

©Коллектив авторов

ОЦЕНКА ВЛИЯНИЯ ЖЕНСКИХ ПОЛОВЫХ ГОРМОНОВ НА ФУНКЦИОНИРОВАНИЕ БЕЛКА-ТРАНСПОРТЕРА ГЛИКОПРОТЕИНА-P *IN VITRO*

А.В. Шулькин, И.В. Черных, Н.М. Попова*, А.А. Слепнев, Е.Н. Якушева

Рязанский государственный медицинский университет имени академика И.П. Павлова,
390026, Рязань, ул. Высоковольная, 9; *эл. почта: p34-66@yandex.ru

На клетках линии Сасо-2 изучено влияние женских половых гормонов эстрадиола и прогестерона на функционирование белка-транспортера гликопротеина-P (Pgp). Активность Pgp анализировали в трансвелл-системе по транспорту его субстрата — фексофенадина, а его количество оценивали методом иммуноферментного анализа. В ходе исследования было установлено, что эстрадиол в концентрации 10 мкМ при инкубации в течение 3 суток повышал активность и синтез Pgp. При этом данный эффект подавлялся ингибитором конститутивного андростанового рецептора (CAR) CINPA 1. При инкубации в течение 3 суток 100 мкМ прогестерон повышал синтез Pgp, однако активность белка-транспортера не изменялась, что связано с негеномным (прямым) ингибированием молекулы Pgp гестагеном. Ингибитор прегнан-Х-рецептора (PXR) — кетоконазол подавлял индуцирующее действие прогестерона на синтез Pgp. Комбинация 10 мкМ эстрадиола и 100 мкМ прогестерона повышала синтез Pgp, однако не приводила к увеличению активности белка-транспортера, что также связано с прямым ингибированием Pgp гестагеном. Таким образом, установлено, что эстрадиол повышает активность и синтез Pgp за счёт стимуляции CAR, а прогестерон стимулирует синтез белка-транспортера за счёт активации PXR.

Ключевые слова: гликопротеин-P; эстрадиол; прогестерон; конститутивный андростановый рецептор; прегнан-Х-рецептор

DOI: 10.18097/PBMC20206606444

ВВЕДЕНИЕ

Гликопротеин-P (Pgp, ABCB1) — белок-транспортер, локализованный преимущественно в плазматической мембране клеток и использующий энергию АТФ для выведения эндо- и экзобиотиков из клеток во внеклеточное пространство и биологические жидкости. Наиболее изучена роль Pgp в формировании феномена множественной лекарственной устойчивости (MDR, multiple drug resistance) опухолевых клеток. Pgp также принимает активное участие во всасывании, распределении и выведении лекарственных веществ, являющихся его субстратами, что опосредовано его локализацией в органах и тканях, обеспечивающих процессы фармакокинетики. Pgp считается наиболее клинически значимым белком-транспортером, так как его субстратами или ингибиторами могут быть около 50% используемых лекарственных веществ [1].

Изучение действия лекарственных, в том числе гормональных, веществ на активность Pgp важно не только для оценки их влияния на множественную резистентность различных (в том числе гормонозависимых) опухолей, но и для прогнозирования развития фармакокинетических межлекарственных взаимодействий на уровне белка-транспортера.

Способность женских половых гормонов регулировать функционирование Pgp была отмечена в научной литературе. В опытах *in vivo* показано индуцирующее влияние физиологических доз эстрадиола и прогестерона на функциональную активность Pgp [2, 3]. В то же время выявлено снижение функциональной активности Pgp у самок кроликов при беременности на фоне повышения уровня прогестерона [4].

При оценке влияния эстрадиола и прогестерона на функционирование Pgp в экспериментах *in vitro* были получены противоречивые результаты.

На клеточной линии рака молочной железы, трансдуцированной геном MDR1, показано, что эстрадиол (10 пМ – 10 нМ) при инкубации в течение 4 суток уменьшал количество и активность Pgp [5]. На линии клеток карциномы яичника человека (NCI-ADR-RES) и клеточной линии клеток карциномы плаценты человека (JAR) выявлено, что эстрадиол и прогестерон увеличивали количество и активность данного белка-транспортера [6].

На линии клеток L-MDR1, созданной путём трансфекции клеточной линии эпителиоцитов почки свиньи LLC-PK1 геном MDR1 человека, и доксорубинорезистентной линии клеток моноцитарной лейкемии мышей с избыточной экспрессией *mdr1a/1b* (P388/dx) установлено, что прогестерон снижал активность Pgp [7].

Анализ литературы показал, что исследований женских половых гормонов на линиях клеток органов, отвечающих за фармакокинетику лекарственных веществ (эпителий кишечника, гепатоциты, эндотелий гистогематических барьеров), практически не проводилось, как и не оценивалось совместное действие эстрогенов и гестагенов. Механизмы влияния женских половых гормонов на функционирование Pgp также остаются неизученными.

Учитывая то обстоятельство, что тощая кишка не является органом-мишенью для эстрадиола и прогестерона, можно предположить, что половые гормоны реализуют свое действие через орфанные рецепторы: прегнан-Х-рецептор (PXR) и конститутивный андростановый рецептор (CAR).

Поэтому целью настоящего исследования было изучение влияния эстрадиола, прогестерона и их комбинации на активность и синтез Pgp *in vitro* на клеточной модели тонкокишечного эпителия, а также оценка роли PXR и CAR в реализации действия женских половых гормонов.

МЕТОДИКА

Исследования *in vitro* выполнены на клетках линии Caco-2, полученной из Института цитологии, Санкт-Петербург. При длительном культивировании данные клетки спонтанно дифференцируются в клетки, подобные кишечному эпителию [8]. Клеточную линию Caco-2 культивировали при 37°C и 5% содержании CO₂ в модифицированной Дульбекко среде Игла (DMEM) с высоким содержанием глюкозы (4500 мг/л) (“Sigma-Aldrich”, Германия), содержащей L-глутамин (4 мМ, “Sigma-Aldrich”), 15% бычьей сыворотку (“Sigma-Aldrich”), 100 Ед./мл пенициллина и 100 мкг/мл стрептомицина (“Sigma-Aldrich”). После достижения 70-90% конfluence клетки снимали с фласки добавлением раствора трипсин-ЭДТА (0,25% трипсин и 0,2% ЭДТА, “Sigma-Aldrich”) и высевали в трансвелл-систему для оценки активности Pgp или в 6-луночные планшеты для определения влияния половых гормонов на синтез белка-транспортера. Клетки культивировали в течение 21 суток, так как на данном сроке происходит спонтанная дифференцировка в клетки, подобные кишечным эпителиоцитам.

Трансвелл-система представлена двумя камерами: апикальной и базолатеральной. Дно апикальной камеры является полупроницаемой мембраной, на которую высевали клетки с плотностью 10⁵ см² (33000 клеток/ячейка). В работе применяли 12-луночный планшет с полупроницаемой мембраной диаметром 1,12 см и диаметром пор 0,4 мкм (12 mm Transwell® with 0.4 µm Pore Polycarbonate Membrane Insert, Sterile, “Corning”, США). Транспортные эксперименты проводили при достижении трансэпителиального сопротивления более 500 мОм×см². Транспортные эксперименты, выполненные в одной и той же трансвелл-системе, осуществляли с интервалом не менее 7 суток.

Активность Pgp *in vitro* оценивали по транспорту маркерного субстрата белка-транспортера — фексофенадина (“Sigma-Aldrich”) в трансвелл-системе. Для этого питательную среду заменяли на транспортную — раствор Хэнкса (“Sigma-Aldrich”), забуференный 25 мМ Hepes при pH 7,4 (“Sigma-Aldrich”), содержащий 1% диметилсульфоксид (“ПанЭко”, Россия). Далее в апикальную камеру добавляли фексофенадин в конечной концентрации 150 мкМ [9], а через 1 ч, 2 ч и 3 ч забирали по 50 мкл образцов транспортной среды из базолатеральной камеры для определения содержания маркерного субстрата (*ab* транспорт за счёт пассивной диффузии против работы Pgp). Затем в других трансвелл-системах оценивали транспорт фексофенадина из базолатеральной камеры в апикальную (*ba* транспорт, обусловленный пассивной

диффузией и белком-транспортером). Для этого маркерный субстрат в концентрации 150 мкМ добавляли в базолатеральную камеру, а затем через 1 ч, 2 ч и 3 ч забирали по 50 мкл образцов из апикальной камеры для определения концентрации фексофенадина.

Транспорт фексофенадина как из камеры *a* в камеру *b*, так и обратно оценивали по формуле (1) [8]:

$$P_{app} = \frac{dQ}{dt} \times \frac{1}{(A \times C_0)} \quad (1),$$

где P_{app} — коэффициент кажущейся проницаемости (apparent permeability coefficient), dQ/dt — изменение концентрации субстрата в камере-реципиенте за время инкубации, A — площадь полупроницаемой мембраны лунки в трансвелл-системе, на которой культивировали клетки, C_0 — начальная концентрация субстрата в камере-доноре.

Затем рассчитывали отношение коэффициентов кажущейся проницаемости: *ba* к *ab*. Данный параметр является интегральным и оценивает общий вклад Pgp в транспорт фексофенадина через билипидную мембрану.

Концентрацию фексофенадина в транспортной среде определяли методом высокоэффективной жидкостной хроматографии на хроматографе Стайер (“Аквилон”, Россия) с УФ детектированием при длине волны 220 нм по оригинальной методике [4]. Полученную пробу транспортной среды (50 мкл), содержащую фексофенадин, разводили в 150 мкл подвижной фазы, и 100 мкл полученного раствора вводили в хроматограф.

Для оценки влияния женских половых гормонов на активность Pgp *in vitro* их добавляли в обе камеры (апикальную и базолатеральную) вне зависимости от направления транспорта фексофенадина.

Для изучения влияния эстрадиола и прогестерона на синтез Pgp клетки снимали с лунок 6-луночного планшета добавлением раствора трипсин-ЭДТА (0,25% трипсин и 0,2% ЭДТА). Полученные клетки лизировали трёхкратным циклом замораживания-размораживания. В лизате определяли содержание Pgp методом иммуноферментного анализа с помощью набора Human Permeability glycoprotein ELISA kit (“Blue gene”, Китай). Количество белка в пробах анализировали методом Бредфорда (Pierce Coomassie Plus (Bradford) Assay Kit, “ThermoFisher”, США).

Эксперимент включал следующие серии:

- 1) контрольная серия (n=3) — клетки, которые инкубировали с транспортной средой без добавления женских половых гормонов;
- 2) оценка влияния рифампицина (10 мкМ) на активность и синтез Pgp — контроль индукции при инкубировании в течение 3 суток (n=3);
- 3) оценка влияния эстрадиола в концентрациях 1 мкМ и 10 мкМ на активность и синтез Pgp при инкубировании в течение 3 суток (n=3);
- 4) оценка влияния прогестерона в концентрациях 1 мкМ, 10 мкМ, 100 мкМ на активность и синтез Pgp при инкубировании в течение 3 суток (n=3);

ВЛИЯНИЕ ЖЕНСКИХ ПОЛОВЫХ ГОРМОНОВ НА ФУНКЦИОНИРОВАНИЕ Pgr

5) оценка влияния прогестерона в концентрации 100 мкМ на активность Pgr при инкубировании в течение 30 мин (n=3);

6) оценка влияния комбинации эстрадиола 10 мкМ и прогестерона 100 мкМ на активность и синтез Pgr при инкубировании в течение 3 суток (n=3);

7) оценка влияния комбинации ингибитора конститутивного андростанового рецептора — CINPA 1 (“TOCRIS”, Великобритания) 10 мкМ и эстрадиола 10 мкМ на активность и синтез Pgr при инкубировании в течение 3 суток (n=3);

8) оценка влияния комбинации ингибитора прегнан-Х-рецептора — кетоконазола 10 мкМ (“Sigma-Aldrich”) и эстрадиола 10 мкМ на активность и синтез Pgr при инкубировании в течение 3 суток (n=3);

9) оценка влияния ингибитора прегнан-Х-рецептора (кетоконазола) 10 мкМ на активность Pgr при инкубировании в течение 30 мин (n=3);

10) оценка влияния комбинации ингибитора прегнан-Х-рецептора — кетоконазола 10 мкМ и прогестерона 100 мкМ на активность и синтез Pgr при инкубировании в течение 3 суток (n=3).

Полученные результаты обрабатывали с помощью программы StatSoft Statistica 13.0 и Microsoft Excel for MAC ver. 16.24. Для оценки статистической значимости различий использовали дисперсионный анализ (ANOVA), попарные сравнения выполняли с помощью критерия Ньюмена-Кейлса. Статистически значимыми считали различия при $p < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Культивирование клеток линии Caco-2 в присутствии 10 мкМ рифампицина в течение 3 суток приводило к повышению активности Pgr, что проявлялось в снижении Rapp *ab* фексофенадина

на 31,7% ($p=0,041$) и повышении отношения Rapp *ba* к Rapp *ab* на 93,2% ($p=0,004$) по сравнению с контролем (таблица). При этом происходило увеличение количества Pgr на 52,7% ($p=0,017$) (рисунок). Данные результаты свидетельствуют о том, что рифампицин как классический индуктор Pgr повышает активность белка-транспортера за счёт увеличения его синтеза, что согласуется с данными литературы [10] и подтверждает адекватность используемых методов исследования.

Эстрадиол в концентрации 1 мкМ достоверно не влиял на активность Pgr, а в концентрации 10 мкМ при инкубации в течение 3 суток вызывал повышение отношения Rapp *ba* к Rapp *ab* фексофенадина на 73,5% ($p=0,015$) и тенденцию к снижению Rapp *ab* на 29,3% ($p=0,083$) по сравнению с контрольной серией, что характеризует повышение активности Pgr (таблица).

Аналогичным образом эстрадиол в концентрации 1 мкМ достоверно не влиял на количество белка-транспортера, а в концентрации 10 мкМ повышал уровень Pgr на 49,6% ($p=0,037$) по сравнению с показателями контроля. Таким образом, эстрадиол увеличивает активность Pgr за счёт повышения синтеза белка-транспортера.

При инкубировании клеток линии Caco-2 с прогестероном в концентрациях 1 мкМ, 10 мкМ и 100 мкМ в течение 3 суток изучаемые показатели Rapp *ba*, Rapp *ab* фексофенадина и их отношение достоверно от значений контроля не отличались, что свидетельствует об отсутствии изменений активности Pgr. В то же время прогестерон в концентрации 100 мкМ при инкубировании в течение 3 суток повышал количество белка-транспортера на 114,3% ($p=0,018$) по сравнению с показателями контрольной серии, а в более низких концентрациях (1 мкМ и 10 мкМ) достоверного эффекта не оказал (рисунок).

Таблица. Влияние исследуемых веществ на транспорт фексофенадина через билипидную мембрану клеток линии Caco-2

	Rapp <i>ba</i> , $\times 10^{-6}$ см/сек	Rapp <i>ab</i> , $\times 10^{-6}$ см/сек	Rapp <i>ba</i> / Rapp <i>ab</i>
Контроль, n=5	2,32±0,66	0,82±0,15	2,79±0,36
Рифампицин 10 мкМ 3 суток, n=3	2,90±0,31	0,56±0,09*	5,39±1,24*
Эстрадиол 1 мкМ 3 сут, n=3	1,93±0,28	0,52±0,33	4,68±2,32
Эстрадиол 10 мкМ 3 суток, n=3	2,69±0,70	0,58±0,17	4,84±1,33*
Прогестерон 1 мкМ 3 суток, n=3	1,95±0,46	0,63±0,31	3,36±0,83
Прогестерон 10 мкМ 3 суток, n=3	2,13±0,18	0,71±0,15	3,1±0,71
Прогестерон 100 мкМ 3 суток, n=3	2,32±0,42	0,76±0,66	3,1±0,84
Прогестерон 100 мкМ 30 мин, n=3	2,03±0,42	0,99±0,19	2,06±0,17*
Эстрадиол 10 мкМ и прогестерон 100 мкМ 3 суток, n=3	2,52±0,32	0,84±0,39	3,47±1,69
Кетоконазол 10 мкМ 30 мин, n=3	1,84±0,13	0,84±0,12	2,14±0,44*
Эстрадиол 10 мкМ и CINPA 1 10 мкМ 3 суток, n=3	1,88±0,31	0,72±0,05	2,61±0,37
Эстрадиол 10 мкМ и кетоконазол 10 мкМ 3 суток, n=3	1,93±0,368	0,63±0,13*	3,24±1,33
Прогестерон 100 мкМ и кетоконазол 10 мкМ 3 суток, n=3	1,94±0,11	1,08±0,19	1,85±0,27*

Примечание: * — данные представлены в виде среднего значения ± стандартное отклонение, $p < 0,05$ — достоверные различия с показателями контроля. Данные представлены в виде среднего значения ± стандартное отклонение.

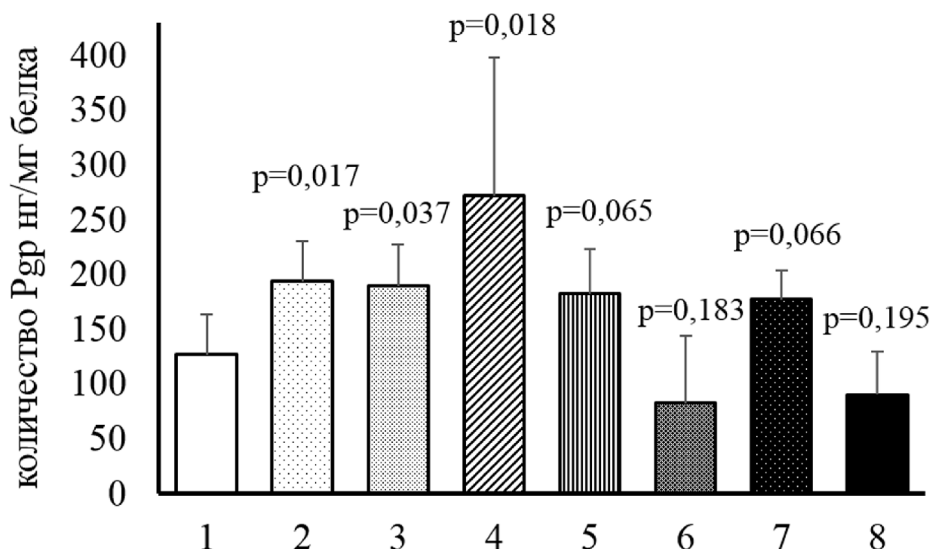


Рисунок. Количество Pgr в клетках линии Сасо-2 при инкубации с исследуемыми веществами. 1 — контроль (n=7), 2 — 10 мкМ рифампицин (n=4), 3 — 10 мкМ эстрадиол (n=3), 4 — 100 мкМ прогестерон (n=3), 5 — 10 мкМ эстрадиол + 100 мкМ прогестерон (n=3), 6 — 10 мкМ эстрадиол + 10 мкМ CINPA 1 (n=3), 7 — 10 мкМ эстрадиол + 10 мкМ кетоконазол (n=3), 8 — 100 мкМ прогестерон + 10 мкМ кетоконазол (n=3). Статистическая значимость указана по отношению к контролю. Данные представлены в виде среднего значения ± стандартное отклонение.

Для объяснения полученных результатов дополнительно была выполнена серия экспериментов по инкубации клеток линии Сасо-2 с 100 мкМ прогестерона в течение 30 мин. Данного времени достаточно для негеномного — прямого (обусловленного непосредственным взаимодействием с молекулой белка) ингибирования Pgr, но не хватает для проявления геномного эффекта — изменения синтеза белка-транспортера [11]. Прогестерон в концентрации 100 мкМ снижал отношение $R_{pp\ ba}$ к $R_{pp\ ab}$ на 26,2% ($p=0,018$) по сравнению с показателями контроля, что свидетельствует о снижении активности белка-транспортера.

Таким образом, прогестерон является негеномным или прямым ингибитором Pgr, то есть способен ингибировать его активность при непосредственном взаимодействии с молекулой белка-транспортера. В то же время при длительной инкубации гестаген повышает синтез Pgr, хотя при этом активность транспортера достоверно от показателей контроля не отличается, что, видимо, связано с прямым ингибированием гормоном изучаемого белка.

Комбинация 10 мкМ эстрадиола и 100 мкМ прогестерона достоверно не влияла на активность Pgr, так как $R_{pp\ ba}$, $R_{pp\ ab}$ фексофенадина и их отношение статистически значимо от показателей контроля не отличались. При этом количество Pgr имело тенденцию к повышению на 43,8% ($p=0,065$). Полученные результаты показывают, что комбинация эстрогена и гестагена может повысить синтез белка-транспортера, однако его активность при этом не изменится, за счёт негеномного (прямого) ингибирующего действия прогестерона.

В ходе следующего этапа исследования была изучена роль CAR и PXR в механизме действия половых гормонов на Pgr клеток линии Сасо-2.

Согласно данным литературы, эстрадиол может индуцировать как CAR, так и PXR, а прогестерон — только PXR [12]. Поэтому в нашем исследовании было оценено влияние ингибиторов CAR и PXR на действие эстрадиола и ингибитора PXR на эффект прогестерона.

В качестве ингибитора CAR был использован CINPA 1, повышающий взаимодействие корепрессора и снижающий взаимодействие коактиватора с CAR лиганд-связывающим доменом и нарушающий связывание CAR с промоторными областями генов-мишеней [13].

Для ингибирования PXR применяли кетоконазол, обладающий способностью нарушать взаимодействие PXR с коактиватором стероидного рецептора коактиватор-1 [14].

Ингибиторы CINPA 1 и кетоконазол подавляли индуцирующее действие эстрадиола на активность Pgr при инкубации в течение 3 суток: $R_{pp\ ba}$, $R_{pp\ ab}$ фексофенадина и их отношение в сериях CINPA 1-эстрадиол (серия 7) и кетоконазол-эстрадиол (серия 8) статистически значимо от показателей контроля не отличались. При этом ингибитор CAR CINPA 1 нивелировал индуцирующее действие эстрогена на синтез Pgr: количество белка-транспортера в серии CINPA 1-эстрадиол (серия 7) достоверно не отличалось от значений контроля. В то же время ингибитор PXR кетоконазол существенно не влиял на способность эстрадиола повышать синтез белка-транспортера: количество Pgr в серии кетоконазол-эстрадиол (серия 8) превышало значения контроля на 39,6% ($p=0,066$).

Для объяснения выявленной способности кетоконазола подавлять индуцирующее действие эстрадиола на активность Pgr дополнительно была выполнена серия эксперимента по инкубированию кетоконазола с клетками Сасо-2 (серия 9)

в течение 30 мин, что достаточно для прямого ингибирования белка-транспортера, а не изменения его синтеза. В данной серии выявлено снижение отношения Rppr *ba* к Rppr *ab* фексофенадина на 23,3% ($p=0,058$), что свидетельствует о том, что кетоконазол является прямым ингибитором Pgr, то есть уменьшает его активность за счёт непосредственного взаимодействия с белком-транспортером.

В совокупности полученные данные показывают, что эстрадиол повышает активность и синтез Pgr за счёт стимуляции CAR. Выявленное в исследовании снижение активности белка-транспортера при инкубации с кетоконазолом обусловлено прямым подавляющим действием ингибитора PXR.

Кетоконазол нивелировал индуцирующее действие прогестерона на синтез Pgr: количество белка-транспортера в серии совместного применения кетоконазола и прогестерона (серия 10) статистически значимо не отличалось от показателей контроля (рисунок). При этом активность Pgr даже снижалась по сравнению с контролем, о чём свидетельствует уменьшение отношения Rppr *ba* к Rppr *ab* фексофенадина на 33,7% ($p=0,008$) (таблица). Данные результаты показывают, что прогестерон стимулирует синтез белка-транспортера за счёт взаимодействия с PXR. Выявленное в исследовании снижение активности Pgr при инкубировании клеток Caco-2 в присутствии прогестерона и кетоконазола, скорее всего, связано с прямым ингибирующим действием тестируемых веществ на активность белка-транспортера.

Изучаемые в настоящем исследовании CAR и PXR принадлежат к суперсемейству ядерных рецепторов. В норме данные белки экспрессируются на низком уровне. Однако при воздействии ксено- и эндобиотиков (например, эстрадиола и прогестерона) их уровень может существенно повышаться. Образуя гетеродимерный комплекс с ретиноид-Х-рецептором, они связываются с промоторами своих генов-мишеней в области PXR респонсивного элемента и фенотарбитал респонсивного модуля соответственно и изменяют их экспрессию [15]. Показано, что промотор гена *MDR1*, кодирующий Pgr, содержит DR4 мотив, который может взаимодействовать с PXR и CAR и повышать экспрессию этого гена [16].

В опытах *in vitro* на клеточной линии гепатоцеллюлярной карциномы человека (HepG2) установлено, что 17β -эстрадиол и эстрон в концентрации 10 мкМ активировали экспрессию CAR [17]. В эксперименте на клетках CV-1, трансфицированных транскрипционным фактором PXR, выявлено, что прогестерон в концентрациях 10^{-7} - 10^{-4} М стимулировал экспрессию PXR [18].

В ходе настоящего исследования впервые показано, что эстрадиол, стимулируя CAR, повышает синтез и активность Pgr. Прогестерон, стимулируя PXR, повышает синтез белка-транспортера, однако, повышения активности Pgr при этом не происходит, так как гестаген обладает негеномной (прямой) ингибирующей активностью на молекулу транспортера.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ И ВЫВОДЫ

В ходе настоящего исследования на линии клеток Caco-2 (модели тонкокишечного эпителия) изучено влияние женских половых гормонов эстрадиола и прогестерона на функционирование белка-транспортера Pgr. Показано, что эстрадиол в концентрации 10 мкМ при инкубировании в течение 3 суток стимулирует CAR, что приводит к повышению синтеза и активности Pgr. Прогестерон в концентрации 100 мкМ при инкубировании в течение 3 суток стимулирует PXR, что вызывает повышение синтеза белка-транспортера. При этом гестаген в данной концентрации ингибирует активность Pgr за счёт негеномного эффекта, а именно непосредственного взаимодействия с его молекулой, поэтому индукция синтеза белка-транспортера не приводит к изменению его активности. Полученные результаты объясняют противоречивые данные литературы по влиянию прогестерона на активность Pgr.

Информация о влиянии половых гормонов на функционирование Pgr может быть использована для прогнозирования развития межлекарственных взаимодействий с участием данного белка-транспортера.

ФИНАНСИРОВАНИЕ.

Исследование выполнено при финансовой поддержке гранта Российского фонда фундаментальных исследований № 18-415-623001.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Настоящая статья не содержит каких-либо исследований с участием людей или с использованием животных в качестве объектов.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

ЛИТЕРАТУРА

1. Якушева Е.Н., Титов Д.С. (2018) Биохимия, **83**(8), 1148-1172. [Yakusheva E.N., Titov D.S. (2018) Biochemistry (Moscow), **83**(8), 1148-1172.]
2. Шулькин А.В., Черных И.В., Мыльников П.Ю., Уткин Д.О., Якушева Е.Н. (2018) Пробл. эндокринол., **64**(3), 144-150. [Shchulkin A.V., Chernykh I.V., Mylnikov P.Yu., Utkin D.O., Yakusheva E.N. (2018) Probl. Endocrinol., **64**(3), 144-150.]
3. Brayboy L.M., Oulhen N., Long S., Voigt N., Raker C., Wessel G. (2017) *Reprod. Toxicol.*, **69**, 121-131.
4. Попова Н.М., Шулькин А.В., Черных И.В., Есенина А.С., Градинарь М.М., Никифорова Л.В., Рябков А.Н., И.П. Павлова, 4, 466-473. [Popova N.M., Shchulkin A.V., Chernykh I.V., Yesenina A.S., Gradinar M.M., Nikiforova L.V., Ryabkov A.N., Yakusheva E.N. (2018) *Ross. Med.-Biol. Vestn. Im. Akad. I.P. Pavlova*, **4**, 466-473.]

5. Mutoh K., Tsukahara S., Mitsuhashi J., Katayama K., Sugimoto Y. (2006) *Cancer Sci.*, **97**(11), 1198-1204.
6. Coles L.D., Lee I.J., Voullas P.J., Eddington N.D. (2009) *Mol. Pharm.*, **6**(6), 1816-1825.
7. Frohlich M., Albermann N., Sauer A., Walter-Sack I., Haefali W.E., Weiss J. (2004) *Biochem. Pharmacol.*, **68**(12), 2409-2416.
8. Elsby R., Surry D.D., Smith V.N., Gray A.J. (2008) *Xenobiotic*, **38**(7-8), 1140-1164.
9. Petri N., Tannergren C., Rungstad D., Lennernäs H. (2004) *Pharmac. Res.*, **21**(8), 1398-404.
10. Elmeliegy M., Vourvahis M., Guo C., Wang D.D. (2020) *Clin. Pharmacokinet.*, **59**, 699-714.
11. Стрельцова Д.Е., Черныш М.А., Гриусевич П.В., Демидчик В.В. (2019) *Журн. Белорус. гос. универ. Биология*, **3**, 3-12. [Streltsova D.E., Chernysh M.A., Griusevich P.V., Demidchik V.V. (2019) *Zhurn. Belorus. Gos. Univer. Biologiya*, **3**, 3-12.]
12. Kretschmer X.C., Baldwin W.S. (2005) *Chem.-Biol.*, **155**, 111-128
13. Cherian M.T., Lin W., Wu J., Chen T. (2015) *Mol. Pharmacol.*, **87**, 878-889.
14. Huang H., Wang H., Sinz M., Zoeckler M., Staudinger J., Redinbo M.R., Teotico D.G., Locker J., Kalpana G.V., Mani S. (2007) *Oncogene*, **26**, 258-268.
15. Wang Y.M., Ong S.S., Chai S.C., Chen T. (2012) *Expert Opin. Drug. Metab. Toxicol.*, **8**(7), 803-817.
16. Geick A., Eichelbaum M., Burk O. (2001) *J. Biol. Chem.*, **276**, 14581-14587.
17. Kawamoto T., Kakizaki S., Yoshinari K., Negishi M. (2000) *Mol. Endocrin.*, **14**(11), 1897-1905.
18. Kliewer S.A., Moore J.T., Wade L., Staudinger J.L., Watson M.A., Jones S.A., McKee D.D., Oliver B.B., Willson T.M., Zetterström R.H., Perlmann T., Lehmann J.M. (1998) *Cell*, **92**(1), 73-82.

Поступила в редакцию: 10. 06. 2020.
 После доработки: 23. 06. 2020.
 Принята к печати: 18. 08. 2020.

EVALUATION OF FEMALE SEX HORMONES INFLUENCE ON THE PROTEIN-TRANSPORTER P-GLYCOPROTEIN FUNCTIONING *IN VITRO*

A.V. Shchulkin, I.V. Chernykh, N.M. Popova, A.A. Slepnev, E.N. Yakusheva*

Ryazan State Medical University,
9 Vysokovoltnaya str., Ryazan, 390026 Russia; *e-mail: p34-66@yandex.ru

The effects of female sex hormones estradiol and progesterone on P-glycoprotein (Pgp) functioning have been investigated using Caco-2 cells. Pgp activity was analyzed in a transwell system by the transport of its substrate, fexofenadine. The amount of the transporter protein was analyzed by enzyme immunoassay. Incubation of Caco-2 cells with 10 μ M estradiol and incubation for 3 days increased activity and synthesis of Pgp. Moreover, this effect was suppressed by the inhibitor of the constitutive androstane receptor (CAR) CINPA 1. Incubation of these cells with 100 μ M progesterone for 3 days increased Pgp synthesis, but its activity remained unchanged due to non-genomic (direct) inhibition of Pgp molecule by gestagen. The pregnan-X receptor inhibitor (PXR), ketoconazole suppressed the inducing effect of progesterone on Pgp synthesis. The combination of 10 μ M estradiol and 100 μ M progesterone increased Pgp synthesis, but did not increase the transporter protein activity, due to direct inhibition of the Pgp molecule by progesterone. Thus, it was found that estradiol increased activity and synthesis of Pgp by stimulating CAR, and progesterone stimulated transporter protein synthesis by activating PXR.

Key words: P-glycoprotein; estradiol; progesterone; constitutive androstane receptor; pregnan-X receptor

Funding. The study was supported by a grant from the Russian Foundation for Basic Research No. 18-415-623001.

Received: 10.06.2020, revised: 23.06.2020, accepted: 18.08.2020.