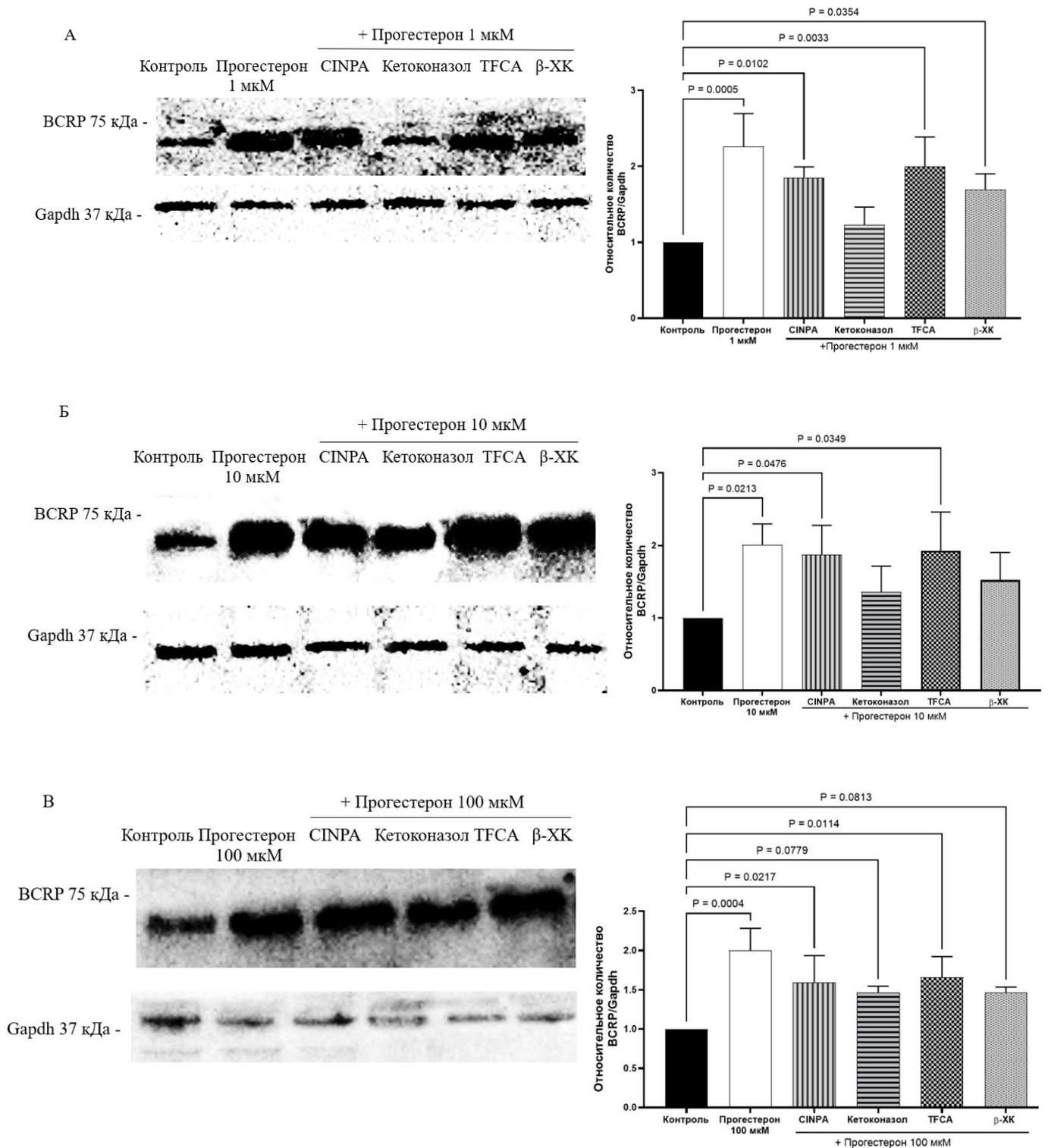


Рисунок 42 – Влияние ингибиторов усыновленных рецепторов на индуцирующее действие прогестерона на уровень BCRP

Примечание – CINPA – ингибитор CAR, кетоконазол – ингибитор PXR, TFCA – ингибитор LXR $\alpha$ , β-ХК – ингибитор FXR

При концентрации прогестерона 100 мкМ аналогичным образом ингибиторы PXR и FXR препятствовали повышению количества BCRP под действием

прогестерона, а ингибиторы CAR – CINPA1 и ингибитор LXR $\alpha$  – TFCA достоверного эффекта на индуцирующее действие прогестерона (100 мкМ) не оказали, относительное количество BCRP превышало показатели контроля соответственно на 59,4% ( $p=0,022$ ) и на 65,8% ( $p=0,011$ ) (Рисунок 42В).

Тестостерон во всех концентрациях 1, 10 и 100 мкМ повышал относительное количество BCRP на 140,3% ( $p=0,0017$ ), 118,7% ( $p=0,0015$ ) и 108,9% ( $p=0,001$ ) по сравнению с контролем соответственно.

Ингибитор PXR – кетоконазол и ингибитор FXR – тауро- $\beta$ -холевая кислота предотвращали индуцирующее действие тестостерона (1 мкМ), а ингибитор CAR – CINPA1 и ингибитор LXR $\alpha$  – TFCA достоверного эффекта на стимулирующее действие тестостерона не оказали, относительное количество BCRP превышало показатели контроля на 93,78% ( $p=0,028$ ) и 142,5% ( $p=0,0015$ ) соответственно (Рисунок 43А).

При концентрации тестостерона 10 мкМ аналогичным образом кетоконазол и тауро- $\beta$ -холевая кислота предотвращали индуцирующее действие тестостерона. Ингибиторы CAR и LXR $\alpha$  достоверного эффекта на стимулирующее действие тестостерона не оказали, относительное количество BCRP превышало показатели контроля на 80,6% ( $p=0,023$ ) и на 108,3% ( $p=0,003$ ) соответственно (Рисунок 43Б).

При концентрации тестостерона 100 мкМ все протестированные ингибиторы усыновленных рецепторы достоверного эффекта на индуцирующее действие андрогена не оказали: при комбинации тестостерона с CINPA 1 относительное количество BCRP увеличивалось на 69,7% ( $p=0,024$ ), при комбинации тестостерона с кетоконазолом – на 65,9% ( $p=0,032$ ), при комбинации тестостерона с тауро- $\beta$ -холевой кислотой на 83,8% ( $p=0,007$ ), при комбинации тестостерона с TFCA – на 96,9% ( $p=0,0024$ ) (Рисунок 43В).

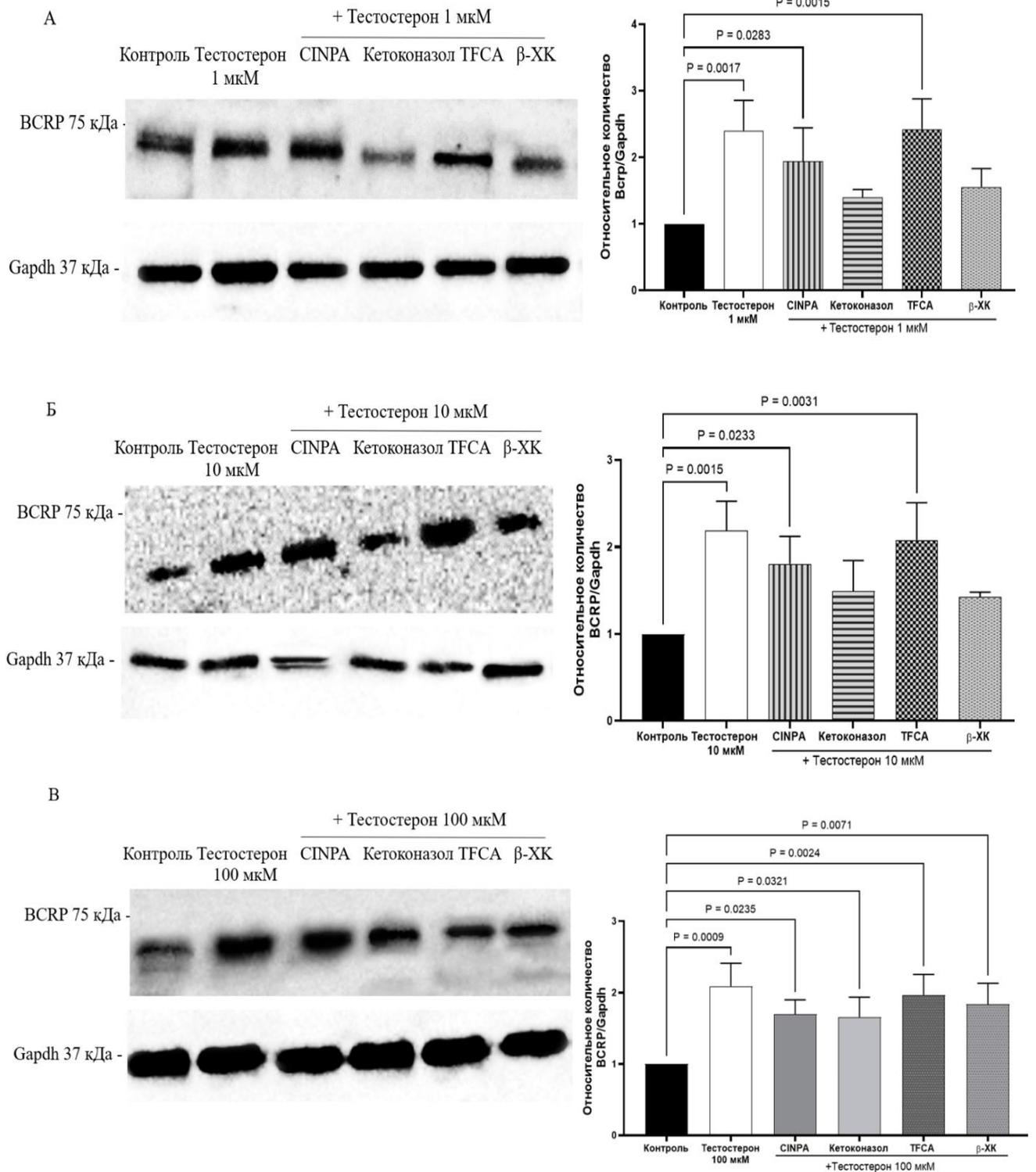


Рисунок 43 – Влияние ингибиторов усыновленных рецепторов на индуцирующее действие тестостерона на уровень BCRP

Примечание – CINPA – ингибитор CAR, кетоконазол – ингибитор PXR, TFCA – ингибитор LXR $\alpha$ , β-ХК – ингибитор FXR

Таким образом, ингибитор CAR – CINPA1 и ингибитор PXR – кетоконазол

при концентрации эстрадиола 100 мкМ предотвращают повышение относительного количества VCRP. При концентрациях прогестерона 1-100 мкМ ингибитор PXR кетоконазол нивелирует повышение количества VCRP по сравнению с контролем, ингибитор FXR – тауро-β-холевая кислота препятствует повышению уровня VCRP под действием прогестерона в концентрациях 10 и 100 мкМ. Ингибитор PXR – кетоконазол и ингибитор FXR – тауро-β-холевая кислота предотвращают индуцирующее действие тестостерона на количество VCRP в концентрациях 1 и 10 мкМ. Полученные результаты характеризуют участие рецепторов CAR, PXR, FXR в синтезе VCRP под действием половых гормонов.

### **3.10. Роль усыновленных рецепторов в регуляции OATP1B1 половыми гормонами**

На данном этапе работы выполнены эксперименты с использованием гормонов только в тех сериях и концентрациях, в которых было установлено их индуцирующее или ингибирующее влияние на относительное количество CAR, PXR, FXR, LXRα в ядерной фракции клеток. При оценке роли CAR, PXR, FXR, LXRα 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-TA не предотвратило индукцию OATP1B1, вызванную эстрадиолом. Относительное количество белка-транспортера превышало контрольные показатели на 31,7% ( $p=0,009$ ) при использовании гормона в концентрации 10 мкМ и на 28,1% ( $p=0,003$ ) при использовании эстрадиола в концентрации 100 мкМ (Рисунок 44). 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.

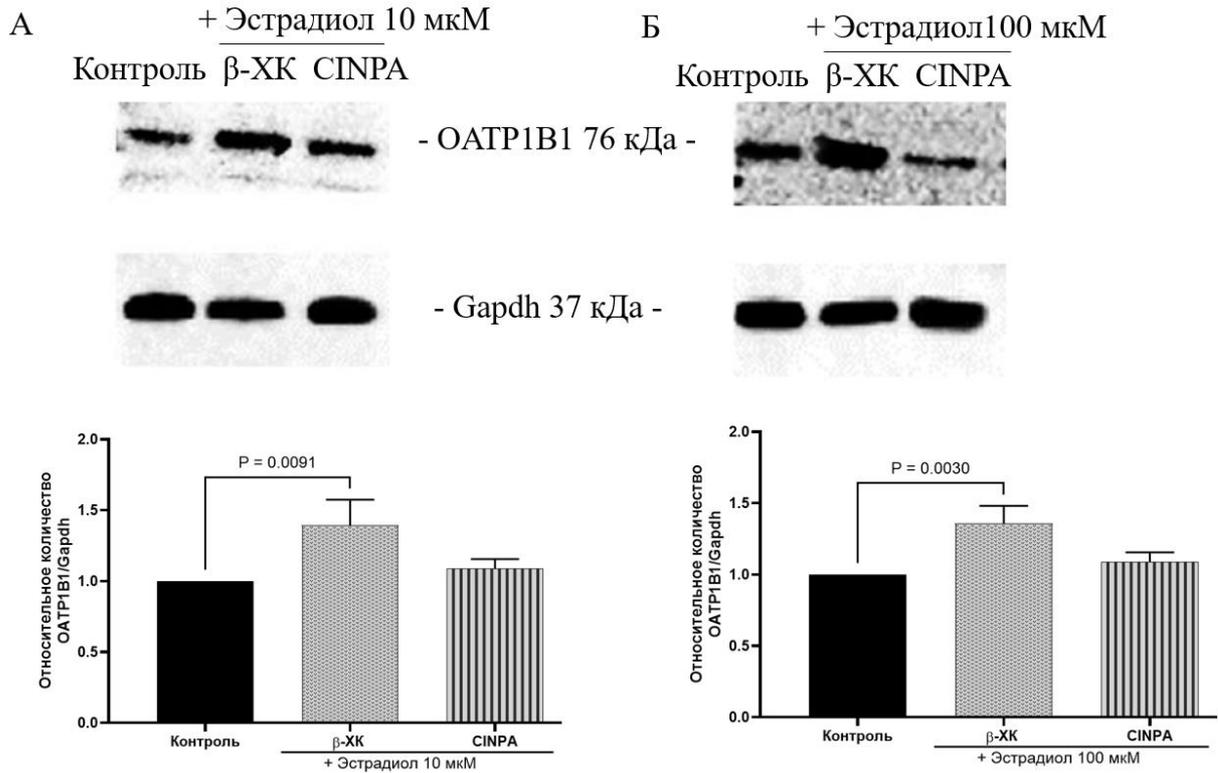


Рисунок 44 – Влияние ингибиторов усыновленных рецепторов на индуцирующее действие эстрадиола на уровень OATP1B1

Примечание – CINPA – ингибитор CAR, β-ХК – ингибитор FXR

Изолированное ингибирование FXR, PXR и LXR $\alpha$ , а также одновременное ингибирование исследуемых рецепторов не повлияло на подавляющее действие прогестерона на OATP1B1, количество белка-транспортера снизилось относительно контроля соответственно на 27,1% ( $p=0,004$ ), 24,1% ( $p=0,0004$ ), 30,6% ( $p<0,0001$ ) и 35,4% ( $p=0,0085$ ) при использовании прогестерона в концентрации 10 мкМ; на 21,2% ( $p=0,0012$ ), 30,5% ( $p=0,0003$ ), 34,3% ( $p=0,0002$ ) и 22,9% ( $p=0,0026$ ) при использовании прогестерона в концентрации 100 мкМ (Рисунок 45).

Полученные результаты свидетельствуют о том, что изученные ядерные рецепторы не участвуют в снижении относительного количества OATP1B1 под влиянием прогестерона.

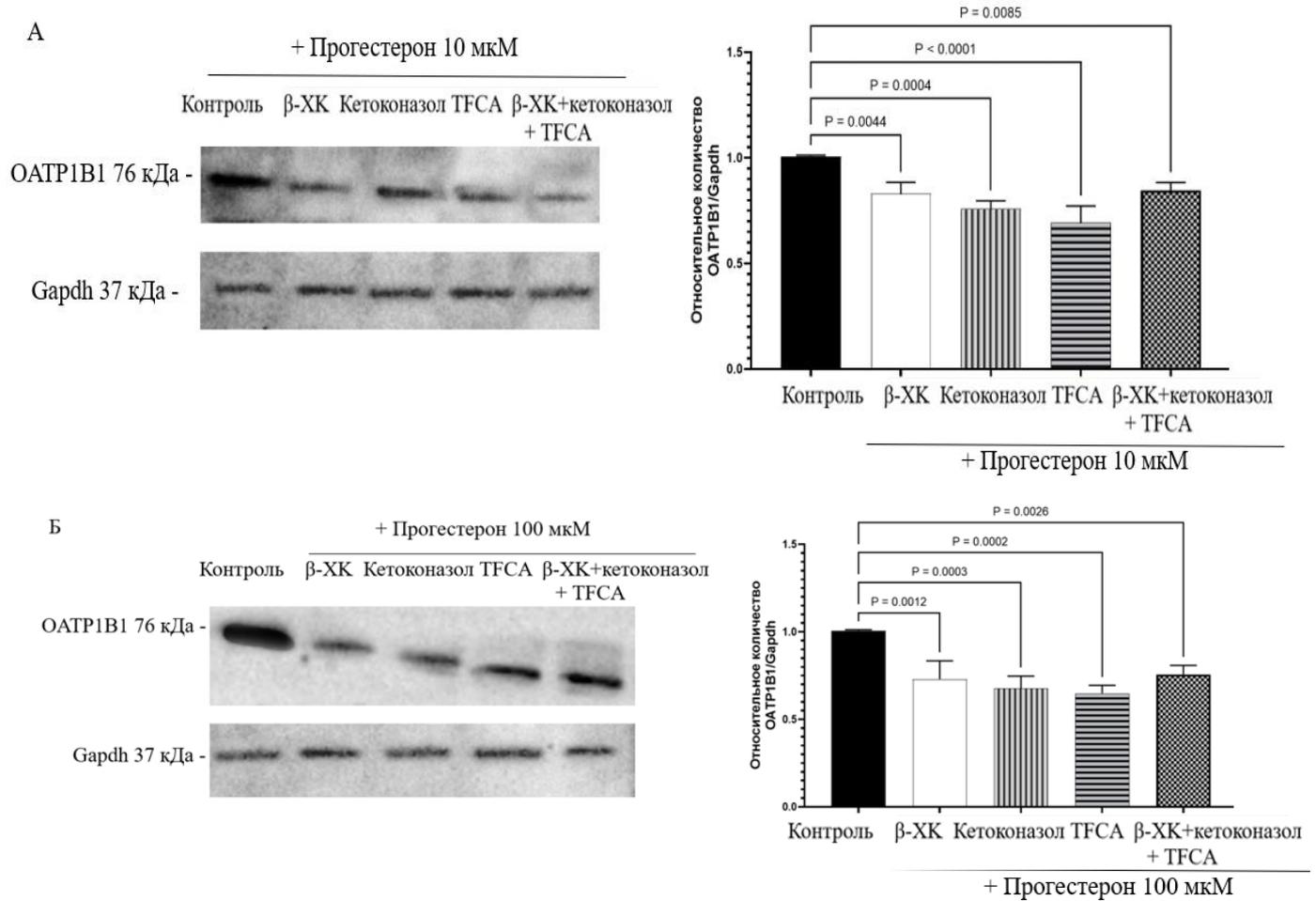


Рисунок 45 – Влияние ингибиторов усыновленных рецепторов на подавляющее действие прогестерона на уровень ОАТР1В1

Примечание – кетоконазол – ингибитор PXR, TFCA – ингибитор LXR $\alpha$ ,  $\beta$ -ХК – ингибитор FXR

Изолированное ингибирование FXR, CAR, PXR и LXR $\alpha$  не изменяло индуцирующее действие тестостерона на ОАТР1В1, уровень белка-транспортера превышал контрольные показатели соответственно на 85,2% ( $p=0,004$ ), 65,6% ( $p=0,02$ ), 60,2% ( $p=0,03$ ) и 63,4% ( $p=0,02$ ) при применении тестостерона в концентрации 10 мкМ; и на 71,1% ( $p=0,004$ ), 82,5% ( $p=0,001$ ), 118,0% ( $p<0,0001$ ) и 85,8% ( $p=0,0009$ ) при концентрации тестостерона 100 мкМ (Рисунок 46).

Учитывая полученные в ходе исследования данные о том, что тестостерон вызывает увеличение количества PXR, LXR $\alpha$  и FXR в ядерной фракции клеток, был проведен эксперимент с одновременным ингибированием трех рецепторов. Одновременное ингибирование FXR, PXR и LXR $\alpha$  предотвращало увеличение

экспрессии OATP1B1 под действием тестостерона в концентрациях 10 и 100 мкМ (Рисунок 47). Таким образом, по-видимому, все три рецептора – FXR, PXR и LXR $\alpha$  опосредуют индукцию OATP1B1 под действием тестостерона.

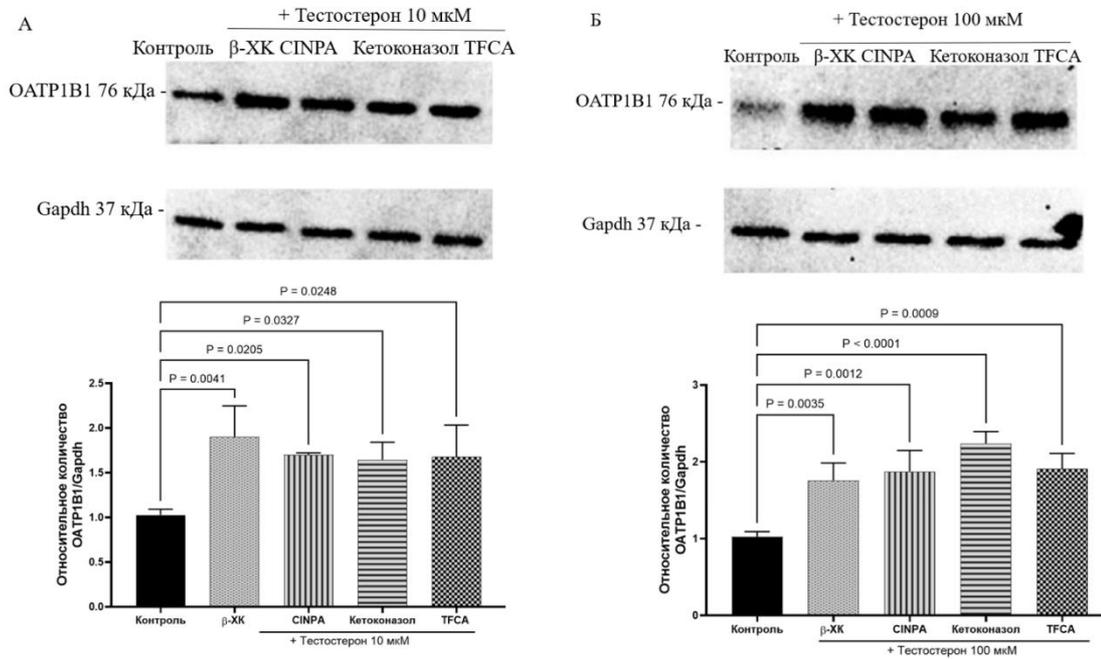


Рисунок 46 – Влияние ингибиторов усыновленных рецепторов на подавляющее действие тестостерона на уровень OATP1B1

Примечание – кетоконазол – ингибитор PXR, TFCA – ингибитор LXR $\alpha$ ,  $\beta$ -ТА – ингибитор FXR

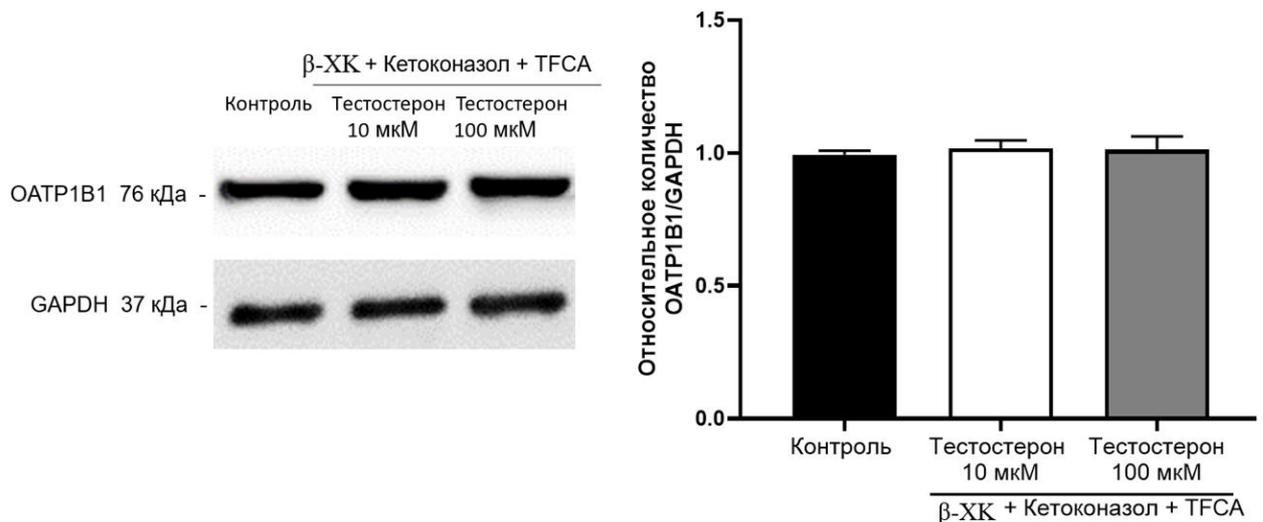


Рисунок 47 – Влияние комбинации ингибиторов усыновленных рецепторов на подавляющее действие тестостерона на уровень OATP1B1

Примечание – кетоконазол – ингибитор PXR, TFCA – ингибитор LXR $\alpha$ ,  $\beta$ -ТА – ингибитор FXR

### 3.11. Роль усыновленных рецепторов в регуляции OATP1B3 половыми гормонами

На данном этапе работы выполнены эксперименты с использованием гормонов в тех сериях и концентрациях, в которых было установлено модулирующее действие на относительное количество рецепторов в ядерной фракции клеток HepG2. При оценке роли CAR, PXR, FXR, LXR $\alpha$  в механизмах регуляции OATP1B3 в клетках линии HepG2 были получены следующие результаты. Эстрадиол в концентрациях 10 и 100 мкМ вызывал увеличение относительного количества OATP1B3 на 81,8% ( $p < 0,001$ ) и 122,9% ( $p = 0,019$ ) соответственно. В концентрации эстрадиола 10 мкМ ингибирование FXR снижало выраженность индукции OATP1B3 под действием гормона, уровень транспортера снижался на 28,9% ( $p = 0,0011$ ) по сравнению с изолированным воздействием эстрогена, однако превышал показатели контроля на 29,1% ( $p = 0,073$ ). Ингибирование остальных усыновленных рецепторов (CAR, PXR и LXR $\alpha$ ) на фоне эстрадиола (10 мкМ) статистически значимого эффекта не оказало, относительное количество OATP1B3 превышало показатели контроля на 103,7% ( $p < 0,001$ ), 99,6% ( $p < 0,001$ ) и 102,9% ( $p < 0,001$ ) соответственно (Рисунок 48А). 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 $\alpha$  на фоне эстрадиола (100 мкМ) статистически значимого эффекта не наблюдалось, относительное количество OATP1B3 превышало показатели контроля на 108,5% ( $p = 0,038$ ), 115,6% ( $p = 0,027$ ) и 129,6% ( $p = 0,013$ ) соответственно (Рисунок 48Б). Таким образом, FXR опосредует индуцирующий эффект эстрадиола на относительное количество OATP1B3 в клетках линии HepG2.

Тестостерон в концентрациях 1, 10 и 100 мкМ повышал количество OATP1B3 на 96,5% ( $p = 0,0082$ ), 111,9% ( $p = 0,0088$ ) и 137,9% ( $p = 0,0064$ ) относительно контроля соответственно. При концентрации тестостерона 1 мкМ ингибирование LXR $\alpha$  предотвращало индукцию OATP1B3, уровень транспортера достоверно не

отличался от контроля. Ингибирование CAR, PXR и FXR не влияло на эффект тестостерона, относительное количество транспортера увеличивалось на 113,5% ( $p=0,0025$ ), 95,9% ( $p=0,0086$ ) и 94,5% ( $p=0,0095$ ) соответственно (Рисунок 49А). Аналогичные результаты были получены и при концентрации тестостерона 10 мкМ, ингибирование LXR $\alpha$  предотвращало индукцию OATP1B3, а ингибирование CAR, PXR и FXR не влияло на индуцирующий эффект тестостерона, относительное количество транспортера увеличивалось на 94,1% ( $p=0,026$ ), 103,4% ( $p=0,0148$ ) и 104,1% ( $p=0,0141$ ) соответственно по сравнению с контролем (Рисунок 49Б).

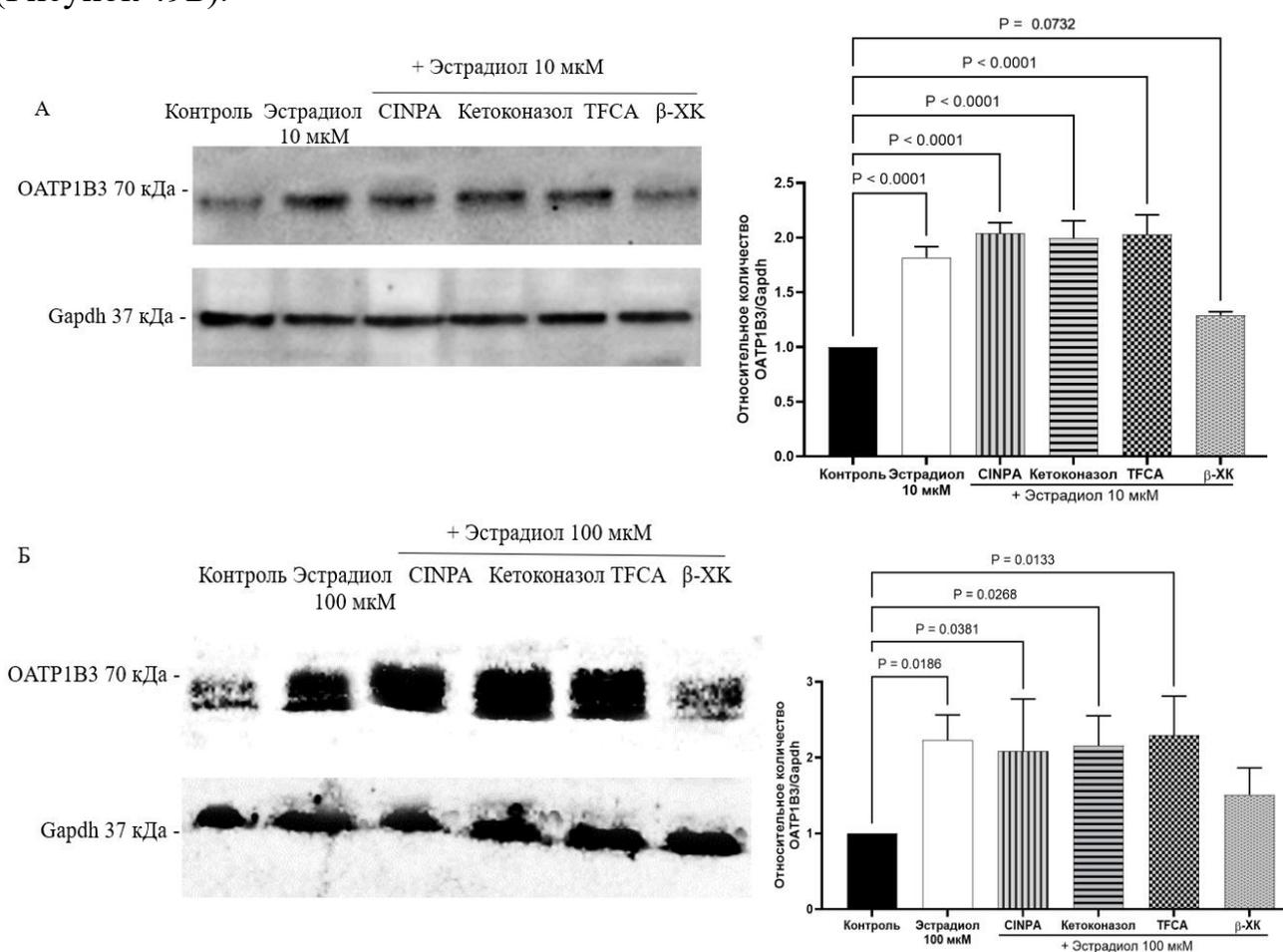


Рисунок 48 – Влияние ингибиторов усыновленных рецепторов на индуцирующее действие эстрадиола на уровень OATP1B3

Примечание – CINPA – ингибитор CAR, β-ХК – ингибитор FXR, кетоконазол – ингибитор PXR, TFCA – ингибитор LXR $\alpha$

В концентрации тестостерона 100 мкМ ингибирование рецепторов не влияло на индуцирующее действие андрогена, относительное количество OATP1B3 увеличивалось при комбинации тестостерона с CINPA 1 на 130,0% ( $p=0,0096$ ),

комбинации тестостерона с кетоконазолом на 111,5% ( $p=0,025$ ), комбинации тестостерона с TFCA на 94,78% ( $p=0,06$ ), комбинации тестостерона с тауро- $\beta$ -холевой кислотой на 112,5% ( $p=0,024$ ) относительно контроля (Рисунок 49В).

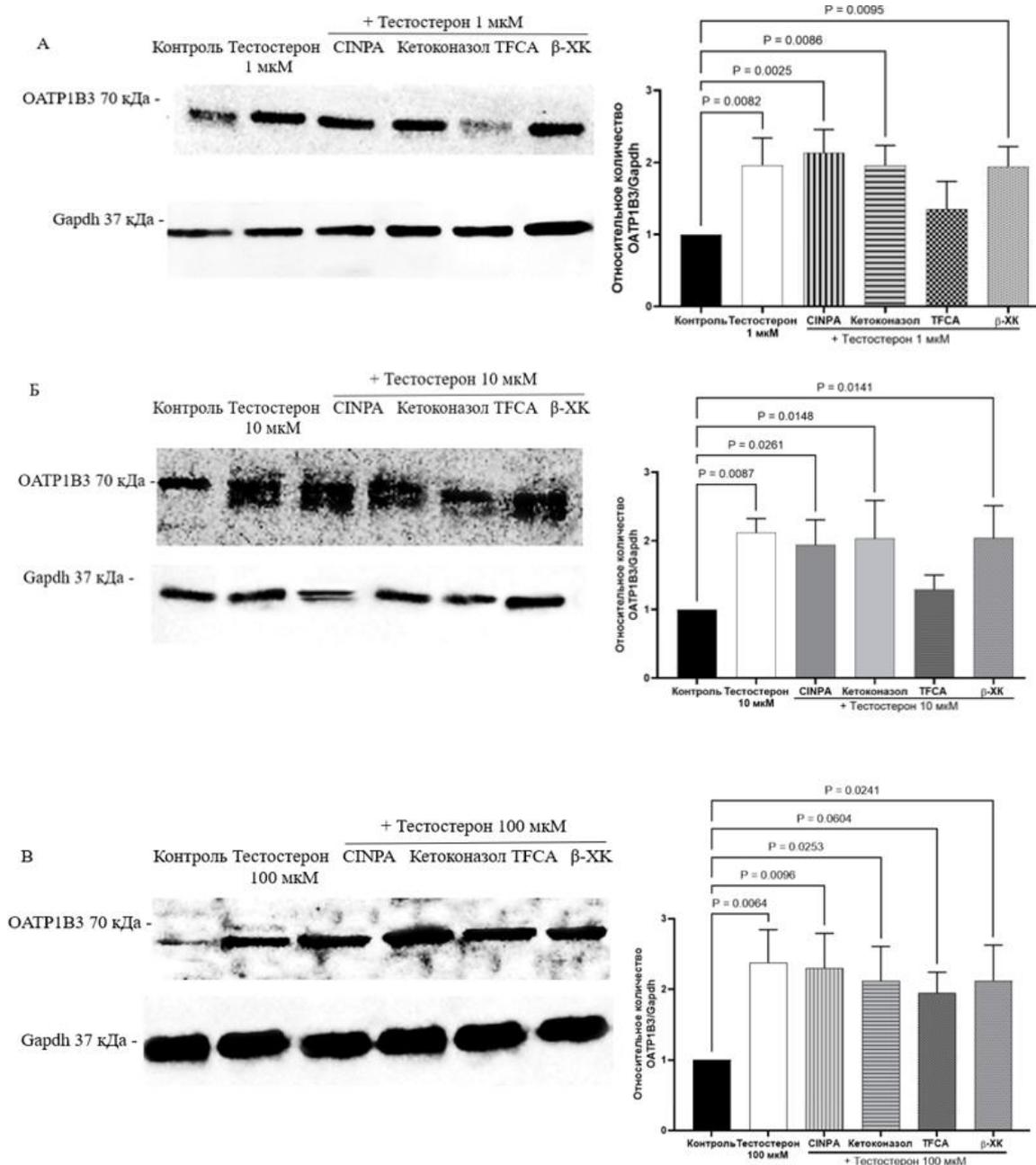


Рисунок 49 – Влияние ингибиторов усыновленных рецепторов на индуцирующее действие тестостерона на уровень ОАТР1В3

Примечание – CINPA – ингибитор CAR,  $\beta$ -ХК – ингибитор FXR, кетоконазол – ингибитор PXR, TFCA – ингибитор LXR $\alpha$

Таким образом, индуцирующее действие тестостерона на количество ОАТР1В3 реализуется через LXR $\alpha$ .

## ОБСУЖДЕНИЕ

Мембранные белки-переносчики играют важную роль в транспорте эндогенных соединений и ксенобиотиков через биологические мембраны. Все их можно разделить на два суперсемейства ABC-транспортёры и SLC-транспортёры [266].

ABC-транспортёры обеспечивают транспорт субстратов через мембрану клеток за счёт энергии АТФ [225], SLC-транспортёры – без затраты энергии, за счёт электрохимического потенциала, симпорта/антипорта [90].

Из всего многообразия белков-переносчиков наибольшее клиническое значение как транспортёры ксенобиотиков играют Pgp и BCRP – из суперсемейства ABC-транспортёров, OATP1B1 и OATP1B3 из суперсемейства SLC-транспортёров [298].

Pgp и BCRP являются эффлюксными транспортёрами, то есть обеспечивают выведение веществ из клеток во внеклеточное пространство и биологические жидкости. Данные транспортёры экспрессируются в клетках кишечника, печени, 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 в забарьерные органы через гистогематические барьеры соответственно [109, 150].

Pgp и BCRP обладают широкой субстратной специфичностью. Субстратами Pgp являются липофильные биобиотики и ксенобиотики: противоопухолевые, гипотензивные и антигистаминные препараты, сердечные гликозиды, антиагреганты, антикоагулянты, стероидные и тиреоидные гормоны, антибиотики, ингибиторы ВИЧ-протеазы, иммунодепрессанты и др. [109]. К субстратам BCRP относят противоопухолевые средства (метотрексат, митоксантрон), празозин, глибенкламид, циметидин, сульфасалазин, нитрофурантоин, розувастатин.

Полипептиды, переносящие органические анионы (OATP), представляют собой семейство транспортёров, входящих в суперсемейство переносчиков растворенных веществ (SLC) [143]. Белки OATP1B1 и OATP1B3 имеют сходные

аминокислотные последовательности с 80% гомологией [290]. OATP1B1 и OATP1B3 высоко экспрессируются в клетках печени человека и локализуются на базолатеральной мембране гепатоцитов [260].

OATP1B1 и OATP1B3 опосредуют поглощение печенью из крови многих лекарственных веществ (например, ингибиторов 3-гидрокси-3-метилглутарил-кофермент А (ГМГ-КоА) редуктазы, противодиабетических, противоопухолевых препаратов) и эндогенных соединений (например, желчных кислот) [260].

Важная клиническая роль данных белков для транспорта ксенобиотиков заключается в том, что при изменении их активности, например вследствие индукции или ингибирования, может происходить изменение концентрации субстратов транспортеров в плазме/сыворотке. Например, при ингибировании Pgp/BCRP выведение их субстратов почками и печенью будет замедляться, всасывание в кишечнике будет увеличиваться, что приведет к повышению их концентрации в организме и может приводить к развитию нежелательных лекарственных реакций. И наоборот, при индукции Pgp/BCRP концентрация их субстратов в организме будет снижаться, что вызовет снижение эффективности терапии.

Аналогичным образом, ингибирование OATP1B1/OATP1B3 приведет к снижению проникновения веществ-субстратов в гепатоциты из кровотока, что может вызывать увеличение их концентрации в крови и развитие нежелательных лекарственных реакций, и наоборот, повышение активности транспортера способствует усиленному проникновению субстратов в гепатоциты, где они будут подвергаться биотрансформации и выводиться с желчью в кишечник, что проявляется снижением эффективности лечения.

Таким образом, транспортеры Pgp, BCRP, OATP1B1, OATP1B3 защищают организм от воздействия избытка эндогенных и экзогенных веществ, в том числе и лекарственных препаратов, а изменение их активности может существенно повлиять на реализацию данной защитной роли.

Регуляция белков-транспортеров в настоящее время активно изучается. Описаны генетические, эпигенетические и пост-трансляционные механизмы

регуляторного воздействия [47, 258].

В рамках настоящей работы оценивалось влияние половых гормонов на функционирование изучаемых белков-транспортеров, что позволяет лучше понять их биохимическое и эволюционное предназначение, половые и иные различия в их работе, а также прогнозировать развитие межлекарственных взаимодействий при совместном назначении субстратов транспортеров и препаратов, влияющих на уровень половых гормонов.

Половые стероидные гормоны синтезируются гонадами и надпочечниками, а также в меньшей степени печенью и жировой тканью [38, 332]. Наиболее активными половыми стероидами являются эстрогены, андрогены и прогестины, которые управляют функциями клеток и тканей, а также могут способствовать развитию патологий, включая злокачественную трансформацию [133]. На сегодняшний день помимо влияния половых стероидов на репродуктивные органы [187], большое внимание уделяется их действию на другие органы и ткани, которые не являются их основными мишенями [204].

Так, еще в 1980-х годах Хойенга и Хойенга предположили, что самки млекопитающих за счет влияния женских половых гормонов являются более резистентными к воздействию неблагоприятных факторов внешней среды, чем самцы, что позволяет им сохранять фертильность и оставлять потомство [159].

В ходе эволюции печень самок приобрела способность под контролем эстрогенов усиливать инфлюкс питательных веществ (белков, жирных кислот и холестерина), что повышает резистентность клеток и способствует сохранению фертильной функции и развитию гестации [97].

Белки-транспортеры регулируют как системные, так и локальные концентрации несвязанных с белками плазмы крови веществ, в том числе и лекарственных, поэтому могут напрямую или косвенно регулировать эффекты своих эндогенных субстратов, а также участвовать в развитии органотоксичности лекарственных веществ. За последнее десятилетие в нескольких работах [77, 232, 322] изучалась роль транспортеров в токсичности ксенобиотиков. Кроме того, недавние исследования показали, что тканеспецифическая экспрессия нескольких

транспортеров может способствовать локальному накоплению лекарственных веществ, развитию межлекарственных взаимодействий, и что функциональные изменения этих транспортеров могут напрямую влиять на восприимчивость человека к поражению органов, вызванному лекарствами [26].

Поэтому изучение влияния половых гормонов на функционирование основных белков-транспортеров, участвующих в фармакокинетике лекарственных веществ, необходимо для понимания механизмов гендерной резистентности к воздействию эндогенных веществ и ксенобиотиков.

На первом этапе работы оценивалось прямое влияние половых гормонов на активность изучаемых белков-транспортеров, для этого осуществляли короткую преинкубацию с гормонами – 30 мин для клеток Caco-2 при исследовании Pgp и BCRP и – 15 мин для клеток HepG2 при изучении OATP1B1/OATP1B3. Этого времени достаточно, чтобы тестируемые вещества могли связаться с молекулой транспортера и изменить ее активность [207].

В ходе исследования было установлено, что эстрадиол оказывает прямое ингибирующее действие на активность BCRP, OATP1B1, OATP1B3 только в максимальной концентрации – 100 мкМ; прогестерон ингибирует Pgp в дозах 10 и 100 мкМ, BCRP в диапазоне изученных концентраций от 100 нМ до 100 мкМ, OATP1B1, OATP1B3 в концентрациях от 1 до 100 мкМ [32]. Тестостерон ингибирует только АТФ-зависимые транспортеры – Pgp и BCRP в концентрациях 10 и 100 мкМ.

Таким образом, все половые гормоны оказывают ингибирующее действие на изучаемые транспортеры. Однако обращает на себя внимание, что оказывают они это действие в высоких концентрациях, существенно превосходящих физиологические концентрации половых гормонов в сыворотке крови.

У женщин в пременопаузе эстрадиол продуцируется клетками гранулы в фолликулах, а после наступления менопаузы гормон синтезируется в экстрагонадных тканях [283]. Нормальный уровень эстрадиола у пременопаузальных женщин находится в диапазоне между 30 и 400 пг/мл (в зависимости от овариальной функции), но снижается до 0-30 пг/мл в

постменопаузе [116].

Прогестерон вырабатывается желтым телом и является доминирующим гормоном после овуляции в лютеиновой фазе. По сравнению с низкими уровнями (1–2 нмоль/л) во время фолликулярной фазы, уровни прогестерона увеличиваются до 15–20 нмоль/л в ранней лютеиновой фазе, а затем достигают пика в середине лютеиновой фазы (35–50 нмоль/л). Если зачатие не происходит, желтое тело начинает разрушаться через 9–10 дней после овуляции, в результате чего уровни прогестерона падают (20–40 нмоль/л) [183].

При беременности у женщин выработка прогестерона в конечном итоге поддерживается плацентой, а его сывороточные концентрации колеблются примерно от 100 до 500 нмоль/л. Прогестерон имеет решающее значение не только для развития, но и для сохранения беременности, как за счет его эндокринных, так и иммунологических эффектов [246, 294].

Таким образом, только при беременности уровень прогестерона может приблизиться к тем концентрациям, в которых гестаген способен оказать прямое ингибирующее влияние на P<sub>g</sub>r, VCRP, OATP1B1/OATP1B3.

Андрогены считаются основными мужскими половыми гормонами. Существует несколько форм циркулирующих андрогенов, при этом тестостерон и дигидротестостерон действуют как мощные лиганды для андрогеновых рецепторов (AR) [282]. Нормальные уровни общего тестостерона у мужчин составляют 10–35 нмоль/л [296]. Свободный тестостерон и тестостерон, слабо связанный с альбумином в крови, могут взаимодействовать с андрогеновым рецептором (AR), но плотный комплекс тестостерона, связанный с SHBG (sex hormone-binding globulin), не может связываться с AR в целевых тканях [263].

Однако лекарственные препараты на основе половых гормонов при пероральном приеме в ЖКТ могут создавать достаточно высокие концентрации. Например, эстрадиол («Прогинова») применяется в дозе 2 мг, а прогестерон в дозе 200 мг («Утрожестан»). Это означает, что в просвете кишечника будет возникать концентрация эстрогена примерно 30 мкМ ( $2 \cdot 10^{-3}$  г / 272 г/моль / 0,25 л) (расчет согласно рекомендациям FDA) и концентрация гестогена 2,55 мМ ( $200 \cdot 10^{-3}$  г / 314

г/моль /0,25 л ). То есть в просвете кишечника могут создаваться концентрации женских половых гормонов, которые способны ингибировать активность Pgr и BCRP.

Препараты тестостерона применяются в основном парентерально, и повышают уровень гормона в сыворотке крови примерно до 30-150 нМ [212, 239], поэтому, видимо, прямое ингибирование транспортеров под действием андрогена не играет существенной клинической роли.

Полученные результаты согласуются с представлениями о структуре клинически значимых ингибиторов SLCO1B1 ( $IC_{50} < 10$  мкМ). Если препарат имеет прогнозируемый  $clogP > 3,5$  и  $\geq 1$  отрицательно заряженный атом, то в 94% случаев соединение является ингибитором SLCO1B1. Сочетание  $clogP > 3,5$  и  $\geq 1$  отрицательно заряженного атома обеспечивало 25-кратное обогащение ингибиторов по сравнению с исходным распределением набора данных [167].

Poongavanam V. et al., 2012 г. сформулировали 386 правил определения субстратов Pgr, при этом 35% соединений соответствуют хотя бы одному из разработанных правил [242]. Ингибиторы Pgr чаще всего являются аминами, третичными аминами, ароматическими соединениями, алкилариловыми эфирами, или гетероциклами.

Таким образом, с использованием всех разработанных моделей возможно правильно предсказать более 80% всех ингибиторов Pgr с общей точностью прогнозирования более 70%.

Липофильность, по-видимому, является важным фактором, определяющим ингибирование BCRP для некоторых соединений, включая флавоноиды, но не для других соединений, таких как аналоги тариквидара. Плоская структура, амин, связанный с углеродом гетероциклического кольца, и потенциал водородной связи также могут быть важны для некоторых ингибиторов BCRP.

Таким образом, физико-химические свойства гормонов согласуются с характеристиками ингибиторов изучаемых транспортеров.

На следующем этапе исследования было изучено влияние половых гормонов при длительности воздействия 24 ч на экспрессию генов, кодирующих изучаемые

белки-транспортеры, и на их относительное количество [8, 9].

Эстрадиол при длительности воздействия 24 ч в клетках Сасо-2 повышает экспрессию гена *MDR1*, кодирующего Pgp, в концентрациях 1-100 мкМ, в концентрациях 10 и 100 мкМ повышает также уровень Pgp. В концентрациях 100 нМ – 100 мкМ, увеличивает экспрессию гена *ABCG2*, кодирующего BCRP, и увеличивает уровень белка-транспортера в диапазоне концентраций 100 нМ – 100 мкМ. Эстрадиол в клетках линии НерG2 увеличивает экспрессию гена *SLCO1B1* и уровень белка OATP1B1 в концентрациях 10 и 100 мкМ, а также увеличивает экспрессию гена *SLCO1B3*, кодирующего OATP1B3, в концентрациях 1, 10 и 100 мкМ и повышает уровень OATP1B3 в концентрациях 10 и 100 мкМ.

Прогестерон в концентрациях 10-100 мкМ увеличивает экспрессию гена *MDR1* и уровень Pgp в концентрации 100 мкМ, в концентрациях 10-100 мкМ повышает экспрессию гена *ABCG2* и уровень BCRP в концентрациях 1-100 мкМ, вызывает тенденцию к снижению экспрессии гена *SLCO1B1* в концентрации 100 мкМ и снижает уровень OATP1B1 в концентрациях 10 и 100 мкМ и не влияет на уровень мРНК *SLCO1B3* и относительное количество белка OATP1B3.

Тестостерон в концентрациях 10 и 100 мкМ снижает уровень мРНК гена *MDR1* и относительное количество Pgp в диапазоне концентраций от 1 до 100 мкМ, повышает экспрессию генов *ABCG2*, *SLCO1B1* и *SLCO1B3* и количество белков BCRP, OATP1B1 и OATP1B3 в диапазоне концентраций 1-100 мкМ [26, 281].

Таким образом, полученные результаты подтверждают, что увеличение уровня изучаемых транспортных белков под действием половых гормонов связано с повышением экспрессии генов, которые их кодируют.

Учитывая то обстоятельство, что половые гормоны оказывали прямое ингибирующее действие на активность изучаемых транспортеров при кратковременном воздействии (15 и 30 мин), но при этом, в большинстве случаев повышали уровень белков Pgp, BCRP, OATP1B1, OATP1B3 при длительном воздействии, целесообразно было проверить как изменится транспортная активность белков при воздействии гормонов в течение 24 ч.

Эстрадиол в концентрациях 10 и 100 мкМ повышал активность Pgp,

прогестерон на нее не влиял, а тестостерон вызывал ее снижение. Таким образом полученные результаты свидетельствуют о том, что прямая ингибирующая активность прогестерона на Pgr нивелируется повышением уровня белка транспортера под действием гестагена.

Эстрадиол в концентрациях 10 и 100 мкМ усиливал функциональную активность Pgr, что может быть связано с его способностью регулировать экспрессию или посттрансляционные модификации транспортера. В отличие от эстрадиола, тестостерон подавлял активность Pgr, что указывает на возможное конкурентное ингибирование или аллостерическую регуляцию. Прогестерон не оказывал прямого влияния на активность Pgr, однако, учитывая его способность повышать уровень белка транспортера, можно предположить, что его ингибирующий эффект компенсируется увеличением количества Pgr. Таким образом, модуляция Pgr стероидными гормонами зависит не только от их непосредственного взаимодействия с транспортерами, но и от их влияния на экспрессию генов, которые кодируют транспортные белки.

Эстрадиол только в низкой концентрации 1 мкМ повышал активность BCRP, а прогестерон и тестостерон на нее не влияли [7]. Таким образом и в случае с BCRP прямая ингибирующая активность прогестерона и тестостерона на Pgr нивелируется повышением уровня белка транспортера под действием гормонов. Повышение активности BCRP под действием низкой концентрации эстрадиола, вероятнее всего, связано с тем, что в указанной концентрации эстроген вызывает повышение уровня белка-транспортера, но не оказывает прямого действия.

Результаты проведенного исследования свидетельствуют о том, что эстрадиол в низкой концентрации (1 мкМ) усиливал активность BCRP, а прогестерон и тестостерон на нее не влияли. Данный факт позволяет предположить, что, как и в случае с Pgr, потенциальная ингибирующая способность прогестерона и тестостерона компенсируется повышением уровня белка-транспортера. Стимулирующий эффект эстрадиола в низкой концентрации, вероятно, связан с увеличением экспрессии BCRP, а не с прямым воздействием на его активность. Это согласуется с известными механизмами гормональной

регуляции транспортеров, при которых эстрогены могут активировать транскрипционные факторы (например, через рецепторы ER $\alpha$ /ER $\beta$ ), повышающие синтез транспортных белков [1, 76].

Таким образом, регуляция VSCRР стероидными гормонами зависит как от их концентрации, так и от баланса между прямым воздействием на транспортную функцию и влиянием на экспрессию белка.

Эстрадиол и тестостерон повышали активность транспортеров OATP1B1/OATP1B3, а прогестерон ее снижал. Учитывая, что эстрадиол оказывал прямое ингибирующее действие на активность OATP1B1/OATP1B3, полученные результаты свидетельствуют о том, что индуцирующее действие эстрогена на количество транспортеров сильнее, чем его ингибирующая активность. Влияние прогестерона и тестостерона на количество и активность инфлюксных транспортеров было однонаправленным (снижение для прогестерона, увеличение для тестостерона) и поэтому полученные данные об изменении активности OATP1B1/OATP1B3 при длительном воздействии гормонов являются логичными.

Таким образом, регуляция OATP1B1/OATP1B3 стероидными гормонами зависит от баланса между их прямым воздействием на транспортную функцию и влиянием на экспрессию кодирующих генов. Полученные результаты подчеркивают важность длительных воздействий гормонов, поскольку кратковременные эффекты *in vitro* могут не отражать их реального физиологического влияния *in vivo*.

На следующем этапе исследования были изучены механизмы регуляции транспортеров под действием половых гормонов.

По классическим представлениям половые гормоны регулируют клеточные функции в основных органах мишенях через свои специфические рецепторы. На данный момент описаны два типа ядерных эстрогеновых рецептора (ER $\alpha$  и ER $\beta$ ) и мембранный эстрогеновый рецептор – G-protein-coupled estrogen receptor (GPER1), два типа ядерных прогестероновых рецептора (PR-A и PR-B) и ядерный и мембранный андрогеновые рецепторы (AR) [305].

Однако, учитывая локализацию транспортных белков в органах и тканях

(Pgp, BCRP – в клетках печени, кишечника, почек, гистогематических барьеров; OATP1B1/OATP1B3 – в клетках печени), которые не являются основными мишенями для половых гормонов, а также полученные данные о том, что половые гормоны оказывали влияние на изучаемые белки транспортеры только в высоких концентрациях 1-100 мкМ, мы предположили, что эстрадиол, прогестерон и тестостерон влияют на транспортеры не через свои специфические ядерные/мембранные рецепторы, а через рецепторы реагирующие на ксенобиотики и регулирующие белки-транспортеры и ферменты I и II фаз биотрансформации – CAR, PXR, FXR и LXR $\alpha$ .

Данные рецепторы относятся к подгруппе «усыновленных» суперсемейства ядерных рецепторов. Свое название они получили из-за того, что в отличие от классических ядерных рецепторов для них, совсем недавно были установлены эндогенные лиганды, до этого они были не известны и рецепторы относились к подгруппе «орфанных», то есть для которых не известны эндогенные лиганды [307]. На данный момент считается, что лигандом фарназоид X рецептора (FXR) являются желчные кислоты [87], конститутивного андростанового рецептора (CAR) – андростан, прегнан X рецептора (PXR) – прегненолон 16 $\alpha$ -карбонитрил [283], печеночного X рецептора подтипа альфа (LXR $\alpha$ ) – оксистеролы [275].

На сегодняшний день доказана важная роль FXR в регуляции синтеза желчных кислот, CAR и PXR – внутриклеточного метаболизма и окислительно-восстановительного баланса, LXR $\alpha$  – метаболизма липидов и холестерина. Кроме того, все эти рецепторы (FXR, CAR, PXR, LXR $\alpha$ ) могут принимать участие в регуляции ферментов I и II фазы биотрансформации (например, изоферментов цитохрома P450), а также белков-транспортеров [16, 119].

В ходе настоящего исследования было установлено, что в клетках Caco-2 эстрадиол повышает количество CAR (концентрации 10 и 100 мкМ) и PXR (1, 10 и 100 мкМ), прогестерон активирует PXR (концентрации 10 и 100 мкМ) и FXR (1, 10, 100 мкМ), тестостерон стимулирует – PXR и FXR (концентрация 10 мкМ).

На клетках HepG2 было установлено, что эстрадиол активирует CAR (концентрации 10 и 100 мкМ) и FXR (1, 10 и 100 мкМ), прогестерон стимулирует

PXR (концентрации 10 и 100 мкМ), FXR (1 и 10 мкМ), LXR $\alpha$  (1 и 10 мкМ), тестостерон ингибирует CAR (концентрации 10 и 100 мкМ), и активирует PXR (10 и 100 мкМ), FXR (1, 10 и 100 мкМ) и LXR $\alpha$  (10 мкМ).

То есть в разных типах клеток половые гормоны активируют в основном одни и те же усыновленные рецепторы, но наблюдается и тканеспецифичное действие.

Полученные результаты дополняют данные научной литературы и свидетельствуют о том, что изученные усыновленные рецепторы могут быть вовлечены в регуляцию как эффлюксных, так и инфлюксных белков-транспортеров под действием половых гормонов.

В опытах *in vitro* на клеточной линии гепатоцеллюлярной карциномы человека (HepG2) установлено, что 17 $\beta$ -эстрадиол и эстрон в концентрации 10 мкМ активировали экспрессию CAR [181].

На линии клеток гепатоцеллюлярной карциномы человека HepG2, трансфицированных экспрессионной плазмидой mCAR и показывающих высокую конститутивную экспрессию mCAR с активацией энхансерного элемента NR1, выявлено, что эстрадиол повышал экспрессию CAR, а тестостерон и прогестерон ее подавляли [181].

В эксперименте на клетках CV-1, трансфицированных транскрипционным фактором PXR, выявлено, что прогестерон в концентрациях 10<sup>-7</sup>-10<sup>-4</sup> М стимулировал экспрессию PXR [66].

На клетках CV-1, котрансфицированных репортерным геном tk(MH100)4-luc и химерным рецептором, состоящим из ДНК-связывающего домена GAL4 и домена связывания PXR-лиганда, было показано, что эстрадиол, прогестерон и дигидротестостерон активируют PXR [293].

Андростерон – основной продукт распада тестостерона, может активировать FXR [333]. На моноцитах человека, дифференцированных в макрофаги (клеточная линия THP-1), было показано, что тестостерон (1–10 нМ, 24–72 ч) увеличивал экспрессию гена и количества белка LXR $\alpha$  [184].

На заключительном этапе исследования с помощью специфических

ингибиторов была оценена роль усыновленных рецепторов в регуляции Pgr, VCRP, OATP1B1, OATP1B3 под действием половых гормонов в клетках, которые не являются мишенями для половых гормонов – клетках кишечника (Caco-2) и клетках печени (HepG2). Тауро- $\beta$ -холевую кислоту использовали в качестве ингибитора FXR. Предполагается, что она взаимодействует с лиганд-связывающим карманом FXR и препятствует реализации его активности [141]. CINPA1 (CAR inhibitor not PXR activator 1) использовали в качестве ингибитора CAR. Он блокирует лиганд связывающий домен CAR, а также подавляет его взаимодействие с коактиваторами [85]. Ингибирование PXR осуществляли с помощью кетоконазола. Кетоконазол (противогрибковый препарат группы азолов) связывается с AF-2 областью лиганд-связывающего домена PXR и, таким образом, подавляет его активацию [59]. Для интактивации LXR $\alpha$  использовали N-(4-трифторметилфенил) 3,4-диметоксициннамид (TFCA). Считается, что TFCA ингибирует активацию лиганд-связывающего домена LXR $\alpha$  за счет водородной связи с Arg305 в области H5 этого домена [88].

В нашем исследовании было установлено, что индуцирующее действие эстрадиола на Pgr реализуется через CAR, а индуцирующее действие прогестерона – через CAR и PXR.

Индуцирующее действие эстрадиола на VCRP реализуется через CAR и PXR, действие прогестерона – через PXR и FXR, действие тестостерона – через PXR и FXR. При этом стоит отметить, что индуцирующее действие эстрадиола не ингибировалось полностью, что также может быть связано с участием в данном процессе ядерных эстрогеновых рецепторов. Действие эстрадиола на OATP1B1 опосредовано транскрипционным фактором CAR. Изученные усыновленные рецепторы не участвуют в снижении относительного количества OATP1B1 под влиянием прогестерона. Вероятно, что все три рецептора – FXR, PXR и LXR $\alpha$  опосредуют индукцию OATP1B1 под действием тестостерона.

FXR опосредует индуцирующий эффект эстрадиола на количество OATP1B3, а индуцирующее действие тестостерона на OATP1B3 реализуется через LXR $\alpha$ .

Таким образом, в настоящем исследовании установлено, что в клетках кишечника и печени, которые с одной стороны не являются основными мишенями для воздействия половых гормонов, а с другой играют важную роль в фармакокинетике лекарственных препаратов и защите организма от воздействия ксенобиотиков, регуляция защитных транспортных белков Pgp, BCRP, OATP1B1, OATP1B3 половыми гормонами в высоких дозах осуществляется за счет усвоенных ядерных рецепторов (CAR, PXR, FXR, LXR $\alpha$ ), которые выполняют роль ксеносенсоров в организме человека. При воздействии на клетки печени и кишечника высоких доз эстрадиола, прогестерона и тестостерона, организм воспринимает их как ксенобиотики и активирует системы, направленные на защиту от них, в частности повышается экспрессия генов, количество и активность белков-транспортеров Pgp, BCRP, OATP1B1, OATP1B3, которые препятствуют всасыванию веществ в кишечнике (эффлюксные транспортеры) и способствуют их захвату в гепатоциты для последующего метаболизма (инфлюксные транспортеры) и выведения клетками печени.

## 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 $\alpha$  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 (Рисунок 50).

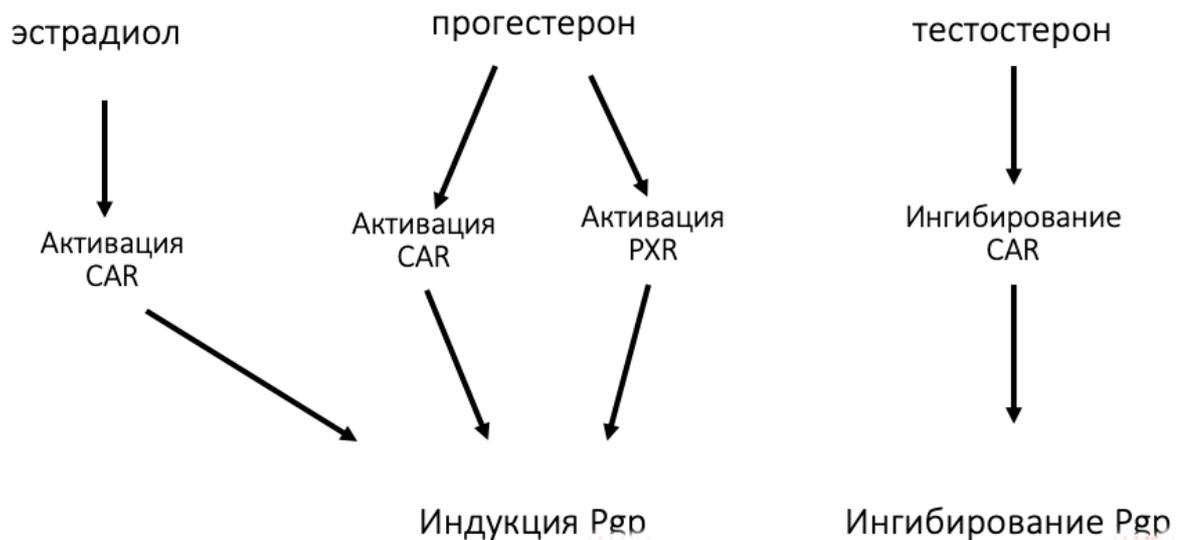


Рисунок 50 – Обобщенный механизм влияния половых гормонов в высоких дозах на Pgp

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 (Рисунок 51).

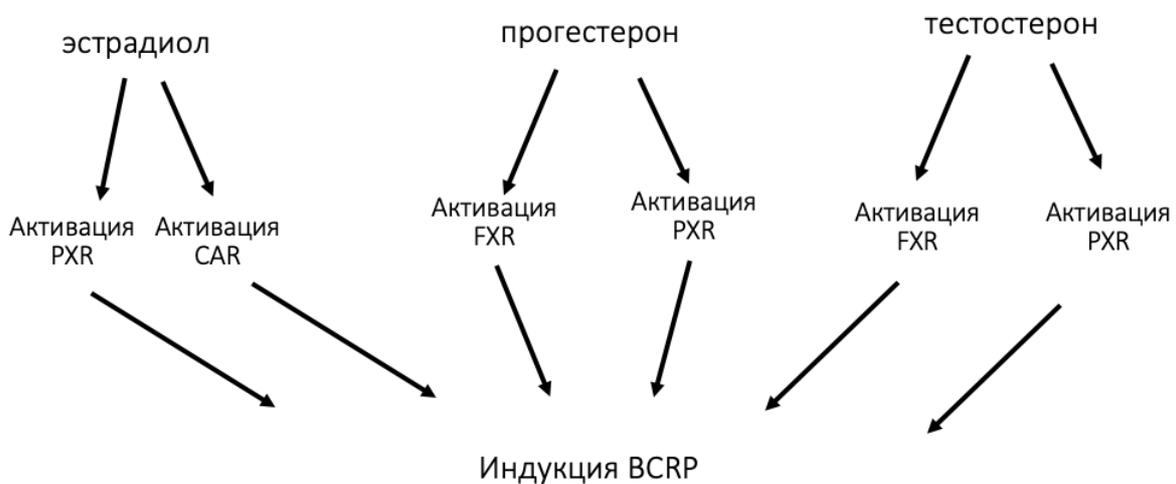


Рисунок 51 – Обобщенный механизм влияния половых гормонов в высоких дозах на BCRP

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 $\alpha$  опосредуют индукцию OATP1B1 тестостероном (Рисунок 52).

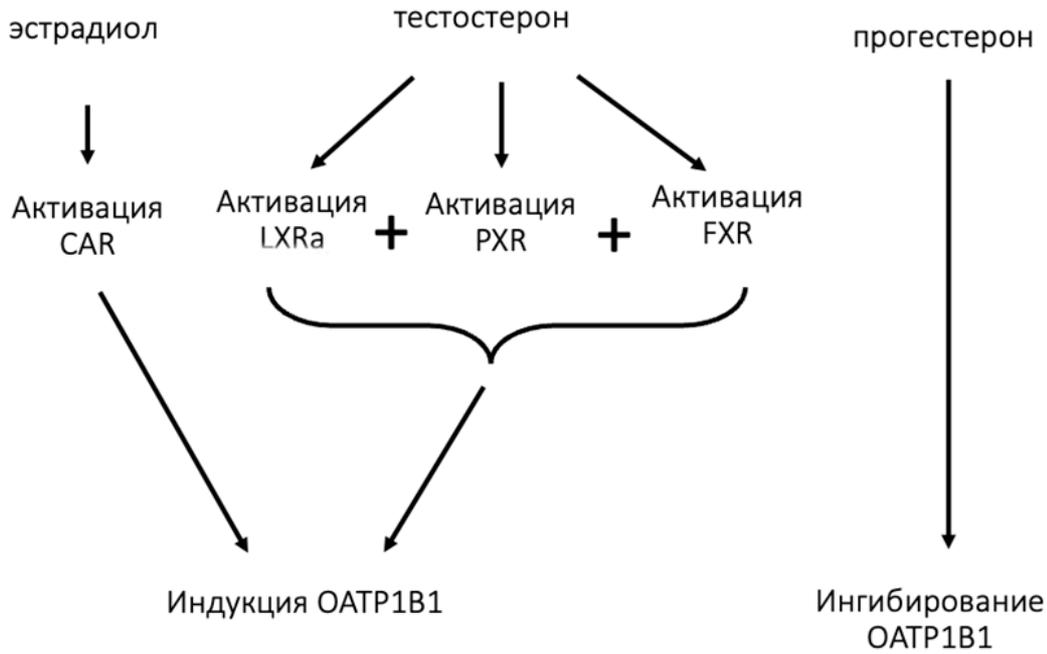


Рисунок 52 – Обобщенный механизм влияния половых гормонов в высоких дозах на OATP1B1

Эстрадиол и тестостерон увеличивают экспрессию гена *SLCO1B3* и количество белка OATP1B3, а прогестерон не влияет на экспрессию гена *SLCO1B3* и количество белка OATP1B3.

Индущирующий эффект эстрадиола на OATP1B3 опосредует FXR, а стимулирующее действие тестостерона реализуется через LXRα (Рисунок 53).



Рисунок 53 – Обобщенный механизм влияния половых гормонов в высоких дозах на OATP1B3

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 $\alpha$  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 ВСРР, ОАТР1В1, ОАТР1В3 только в максимальной концентрации - 100 мкМ. Прогестерон ингибирует Рgr в концентрациях 10 и 100 мкМ, ВСРР – в диапазоне концентраций от 100 нМ до 100 мкМ, ОАТР1В1, ОАТР1В3 – в концентрациях от 1 до 100 мкМ. Тестостерон ингибирует только АТФ-зависимые транспортеры – Рgr и ВСРР 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 Рgr (10-100 мкМ). Прогестерон повышает уровень мРНК гена *MDR1* (10-100 мкМ) и количество белка Рgr (100 мкМ), но не влияет на его активность. Тестостерон снижает уровень мРНК гена *MDR1* (10-100 мкМ), содержание белка Рgr 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 ВСРР (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 ВСРР (1-100 мкМ) и не влияет на его активность. Тестостерон повышает уровень мРНК гена *ABCG2*, уровень белка ВСРР (1-100 мкМ) и не изменяет его активность.

4. На клетках линии НерG2 при длительности воздействия 24 ч показано, что эстрадиол повышает экспрессию гена *SLCO1B1*, количество белка-транспортера и активность ОАТР1В1 (10 и 100 мкМ). Прогестерон (10 и 100 мкМ) вызывает снижение уровня белка ОАТР1В1 и его активности, без достоверного изменения экспрессии гена *SLCO1B1*. Тестостерон увеличивает экспрессию гена *SLCO1B1*, относительное количество и активность ОАТР1В1 (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 $\alpha$  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 $\alpha$ .

10. Усыновленные ядерные рецепторы PXR, CAR, FXR, LXR $\alpha$  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, VCRP, 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, VCRP, OATP1B1/OATP1B3, а тестостерон как ингибитор Pgr и VCRP.

3. Усыновленные рецепторы CAR и PXR можно использовать в качестве мишеней для модуляции активности белка-транспортера Pgr; CAR, PXR и FXR для модуляции VCRP; CAR – для модуляции OATP1B1; FXR и LXR $\alpha$  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 СОКРАЩЕНИЙ**

ДХК – дезоксихолевая кислота

ЛПВП – липопротеинов высокой плотности

ЛХК – литохолевая кислота

ПЦР-RT – полимеразная цепная реакция в реальном времени

ХДХК – хенодезоксихолевая кислота

ХК – холевая кислота

ABC – АТФ-связывающая кассета (англ.: ATP-binding cassette)

AEBSF – 4-(2-аминоэтил)бензолсульфонилфторид

AF – активаторная функция (англ.: activator function)

AhR – арильный углеводородный рецептор (англ.: aryl hydrocarbon receptor)

AhRE – элемент ответа на арилуглеводороды (англ.: aryl hydrocarbon response element)

AR – андрогеновый рецептор (англ.: androgen receptor)

ARE – элемент ответа на антиоксиданты (англ.: antioxidant response element)

BCRP – белок резистентности рака молочной железы (англ.: breast cancer resistance protein)

BSEP – эффлюксный переносчик желчных солей (англ.: bile salt export pump)

Caco-2 – клетки аденокарциномы ободочной кишки человека (англ.: cancer coli, colon cancer)

CAR – конститутивный андростановый рецептор (англ.: constitutive androstane receptor)

CYP – цитохром (англ.: cytochrome)

DBD – ДНК-связывающий домен (англ.: DNA binding domain)

DMEM – модифицированная среда Игла (англ.: Dulbecco's Modified Eagle Medium)

DNP – диарилпропионитрилом (англ.: diarylpropionitrile)

EDTA – Этилендиаминтетрауксусная кислота (англ.: Ethylenediaminetetraacetic acid)

- ER – эстрогеновый рецептор (англ.: estrogen receptor)
- ERE – элемент ответа на эстроген (англ.: estrogen response element)
- FXR – фарнезоидный X рецептор (англ.: farnesoid X receptor)
- GAPDH – глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназа (англ.: glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase)
- GNC – Комитет по номенклатуре генов (англ.: gene nomenclature committee)
- GR – глюкокортикоидный рецептор (англ.: glucocorticoid receptor)
- HEPES – буферный раствор (англ.: 4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid)
- HIF-1 $\alpha$  – фактор, индуцируемый гипоксией 1 $\alpha$  (англ.: hypoxia-inducible factor 1 $\alpha$ )
- HNF – ядерный фактор гепатоцитов (англ.: hepatocyte nuclear factor)
- HRE – элемент ответа на гипоксию (англ.: hypoxia response element)
- HUGO – Организации генома человека (англ.: Human Genom Organization)
- IC50 – полумаксимальная ингибирующая концентрация (англ.: half maximal inhibitory concentration)
- LBD – лиганд-связывающий домен (англ.: ligand binding domain)
- LBP – лиганд-связывающий карман (англ.: ligand binding pocket)
- LRH-1 – гомолог рецептора печени 1 (англ.: homologue of the liver receptor)
- LXR – печеночный X рецептор (англ.: liver X receptor)
- MATE – белок экстррузии лекарств и токсинов (англ.: multidrug and toxin extrusion)
- MCA – А и b-мурихолевые кислоты (англ.: muricholic acid)
- MDR1 – Ген множественной лекарственной устойчивости 1 (англ.: multidrug resistance protein 1)
- mRNA – матричная РНК (англ.: messenger RNA)
- MRP – белок, ассоциированный с множественной лекарственной устойчивостью (англ.: multidrug resistance-associated protein)
- MRP1 – белки, ассоциированные с множественной лекарственной устойчивостью (англ.: multidrug resistance-associated protein)
- NBD – нуклеотидсвязывающий домен (англ.: nucleotide-binding domains)
- NF $\kappa$ B – элемент ответа на субъединицу активного ядерного фактора каппа В

(англ.: Nuclear Factor Кappa B)

NR – ядерные рецепторы (англ.: nuclear receptors)

NTCP – полипептид ко-транспорта таурохолата натрия (англ.: Na<sup>+</sup>-taurocholate cotransporting polypeptide)

OATP – полипептид, транспортирующий органические анионы (англ.: organic anion transporting polypeptide)

OCT1 – транспортер органических катионов (англ.: organic cation transporters)

OATP – полипептид, транспортирующий органические анионы (англ.: organic anion transporting polypeptide)

PBREM – фенобарбитал-чувствительный энхансерный модуль (англ.: phenobarbital responsive enhancer module)

PBS – Фосфатно-солевой буфер (англ.: phosphate-buffered saline)

PCN – лиганд прегненолона-16-карбонитрила (англ.: pregnenolone 16 $\alpha$ -carbonitrile)

Pgp – P-гликопротеин (англ.: P-glycoprotein)

PPAR $\gamma$  – рецептор, активируемый пролифераторами пероксисом  $\gamma$  (англ.: peroxisome proliferator-activated Receptor  $\gamma$ )

PPT – пропилпиразолтриолом (англ.: propylpyrazoltriol)

PR – прогестероновый рецептор (англ.: progesterone receptor)

PRE – элемент ответа на прогестерон (англ.: progesterone response element)

PXR – прегнан-Х-рецептор (англ.: pregnane X receptor)

RXR – ретиноидный X рецептор (англ.: retinoid X receptor)

SLC – семейство переносчиков растворенных веществ (англ.: solute carrier family)

TMD – трансмембранный домен (англ.: transmembrane domain)

VBL – винбластин (англ.: Vinca alkaloid)

VDR – Рецептор витамина D (англ.: Vitamin D Receptor)

XREs – элемент ксенобиотического ответа (англ.: xenobiotic response element)

**СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ**

1. Ассоциация экспрессии эстрогеновых рецепторов бета с показателем пролиферативной активности Ki-67 в ткани рака молочной железы. / Т.А. Богущ, П.Д. Поцелуева, А.М. Щербаков, [и др.]. – Текст : непосредственный // Антибиотики и Химиотерапия. – 2023. – Т. 68, № 3-4. – С. 39-45.
2. Белки множественной лекарственной резистентности Pgp, MRP и BCRP как маркеры снижения эффективности тамоксифена при лечении рака молочной железы / Т.А. Богущ, Е.А. Дудко, Е.А. Богущ [и др.]. – Текст : непосредственный // Опухоли женской репродуктивной системы. – 2011. – № 1. – С. 8-18.
3. Белки семейства p53 в ответе опухолевых клеток на ионизирующее излучение: развитие проблемы / О.А. Кучур, Д.О. Кузьмина, М.С. Духинова [и др.]. – Текст : непосредственный // Acta Naturae. – 2021. – Т. 13, № 3 (50). – С. 65-76.
4. Белок резистентности рака молочной железы: структура, локализация, функции, значение для рациональной фармакотерапии / Н.М. Попова, А.В. Щулькин, Ю.С. Транова [и др.]. – Текст (визуальный) : непосредственный // Российский медико-биологический вестник имени академика И.П. Павлова. – 2024. – Т. 32, № 2. – С. 305-314.
5. Влияние агониста фарнезоидного X-рецептора на постпрандиальную липемию у крыс, получающих рацион, содержащий супрафизиологическую дозу жиров / Ю.Н. Алехин, О.С. Попова, В.С. Понамарёв [и др.]. – Текст : непосредственный // Разработка и регистрация лекарственных средств. – 2023. – Т. 12, № 2. – С. 174-184.
6. Влияние гипоксии различных видов на функциональную активность и экспрессию гликопротеина-P / Е.Н. Якушева, И.В. Черных, А.В. Щулькин [и др.]. – Текст (визуальный) : непосредственный // Обзоры по клинической фармакологии и лекарственной терапии. – 2016. – Т. 14, № 1. – С. 71-77.
7. Влияние половых гормонов на белок транспортер ABCG2 в клетках линии Сасо-2 / А.А. Слепнев, Ю.В. Абаленихина, Н.М. Попова [и др.]. – Текст : непосредственный // Биологические мембраны. - 2023. - Т. 40, № 5. - С. 370-378.
8. Влияние половых гормонов на экспрессию генов ABC транспортеров - P-

гликопротеина и белка резистентности рака молочной железы *in vitro* / А.А. Слепнев, П.Ю. Мыльников, Ю.В. Абаленихина [и др.]. – Текст : непосредственный // Прикладные информационные аспекты медицины. 2025. Т. 28. № 1. С. 76-82.

9. Влияние половых гормонов на экспрессию генов, кодирующих полипептиды, транспортирующие органические анионы OATP1B1/OATP1B3 *in vitro* / А.А. Слепнев, Ю.В. Абаленихина, Ананьева П.Д. [и др.]. – Текст : непосредственный // Вопросы биологической, медицинской и фармацевтической химии. 2025. Т. 28. № 6. С. 21-26.

10. Влияние рифампицина на систему толл-подобных рецепторов в прилежащем ядре мозга длительно алкоголизированных крыс в период отмены алкоголя / М.И. Айрапетов, С.О. Ереско, Д.А. Скабелкин [и др.]. – Текст : непосредственный // Биомедицинская химия. – 2022. – Т. 68, № 4. – С. 279-287.

11. Гликопротеин-R: строение, регуляция, значение в фармакотерапии заболеваний (краткий обзор) / А.В. Байрашевская, А.В. Муленкова, Т.И. Шлапакова [и др.]. – Текст : непосредственный // Медицинский альманах. – 2020. – № 3 (64). – С. 36-42.

12. Довжикова, И.В. Рецепторы эстрогенов (обзор литературы). / И.В. Довжикова, И.А. Андриевская. – Текст : непосредственный // Бюллетень. – 2019. – № 7. – 120-127.

13. Желчные кислоты и их значение для деятельности центральной нервной системы. / Ю.О. Шульпекова, П.Е. Ткаченко, Е.Н. Широкова [и др.]. – Текст : непосредственный // Российский журнал гастроэнтерологии, гепатологии, колопроктологии. – 2021. – Т. 31, № 5. – С. 7-15.

14. Ивашкин, В.Т. Ядерные рецепторы и патология печени / В.Т. Ивашкин. – Текст : непосредственный // Российский журнал гастроэнтерологии, гепатологии, колопроктологии. – 2010. – № 4. – С. 7-15.

15. Исследование функциональной активности и экспрессии гликопротеина-R при аллоксаниндуцированном сахарном диабете 2-го типа / Е.Н. Якушева, Д.С. Титов, Н.М. Попова [и др.]. – Текст (визуальный) : непосредственный // Вестник РУДН. – 2016. – № 4. – С. 118-126.

16. Калинина, Е.В. Окислительный стресс и редокс-зависимый сигналинг при раке предстательной железы / Е.В. Калинина, Л.А. Гаврилюк, В.С. Покровский. – Текст : непосредственный // Биохимия. – 2022. – Т. 87, № 4. – С. 459-473.

17. Клетки линии Сасо-2 как модель для изучения абсорбции лекарственных веществ / А.В. Шулькин, Ю.С. Транова, Ю.В. Абаленихина [и др.]. – Текст : непосредственный // Экспериментальная и клиническая гастроэнтерология. – 2022. – № 10 (206). – С. 63-69.

18. Конститутивный андростановый рецептор (CAR): ксеносенсор и терапевтическая мишень / Е.М. Качайло, В.О. Пустыльняк, В.В. Ляхович [и др.]. – Текст : непосредственный // Биохимия. – 2011. – Т. 76, № 10. – С. 1335-1347.

19. Кузнецова, Е.Л. Гепатобилиарные транспортеры (OATP2 и BSEP) в ткани печени пациентов с холестатическими заболеваниями печени на фоне проводимой терапии. / Е.Л. Кузнецова, Е.Н. Широкова. – Текст : непосредственный // Российский журнал Гастроэнтерологии, Гепатологии, Колопроктологии. – 2007. – № 2. – С. 28-34.

20. Кулес В.Г. Метаболизм лекарственных средств. Научные основы персонализированной медицины / В.Г. Кулес, С.В. Грачев, Д.А. Сычев, Г.В. Раменская. - Москва : ГЭОТАР-Медиа, 2008. - 671 с.

21. Кучур, О.А. Перепрограммирование транскрипции в регуляции выживания опухолевых клеток при ионизирующем излучении: роль p53 / О.А. Кучур, А.В. Завирский, А.А. Штиль. – Текст : непосредственный // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. – 2022. – Т. 174, № 11. – С. 621-627.

22. Линия клеток HepG2 как модель для изучения проникновения статинов в гепатоциты / П.Д. Ерохина, А.А. Слепнев, П.Ю. Мыльников [и др.]. - Текст (визуальный) : непосредственный // Экспериментальная и клиническая гастроэнтерология. – 2022. – № 10 (206). – С. 70-76.

23. МАТЕ-транспортеры: участие в фармакокинетике лекарственных средств и межлекарственных взаимодействиях / В.А. Евтеев, А.Б. Прокофьев, Н.Д. Бунятян [и др.]. – Текст : непосредственный // Фармация. – 2019. – Т. 68, №7. – С. 44-47.

24. Методика количественного анализа маркерного субстрата ABCB1-белка

фексофенадина в лизате клеток Сасо-2. / М.А. Копаница, Ю.С. Транова, И.В.Черных, [и др.]. – Текст : непосредственный // Фармакокинетика и Фармакодинамика. – 2023. – № 2. – С. 60-68.

25. Методика определения принадлежности лекарственных средств к числу субстратов гликопротеина-Р / Е.Н. Якушева, И.В. Черных, А.В. Щулькин [и др.]. – Текст (визуальный) : непосредственный // Российский медикобиологический вестник имени академика И.П. Павлова. – 2015. – Т. 23, № 3. – С.49-53.

26. Механизм влияния тестостерона на белок-транспортер Р-гликопротеин / А.А. Слепнев, А.В. Щулькин, Ю.В. Абаленихина [и др.]. – Текст : непосредственный // Российский физиологический журнал им. И.М. Сеченова. - 2022. - Т. 108, № 9. - С. 1188-1199.

27. Модулирование действия ядерных рецепторов и регуляция биотрансформации лекарств / С.Н. Ларина, Н.В. Чебышев, Е.В. Ших [и др.]. – Текст : непосредственный // Биомедицина. – 2009. – № 2. – С. 70-80.

28. Общая фармакопейная статья. Электрофорез в полиакриламидном геле (утв. и введена в действие Приказом Минздрава России от 31.10.2018 N 749) ОФС.1.2.1.0023.15. («Государственная фармакопея Российской Федерации. XIV издание. Том I»).

29. Покровский, В.С. Метаболизм сфинголипидов в опухолевых клетках / В.С. Покровский, В.И. Иванова-Радкевич, О.М. Кузнецова. – Текст : непосредственный // Биохимия. – 2023. – Т. 88, № 7. – С. 1045-1068.

30. Разработка и валидация методики количественного определения аторвастатина в клетках линии НерG2 методом высокоэффективной жидкостной хроматографии с масс-спектрометрическим детектированием / П.Д. Ерохина, П.Ю. Мыльников, С.О. Ганина [и др.]. – Текст : непосредственный // Российский медикобиологический вестник имени академика И.П. Павлова. – 2022. – Т.30. №2. – С. 149-158.

31. Разработка и валидация методики количественного определения сульфасалазина в плазме крови кроликов и среде культивирования клеток методом ВЭЖХ-МС/МС / М.И. Поветко, П.Ю. Мыльников, Ю. Транова [и др.]. – Текст :

непосредственный // Химико-фармацевтический журнал. – 2025. – № 3. – С. 39-44.

32. Регуляция органического анионтранспортирующего полипептида 1В3 (ОАТР1В3) половыми гормонами / А.А. Слепнев, Ю.В. Абаленихина, А.В. Шулькин [и др.]. – Текст : непосредственный // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. – 2024. – Т. 177, № 5. – С. 630-634.

33. Роль белка-транспортера гликопротеина-Р в проникновении ротенона в головной мозг через гематоэнцефалический барьер / М.М. Градинарь, А.В. Шулькин, П.Ю. Мыльников [и др.]. – Текст (визуальный) : непосредственный // Прикладные информационные аспекты медицины. – 2024. – Т. 27, № 2. – С.86-93.

34. Роль ядерных рецепторов в регуляции биотрансформации ксенобиотиков / С.Н. Ларина, И.В. Игнатъев, Н.В. Чебышев [и др.]. – Текст : непосредственный // Биомедицина. – 2010, № 1. – С. 5-16.

35. Связь эффективности химиотерапии с особенностями экспрессии трансмембранных белков Р-гликопротеина (ABC1B1), MRP2 (ABCC2), BCRP (ABCG2) у больных раком молочной железы / К.Ю. Христенко, С.В. Вторушин, М.В. Завьялова [и др.]. – Текст : непосредственный // Сибирский онкологический журнал. – 2016. – Т. 16, № 4. – С. 40-44.

36. Смирнов, А.Н. Ядерные рецепторы: номенклатура, лиганды, механизмы влияния на экспрессию генов (обзор). / А.Н. Смирнов. – Текст : непосредственный // Биохимия. – 2002. – Т.67, № 9. – С. 1157-1181.

37. Смирнов, Л.П. Транспортеры органических анионов (ОАТ). Молекулярное разнообразие, структура, функция, участие в функционировании системы биотрансформации ксенобиотиков у животных (обзор) / Л.П. Смирнов, И.В. Суховская, Е.В. Борвинская. – Текст : непосредственный // Труды Карельского научного центра Российской академии наук. – 2017. – Т. 1. – С. 28-42.

38. Смирнова, О.В., Роль полиморфизмов генов PNPLA3, MBOAT7 и TM6SF2 в развитии неалкогольной жировой болезни печени при метаболическом синдроме. / О.В. Смирнова, Д.В. Лагутинская. – Текст : непосредственный // Ожирение и метаболизм. – 2022. – Т. 19, № 2. – С. 166-170.

39. Структура и роль фарнезоидного X-рецептора в метаболизме желчных

кислот, а также терапевтическое воздействие на него при заболеваниях гепатобилиарной системы / Д.С. Шпаков, М.Р. Мунаева, Х.Б. Мальсагова [и др.]. – Текст : непосредственный // Медицина. Социология. Философия. Прикладные исследования. – 2023. – № 3. – С. 190-193.

40. Структура, функции гликопротеина-Р и его значение для рациональной фармакотерапии / Е.Н. Якушева, А.В. Щулькин, Н.М. Попова [и др.]. – Текст (визуальный) : непосредственный // Обзоры по клинической фармакологии и лекарственной терапии. – 2014. – Т. 12, № 2. – С. 3-11.

41. Ташенова, А.И. Транспортная система гликопротеина-Р и фармакокинетика лекарственных средств / А.И. Ташенова. – Текст : непосредственный // Биомедицина. – 2010. – Т.1, № 4. – С. 24-32.

42. Фарнезоидный рецептор (FXR) как потенциальная терапевтическая мишень при неалкогольной жировой болезни печени и ассоциированных заболеваниях / А.В. Боголюбова, А.Ю. Майоров, Е.Е. Мишина [и др.]. – Текст : непосредственный // Сахарный диабет. – 2017. – Т. 20, № 6. – С. 449-453.

43. Федотчева, Т.А. Фармакологические способы преодоления множественной лекарственной устойчивости к химиотерапии / Т.А. Федотчева, Н.Л. Шимановский. – Текст : непосредственный // Химико-фармацевтический журнал. – 2022. – Т. 56, № 10. – С. 4-11.

44. Функциональная активность гликопротеина-Р в гематоэнцефалическом барьере на фоне ишемии-реперфузии головного мозга / И.В. Черных, А.В. Щулькин, Е.Н. Якушева [и др.]. – Текст (визуальный) : непосредственный // Российский физиологический журнал им. И.М. Сеченова. – 2019. – Т. 105, № 5. – С. 657-664.

45. Шептулина, А.Ф. Ядерные рецепторы в регуляции транспорта и метаболизма желчных кислот / А.Ф. Шептулина, Е.Н. Широкова, В.Т. Ивашкин. – Текст : непосредственный // Российский журнал гастроэнтерологии, гепатологии, колопроктологии. – 2013. – № 5. – С. 32-45.

46. Шимановский, Н.Л. Роль искусственного интеллекта в снижении риска развития побочных реакций при множественных лекарственных взаимодействиях

/ Н.Л. Шимановский, В.А. Судаков, В.В. Береговых. – Текст : непосредственный // Вестник Российской академии медицинских наук. – 2024. – Т. 79, № 3. – С. 250-260.

47. Штиль, А.А. Эпигенетическая регуляция множественной лекарственной устойчивости в опухолевых клетках: передача сигналов, транскрипционная активация и возможности профилактики / А.А. Штиль. – Текст : непосредственный // Успехи современной биологии. – 2001. – Т. 121, № 6. – С. 563-575.

48. Экспрессия ядерных рецепторов PPAR, LXR и RXR в печени и показатели липидного и углеводного обмена в крови у чувствительных и резистентных к гепатоканцерогенезу линий мышей. / Е.Н. Пивоварова, Н.В. Багинская, М.Л. Перепечаева [и др.]. – Текст : непосредственный // Биомедицинская химия. – 2010. – Т. 56, № 4. – С. 480-489.

49. Якушева, Е.Н. Локализация, модели функционирования и физиологические функции гликопротеина-Р / Е.Н. Якушева, Д.Н. Титов, С.К. Правкин. – Текст (визуальный) : непосредственный // Успехи физиологических наук. – 2017. – Т. 48, № 4. – С. 70-87.

50. Якушева, Е.Н. Структура и функционирование белка множественной лекарственной устойчивости / Е.Н. Якушева, Д.С. Титов. – Текст (визуальный) : непосредственный // Биохимия. – 2018. – Т. 83, № 8. – С. 1148-1172.

51. A multidrug resistance transporter from human MCF-7 breast cancer cells / L.A. Doyle, W. Yang, L.V. Abruzzo [et al.]. – Text : visual // Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. – 1998. – Vol. 95, № 26. – P. 15665-15670.

52. A mutation in LXR $\alpha$  uncovers a role for cholesterol sensing in limiting metabolic dysfunction-associated steatohepatitis / A.T. Clark, L. Russo-Savage, L.A. Ashton [et al.]. – Text : visual // Nature Communications. – 2025. – Vol. 16, № 1. – P. 1102.

53. A new orphan member of the nuclear hormone receptor superfamily that interacts with a subset of retinoic acid response elements / M. Baes, T. Gulick, H. S. Choi [et al.]. – Text : visual // Molecular and Cellular Biology. – 1994. – Vol. 14, № 3. – P.

1544-1552.

54. A novel human hepatic organic anion transporting polypeptide (OATP2) / B. Hsiang, Y. Zhu, Z. Wang [et al.]. – Text : visual // *The Journal of Biological Chemistry*. – 1999. – Vol. 274, № 52. – P. 37161-37168.

55. A novel human organic anion transporting polypeptide localized to the basolateral hepatocyte membrane / J. König, Y. Cui, A.T. Nies [et al.]. – Text : visual // *American Journal of Physiology - Gastrointestinal and Liver Physiology*. – 2000. – Vol. 278, № 1. – P. G156-G164.

56. A Structural Model of the Constitutive Androstane Receptor Defines Novel Interactions That Mediate Ligand-Independent Activity / I. Dussault, M. Lin, K. Hollister [et al.]. – Text : visual // *Molecular and Cellular Biology*. – 2002. – Vol. 22, № 15. – P. 5270-5280.

57. ABCG2 Overexpression contributes to pevonedistat resistance / R.J. Kathawala, C.M. Espitia, T.M. Jones [et al.]. – Text : visual // *Cancers*. – 2020. – Vol. 12, № 2. – P. 429.

58. Abuznait, A.H. Exposure of LS-180 cells to drugs of diverse physicochemical and therapeutic properties up-regulates P-glycoprotein expression and activity / A.H. Abuznait, S.G. Patrick, A. Kaddoumi. – Text : visual // *Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*. – 2011. – Vol. 14, № 2. – P. 236-248.

59. Activated pregnenolone X-receptor is a target for ketoconazole and its analogs / H. Wang, H. Huang, H. Li [et al.]. – Text : electronic // *Clinical Cancer Research*. – 2007. – Vol. 13, № 8. – P. 2488-2495.

60. Activation of LXRs prevents bile acid toxicity and cholestasis in female mice / H. Uppal, S.P. Saini, A. Moschetta [et al.]. – Text : visual // *Hepatology*. – 2007. – Vol. 45, № 2. – P. 422-432.

61. Advances in our structural understanding of orphan nuclear receptors / N. Gallastegui, J.A. Mackinnon, R.J. Fletterick [et al.]. – Text : visual // *Trends in Biochemical Sciences*. – 2015. – Vol. 40, № 1. – P. 25-35.

62. Alemany, M. The Roles of Androgens in Humans: Biology, Metabolic Regulation and Health / M. Alemany – Text : visual // *International Journal of Molecular*

Sciences. – 2022. – Vol. 23, № 19. – P. 11952.

63. Alexander, S. Ion channels / S. Alexander, A. Mathie, J. Peters – Text : visual // *British Journal of Pharmacology*. – 2011. – Vol. 164, № 1. – P. S137-S174.

64. Allosteric Antagonism of the Pregnane X Receptor (PXR) / R. Kamaraj, M. Drastik, J. Maixnerova [et al.]. – Text : visual // *Cells*. – 2022. – Vol. 11, № 19. – P. 2974.

65. Al-Momany, B. Dihydrotestosterone Induces Chemo-Resistance of Triple-Negative Breast MDA-MB-231 Cancer Cells Towards Doxorubicin Independent of ABCG2 and miR-328-3p / B. Al-Momany, H. Hammad, M. Ahram – Text : visual // *Current Molecular Pharmacology*. – 2021. – Vol. 14, № 5. – P. 860-870.

66. An orphan nuclear receptor activated by pregnanes defines a novel steroid signaling pathway / S.A. Kliewer, J.T. Moore, L. Wade [et al.]. – Text : visual // *Cell*. – 1998. – Vol. 92, № 1. – P. 73-82.

67. An Updated Evolutionary Study of the Nuclear Receptor Protein Family / L. Papageorgiou, L. Shalzi, K. Pierouli [et al.]. – Text : visual // *World Academy of Sciences Journal*. – 2021. – Vol. 3. – P. 1-8.

68. Analysis of the effects of sex hormone background on the rat choroid plexus transcriptome by cDNA microarrays / T. Quintela, I. Gonçalves, L. C. Carreto [et al.]. – Text : visual // *PLoS One*. – 2013. – Vol. 8, № 4. – P. e60199.

69. Apfel, R. A novel orphan receptor specific for a subset of thyroid hormone-responsive elements and its interaction with the retinoid/thyroid hormone receptor subfamily / R. Apfel, D. Benbrook, E. Lernhardt [et al.]. – Text : visual // *Molecular and Cellular Biology*. – 1994. – Vol. 14, № 10. – P. 7025-7035.

70. Associations between Pregnane X Receptor and Breast Cancer Growth and Progression / B.A. Creamer, S.N. B. Sloan, J.F. Dennis [et al.]. – Text : visual // *Cells*. – 2020. – Vol. 9, № 10. – P. 2295.

71. ATP-binding cassette B1 transports seliciclib (R-roscovitine), a cyclin-dependent kinase inhibitor / Z. Rajnai, D. Méhn, E. Beéry [et al.]. – Text : visual // *Drug Metabolism and Disposition*. – 2010. – Vol. 38, № 11. – P. 2000-2006.

72. Bautista-Olivier, C.D. PXR as the tipping point between innate immune response, microbial infections, and drug metabolism / C.D. Bautista-Olivier, G. Elizondo

– Text : visual // Biochemical Pharmacology. – 2022. – Vol. 202. – P. 115147.

73. Bełtowski, J. Liver X receptor (LXR) and the reproductive system – a potential novel target for therapeutic intervention / J. Bełtowski, A. Semczuk – Text : visual // Pharmacological Reports. – 2010. – Vol. 62, № 1. – P. 15-27.

74. Bile acid metabolism and signaling, the microbiota, and metabolic disease / J. Cai, B. Rimal, C. Jiang [et al.]. – Text : visual // Pharmacology & Therapeutics. – 2022. – Vol. 237. – P. 108238.

75. Bile acid metabolism in health and ageing-related diseases / X.J. Li, C. Fang, R.H. Zhao [et al.]. – Text : visual // Biochemical Pharmacology. – 2024. – Vol. 225. – P. 116313.

76. Binding of Androgen- and Estrogen-Like Flavonoids to Their Cognate (Non)Nuclear Receptors: A Comparison by Computational Prediction / G. D'Arrigo, E. Gianquinto, G. Rossetti [et al.]. – Text : visual // Molecules. – 2021. – Vol. 26, № 6. – P. 1613.

77. Can bile salt export pump inhibition testing in drug discovery and development reduce liver injury risk? An International Transporter Consortium perspective / J. G. Kenna, K. S. Taskar, C. Battista [et al.]. – Text : visual // Clinical Pharmacology & Therapeutics. – 2018. – Vol. 104, № 5. – P. 916-932.

78. Capsaicin improves glucose homeostasis by enhancing glucagon-like peptide-1 secretion through the regulation of bile acid metabolism via the remodeling of the gut microbiota in male mice / S. Hui, L. Huang, X. Wang [et al.]. – Text : visual // The FASEB Journal. – 2020. – Vol. 34, № 6. – P. 8558-8573.

79. CAR requires Gadd45 $\beta$  to promote phenobarbital-induced mouse liver tumors in early stage / T. Hori, K. Yokobori, R. Moore [et al.]. – Text : visual // Frontiers in Oncology. – 2023. – Vol. 13. – P. 1217847.

80. Cellular uptake of rose bengal is mediated by OATP1B1/1B3 transporters / K. Sztandera, M. Gorzkiewicz, E.A. Zizzi [et al.]. – Text: visual // Bioelectrochemistry. – 2023. – Vol. 152. – P. 108449.

81. Chai, A.B. Regulation of P-Glycoprotein in the Brain / A.B. Chai, R. Callaghan, I.C. Gelissen. – Text : visual // International Journal of Molecular Sciences. –

2022. – Vol. 23, № 23. – P. 14667.

82. Chai, X. Nuclear receptors PXR and CAR: implications for drug metabolism regulation, pharmacogenomics and beyond / X. Chai, S. Zeng, W. Xie. – Text : visual // Expert Opinion on Drug Metabolism & Toxicology. – 2013. – Vol. 9, № 3. – P. 253-266.

83. Characterization of PXR mediated P-glycoprotein regulation in intestinal LS174T cells / B.P. Kota, V.H. Tran, J. Allen, M. Bebawy, B.D. Roufogalis – Text : visual // Pharmacological research. – 2010 – Vol. 62, N 5. – P. 426–431.

84. Chen, L. Post-translational modifications of nuclear receptors and human disease / L. Chen, Y. Ma, L. Qian. – Text : visual // Acta Pharmacologica Sinica. – 2019. – Vol. 40, № 6. – P. 716-725.

85. Cherian, M.T. Small-molecule modulators of the constitutive androstane receptor / M.T. Cherian, S.C. Chai, T. Chen. – Text : visual // Expert Opinion on Drug Metabolism & Toxicology. – 2015. – Vol. 11, № 7. – P. 1099-1114.

86. Cheung, K.W.K. A Comprehensive Analysis of Ontogeny of Renal Drug Transporters: mRNA Analyses, Quantitative Proteomics, and Localization / K.W.K. Cheung, B.D. van Groen, E. Spaans [et al.]. – Text : visual // Clinical Pharmacology & Therapeutics. – 2019. – Vol. 106, № 2. – P. 437-451.

87. Chiang, J. Y. L. Discovery of farnesoid X receptor and its role in bile acid metabolism / J. Y. L. Chiang, J. M. Ferrell. – Text : visual // Molecular and Cellular Endocrinology. – 2022. – Vol. 548. – P. 111618.

88. Cinnamamides, novel liver X receptor antagonists that inhibit ligand-induced lipogenesis and fatty liver. / W.C. Sim, D.G. Kim, K.J. Lee [et al.]. – Text: visual // The Journal of pharmacology and experimental therapeutics. – 2015 – Vol. 355, N 3. – P. 362–369.

89. Cloning of the human glucocorticoid receptor cDNA / M.V. Govindan, M. Devic, S. Green [et al.]. – Text : visual // Nucleic Acids Research. – 1985. – Vol. 13, № 22. – P. 8293-8304.

90. Colas, C. SLC transporters: structure, function, and drug discovery / C. Colas, P.M. Ung, A. Schlessinger. – Text : visual // MedChemComm. – 2016. – Vol. 7, № 6. – P. 1069-1081.

91. Colas, C. Toward a Systematic Structural and Functional Annotation of Solute Carriers Transporters-Example of the SLC6 and SLC7 Families / C. Colas – Text: visual // *Frontiers in Pharmacology*. – 2020. – Vol. 11. – P. 1229.

92. Coles, L.D. Estradiol and progesterone-mediated regulation of P-gp in P-gp overexpressing cells (NCI-ADR-RES) and placental cells (JAR) / L.D. Coles, I.J. Lee, P.J. Voulalas, N.D. Eddington. – Text : visual // *Molecular Pharmaceutics*. – 2009. – Vol. 6, № 6. – P. 1816-1825.

93. Complete OATP1B1 and OATP1B3 deficiency causes human Rotor syndrome by interrupting conjugated bilirubin reuptake into the liver / E. van de Steeg, V. Stránecký, H. Hartmannová [et al.]. – Text : visual // *The Journal of Clinical Investigation*. – 2012. – Vol. 122, № 2. – P. 519-528.

94. Computational study of the binding mechanism between farnesoid X receptor a and antagonist N-benzyl-N-(3-(tertbutyl)-4-hydroxyphenyl)-2,6-dichloro-4-(dimethylamino) benzamide / J. Du, M. Qiu, L. Guo [et al.]. – Text : visual // *Journal of Biomolecular Structure and Dynamics*. – 2019. – Vol. 37, № 6. – P. 1628-1640.

95. Constitutive androstane receptor and pregnane X receptor genotype influence efavirenz plasma concentration and CYP2B6 enzyme activity / Z. Petros, A. Habtewold, E. Makonnen [et al.]. – Text : visual // *Scientific Reports*. – 2022. – Vol. 12, № 1. – P. 9698.

96. Cui, Y.J. Tissue distribution, gender-divergent expression, ontogeny, and chemical induction of multidrug resistance transporter genes (Mdr1a, Mdr1b, Mdr2) in mice / Y.J. Cui, X. Cheng, Y.M. Weaver, C.D. Klaassen – Text : visual // *Drug Metabolism and Disposition*. – 2009. – Vol. 37, № 1. – P. 203-210.

97. Della Torre, S. Sex Differences: A Resultant of an Evolutionary Pressure?/ S. Della Torre, A. Maggi – Text : visual // *Cell metabolism*. – 2017. – Vol. 25, N 3. P. 499-505.

98. Dermauw, W. The ABC gene family in arthropods: comparative genomics and role in insecticide transport and resistance / W. Dermauw, T. Van Leeuwen // *Insect Biochemistry and Molecular Biology*. - 2014. - Vol. 45. - P. 89-110.

99. Dexamethasone down-regulates ABCG2 expression levels in breast cancer

cells / M. Honorat, A. Mesnier, A. Di Pietro [et al.]. – Text : visual // *Biochemical and Biophysical Research Communications*. – 2008. – Vol. 375, № 3. – P. 308-314.

100. Dexamethasone enhances constitutive androstane receptor expression in human hepatocytes: Consequences on cytochrome P450 gene regulation / J.-M. Pascussi, S. Gerbal-Chaloin, J.-M. Fabre [et al.]. – Text : visual // *Molecular Pharmacology*. – 2000. – Vol. 58, № 6. – P. 1441–1450.

101. Dey, S. Pharmacokinetics of erythromycin in rabbit corneas after single-dose infusion: role of P-glycoprotein as a barrier to in vivo ocular drug absorption / S. Dey, S. Gunda, A.K. Mitra. – Text : visual // *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*. – 2004. – Vol. 311, № 1. – P. 246-255.

102. Dhumeaux, D. Hereditary conjugated hyperbilirubinaemia: 37 years later / D. Dhumeaux, S. Erlinger – Text : visual // *Journal of Hepatology*. – 2013. – Vol. 58, № 2. – P. 388-390.

103. Differential regulation of sinusoidal and canalicular hepatic drug transporter expression by xenobiotics activating drug-sensing receptors in primary human hepatocytes / E. Jigorel, M. Le Vee, C. Boursier-Neyret [et al.]. – Text : visual // *Drug Metabolism and Disposition*. – 2006. – Vol. 34. – P. 1756-1763.

104. Dinh, D.T. Nuclear Receptors in Ovarian Function / D.T. Dinh, D.L. Russell – Text : visual // *Advances in Experimental Medicine and Biology*. – 2022. – Vol. 1390. – P. 41-58.

105. Discovery of Novel Human Constitutive Androstane Receptor Agonists with the Imidazo[1,2-a]pyridine Structure / I. Mejdrová, J. Dušek, K. Škach [et al.]. – Text : visual // *Journal of Medicinal Chemistry*. – 2023. – Vol. 66, № 4. – P. 2422-2456.

106. Drug Development and Drug Interactions | Possible Models for Decision-Making. – Text : visual // <https://www.fda.gov/drugs/drug-interactions-labeling/drug-development-and-drug-interactions-possible-models-decision-making>. – 2023.

107. Eckenstaler, R. The Role of ABCG2 in the Pathogenesis of Primary Hyperuricemia and Gout – An Update / R. Eckenstaler, R.A. Benndorf. – Text : visual // *International Journal of Molecular Sciences*. – 2021. – Vol. 22, № 13. – P. 6678.

108. Ee, P.L.R. Modulation of MRP1 protein transport by 17 $\beta$ -estradiol in BeWo

cells, a human placental choriocarcinoma cell line / P.L.R. Ee, A. Lacrete, E.W. Lee [et al.]. – Text : visual // *Molecular Pharmacology*. – 2004. – Vol. 65, № 6. – P. 1348-1355.

109. Effect of P-glycoprotein (P-gp) Inducers on Exposure of P-gp Substrates: Review of Clinical Drug-Drug Interaction Studies / M. Elmeliegy, M. Vourvahis, C. Guo [et al.]. – Text : visual // *Clinical Pharmacokinetics*. – 2020. – Vol. 59, № 6. – P. 699–714.

110. Efficacy and safety of the farnesoid X receptor agonist obeticholic acid in patients with type 2 diabetes and nonalcoholic fatty liver disease / S. Mudaliar, R.R. Henry, A.J. Sanyal [et al.]. – Text : visual // *Gastroenterology*. – 2013. – Vol. 145, № 3. – P. 574-582.

111. Efflux transport of estrogen glucuronides by human MRP2, MRP3, MRP4 and BCRP / E. Järvinen, F. Deng, H. Kidron [et al.]. – Text : visual // *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*. – 2018. – Vol. 178. – P. 99-107.

112. Endocrine regulation of gender-divergent mouse organic anion-transporting polypeptide (Oatp) expression / X. Cheng, J. Maher, H. Lu [et al.]. – Text : visual // *Molecular Pharmacology*. – 2006. – Vol. 70, № 4. – P. 1291-1297.

113. Endogenous bile acids are ligands for the nuclear receptor FXR/BAR / H. Wang, J. Chen, K. Hollister [et al.]. – Text : visual // *Molecular Cell*. – 1999. – Vol. 3, № 5. – P. 543-553.

114. Enhanced microbial bile acid deconjugation and impaired ileal uptake in pregnancy repress intestinal regulation of bile acid synthesis / C. Ovadia, A. Perdonés-Montero, K. Spagou [et al.]. – Text : visual // *Hepatology*. – 2019. – Vol. 70, № 1. – P. 276–293.

115. Enhancement of genotype 1 hepatitis C virus replication by bile acids through FXR / C. Scholtes, O. Diaz, V. Icard [et al.]. – Text : visual // *Journal of Hepatology*. – 2008. – Vol. 48, № 2. – P. 192-199.

116. Estradiol (Blood) – Text : electronic // *Health Encyclopedia* – University of Rochester Medical Center. – 2022. – URL: <https://www.urmc.rochester.edu/encyclopedia/content.aspx?ContentTypeID=167&ContentID=estradiol> (accessed: 11.12.2022).

117. Estrogen-mediated post transcriptional down-regulation of breast cancer resistance protein/ABCG2 / Y. Imai, E. Ishikawa, S. Asada [et al.]. – Text : visual // *Cancer Research*. – 2005. – Vol. 65, № 2. – P. 596-604.

118. Estrogen-mediated post transcriptional down-regulation of P-glycoprotein in MDR1-transduced human breast cancer cells / K. Mutoh, S. Tsukahara, J. Mitsuhashi [et al.]. – Text : visual // *Cancer Science*. – 2006. – Vol. 97, № 11. – P. 1198-1204.

119. Evolution of promiscuous nuclear hormone receptors: LXR, FXR, VDR, PXR, and CAR / M.D. Krasowski, A. Ni, L.R. Hagey [et al.]. – Text : electronic // *Molecular and Cellular Endocrinology*. – 2011. – Vol. 334, № 1-2. – P. 39-48.

120. Evseenko, D.A. Independent regulation of apical and basolateral drug transporter expression and function in placental trophoblasts by cytokines, steroids, and growth factors / D.A. Evseenko, J.W. Paxton, J.A. Keelan. – Text : visual // *Drug Metabolism and Disposition*. – 2007. – Vol. 35, № 4. – P. 595-601.

121. Expression and regulation of ABCG2/BCRP1 by sex steroids in the Harderian gland of the Syrian hamster (*Mesocricetus auratus*) / L. Mares, F. Vilchis, B. Chávez [et al.]. – Text: visual // *Comptes Rendus Biologies*. – 2019. – Vol. 342, № 9-10. – P. 279-289.

122. Expression level of ABCG2 in the placenta decreases from the mid stage to the end of gestation / S. Yasuda, S. Itagaki, T. Hirano [et al.]. – Text : visual // *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*. – 2005. – Vol. 69, № 10. – P. 1871-1876.

123. Eytan, G.D. Functional reconstitution of P-glycoprotein reveals an apparent near stoichiometric drug transport to ATP hydrolysis / G.D. Eytan, R. Regev, Y.G. Assaraf. – Text : visual // *The Journal of Biological Chemistry*. – 1996. – Vol. 271, № 6. – P. 3172-3178.

124. Farnesoid X receptor agonists as therapeutic target for cardiometabolic diseases / C. Li, J. Yang, Y. Wang [et al.]. – Text : visual // *Frontiers in Pharmacology*. – 2020. – Vol. 11. – P. 1247.

125. Farnesoid X receptor responds to bile acids and represses cholesterol 7alpha-hydroxylase gene (CYP7A1) transcription / J.Y. Chiang, R. Kimmel, C. Weinberger [et al.]. – Text : visual // *The Journal of Biological Chemistry*. – 2000. – Vol. 275, № 15. –

P. 10918-10924.

126. Farnesoid X receptor, hepatocyte nuclear factors 1alpha and 3beta are essential for transcriptional activation of the liver-specific organic anion transporter-2 gene / H. Ohtsuka, T. Abe, T. Onogawa [et al.]. – Text : visual // *Journal of Gastroenterology*. – 2006. – Vol. 41, № 4. – P. 369-377.

127. Farnesoid X receptor: From Structure to Function and Its Pharmacology in Liver Fibrosis / C. Ding, Z. Wang, X. Dou, [et al.]. – Text : visual // *Aging Dis.* – 2024. – Vol. 15, № 4. – P. 1508-1536.

128. Fitting the elementary rate constants of the P-GP transporter network in the hMDR1-MDCK confluent cell monolayer using a particle swarm algorithm / D. Agnani, P. Acharya, E. Martinez [et al.]. – Text : visual // *PLoS One*. – 2011. – Vol. 6, № 10. – P. e25086.

129. Frigo, D.E. Nuclear receptors: from molecular mechanisms to therapeutics / D.E. Frigo, M. Bondesson, C. Williams – Text : visual // *Essays in Biochemistry*. – 2021. – Vol. 65, № 6. – P. 847-856.

130. FXR agonist GW4064 improves liver and intestinal pathology and alters bile acid metabolism in rats undergoing small intestinal resection / Y. Cao, Y. Xiao, K. Zhou [et al.]. – Text : visual // *American Journal of Physiology. Gastrointestinal and Liver Physiology*. – 2019. – Vol. 317, № 2. – P. G108-G115.

131. FXR regulates intestinal cancer stem cell proliferation / T. Fu, S. Coulter, E. Yoshihara [et al.]. – Text : visual // *Cell*. – 2019. – Vol. 176, № 5. – P. 1098-1112.

132. FXR, a multipurpose nuclear receptor / F.Y. Lee, H. Lee, M.L. Hubbert [et al.]. – Text : visual // *Trends in Biochemical Sciences*. – 2006. – Vol. 31, № 10. – P. 572-580.

133. Gao X. The roles of sex steroid receptor coregulators in cancer / X. Gao, B.W. Loggie, Z. Nawaz – Text : visual // *Molecular cancer*. – 2002. – Vol. 14, N 1. – P. 7.

134. Gender dictates the nuclear receptor-mediated regulation of CYP3A44 / S. Anakk, W. Huang, J.L. Staudinger [et al.]. – Text : visual // *Drug Metabolism and Disposition*. – 2007. – Vol. 35, № 1. – P. 36-42.

135. GeneNote: whole genome expression profiles in normal human tissues / O.

Shmueli, S. Horn-Saban, V. Chalifa-Caspi [et al.]. – Text : visual // *Comptes Rendus Biologies.* – 2003. – Vol. 326, № 10-11. – P. 1067-1072.

136. Gessner, A. Multidrug Resistance in Cancer Therapy: The Role of P-Glycoprotein and Other ABC Transporters / A. Gessner, J. König, M.F. Fromm. – Text : visual // *Pharmaceuticals.* – 2019. – Vol. 12, № 4. – P. 168.

137. Giguere, V. Orphan nuclear receptors: from gene to function / V. Giguere. – Text : visual // *Endocrine Reviews.* – 1999. – Vol. 20, № 5. – P. 689-725.

138. Gioiello, A. Patented Farnesoid X receptor modulators: a review (2019 - present) / A. Gioiello, E. Rosatelli, B. Cerra – Text : visual // *Expert Opinion on Therapeutic Patents.* – 2024. – Vol. 34, № 7. – P. 547-564.

139. Guggulsterone, a farnesoid X receptor antagonist lowers plasma trimethylamine-N-oxide levels: an evidence from in vitro and in vivo studies / A. Gautam, Y.N. Paudel, S. Abidin [et al.]. – Text : visual // *Human & Experimental Toxicology.* – 2019. – Vol. 38, № 3. – P. 356–370.

140. Gustafsson, J.A. Historical overview of nuclear receptors / J. A. Gustafsson. – Text : visual // *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology.* – 2016. – Vol. 157. – P. 3-6.

141. Gut microbiota regulates bile acid metabolism by reducing the levels of tauro-beta-muricholic acid, a naturally occurring FXR antagonist / S.I. Sayin, A. Wahlström, J. Felin [et al.]. – Text : visual // *Cell Metabolism.* – 2013. – Vol. 17, № 2. – P. 225-235.

142. Gutendorf, B. Comparison of an array of in vitro assays for the assessment of the estrogenic potential of natural and synthetic estrogens, phytoestrogens and xenoestrogens / B. Gutendorf, J. Westendorf. – Text : visual // *Toxicology.* – 2001. – Vol. 166, № 1-2. – P. 79-89.

143. Gyimesi, G. Transporter-Mediated Drug Delivery / G. Gyimesi, M.A. Hediger. – Text : visual // *Molecules.* – 2023. – Vol. 28, № 3. – P. 1151.

144. Hagenbuch, B. Organic anion transporting polypeptides: Pharmacology, toxicology, structure, and transport mechanisms / B. Hagenbuch, B. Stieger, K.P. Locher – Text : visual // *Pharmacological Reviews.* – 2025. – Vol. 77, № 2. – P. 100023.

145. Hagenbuch, B. Xenobiotic transporters of the human organic anion

transporting polypeptides (OATP) family / B. Hagenbuch, C. Gui. – Text : visual // *Xenobiotica*. – 2008. – Vol. 38, № 7-8. – P. 778–801.

146. Harmful effect of ER $\beta$  on BCRP-mediated drug resistance and cell proliferation in ER $\alpha$ /PR-negative breast cancer / W. Li, M. Jia, X. Qin [et al.]. – Text : visual // *FEBS Journal*. – 2013. – Vol. 280, № 23. – P. 6128-6140.

147. Hartz, A. M. 17- $\beta$ -Estradiol: a powerful modulator of blood-brain barrier BCRP activity / A.M. Hartz, A. Mahringer, D.S. Miller, B. Bauer. – Text : visual // *Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism*. – 2010. – Vol. 30, № 9. – P. 1742-1755.

148. Hartz, A.M. Estrogen receptor beta signaling through phosphatase and tensin homolog/phosphoinositide 3-kinase/Akt/glycogen synthase kinase 3 down-regulates blood-brain barrier breast cancer resistance protein / A.M. Hartz, E.K. Madole, D.S. Miller, B. Bauer – Text : visual // *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*. – 2010. – Vol. 334, № 2. – P. 467-476.

149. Hepatic CYP2B6 expression: gender and ethnic differences and relationship to CYP2B6 genotype and CAR (constitutive androstane receptor) expression / V. Lamba, J. Lamba, K. Yasuda [et al.]. – Text : visual // *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*. – 2003. – Vol. 307, № 3. – P. 906-922.

150. Hepatic transport of bile salts / G. Kullak-Ublick, B. Stieger, B. Hagenbuch [et al.] – Text : visual // *Seminars in Liver Disease*. – 2000. – Vol. 20, № 3. – P. 273–292.

151. Hepatic uptake of cholecystinin octapeptide by organic anion-transporting polypeptides OATP4 and OATP8 of rat and human liver / M.G. Ismail, B. Stieger, V. Cattori [et al.]. – Text : visual // *Gastroenterology*. – 2001. – Vol. 121, № 5. – P. 1185-1190.

152. Heterodimerization of Retinoid X Receptor with Xenobiotic Receptor partners occurs in the cytoplasmic compartment: Mechanistic insights of events in living cells / A.K. Dash, A.S. Yende, B. Jaiswal [et al.]. – Text : visual // *Experimental Cell Research*. – 2017. – Vol. 360, № 2. – P. 337-346.

153. High glucose decreases expression and activity of p-glycoprotein in cultured human retinal pigment epithelium possibly through iNOS induction / Y. Zhang, C. Li, X. Sun [et al.]. – Text : visual // *PLoS One*. – 2012. – Vol. 7, № 2. – P. e31631.

154. Hilgers, A.R. Caco-2 cell monolayers as a model for drug transport across the intestinal mucosa / A.R. Hilgers, R.A. Conradi, P.S. Burton. – Text : visual // *Pharmaceutical research*. – 1990. – Vol. 7, N 9. – P. 902-910.

155. Hoffmann, J.M. Nuclear hormone receptors: Roles of xenobiotic detoxification and sterol homeostasis in healthy aging / J.M. Hoffmann, L. Partridge. – Text : visual // *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology*. – 2015. – Vol. 50, № 5. – P. 380-392.

156. Hollenstein, K. Structure and mechanism of ABC transporter proteins / K. Hollenstein, R.J. Dawson, K.P. Locher. – Text : visual // *Current Opinion in Structural Biology*. – 2007. – Vol. 17, № 4. – P. 412-418.

157. Honkakoski, P. Searching for Constitutive Androstane Receptor Modulators / P. Honkakoski. – Text : visual // *Drug Metabolism and Disposition*. – 2022. – Vol. 50, № 7. – P. 1002-1009.

158. Hormonal regulation of hepatic organic anion transporting polypeptides / M. Wood, M. Ananthanarayanan, B. Jones [et al.]. – Text : visual // *Molecular Pharmacology*. – 2005. – Vol. 68, № 1. – P. 218-225.

159. Hoyenga, K.B. Gender and energy balance: sex differences in adaptations for feast and famine./ K.B. Hoyenga, K.T. Hoyenga – Text : visual // *Physiology and behavior*. – 1982. – Vol. 28, N 3. – P. 545-63.

160. Huang, P. Structural overview of the nuclear receptor superfamily: insights into physiology and therapeutics / P. Huang, V. Chandra, F. Rastinejad – Text : visual // *Annual Review of Physiology*. – 2010. – Vol. 72. – P. 247-272.

161. Identification of a novel gene family encoding human liver-specific organic anion transporter LST-1 / T. Abe, M. Kakyo, T. Tokui [et al.]. – Text : visual // *The Journal of Biological Chemistry*. – 1999. – Vol. 274, № 24. – P. 17159-17163.

162. Identification of a nuclear receptor for bile acids / M. Makishima, A.Y. Okamoto, J.J. Repa [et al.]. – Text : visual // *Science*. – 1999. – Vol. 284, № 5418. – P. 1362-1365.

163. Identification of a nuclear receptor that is activated by farnesol metabolites / B. M. Forman, E. Goode, J. Chen [et al.]. – Text : visual // *Cell*. – 1995. – Vol. 81, № 5.

– P. 687-693.

164. Identification of androgen-regulated genes in mouse kidney by representational difference analysis and random arbitrarily primed polymerase chain reaction / M.J. Melià, N. Bofill, M. Hubank [et al.]. – Text : visual // *Endocrinology*. – 1998. – Vol. 139, № 2. – P. 688–695.

165. Identifying CAR Modulators Utilizing a Reporter Gene Assay / C. Lynch, J. Zhao, H. Wang [et al.]. – Text : visual // *Methods in Molecular Biology*. – 2022. – Vol. 2474. – P. 29-38.

166. Ijssennagger, N. Gene expression profiling in human precision cut liver slices in response to the FXR agonist obeticholic acid / N. Ijssennagger, A. W. F. Janssen, A. Milona [et al.]. – Text : visual // *Journal of Hepatology*. – 2016. – Vol. 64, № 5. – P. 1158-1166.

167. In silico and in vitro assessment of OATP1B1 inhibition in drug discovery / M. L. Danielson, G. A. Sawada, T. J. Raub [et al.]. – Text : visual // *Molecular Pharmaceutics*. – 2018. – Vol. 15, № 8. – P. 3060-3068.

168. Interaction of glucocorticoids with FXR/FGF19/FGF21-mediated ileum-liver crosstalk / F.A. Al-Aqil, M.J. Monte, A. Peleteiro-Vigil [et al.]. – Text : visual // *Biochimica et Biophysica Acta Molecular Basis of Disease*. – 2018. – Vol. 1864, № 9. – P. 2927-2937.

169. Interaction of Sulfonylureas with Liver Uptake Transporters OATP1B1 and OATP1B3 / Y. Chen, L. Chen, H. Zhang [et al.]. – Text : visual // *Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology*. – 2018. – Vol. 123, № 2. – P. 147-154.

170. Interaction of the breast cancer resistance protein with plant polyphenols / H.C. Cooray, T. Janvilistri, H.W. van Veen [et al.]. – Text : visual // *Biochemical and Biophysical Research Communications*. – 2004. – Vol. 317, № 1. – P. 269-275.

171. International Union of Pharmacology. LXVI. Orphan nuclear receptors / G. Benoit, A. Cooney, V. Giguere [et al.]. – Text : visual // *Pharmacological Reviews*. – 2006. – Vol. 58, № 4. – P. 798-836.

172. Intestine-selective farnesoid X receptor inhibition improves obesity-related metabolic dysfunction / C. Jiang, C. Xie, Y. Lv [et al.]. – Text : visual // *Nature*

Communications. – 2015. – Vol. 6. – P. 10166.

173. Intracellular localization of pregnane X receptor in HepG2 cells cultured by the hanging drop method / K. Yokobori, K. Kobayashi, I. Azuma [et al.]. – Text : visual // *Drug Metabolism and Pharmacokinetics*. – 2017. – Vol. 32, № 5. – P. 265-272.

174. Intrahepatic cholestasis of pregnancy levels of sulfated progesterone metabolites inhibit farnesoid X receptor resulting in a cholestatic phenotype / S. Abu-Hayyeh, G. Papacleovoulou, A. Lövgren-Sandblom [et al.]. – Text : visual // *Hepatology*. – 2013. – Vol. 57, № 2. – P. 716-726.

175. Jaundice revisited: recent advances in the diagnosis and treatment of inherited cholestatic liver diseases / H.L. Chen, S.H. Wu, S.H. Hsu [et al.]. – Text : visual // *Journal of Biomedical Science*. – 2018. – Vol. 25, № 1. – P. 75.

176. Jin, M.C. Sex Steroid Hormones Differentially Regulate the Expression of P-Glycoprotein in the Blood-Brain Barrier of Rats / M.C. Jin, E.W. Lee, Q. Mao, J.D. Unadkat. – Text : visual // *Drug Metabolism and Disposition*. – 2006. – Vol. 34, № 7. – P. 1195-1201.

177. Juliano, R.L. A surface glycoprotein modulating drug permeability in Chinese hamster ovary cell mutants / R.L. Juliano, V. Ling. – Text: visual // *Biochimica et Biophysica Acta*. – 1976. – Vol. 455, № 1. – P. 155-162.

178. Kadmiel, M. Glucocorticoid receptor signaling in health and disease / M. Kadmiel, J. A. Cidlowski. – Text : visual // *Trends in Pharmacological Sciences*. – 2013. – Vol. 34, № 9. – P. 518-530.

179. Kalaany, N.Y. LXRs and FXR: The yin and yang of cholesterol and fat metabolism / N.Y. Kalaany, D.J. Mangelsdorf. – Text : visual // *Annual Review of Physiology*. – 2006. – Vol. 68. – P. 159-191.

180. Kanado, Y. Estradiol regulation of P-glycoprotein expression in mouse kidney and human tubular epithelial cells, implication for renal clearance of drugs / Y. Kanado, Y. Tsurudome, Y. Omata [et al.]. – Text : visual // *Biochemical and Biophysical Research Communications*. – 2019. – Vol. 519. – P. 613-619.

181. Kawamoto T. Estrogen activation of the nuclear orphan receptor CAR (constitutive active receptor) in induction of the mouse CYP2B10 gene / T. Kawamoto,

S. Kakizaki, K. Yoshinari [et al.]. – Text : visual // *Molecular Endocrinology*. – 2000. – Vol. 14, № 11. – P. 1897-1905.

182. Ketoconazole and miconazole are antagonists of the human glucocorticoid receptor: Consequences on the expression and function of the constitutive androstane receptor and the pregnane X receptor / C. Duret, M. Daujat-Chavanieu, J.-M. Pascussi [et al.]. – Text : visual // *Molecular Pharmacology*. – 2006. – Vol. 70, № 1. – P. 329-339.

183. Key to life: physiological role and clinical implications of progesterone / B. Nagy, J. Szekeres-Barthó, G. L. Kovács [et al.]. – Text : visual // *International Journal of Molecular Sciences*. – 2021. – Vol. 22, № 20. – P. 11039.

184. Kilby, E.L. Testosterone stimulates cholesterol clearance from human macrophages by activating LXR $\alpha$  / E.L. Kilby, D.M. Kelly, T.H. Jones. – Text : visual // *Life Sciences*. – 2021. – Vol. 269. – P. 119040.

185. Kininis, M. A global view of transcriptional regulation by nuclear receptors: gene expression, factor localization, and DNA sequence analysis / M. Kininis, W.L. Kraus. – Text : visual // *Nuclear Receptor Signaling*. – 2008. – Vol. 6. – P. e005.

186. Kitamura, S. Studies on the Intestinal Absorption Characteristics of Sulfasalazine, a Breast Cancer Resistance Protein (BCRP) Substrate / S. Kitamura, B.L. Urquhart, R. Fujiwara, D. Markovich, Y. Sugiyama. – Text : visual // *Pharmaceutical Research*. – 2008. – Vol. 25, № 12. – P. 2866-2874.

187. Kuan, K.K.W. Female Reproductive Systems: Hormone Dependence and Receptor Expression. / K.K.W. Kuan, P.T.K. Saunders – Text : visual // *Advances in experimental medicine and biology*. – 2022. – Vol. 1390. – P. 21–39.

188. Large-scale purification of functional human P-glycoprotein (ABCB1) / K. Nandigama, S. Lusvarghi, S. Shukla [et al.]. – Text : visual // *Protein Expression and Purification*. – 2019. – Vol. 159. – P. 60-68.

189. Li, W. Harmful effect of ER $\beta$  on BCRP-mediated drug resistance and cell proliferation in ER $\alpha$ /PR-negative breast cancer / W. Li, M. Jia, X. Qin [et al.]. – Text : visual // *FEBS Journal*. – 2013. – Vol. 280, № 23. – P. 6128-6140. – DOI: 10.1111/febs.12533.

190. Liew Y, Capule FR, Makmor-Bakry M. Effects of genetic polymorphisms of

ABCB1 on the efficacy of anesthetic and analgesic agents: a systematic review. *Pharmacogenomics*. 2021 Nov;22(16):1099-1106.

191. Liu, X. Drug Transporters in Drug Disposition, Effects and Toxicity / X. Liu, G. Pan. – Text : visual // *Advances in Experimental Medicine and Biology*. – 2019. – Vol. 1141.

192. Liver X Receptor: an oxysterol sensor and a major player in the control of lipogenesis / S. Ducheix, J.M. Lobaccaro, P.G. Martin [et al.]. – Text : visual // *Chemistry and Physics of Lipids*. – 2011. – Vol. 164, № 6. – P. 500-514.

193. Liver X receptors and their agonists: Targeting for cholesterol homeostasis and cardiovascular diseases / Z. Ma, C. Deng, W. Hu [et al.]. – Text : visual // *Current Issues in Molecular Biology*. – 2017. – Vol. 22. – P. 41-64.

194. Lonai'd, D.M. Nuclear receptor coregulators: Modulators of pathology and therapeutic targets / D.M. Lonai'd, B.W. O'Malley. – Text : visual // *Nature Reviews Endocrinology*. – 2012. – Vol. 8, № 10. – P. 598-604.

195. Loo, T.W. Identification of Residues in the Drug Translocation Pathway of the Human Multidrug Resistance P-glycoprotein by Arginine Mutagenesis / T.W. Loo, M.C. Bartlett, D.M. Clarke. – Text : visual // *The Journal of Biological Chemistry*. – 2009. – Vol. 284, № 36. – P. 24074-24087.

196. Low retinol levels differentially modulate bile salt-induced expression of human and mouse hepatic bile salt transporters / M.O. Hoeke, J.R. Plass, J. Heegsma [et al.]. – Text : visual // *Hepatology*. – 2009. – Vol. 49, № 1. – P. 151-159.

197. LXR, a nuclear receptor that defines a distinct retinoid response pathway / P. J. Willy, K. Umesono, E. S. Ong [et al.]. – Text : visual // *Genes & Development*. – 1995. – Vol. 9, № 9. – P. 1033-1045.

198. LXRalpha is uniquely required for maximal reverse cholesterol transport and atheroprotection in ApoE-deficient mice / C. Hong, M.N. Bradley, X. Rong [et al.]. – Text : visual // *Journal of Lipid Research*. – 2012. – Vol. 53, № 6. – P. 1126-1133.

199. LXRbeta is required for adipocyte growth, glucose homeostasis, and beta cell function / I. Gerin, V.W. Dolinsky, J.G. Shackman [et al.]. – Text : visual // *The Journal of Biological Chemistry*. – 2005. – Vol. 280, № 24. – P. 23024-23031.

200. LXRs control lipid-inducible expression of the apolipoprotein E gene in macrophages and adipocytes / B.A. Laffitte, J.J. Repa, S.B. Joseph [et al.]. – Text : visual // Proceedings of the National Academy of Sciences USA. – 2001. – Vol. 98, № 2. – P. 507-512.

201. LXRs link metabolism to inflammation through Abca1-dependent regulation of membrane composition and TLR signaling / A. Ito, C. Hong, X. Rong [et al.]. – Text : visual // eLife. – 2015. – Vol. 4, №. – P. e08009.

202. Malek, G. Emerging roles for nuclear receptors in the pathogenesis of age-related macular degeneration / G. Malek, E.M. Lad – Text : visual // Cellular and Molecular Life Sciences. – 2014. – Vol. 71, № 23. – P. 4617-4636.

203. Matsubara, T. FXR signaling in the enterohepatic system / T. Matsubara, F. Li, F.J. Gonzalez. – Text : visual // Molecular and Cellular Endocrinology. – 2013. – Vol. 368, № 1-2. – P. 17-29.

204. Mauvais-Jarvis, F. Sex differences in energy metabolism: natural selection, mechanisms and consequences. / F. Mauvais-Jarvis – Text : visual // Nature reviews. Nephrology. – 2024. – Vol. 20, N 1. – P. 56-69.

205. Mechanism for alternating access in neurotransmitter transporters / L.R. Forrest, Y.W. Zhang, M.T. Jacobs [et al.]. – Text : visual // Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. – 2008. – Vol. 105, № 29. – P. 10338-10343.

206. Mellor, H.R. Resistance to chemotherapy in cancer: A complex and integrated cellular response / H.R. Mellor, R. Callaghan. – Text : visual // Pharmacology. – 2008. – Vol. 81, № 4. – P. 275-300.

207. Membrane transporters in drug development / K.M. Giacomini, S.M. Huang, D.J. Tweedie [et al.]. – Text : visual // Nature Reviews Drug Discovery. – 2010. – Vol. 9, № 3. – P. 215-236.

208. Minireview: Liver X receptor beta: Emerging roles in physiology and diseases / C. Gabbi, M. Warner, J.A. Gustafsson [et al.]. – Text : visual // Molecular Endocrinology. – 2009. – Vol. 23, № 2. – P. 129-136.

209. Mitochondrial F-ATP synthase and its transition into an energy-dissipating

molecular machine / G. Lippe, G. Coluccino, M. Zancani [et al.]. – Text : visual // *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*. – 2019. – Vol. 2019. – P. 1-10.

210. Mogrol stimulates G-protein-coupled bile acid receptor 1 (GPBAR1/TGR5) and insulin secretion from pancreatic  $\beta$ -cells and alleviates hyperglycemia in mice / C. Tanaka, N. Harada, Y. Teraoka [et al.]. – Text : visual // *Scientific Reports*. – 2024. – Vol. 14, № 1. – P. 3244.

211. Moiseenkova-Bell, V. Ion Channels: Intersection of Structure, Function, and Pharmacology / V. Moiseenkova-Bell, L. Delemotte, D.L. Minor Jr. – Text : visual // *Journal of Molecular Biology*. – 2021. – Vol. 433, № 17. – P. 167102.

212. Moisey, R. Serum testosterone and bioavailable testosterone correlate with age and body size in hypogonadal men treated with testosterone undecanoate (1000 mg IM – Nebido) / R. Moisey, J. Swinburne, S. Orme. – Text : visual // *Clinical Endocrinology*. – 2008. – Vol. 69, № 4. – P. 642-647.

213. Molecular aspects of ABCB1 and ABCG2 in Gallbladder cancer and its clinical relevance / Nimisha, S.S. Saluja, A.K. Sharma [et al.]. – Text : visual // *Molecular and Cellular Biochemistry*. – 2023. – Vol. 478, № 10. – P. 2379-2394.

214. Molecular characterization and inhibition of amanitin uptake into human hepatocytes / K. Letschert, H. Faulstich, D. Keller [et al.]. – Text : visual // *Toxicological Sciences*. – 2006. – Vol. 91, № 1. – P. 140-149.

215. Muricholic bile acids are potent regulators of bile acid synthesis via a positive feedback mechanism / X. Hu, Y. Bonde, G. Eggertsen [et al.]. – Text : visual // *Journal of Internal Medicine*. – 2014. – Vol. 275, № 1. – P. 27-38.

216. Mutation of a single amino acid of pregnane X receptor switches an antagonist to agonist by altering AF-2 helix positioning / A.D. Huber, W.C. Wright, W. Lin [et al.]. – Text : visual // *Cell Mol Life Sci*. – 2021. – Vol. 78, № 1. – P. 317-335.

217. Mutations in the nuclear bile acid receptor FXR cause progressive familial intrahepatic cholestasis / N. Gomez-Ospina, C.J. Potter, R. Xiao [et al.]. – Text : visual // *Nature Communications*. – 2016. – Vol. 7. – P. 10713.

218. Nakanishi, T. Breast cancer resistance protein (BCRP/ABCG2): its role in multidrug resistance and regulation of its gene expression / T. Nakanishi, D.D. Ross. –

Text : visual // Chinese Journal of Cancer. – 2012. – Vol. 31, № 2. – P. 73-99.

219. NER, a new member of the gene family encoding the human steroid hormone nuclear receptor / D.M. Shinar, N. Endo, S.J. Rutledge [et al.]. – Text : visual // Gene. – 1994. – Vol. 147, № 2. – P. 273-276.

220. Nickel S. The xenoestrogens ethinylestradiol and bisphenol A regulate BCRP at the blood-brain barrier of rats / S. Nickel, A. Mahringer. – Text : visual // Xenobiotica. – 2014. – Vol. 44, № 11. – P. 1046-1054.

221. Nielsen, M.M.K. Current State of SLC and ABC Transporters in the Skin and Their Relation to Sweat Metabolites and Skin Diseases / M.M.K. Nielsen, E. Aryal, E. Safari [et al.]. – Text : visual // Proteomes. – 2021. – Vol. 9, № 2. – P. 23.

222. Noelia, A.G. Liver X receptors as regulators of macrophage inflammatory and metabolic pathways / A.G. Noelia, A. Castrillo. – Text : visual // Biochimica et Biophysica Acta. – 2011. – Vol. 1812, № 8. – P. 982-994.

223. Nuclear receptor SHP dampens transcription function and abrogates mitotic chromatin association of PXR and ER $\alpha$  via intermolecular interactions / S. Kumar, R. Vijayan, A.K. Dash [et al.]. – Text : visual // Biochimica et Biophysica Acta Gene Regulatory Mechanisms. – 2021. – Vol. 1864, № 3. – P. 194683.

224. OATP1B3 is expressed in pancreatic  $\beta$ -islet cells and enhances the insulinotropic effect of the sulfonylurea derivative glibenclamide / H.E. Meyer zu Schwabedissen, K. Boettcher, T. Steiner [et al.]. – Text : visual // Diabetes. – 2014. – Vol. 63. – P. 775-784.

225. Oldham, M.L. Structural insights into ABC transporter mechanism / M.L. Oldham, A.L. Davidson, J. Chen. – Text : visual // Current Opinion in Structural Biology. – 2008. – Vol. 18, № 6. – P. 726-733.

226. Once and for all, LXRA and LXRbeta are gatekeepers of the endocrine system / S. Maqdasy, A. Trousson, I. Tauveron [et al.]. – Text : visual // Molecular Aspects of Medicine. – 2016. – Vol. 49. – P. 31-46.

227. Organic anion-transporting polypeptide B (OATP-B) and its functional comparison with three other OATPs of human liver / G.A. Kullak-Ublick, M.G. Ismail, B. Stieger [et al.]. – Text: visual // Gastroenterology. – 2001. – Vol. 120, № 2. – P. 525-

533.

228. Ovarian hormones modulate multidrug resistance transporters in the ovary / L.M. Brayboy, L.O. Knapik, S. Long [et al.]. – Text : visual // *Contracept Reprod Med.* – 2018. – Vol. 3. – P. 26.

229. Overexpression of OATP1B3 confers apoptotic resistance in colon cancer / W. Lee, A. Belkhiri, A.C. Lockhart, [et al.]. – Text : visual // *Cancer Research.* – 2008. – Vol. 68, № 24. – P. 10315-10323.

230. Pakdel, F. The Role of Estrogen Receptors in Health and Disease / F. Pakdel – Text : visual // *International Journal of Molecular Sciences.* – 2023. – Vol. 24, № 14. – P. 11354.

231. Palmgren, M.G. P-Type ATPases / M.G. Palmgren, P. Nissen. – Text : visual // *Annual Review of Biophysics.* – 2011. – Vol. 40. – P. 243-266.

232. Pan, G. Roles of hepatic drug transporters in drug disposition and liver toxicity / G. Pan. – Text : visual // *Advances in Experimental Medicine and Biology.* – 2019. – Vol. 1141. – P. 293-340.

233. Pawlak, M. General molecular biology and architecture of nuclear receptors / M. Pawlak, P. Lefebvre, B. Staels. – Text : visual // *Current Topics in Medicinal Chemistry.* – 2012. – Vol. 12, № 6. – P. 486-504.

234. Pedersen, P.L. Transport ATPases: structure, motors, mechanism and medicine: a brief overview / P.L. Pedersen. – Text : visual // *Journal of Bioenergetics and Biomembranes.* – 2005. – Vol. 37, № 6. – P. 349-357.

235. Peet, D.J. The LXRs: A new class of oxysterol receptors / D.J. Peet, B.A. Janowski, D.J. Mangelsdorf. – Text : visual // *Current Opinion in Genetics & Development.* – 1998. – Vol. 8, № 5. – P. 571-575.

236. Perland, E. Classification systems of secondary active transporters / E. Perland, R. Fredriksson. – Text : visual // *Trends in Pharmacological Sciences.* – 2017. – Vol. 38, № 3. – P. 305-315.

237. Peroxisome proliferator-activated receptor gamma-regulated ABCG2 expression confers cytoprotection to human dendritic cells / I. Szatmari, G. Vamosi, P. Brazda [et al.]. – Text : visual // *The Journal of Biological Chemistry.* – 2006. – Vol. 281,

№ 33. – P. 23812-23823.

238. P-GP localization in mitochondria and its functional characterization in multiple drug-resistant cell lines / M. Solazzo, O. Fantappiè, N. Lasagna [et al.]. – Text : visual // *Experimental Cell Research*. – 2006. – Vol. 312, № 20. – P. 4070-4078.

239. Pharmacokinetics and acceptability of subcutaneous injection of testosterone undecanoate / L. Turner, L. P. Ly, R. Desai [et al.]. – Text : visual // *Journal of the Endocrine Society*. – 2019. – Vol. 3, № 8. – P. 1531-1540.

240. Pharmacotoxicology of clinically-relevant concentrations of obeticholic acid in an organotypic human hepatocyte system / A. Dash, R.A. Figler, B.R. Blackman [et al.]. – Text : visual // *Toxicology In Vitro*. – 2017. – Vol. 39. – P. 93-103.

241. Pizzagalli, M.D. A guide to plasma membrane solute carrier proteins / M.D. Pizzagalli, A. Bensimon, G. Superti-Furga. – Text : visual // *The FEBS Journal*. – 2021. – Vol. 288, № 9. – P. 2784-2835.

242. Poongavanam, V. Fingerprint-based in silico models for the prediction of P-glycoprotein substrates and inhibitors / V. Poongavanam, N. Haider, G. F. Ecker. – Text : visual // *Bioorganic & Medicinal Chemistry*. – 2012. – Vol. 20, № 18. – P. 5388-5395.

243. Potential of intestine-selective FXR modulation for treatment of metabolic disease / T. van Zutphen, A. Bertolini, H.D. de Vries [et al.]. – Text : visual // *Handbook of Experimental Pharmacology*. – 2019. – Vol. 256. – P. 207-234.

244. Poudel, C. Regulation of Nuclear Receptors PXR and CAR by Small Molecules and Signal Crosstalk: Roles in Drug Metabolism and Beyond / C. Poudel, A.D. Huber, T. Chen – Text : visual // *Drug Metabolism and Disposition*. – 2023. – Vol. 51, № 2. – P. 228-236.

245. Pregnane X Receptor Regulates Liver Size and Liver Cell Fate by Yes-Associated Protein Activation in Mice / Y. Jiang, D. Feng, X. Ma [et al.]. – Text : visual // *Hepatology*. – 2019. – Vol. 69. – P. 343-358.

246. Progesterone during pregnancy: endocrine-immune cross talk in mammalian species and the role of stress / P. Arck, P. J. Hansen, B. Mulac Jericevic [et al.]. – Text : visual // *American Journal of Reproductive Immunology*. – 2007. – Vol. 58, № 3. – P. 268-279.

247. Progesterone regulates transcription of the p21(WAF1) cyclin-dependent kinase inhibitor gene through Sp1 and CBP/p300 / G.I. Owen, J.K. Richer, L. Tung [et al.]. – Text: visual // *Journal of Biological Chemistry*. – 1998. – Vol. 273, № 17. – P. 10696-10701.

248. Protective role of the placental efflux transporter BCRP/ABCG2 in the relationship between prenatal cadmium exposure, placenta weight, and size at birth / E.S. Barrett, Z. Rivera-Núñez, K. Getz [et al.]. – Text : visual // *Environmental Research*. – 2023. – Vol. 225. – P. 115597.

249. Protein expression profiling identifies key proteins and pathways involved in growth inhibitory effects exerted by guggulsterone in human colorectal cancer cells / R. Leo, L. Therachiyil, S.K. Siveen [et al.]. – Text : visual // *Cancers*. – 2019. – Vol. 11, № 10. – P. 1478.

250. Pustyl'nyak, Y.A. Noncanonical Constitutive Androstane Receptor Signaling in Gene Regulation / Y.A. Pustyl'nyak, L.F. Gulyaeva, V.O. Pustyl'nyak – Text : visual // *International Journal of Molecular Sciences*. – 2020. – Vol. 21, № 18. – P. 6735.

251. Rakateli, L.C. AhR, PXR and CAR: From Xenobiotic Receptors to Metabolic Sensors / L.C. Rakateli, R. Huchzermeier, E.P.C. van der Vorst – Text : visual // *Cells*. – 2023. – Vol. 12, № 23. – P. 2752.

252. Ranhotra, H.S. The orphan nuclear receptors in cancer and diabetes / H.S. Ranhotra. – Text : visual // *Journal of Receptors and Signal Transduction*. – 2013. – Vol. 33, № 4. – P. 207-212.

253. Raucy, J.L. Cell-based systems to assess nuclear receptor activation and their use in drug development / J.L. Raucy, J.M. Lasker. – Text : visual // *Drug Metabolism Reviews*. – 2013. – Vol. 45, № 1. – P. 101-109.

254. Regulation of ABC transporters by sex steroids may explain differences in drug resistance between sexes / R. Mineiro, C. Santos, I. Gonçalves [et al.]. – Text : visual // *Journal of Physiology and Biochemistry*. – 2023. – Vol. 79, № 3. – P. 467-487.

255. Regulation of ABCG2 expression at the 3' untranslated region of its mRNA through modulation of transcript stability and protein translation by a putative microRNA in the S1 colon cancer cell line / K.K. To, Z. Zhan, T. Litman [et al.]. – Text : visual //

Molecular and Cellular Biology. – 2008. – Vol. 28, № 17. – P. 5147-5161.

256. Regulation of BCRP/ABCG2 expression by progesterone and 17beta-estradiol in human placental BeWo cells / H. Wang, L. Zhou, A. Gupta [et al.]. – Text : visual // American Journal of Physiology. Endocrinology and Metabolism. – 2006. – Vol. 290, № 4. – P. E798–E807.

257. Regulation of Drug Resistance by Human Pregnane X Receptor in Breast Cancer / Y. Chen, Y. Tang, S. Chen [et al.]. – Text : visual // Cancer Biology & Therapy. – 2016. – Vol. 17, № 12. – P. 1265-1272.

258. Regulation of Drug Transport Proteins-From Mechanisms to Clinical Impact: A White Paper on Behalf of the International Transporter Consortium / K.L.R. Brouwer, R. Evers, E. Hayden [et al.]. – Text : visual // Clinical Pharmacology & Therapeutics. – 2022. – Vol. 112, № 3. – P. 461-484.

259. Regulation of expression and activity of multidrug resistance proteins MRP2 and MDR1 by estrogenic compounds in Caco-2 cells. Role in prevention of xenobiotic-induced cytotoxicity / A. Arias, J.P. Rigalli, S.S. Villanueva [et al.]. – Text : visual // Toxicology. – 2014. – Vol. 320. – P. 46-55.

260. Regulation of Organic Anion Transporting Polypeptides (OATP) 1B1- and OATP1B3-Mediated Transport: An Updated Review in the Context of OATP-Mediated Drug-Drug Interactions / K. Alam, A. Crowe, X. Wang [et al.]. – Text : visual // International Journal of Molecular Sciences. – 2018. – Vol. 19, № 3. – P. 855.

261. Regulation of PXR Function by Coactivator and Corepressor Proteins: Ligand Binding Is Just the Beginning / J.P. Rigalli, D. Theile, J. Nilles [et al.]. – Text : visual // Cells. – 2021. – Vol. 10, № 11. – P. 3137.

262. Regulation of renal oatp mRNA expression by testosterone / R. Lu, N. Kanai, Y. Bao [et al.]. – Text : visual // American Journal of Physiology. – 1996. – Vol. 270, № 2. – P. 332-337.

263. Relevance of low testosterone to nonalcoholic fatty liver disease / A. Mody, D. White, F. Kanwal [et al.]. – Text : visual // Cardiovascular Endocrinology & Metabolism. – 2015. – Vol. 4, № 3. – P. 83-89.

264. Response of the ABCG2 promoter in T47D cells and BeWo cells to sex

hormone treatment / S. Yasuda, M. Kobayashi, S. Itagaki [et al.]. – Text : visual // *Molecular Biology Reports*. – 2009. – Vol. 36, № 7. – P. 1889-1896.

265. Revisiting the role of ABC transporters in multidrug-resistant cancer / R.W. Robey, K.M. Pluchino, M.D. Hall [et al.]. – Text : visual // *Nature Reviews Cancer*. – 2018. – Vol. 18, № 7. – P. 452-464.

266. Roberts, A.G. The Structure and Mechanism of Drug Transporters / A.G. Roberts. – Text : visual // *Methods in Molecular Biology*. – 2021. – Vol. 2342. – P. 193-234.

267. Role of Brain Liver X Receptor in Parkinson's Disease: Hidden Treasure and Emerging Opportunities / S.A.C. Alnaaim, H.M. Al-Kuraishy, A. Alexiou [et al.]. – Text : visual // *Molecular Neurobiology*. – 2024. – Vol. 61, № 1. – P. 341-357.

268. Role of breast cancer resistance protein (BCRP/ABCG2) in cancer drug resistance / K. Natarajan, Y. Xie, M.R. Baer [et al.]. – Text : visual // *Biochemical Pharmacology*. – 2012. – Vol. 83, № 8. – P. 1084-1103.

269. Role of human hepatocyte nuclear factor 4alpha in the expression of drug-metabolizing enzymes and transporters in human hepatocytes assessed by use of small interfering RNA / Y. Kamiyama, T. Matsubara, K. Yoshinari [et al.]. – Text : visual // *Drug Metabolism and Pharmacokinetics*. – 2007. – Vol. 22, № 4. – P. 287-298.

270. Rotary ATPases—dynamic molecular machines / A.G. Stewart, E.M. Laming, M. Sobti [et al.]. – Text : visual // *Current Opinion in Structural Biology*. – 2014. – Vol. 25. – P. 40-48.

271. Roux, B. Ion channels and ion selectivity / B. Roux. – Text : visual // *Essays in Biochemistry*. – 2017. – Vol. 61, № 2. – P. 201-209.

272. Sajid, A. Advances in the structure, mechanism and targeting of chemoresistance-linked ABC transporters / A. Sajid, H. Rahman, S.V. Ambudkar – Text : visual // *Nature Reviews Cancer*. – 2023. – Vol. 23, № 11. – P. 762-779.

273. Seol, W. Isolation of proteins that interact specifically with the retinoid X receptor: Two novel orphan receptors / W. Seol, H.S. Choi, D.D. Moore. – Text : visual // *Molecular Endocrinology*. – 1995. – Vol. 9, № 1. – P. 72-85.

274. Separate and overlapping metabolic functions of LXRA and LXRB in

C57Bl/6 female mice / M. Korach-Andre, P. Parini, L. Larsson [et al.]. – Text : visual // American Journal of Physiology Endocrinology and Metabolism. – 2010. – Vol. 298, № 2. – P. E167-E178.

275. Serviddio, G., Bellanti, F., Vendemiale, G. (2014) Oxysterols in the orchestra of liver cell metabolism, Free Radic Biol Med., 1, S6. doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2014.10.838.

276. Sex difference in the proliferative response of mouse hepatocytes to treatment with the CAR ligand TCPOBOP / G.M. Ledda-Columbano, M. Pibiri, D. Concas [et al.]. – Text : visual // Carcinogenesis. – 2003. – Vol. 24, № 6. – P. 1059-1065.

277. Sex differences in the expression of drug-metabolizing and transporter genes in human liver / L. Yang, Y. Li, H. Hong [et al.]. – Text : visual // Journal of Drug Metabolism & Toxicology. – 2012. – Vol. 3, № 3. – P. 1000119.

278. Sex-related differences in rat choroid plexus and cerebrospinal fluid: a cDNA microarray and proteomic analysis / T. Quintela, H. Marcelino, M.J. Deery [et al.]. – Text: visual // Journal of Neuroendocrinology. – 2016. – Vol. 28, № 1.

279. Sexually dimorphic regulation and induction of P450s by the constitutive androstane receptor (CAR) / J.P. Hernandez, L.C. Mota, W. Huang [et al.]. – Text : visual // Toxicology. – 2009. – Vol. 256. – P. 53-64.

280. Sharom, F.J. The P-glycoprotein multidrug transporter / F.J. Sharom. – Text : visual // Essays in Biochemistry. – 2011. – Vol. 50, № 1. – P. 161-178.

281. Shchulkin, A.V. 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, Yu.V. Abalenikhina, A.A. Slepnev [et al.]. – Text : visual // Current Issues in Molecular Biology. – 2023. – Vol. 45, № 12. – P. 9593-9605.

282. Shen, M. Sex hormones and their receptors regulate liver energy homeostasis / M. Shen, H. Shi – Text : visual // International Journal of Endocrinology. – 2015. – Vol. 2015. – P. 1–12.

283. Shi, Y. Orphan nuclear receptors in drug discovery / Y. Shi. – Text : visual // Drug Discovery Today. – 2007. – Vol. 12, № 11-12. – P. 440-445.

284. Simpson, E. R. Sources of estrogen and their importance / E. R. Simpson. –

Text : visual // The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology. – 2003. – Vol. 86, № 3-5. – P. 225-230.

285. Skandalaki, A. Polymorphisms and Cancer Treatment / A. Skandalaki, P. Sarantis, S. Theocharis. – Text : visual // Biomolecules. – 2021. – Vol. 11. – P. 1142.

286. Solute carrier transporters: the metabolic gatekeepers of immune cells / W. Song, D. Li, L. Tao [et al.]. – Text : visual // Acta Pharmaceutica Sinica B. – 2020. – Vol. 10, № 1. – P. 61-78.

287. Squires, E.J. Cytoplasmic localization of pregnane X receptor and ligand-dependent nuclear translocation in mouse liver / E.J. Squires, T. Sueyoshi, M. Negishi. – Text : visual // Journal of Biological Chemistry. – 2004. – Vol. 279, № 47. – P. 49307-49314.

288. Stein, W.D. Channels, Carriers, and Pumps: An Introduction to Membrane Transport / W.D. Stein, T. Litman. – Text : visual // 2nd edn. Cambridge, MA. – 2014. – Academic Press is an imprint of Elsevier. – 397 p.

289. Structure and function of the human breast cancer resistance protein (BCRP/ABCG2) / Z. Ni, Z. Bikadi, M.F. Rosenberg [et al.]. – Text : visual // Current Drug Metabolism. – 2010. – Vol. 11, № 7. – P. 603-617.

290. Structure of human drug transporters OATP1B1 and OATP1B3 / A.D. Ciută, K. Nosol, J. Kowal [et al.]. – Text : visual // Nature Communications. – 2023. – Vol. 14. – P. 5774.

291. Structure of P-glycoprotein reveals a molecular basis for poly-specific drug binding / S. G. Aller, J. Yu, A. Ward [et al.]. – Text : visual // Science. – 2009. – Vol. 323, № 5922. – P. 1718-1722.

292. Subcellular localization and distribution of the breast cancer resistance protein transporter in normal human tissues / M. Maliepaard, G.L. Scheffer, I.F. Faneyte [et al.]. – Text : visual // Cancer Research. – 2001. – Vol. 61, № 8. – P. 3458-3464.

293. SXR, a novel steroid and xenobiotic sensing nuclear receptor / B. Blumberg, W. Sabbagh, H. Juguilon [et al.]. – Text : visual // Genes & Development. – 1998. – Vol. 12, № 20. – P. 3195-3205.

294. Szekeres-Bartho, J. Immunosuppression by progesterone in pregnancy / J.

Szekeres-Bartho. – Text : visual. – Boca Raton : CRC Press Inc., 1992. – 128 p.

295. Targeting breast cancer resistance protein (BCRP/ABCG2): functional inhibitors and expression modulators / I.F. Zattoni, L.C. Delabio, J.P. Dutra [et al.]. – Text : visual // *European Journal of Medicinal Chemistry*. – 2022. – Vol. 237. – P. 114346.

296. Testosterone Information – Text : electronic // Mount Sinai Health System. – 2022. – URL: <https://www.mountsinai.org/health-library/tests/testosterone> (accessed: 11.12.2022).

297. The 3'-untranslated region contributes to the pregnane X receptor (PXR) expression downregulation by PXR ligands and up-regulation by glucocorticoids / T. Smutny, J. Dusek, L. Hyrsova [et al.]. – Text : visual // *Acta Pharmaceutica Sinica B*. – 2020. – Vol. 10, № 1. – P. 136–152.

298. The ABCs of membrane transporters in health and disease (SLC series): introduction / M.A. Hediger, B. Cléménçon, R.E. Burrier [et al.]. – Text : visual // *Molecular Aspects of Medicine*. – 2013. – Vol. 34, № 2-3. – P. 95-107.

299. The androgen metabolite, 5 $\alpha$ -androstane-3 $\beta$ ,17 $\beta$ -diol, decreases cytokine-induced cyclooxygenase-2, vascular cell adhesion molecule-1 expression, and P-glycoprotein expression in male human brain microvascular endothelial cells / K.L. Zuloaga, S.N. Swift, R. J. Gonzales [et al.]. – Text : visual // *Endocrinology*. – 2012. – Vol. 153, № 12. – P. 5949-5960.

300. The constitutive androstane receptor and pregnane X receptor in the brain / P. Torres-Vergara, Y.S. Ho, F. Espinoza [et al.]. – Text : visual // *British Journal of Pharmacology*. – 2020. – Vol. 177, № 12. – P. 2666-2682.

301. The effect of 17 $\alpha$ -ethynylestradiol induced intrahepatic cholestasis of pregnancy on placental P-glycoprotein in mice: implications in the individualized transplacental digoxin treatment for fetal heart failure / C. Wang, Y. Zhang, Y. Zhan [et al.]. – Text : visual // *Placenta*. – 2016. – Vol. 44. – P. 91-97.

302. The effects of estradiol valerate and remifemin on liver lipid metabolism / B. Jin, W. Wang, W. Bai [et al.]. – Text : visual // *Acta Histochemica*. – 2017. – Vol. 119, № 6. – P. 610-619.

303. The Emerging Role of the SLCO1B3 Protein in Cancer Resistance / R. Sun, Y. Ying, Z. Tang [et al.]. – Text : visual // Protein & Peptide Letters. – 2020. – Vol. 27, № 1. – P. 17-29.

304. The HUGO Gene Nomenclature Committee (HGNC) / S. Povey, R. Lovering, E. Bruford [et al.]. – Text : visual // Human Genetics. – 2001. – Vol. 109, № 6. – P. 678-680.

305. The influence of sex hormones in liver function and disease / A. Kasarinaite, M. Sinton, P. T. K. Saunders [et al.]. – Text : visual // Cells. – 2023. – Vol. 12, № 12. – P. 1604.

306. The nuclear hormone receptor farnesoid X receptor is activated by androsterone / S. Wang, K. L. Lai, F. J. Moy [et al.]. – Text : visual // Endocrinology. – 2006. – Vol. 147, № 9. – P. 4025-4033.

307. The Nuclear Receptor Field: A Historical Overview and Future Challenges / G.I. Mazaira, N.R. Zgajnar, C.M. Lotufo [et al.]. – Text : visual // Nuclear Receptor Research. – 2018. – Vol. 5. – P. 101320.

308. The Nuclear Receptor PXR in Chronic Liver Disease / K. Sayaf, I. Zanotto, F.P. Russo [et al.]. – Text : visual // Cells. – 2022. – Vol. 11, № 1. – P. 61.

309. The nuclear receptor superfamily: the second decade / D.J. Mangelsdorf, C. Thummel, M. Beato [et al.]. – Text : visual // Cell. – 1995. – Vol. 83, № 6. – P. 835-839.

310. The orphan nuclear receptors steroidogenic factor-1 and liver receptor homolog-1: structure, regulation, and essential roles in mammalian reproduction / M.C. Meinsohn, O.E. Smith, K. Bertolin [et al.]. – Text : visual // Physiological Reviews. – 2019. – Vol. 99, № 2. – P. 1249-1279.

311. The Pregnane X Receptor and Indole-3-Propionic Acid Shape the Intestinal Mesenchyme to Restrain Inflammation and Fibrosis / K.L. Flannigan, K.M. Nieves, H.E. Szczepanski [et al.]. – Text : visual // Cellular and Molecular Gastroenterology and Hepatology. – 2023. – Vol. 15, № 3. – P. 765-795.

312. The repressed nuclear receptor CAR responds to phenobarbital in activating the human CYP2B6 gene / T. Sueyoshi, T. Kawamoto, I. Zelko [et al.]. – Text : visual // Journal of Biological Chemistry. – 1999. – Vol. 274, № 10. – P. 6043-6046.

313. The role of pregnane X receptor (PXR) in substance metabolism / Y. Lv, Y.-Y. Luo, H.-W. Ren [et al.]. – Text : visual // *Frontiers in Endocrinology*. – 2022. – Vol. 13. – P. 959902.

314. The stem cell marker Bcrp/ABCG2 enhances hypoxic cell survival through interactions with heme / P. Krishnamurthy, D.D. Ross, T. Nakanishi [et al.]. – Text : visual // *The Journal of Biological Chemistry*. – 2004. – Vol. 279, № 23. – P. 24218-24225.

315. Thigpen, K.G. International sequencing consortium / K.G. Thigpen. – Text : visual // *Environmental Health Perspectives*. – 2004. – Vol. 112, № 6. – P. 406.

316. Tissue distribution and hormonal regulation of the breast cancer resistance protein (Bcrp/Abcg2) in rats and mice / Y. Tanaka, A.L. Slitt, T.M. Leazer [et al.]. – Text : visual // *Biochemical and Biophysical Research Communications*. – 2005. – Vol. 326, № 1. – P. 181-187.

317. To, K.K. Aberrant promoter methylation of the ABCG2 gene in renal carcinoma / K.K. To, Z. Zhan, S.E. Bates. – Text : visual // *Molecular and Cellular Biology*. – 2006. – Vol. 26, № 22. – P. 8572-8585.

318. TOMM40 regulates hepatocellular and plasma lipid metabolism via an LXR-dependent pathway / C.N.V. Yang, J.Y. Chao, K.A. Garton [et al.]. – Text : visual // *Molecular Metabolism*. – 2024. – Vol. 90. – P. 102056.

319. Transcriptional and post-transcriptional regulation of the pregnane X receptor: a rationale for interindividual variability in drug metabolism / T. Smutny, L. Hyrsova, A. Braeuning [et al.]. – Text : visual // *Archives of Toxicology*. – 2020. – Vol. 94, № 11. – P. 3649-3659.

320. Transcriptional upregulation of breast cancer resistance protein by 17 $\beta$ -estradiol in ER $\alpha$ -positive MCF-7 breast cancer cells / Y. Zhang, G. Zhou, H. Wang [et al.]. – Text : visual // *Oncology*. – 2006. – Vol. 71, № 5-6. – P. 446-455.

321. Transport of methotrexate, methotrexate polyglutamates, and 17 $\beta$ -estradiol 17-( $\beta$ -D-glucuronide) by ABCG2: effects of acquired mutations at R482 on methotrexate transport / Z.S. Chen, R.W. Robey, M.G. Belinsky [et al.]. – Text : visual // *Cancer Research*. – 2003. – Vol. 63, № 14. – P. 4048-4054.

322. Transporters and toxicity: insights from the International Transporter Consortium Workshop 4 / M. J. Hafey [et al.]. – Text : visual // *Clinical Pharmacology & Therapeutics*. – 2022. – Vol. 112, № 3. – P. 527-539.

323. Trauner, M. Novel therapeutic targets for cholestatic and fatty liver disease / M. Trauner, C.D. Fuchs. – Text : visual // *Gut*. – 2022. – Vol. 71, № 1. – P. 194-209.

324. Türkova, A. Current advances in studying clinically relevant transporters of the solute carrier (SLC) family by connecting computational modeling and data science / A. Türkova, B. Zdrzil. – Text : visual // *Computational and Structural Biotechnology Journal*. – 2019. – Vol. 17. – P. 390-405.

325. Upregulation of ABCG2 by romidepsin via the aryl hydrocarbon receptor pathway / K.K. To, R. Robey, Z. Zhan [et al.]. – Text : visual // *Molecular Cancer Research*. – 2011. – Vol. 9, № 4. – P. 516-527.

326. Vacuolar-type ATPase: a proton pump to lysosomal trafficking / M. Futai, G.H. Sun-Wada, Y. Wada [et al.]. – Text : visual // *Proceedings of the Japan Academy. Series B, Physical and Biological Sciences*. – 2019. – Vol. 95, № 6. – P. 261-277.

327. Validation and application of Caco-2 assays for the in vitro evaluation of development candidate drugs as substrates or inhibitors of P-glycoprotein to support regulatory submissions / R. Elsby, D.D. Surry, V.N. Smith et al.]. – Text : visual // *Xenobiotica*. – 2008. – Vol. 38, № 7-8. – P. 1140-64.

328. van Kalken, C.K. Cortisol is transported by the multidrug resistance gene product P-glycoprotein / C.K. van Kalken, H.J. Broxterman, H.M. Pinedo [et al.]. – Text : visual // *British Journal of Cancer*. – 1993. – Vol. 67, № 2. – P. 284-289.

329. Wang, H. Hormonal regulation of BCRP expression in human placental BeWo cells / H. Wang, J.D. Unadkat, Q. Mao. – Text : visual // *Pharmaceutical Research*. – 2008. – Vol. 25, № 2. – P. 444-452.

330. Weatherman, R.V. Nuclear-receptor ligands and ligand-binding domains / R.V. Weatherman, R.J. Fletterick, T.S. Scanlan. – Text : visual // *Annual Review of Biochemistry*. – 1999. – Vol. 68. – P. 559-581.

331. Weikum, E.R. The nuclear receptor superfamily: A structural perspective / E.R. Weikum, X. Liu, E.A. Ortlund. – Text : visual // *Protein Science*. – 2018. – Vol. 27,

№ 11. – P. 1876-1892.

332. Wierman, M.E. Sex steroid effects at target tissues: Mechanisms of action. – Text : visual // Advances in physiology education. – 2007 – Vol. 31. – 26–33.

333. Williams Textbook of Endocrinology / R.H. Williams, P.R. Larsen, H.M. Kronenberg [et al.] – Text : visual.– 2002. – 10th ed.

334. Xing, Y. PXR: a center of transcriptional regulation in cancer / Y. Xing, J. Yan, Y. Niu – Text : visual // Acta Pharmaceutica Sinica B. – 2020. – Vol. 10, № 2. – P. 196-206.

335. Xu, E.H. Structural insights into regulation of nuclear receptors by ligands / E.H. Xu, M.H. Lambert. – Text : visual // Nuclear Receptor Signaling. – 2003. – Vol. 1. – P. e004.

336. You, D. Epigenetic regulation of multidrug resistance protein 1 and breast cancer resistance protein transporters by histone deacetylase inhibition / D. You, J.R. Richardson, L.M. Aleksunes. – Text : visual // Drug Metabolism and Disposition. – 2020. – Vol. 48, № 6. – P. 459-480.

337. Zhang, B. PXR: A xenobiotic receptor of diverse function implicated in pharmacogenetics / B. Zhang, W. Xie, M.D. Krasowski. – Text : visual // Pharmacogenomics. – 2008. – Vol. 9, № 11. – P. 1695-1709.

338. Zhao, C. Liver X receptor in cholesterol metabolism / C. Zhao, K. Dahlman-Wright. – Text : visual // The Journal of Endocrinology. – 2010. – Vol. 204, № 3. – P. 233-240.