

©Коллектив авторов

КОЛИЧЕСТВЕННАЯ ОЦЕНКА БЕЛКА РЕЗИСТЕНТНОСТИ РАКА МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ ПРИ БЕРЕМЕННОСТИ У КРОЛИКОВ

Н.М. Попова*, А.А. Слепнев, Ю.В. Абаленихина, А.В. Шулькин, Е.Д. Рокунов, Е.Н. Якушева

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

Белок резистентности рака молочной железы (breast cancer resistance protein, BCRP, ABCG2) — эффлюксный белок-транспортер, переносящий широкий спектр субстратов из клетки во внеклеточное пространство или полости органов. Целью настоящего исследования была комплексная оценка количества BCRP в различные сроки беременности у кроликов. Содержание BCRP в образцах тощей кишки, печени, почки, коры больших полушарий головного мозга и плаценты кролика определяли методом иммуноферментного анализа, в клетках линии гепатоцеллюлярной карциномы человека (HepG2) — методом вестерн-блот. Для изучения механизмов динамики количества BCRP при беременности были исследованы сывороточные концентрации половых гормонов радиоиммунным методом, а относительное количество конститутивного андростанового рецептора (CAR) и прегнан Х рецептора (PXR) в указанных органах — методом вестерн-блот. Для оценки роли CAR и PXR в регулировании уровня BCRP под влиянием прогестерона были выполнены эксперименты *in vitro* на клетках HepG2. Количество BCRP в тощей кишке беременных кроликов многократно превосходит уровень белка-транспортера в плаценте, печени, почках и коре больших полушарий головного мозга. Увеличение количества BCRP в печени кроликов отмечено на 21 сутки беременности с тенденцией к повышению на 28 сутки, в почке — на 28 сутки беременности, а в коре больших полушарий головного мозга — на 14 сутки беременности по сравнению с небеременными самками. *In vitro* на клетках линии HepG2 установлено, что нарастание уровня изучаемого белка-транспортера обусловлено активирующим влиянием прогестерона на PXR.

Ключевые слова: белок резистентности рака молочной железы (breast cancer resistance protein, BCRP, ABCG2); количество белка; беременность; прогестерон; конститутивный андростановый рецептор (CAR); прегнан Х рецептор (PXR)

DOI: 10.18097/PBMC20236901072

ВВЕДЕНИЕ

Белок резистентности рака молочной железы (breast cancer resistance protein, BCRP, ABCG2) — эффлюксный белок-транспортер, переносящий широкий спектр липофильных субстратов из клетки во внеклеточное пространство или полости органов. Впервые он был обнаружен Doyle и соавт. в 1998 году в клетках рака молочной железы резистентной линии MSF-7/AdrVp, где способствовал активному выбросу противоопухолевых средств из цитоплазмы [1]. В настоящее время BCRP выявлен во многих органах и тканях. Он экспрессируется в синцитиотрофобластах плаценты, апикальной мембране эпителия тонкой кишки, канальцевой мембране печени, апикальной мембране эпителиоцитов почечных канальцев, на поверхности эндотелиальных клеток микрососудов головного мозга, в клетках молочной железы [2-5]. Подобная локализация белка-транспортера обуславливает участие BCRP в фармакокинетике лекарственных веществ, являющихся его субстратами. К субстратам BCRP относятся многие противоопухолевые средства, блокаторы кальциевых каналов, противовирусные препараты, фторхинолоны, антибиотики, статины, ингибиторы протонной помпы и др. Кроме того, BCRP переносит ряд эндогенных субстратов: стероидные гормоны и их метаболиты (эстрон-3-сульфат, 17 β -эстрадиол, дегидроэпиандростерон), желчные кислоты, ураты.

Изменение функционирования BCRP может изменить фармакокинетику лекарственных веществ, являющихся его субстратами. Повышение количества и активности белка-транспортера приведёт к снижению концентраций его субстратов в крови и, соответственно, уменьшению эффективности проводимой фармакотерапии. При снижении содержания и активности BCRP концентрация его субстратов в крови повышается, вследствие чего увеличивается риск развития нежелательных лекарственных реакций.

Способность половых гормонов регулировать количество BCRP описана в научной литературе [6]. Поскольку беременность сопровождается выраженной гормональной перестройкой, можно предположить, что при этом изменяется содержание BCRP в различных органах. Учитывая то, что большинство беременных женщин принимает лекарственные препараты, в том числе относящиеся к субстратам данного белка-транспортера, изучение его функционирования при беременности является весьма актуальным. Имеются литературные данные о содержании и активности BCRP в гематоплацентарном барьере, однако комплексная количественная оценка белка-транспортера в различных органах при беременности не проводилась.

Целью настоящего исследования была оценка количества BCRP в органах, играющих роль в фармакокинетике лекарственных веществ, и изучение механизмов его регуляции на протяжении всей беременности.

МЕТОДИКА

Исследования in vivo

Лабораторные животные

Исследование выполнено на 25 кроликах-самках породы “Советская шиншилла” массой 3000-3500 г. Животные были получены из питомника “Столбовая” (Московская область), имели соответствующие ветеринарные свидетельства и содержались в стандартных условиях вивария Рязанского государственного медицинского университета имени академика И.П. Павлова. Все животные были разделены на 5 серий (n=5 на каждую временную точку): интактные кролики (контроль), животные на 7 сутки, 14 сутки, 21 сутки и 28 сутки беременности. Первыми сутками беременности считали первый день после коитуса. Беременность определяли по нарастанию концентрации прогестерона в сыворотке крови, визуальным признакам, данным пальпации и аутопсии.

У всех кроликов в указанные сроки радиоиммунным методом определяли концентрации прогестерона, эстрадиола, тестостерона и пролактина в сыворотке крови. Далее кроликов выводили из эксперимента передозировкой золетила (“Virbac”, Франция) и забирали для исследования образцы тощей кишки, печени, почки, коры больших полушарий головного мозга и плаценты.

Определение количества BCRP

Количество BCRP в полученных тканях определяли методом иммуноферментного анализа с использованием набора ELISA kit (“BlueGene”, Китай). Образцы тканей гомогенизировали на гомогенизаторе DIAH 900 (“Heidolph Instruments”, Германия) при 26000 об/мин в фосфатном буфере (pH=7,2, 0,01 М) на холоде в соотношении 1:1 в течение 1 мин, затем подвергали трёхкратному замораживанию-размораживанию при -20°C для разрушения цитоплазматических мембран, как рекомендовано в инструкции к набору, далее центрифугировали при 1500 g в течение 15 мин. Анализу подвергали надосадочную жидкость. Количество транспортера пересчитывали на общее содержание белка, которое определяли по методу Брэдфорда, используя набор Coomassie Plus (Bradford) Assay Kit (“Thermo Fisher Scientific”, США).

Определение относительного количества транскрипционных факторов

В образцах печени методом вестерн-блот анализировали относительное количество транскрипционных факторов: конститутивного андростанового рецептора (CAR) и прегнан Х рецептора (PXR). Для этого образцы печени измельчали и гомогенизировали в лизирующем буфере NP40 Cell Lysis Buffer Thermo (“Thermo Fisher Scientific”) с добавлением смеси ингибиторов протеиназ (“Sigma-Aldrich”, Германия), используя гомогенизатор Поттера (16-20 ударов). Соотношение масса ткани (мг):объём буфера (мл) составило 1:1. Гомогенат инкубировали в течение 3 ч при 4°C

и постоянном перемешивании и центрифугировали при 22440 g в течение 10 мин (AvantiJXN-3, “BeckmanCoulter”, США). Супернатант использовали для последующего анализа.

Образцы (30 мкг белка) подвергали электрофорезу с использованием TGX Stain-Free FastCast Acrylamide Kit (“Bio-Rad”, США) в буферной системе Laemmli (“Bio-Rad”). Перед загрузкой образцы обрабатывали в соответствии с протоколом производителя. Их смешивали с буфером для образцов Laemmli, содержащем 2,5% 2-меркаптоэтанол (“Bio-Rad”) в соотношении 1:1 и инкубировали 5 мин при температуре 70°C. Электрофорез проводили при 100 В в течение 90 мин. Белки переносили на нитроцеллюлозную мембрану Trans-Blot Turbo Mini-Size nitrocellulose (“Bio-Rad”) с использованием модуля Mini Trans-Blot (“Bio-Rad”) в течение 10 мин при 20 В и 1,3 А. Белки на мембране блокировали 1% раствором Casein Blocker (“Bio-Rad”), содержащим 0,1% (по объёму) Tween 20 (“Sigma-Aldrich”), при инкубации в течение 1 ч и комнатной температуре.

Для определения относительного количества CAR и PXR методом вестерн-блот использовали первичные мышинные моноклональные антитела (MB67 CAR Monoclonal Antibody, “Invitrogen” (США) и MA5-31808 PXR Monoclonal Antibody (1D12G1), “Invitrogen” соответственно) в разведении 1:200. Визуализацию первичных антител осуществляли с использованием вторичных кроличьих антител (Rabbit-anti-Mouse IgG (H+L) Secondary Antibody, HRP, “Invitrogen”) в разведении 1:4000. Белки визуализировали хемилюминесценцией с помощью Chemi Doc XRS+ (“Bio-Rad”). Молекулярная масса белков была подтверждена путём сравнения с маркерами молекулярной массы (Precision plus protein standards Dual Color, “Bio-Rad”). Интенсивность полученных полос (бэндов) анализировали денситометрически с помощью программного обеспечения ImageLab (“Bio-Rad”). Количество CAR и PXR оценивали относительно содержания белка, кодируемого геном домашнего хозяйства GAPDH (первичные GAPDH Loading Control Monoclonal Antibody (GA1R), DyLight 68, “Invitrogen”, разведение 1:1000, вторичные антитела (вторичные кроличьи антитела к первичным антителам GAPDH) Rabbit-anti-Mouse IgG (H+L) Secondary Antibody, HRP, “Invitrogen”, разведение 1:4000).

Исследования in vitro

Для изучения механизмов повышения количества BCRP при беременности также были выполнены эксперименты *in vitro* на клетках линии гепатоцеллюлярной карциномы человека (HepG2) (ЦКП “Коллекция культур клеток позвоночных”, Санкт-Петербург), которая была получена из Института цитологии Российской академии наук (Санкт-Петербург).

Культивирование клеток

Клетки культивировали при температуре 37°C и 5% содержании CO₂ в среде Игла, модифицированной Дульбекко (DMEM) с высоким содержанием глюкозы

БЕЛОК РЕЗИСТЕНТНОСТИ РАКА МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ ПРИ БЕРЕМЕННОСТИ

(4500 мг/л) (“Sigma-Aldrich”), содержащей L-глутамин (4 мМ) (“Sigma-Aldrich”), 10% фетальную бычью сыворотку (“Sigma-Aldrich”), 100 ЕД/мл пенициллина (“Sigma-Aldrich”) и 100 мкг/мл стрептомицина (“Sigma-Aldrich”) на 6-луночных планшетах (“Corning”, США). После образования монослоя клетки использовали в экспериментах.

Серии эксперимента

Были сформированы следующие экспериментальные серии: 1) контроль (n=3) — клетки, инкубированные с питательной средой без добавления тестируемых веществ; 2) оценка влияния прогестерона на относительное количество BCRP: прогестерон (“Sigma-Aldrich”) добавляли в культуральную среду в конечных концентрациях 10 мкМ и 100 мкМ и инкубировали в течение 24 ч, на каждый эксперимент было выполнено по 3 повторения (n=3); 3) оценка роли CAR в повышении относительного количества BCRP под действием прогестерона (n=3): клетки инкубировали с 100 мкМ прогестероном совместно с ингибитором CAR — 10 мкМ 5-[(диэтиламино)ацетил]-10,11-дигидро-5Н-дibenzo[b,f]азепин-3-ил]этиловым эфиром карбаминовой кислоты (CINPA 1, “Tocris”, Великобритания) [7], который добавляли в питательную среду за 30 мин до внесения прогестерона; 4) оценка роли PXR в повышении относительного количества BCRP под действием прогестерона (n=3): клетки инкубировали с 100 мкМ прогестероном совместно с ингибитором PXR — 10 мкМ кетоконазолом [8] (“Sigma-Aldrich”), который добавляли в питательную среду за 30 мин до внесения прогестерона.

Определение относительного количества BCRP

Определение относительного количества BCRP в клетках линии HepG2 проводили методом вестерн-блот аналогично определению CAR и PXR. Образцы супернатанта (20 мкг белка) подвергали электрофорезу с использованием TGX Stain-Free FastCast Acrylamide Kit в буферной системе Laemmli. Образцы смешивали с буфером Laemmli, содержащим 50 мМ 2-меркаптоэтанол в соотношении 1:3, и инкубировали 10 мин при температуре 70°C. Электрофорез проводили при 100 В в течение 90 мин. Детекцию белка BCRP проводили с использованием первичных мышиных моноклональных антител (CD338 (ABCG2) Monoclonal Antibody (5D3), “Invitrogen”) в разведении 1:200 в блокирующем растворе Casein blocker в течение 2 ч при 37°C. Визуализацию первичных антител осуществляли с использованием вторичных кроличьих антител (Rabbit-anti-Mouse IgG (H+L) Secondary Antibody,

HRP, “Invitrogen”) в разведении 1:4000 и инкубацией в течение 1 ч при комнатной температуре.

Статистический анализ

Полученные результаты обрабатывали с помощью программы “StatSoft Statistica 7.0” для определения типа распределения данных по критерию Шапиро-Уилка. При нормальном распределении статистическую значимость различий оценивали с помощью теста ANOVA, попарные сравнения выполняли с помощью критерия Фишера. При распределении данных, отличном от нормального, различия между сериями оценивали с помощью критерия Крускала-Уоллиса. При уровне значимости менее 0,05 проводили парное сравнение параметров с помощью критерия Манна-Уитни с поправкой Бонферрони. Результаты приведены в виде среднего арифметического \pm стандартное отклонение среднего ($M \pm SD$) при нормальном распределении данных или медианы, нижнего и верхнего квартилей ($Me (Q1; Q3)$) при распределении данных, отличном от нормального.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Количество BCRP в тощей кишке беременных кроликов многократно превосходит содержание этого белка-транспортера в плаценте, печени, почках и коре больших полушарий головного мозга (табл. 1). Во все изучаемые сроки беременности содержание транспортера в тощей кишке достоверно не отличалось от показателей контрольных животных. В печени выявлено увеличение количества BCRP на 21 сутки беременности на 545,5% ($p < 0,05$) с тенденцией к повышению на 28 сутки ($p = 0,07$) по сравнению с небеременными самками. В почке содержание BCRP повышалось на 28 сутки беременности на 71,0% ($p < 0,05$), а в коре больших полушарий головного мозга на 14 сутки на 145,0% ($p < 0,05$) по сравнению с показателями нормы контрольных животных. Количество BCRP в плаценте достоверно не отличалось в различные сроки беременности.

Известно, что количество BCRP определяется влиянием половых гормонов. В исследованиях *in vitro* на клетках BeWo, моделирующих плацентарный барьер человека, выявлено, что прогестерон, эстриол, плацентарный лактоген и пролактин повышают, 17 β -эстрадиол снижает, а тестостерон и хорионический гонадотропин не влияют на экспрессию изучаемого белка-транспортера [6]. При этом комбинации 17 β -эстрадиола с прогестероном и тестостероном увеличивают экспрессию BCRP [6].

Таблица 1. Количество белка BCRP в тканях самок кроликов в различные сроки беременности ($Me(Q1; Q3)$), нг/г

Ткань	Контроль	7 сутки	14 сутки	21 сутки	28 сутки
Тощая кишка	106,76 \pm 46,65	114,23 \pm 17,22	104,03 \pm 13,45	68,31 \pm 34,02	102,25 \pm 55,78
Печень	0,66 \pm 0,32	1,0 \pm 0,40	0,57 \pm 0,28	4,32 \pm 0,94*	1,4 \pm 0,81 ($p = 0,071$)
Почка	1,14 \pm 0,29	1,51 \pm 0,45	1,11 \pm 0,47	1,17 \pm 0,51	1,95 \pm 0,85*
Кора больших полушарий головного мозга	0,4 \pm 0,12	0,36 \pm 0,08	0,98 \pm 0,29*	0,32 \pm 0,09	0,42 \pm 0,12
Плацента	—	4,95 \pm 1,14	6,7 \pm 1,13	4,31 \pm 1,56	5,95 \pm 0,91

Примечание: * – достоверные отличия от показателей небеременных самок, $p < 0,05$.

В нашем исследовании сывороточных концентраций половых гормонов (табл. 2) обнаружено повышение уровня прогестерона по сравнению с показателями контроля на 7 сутки беременности на 988,1% ($p<0,05$), на 14 сутки — на 962,3% ($p<0,05$), на 21 сутки — на 1006,3% ($p<0,05$), на 28 сутки — на 378,0% ($p<0,05$) и повышение концентрации пролактина на 28 сутки на 103,8% ($p<0,05$). Уровни других гормонов (эстрадиола и тестостерона) в сыворотке крови достоверно не отличались от показателей до беременности, что может свидетельствовать в пользу регулирования уровня BCRP прогестероном при беременности.

Наиболее выраженные изменения уровня BCRP отмечены в печени, где ранее были исследованы возможные механизмы регуляции этого белка-транспортера при беременности, включающие PXR и CAR. PXR и CAR — ядерные нуклеарные факторы, регулирующие функционирование ряда ферментов и белков-транспортеров, участвующих в метаболизме и транспорте ксенобиотиков, в том числе и BCRP [9, 10]. Уровень PXR в печени

на 21 сутки беременности увеличивался на 30,8% ($p<0,05$) по сравнению с показателями до беременности и не изменялся в остальные сроки. Напротив, уровень CAR снижался во все сроки гестации. Максимальное снижение обнаружено на 28 сутки (на 63,6%, $p<0,05$) (рис. 1), то есть в те же сроки, что и повышение BCRP. Полученные результаты согласуются с литературными данными. На линии клеток Сасо-2 показано, что активация PXR посредством PCN (5-pregnen-3 β -ol-20-one-16 α -carbonitrile) способствует увеличению количества BCRP [11]. Обработка клеток мышей TM4 Sertoli агонистами PXR дексаметазоном (100 мкМ) и PCN (50 мкМ) в течение 24 ч индуцировала экспрессию мРНК и белка BCRP, которую тормозил антагонист PXR кетоконазол (10 мкМ). Генетический нокдаун PXR в клетках TM4 с использованием siRNA также снижал экспрессию белка BCRP, что подтверждает прямую регуляторную роль PXR в семенниках [12]. Опосредованная PXR регуляция уровня BCRP была выявлена в плацентах мышей. В эксперименте на беременных мышках

Таблица 2. Сывороточные концентрации гормонов у самок кроликов во время беременности

Гормон	7 сутки		14 сутки		21 сутки		28 сутки	
	Контроль	Беременность	Контроль	Беременность	Контроль	Беременность	Контроль	Беременность
Эстрадиол, пг/мл	323,46 \pm 122,50	337,67 \pm 139,30	323,70 \pm 122,39	304,89 \pm 82,93	267,50 \pm 41,60	249,35 \pm 54,10	269,40 \pm 47,92	192,10 \pm 118,69
Прогестерон, нг/мл	0,46 \pm 0,23	4,55 \pm 0,77*	0,77 \pm 0,38	8,18 \pm 1,63*	0,63 \pm 0,35	6,97 \pm 1,04*	0,73 \pm 0,21	3,49 \pm 1,63*
Тестостерон, нмоль/л	1,176 \pm 0,52	1,22 \pm 0,35	1,13 \pm 0,59	1,17 \pm 0,48	0,76 \pm 0,12	0,94 \pm 0,37	0,89 \pm 0,31	0,81 \pm 0,32
Пролактин, мМЕ/мл	21,16 \pm 4,30	17,26 \pm 3,20	22,50 \pm 4,70	20,30 \pm 2,65	23,00 \pm 6,10	23,10 \pm 4,90	35,10 \pm 14,90	71,53 \pm 7,76*

Примечание: * – достоверные отличия от показателей небеременных самок, $p<0,05$.

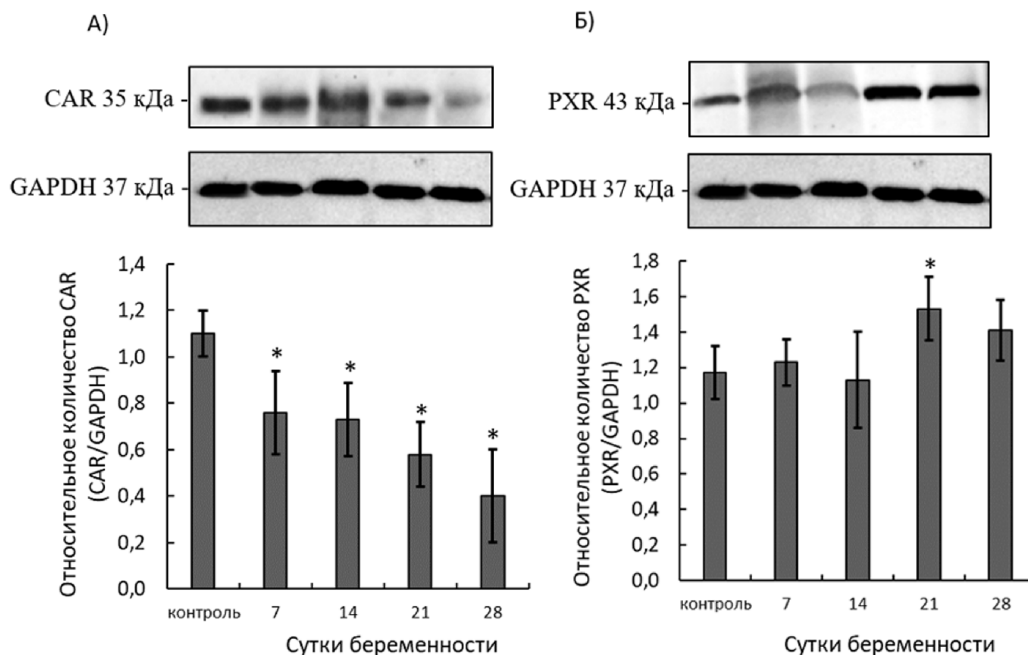


Рисунок 1. Относительное количество конститутивного андростанового рецептора (А) и прегнан Х рецептора (Б) в печени самок кроликов в различные сроки беременности (М \pm SD). Сверху – фото бендов, полученных с помощью ChemiDocXRS+; снизу – результаты денситометрического анализа, выполненного с помощью программного обеспечения ImageLab. * – достоверные отличия от показателей небеременных самок, $p<0,05$.

БЕЛОК РЕЗИСТЕНТНОСТИ РАКА МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ ПРИ БЕРЕМЕННОСТИ

C57BL/6 выявлено, что при внутрибрюшинном введении агониста PXR PCN в дозе 50 мг/кг с 13 по 17 день беременности отмечалось повышение уровня плацентарного BCRP [13].

Для уточнения механизмов влияния прогестерона на уровень BCRP нами были проведены исследования *in vitro* на клетках HepG2, в которых установлено, что 10 мкМ прогестерон повышал количество BCRP на 105,1% ($p<0,05$), а 100 мкМ прогестерон — на 79,5% ($p<0,05$) по сравнению с показателями контроля (рис. 2). Ингибирование CAR посредством CINPA1 не влияло на действие прогестерона в концентрации 100 мкМ на уровень BCRP: данный показатель увеличивался на 67,5% ($p=0,06$) по сравнению с результатами контроля. Ингибитор PXR кетоконазол предотвращал увеличение относительного количества BCRP под действием 100 мкМ прогестерона, которое не отличалось от значений контроля (рис. 2). Полученные данные свидетельствуют о том, что PXR принимает участие в регуляции BCRP под влиянием прогестерона, что согласуется с литературными данными о стимулирующем влиянии прогестерона на данный нуклеарный фактор [14, 15].

Следует отметить, что в нашем исследовании наблюдалось достоверное снижение уровня CAR в печени во все изучаемые сроки беременности.

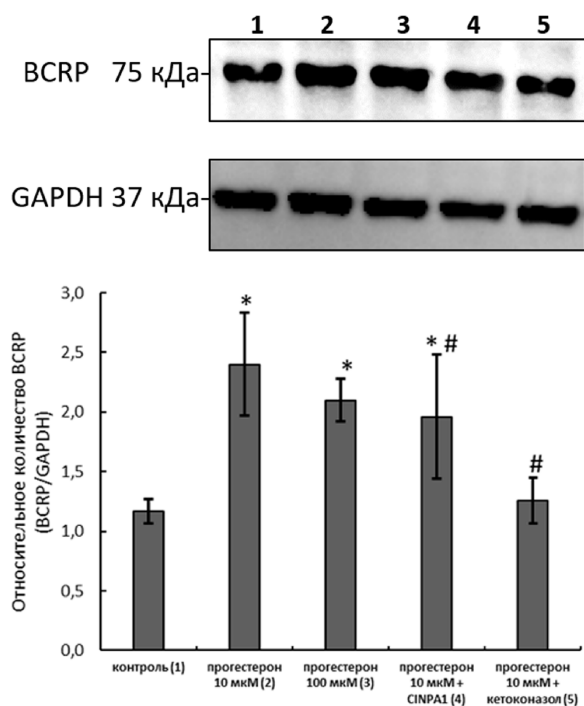


Рисунок 2. Относительное количество BCRP в клетках линии HepG2 в интактных клетках (1) при воздействии прогестерона в концентрациях 10 мкМ (2), 100 мкМ (3) и при сочетанном применении прогестерона и ингибитора CAR — CINPA1 (4), прогестерона и ингибитора PXR — кетоконазола (5) ($M \pm SD$). Сверху — фото бендов, полученных с помощью ChemiDocXRS+; снизу — результаты денситометрического анализа, выполненного с помощью программного обеспечения ImageLab. * — достоверные отличия от показателей контроля, $p<0,05$; # — достоверные отличия от группы прогестерон 10 мкМ, $p<0,05$.

Кроме того, ингибирование данного фактора на клетках HepG2 не устранило активирующее действие прогестерона на уровень BCRP. Полученные результаты подтверждают отсутствие роли CAR в регуляции количества BCRP при беременности под действием прогестерона. Кроме того, известно, что прогестерон является антагонистом данного нуклеарного фактора [16].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, в нашей работе показано, что содержание BCRP в тощей кишке кроликов при беременности многократно превосходит количество белка-транспортера в плаценте, печени, почках и коре больших полушарий головного мозга. Выявлено повышение количества BCRP в печени кроликов на 21 сутки с тенденцией к увеличению на 28 сутки беременности, в почке — на 28 сутки и коре больших полушарий головного мозга — на 14 сутки беременности по сравнению с небеременными самками. При этом нарастание уровня белка-транспортера, скорее всего, обусловлено повышением сывороточной концентрации прогестерона и активацией PXR.

ФИНАНСИРОВАНИЕ

Работа выполнена на бюджетные средства Рязанского государственного медицинского университета имени академика И.П. Павлова.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Работу с животными проводили в соответствии с правилами лабораторной практики (Приказ МЗ РФ № 464н от 18 мая 2021 г). Протокол исследования был утверждён на заседании Комиссии по контролю за содержанием и использованием лабораторных животных № 46 от 01.06.2022.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

ЛИТЕРАТУРА

1. Austin D.L., Ross D.D. (2003) Multidrug resistance mediated by the breast cancer resistance protein BCRP (ABCG2). *Oncogene*, **22**(47), 7340-7358. DOI: 10.1038/sj.onc.1206938
2. Amawi H., Sim H.M., Tiwari A.K., Ambudkar S.V., Shukla S. (2019) ABC transporter-mediated multidrug-resistant cancer. *Adv. Exp. Med. Biol.*, **1141**, 549-580. DOI: 10.1007/978-981-13-7647-4_12
3. Han L.W., Gao C., Mao Q. (2018) An update on expression and function of P-gp/ABCB1 and BCRP/ABCG2 in the placenta and fetus. *Expert Opin. Drug Metab. Toxicol.*, **14**(8), 817-829. DOI: 10.1080/17425255.2018.1499726
4. Gorczyca L., Aleksunes L.M. (2020) Transcription factor-mediated regulation of the BCRP/ABCG2 efflux transporter: A review across tissues and species.

- Expert Opin. Drug Metab. Toxicol., **16**(3), 239-253. DOI: 10.1080/17425255.2020.1732348
5. Hira D., Terada T. (2018) BCRP/ABCG2 and high-alert medications: Biochemical, pharmacokinetic, pharmacogenetic, and clinical implications. Biochem. Pharmacol., **147**, 201-210. DOI: 10.1016/j.bcp.2017.10.004
 6. Wang H., Unadkat J.D., Mao Q. (2008) Hormonal regulation of BCRP expression in human placental BeWo cells. Pharmaceutical Res., **25**(2), 444-452. DOI: 10.1007/s11095-007-9432-z
 7. Fuchs L., Hafner-Blumenstiel V., Markert C., Burhenne J., Weiss J., Haefeli W.E., Mikus G. (2013) Effect of the CYP3A inhibitor ketoconazole on the PXR-mediated induction of CYP3A activity. Eur. J. Clin. Pharmacol., **69**(3), 507-513. DOI: 10.1007/s00228-012-1388-1
 8. Cherian M.T., Lin W., Wu J., Chen T. (2015) CINPA1 is an inhibitor of constitutive androstane receptor that does not activate pregnane X receptor. Mol. Pharmacol., **87**(5), 878-889. DOI: 10.1124/mol.115.097782.
 9. Skandalaki A., Sarantis P., Theocharis S. (2021) Pregnane X receptor (PXR) polymorphisms and cancer treatment. Biomolecules, **11**(8), 1142. DOI: 10.3390/biom11081142.
 10. Pinheiro E.A., Stika C.S. (2020) Drugs in pregnancy: Pharmacologic and physiologic changes that affect clinical care. Seminars Perinatology, **44**(3), 151221. DOI: 10.1016/j.semper.2020.151221.
 11. Jinhu W., Yin Z., Yuhu L. (2020) PXR-ABC drug transporters/ CYP-mediated ursolic acid transport and metabolism in vitro and vivo. Archiv Der Pharmazie, **353**(9), 2000082. DOI: 10.1002/ardp.202000082
 12. Whyte-Allman S.K., Hoque M.T., Jenabian M.A., Routy J.P., Bendayan R. (2017) Xenobiotic nuclear receptors pregnane X receptor and constitutive androstane receptor regulate antiretroviral drug efflux transporters at the blood-testis barrier. J. Pharmacol. Exp. Ther., **363**(3), 324-335. DOI: 10.1124/jpet.117.243584
 13. Gahir S.S., Piquette-Miller M. (2011) Gestational and pregnane X receptor-mediated regulation of placental ATP-binding cassette drug transporters in mice. Drug Metab. Dispos., **39**(3), 465-471. DOI: 10.1124/dmd.110.034983
 14. Masuyama H., Hiramatsu Y., Mizutani Y., Inoshita H., Kudo T. (2001) The expression of pregnane X receptor and its target gene, cytochrome P450 3A1, in perinatal mouse. Mol. Cell. Endocrinol., **172**(1-2), 47-56. DOI: 10.1016/s0303-7207(00)00395-6
 15. Meyer zu Schwabedissen H.E., Kim R.B. (2009) Hepatic OATP1B transporters and nuclear receptors PXR and CAR: Interplay, regulation of drug disposition genes, and single nucleotide polymorphisms. Molecular Pharmaceutics, **6**(6), 1644-1661. DOI: 10.1021/mp9000298
 16. Качайло Е.М., Пустыльяк В.О., Ляхович В.В., Гуляева Л.Ф. (2011) Конститутивный андростановый рецептор (CAR): ксеносенсор и терапевтическая мишень (Обзор). Биохимия, **76**(10), 1335-1347. [Kachaylo E.M., Pustyl'nyak V.O., Lyakhovich V.V., Gulyaeva L.F. (2011) Constitutive androstane receptor (CAR) is a xenosensor and target for therapy. Biochemistry (Moscow), **76**(10), 1087-1097.] DOI: 10.1134/S0006297911000026

Поступила в редакцию: 09. 11. 2022.
После доработки: 24. 01. 2023.
Принята к печати: 30. 01. 2023.

QUANTITATIVE ASSESSMENT OF BREAST CANCER RESISTANCE PROTEIN DURING PREGNANCY IN RABBITS

N.M. Popova*, A.A. Slepnev, Yu.V. Abalenikhina, A.V. Shchulkin, E.D. Rokunov, E.N. Yakusheva

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

Breast cancer resistance protein (BCRP, ABCG2) is an efflux transporter protein that transports various substrates from the cell to the extracellular space or organ cavities. The aim of this study was a complex assessment of the amount of BCRP during pregnancy in rabbits. The amount of BCRP in samples of the rabbit jejunum, liver, kidney, cerebral cortex and placenta was determined by enzyme immunoassay, and in human hepatocellular carcinoma (HepG2) cells by the Western blot. To study the mechanisms involved in control of the dynamic BCRP levels during pregnancy, serum concentrations of sex hormones were investigated by radioimmunoassay and relative amounts of constitutive androstane receptor (CAR) and pregnane X receptor (PXR) in these organs were evaluated using the Western blot method. The putative role of CAR and PXR in regulation of the BCRP level by progesterone was evaluated *in vitro* experiments on HepG2 cells. It was found that amount of BCRP in the jejunum of pregnant rabbits was higher than in the placenta, liver, kidneys, and cerebral cortex. An increase in the amount of BCRP in the liver of rabbits was noted on the 21st day of pregnancy and a tendency to the increase was also detected on the 28th day; in the kidney and cerebral cortex increased BCRP levels were detected on the 28th day and 14th day of pregnancy, respectively, as compared with non-pregnant females. *In vitro* experiments with HepG2 cells have shown that the increase in the BCRP level is determined by the activating effect of progesterone on PXR.

The whole English version is available at <http://pbmc.ibmc.msk.ru>.

Key words: breast cancer resistance protein (BCRP, ABCG2); protein amount; pregnancy; progesterone; constitutive androstane receptor (CAR); pregnane X receptor (PXR)

Funding. This work was supported by the Budget of the Ryazan State Medical University.

Received: 09.11.2022; revised: 24.01.2023; accepted: 30.01.2023.