

МЕХАНИЗМ ВЛИЯНИЯ ТЕСТОСТЕРОНА
НА БЕЛОК-ТРАНСПОРТЕР Р-ГЛИКОПРОТЕИН

© 2022 г. А. А. Слепнев¹, А. В. Шулькин¹, Ю. В. Абаленихина¹*, Н. М. Попова¹,
И. В. Черных¹, Е. Н. Якушева¹

¹Рязанский государственный медицинский университет им. акад. И.П. Павлова Минздрава России,
Рязань, Россия

*E-mail: abalenihipina88@mail.ru

Поступила в редакцию 01.07.2022 г.

После доработки 12.08.2022 г.

Принята к публикации 15.08.2022 г.

Р-гликопротеин (Pgp) – эффлюксный мембранный белок-транспортёр, играющий важную роль в фармакокинетике лекарственных веществ. Известно, что тестостерон может снижать активность и количество Pgp, однако механизмы его действия остаются неизученными. Цель исследования – изучить механизмы влияния тестостерона на функционирование Pgp, в частности оценить роль андрогенного (AR), прегнан Х (PXR) и конститутивного андростанового рецепторов (CAR) в данном процессе *in vitro* и *in vivo*. *In vitro* на клетках линии Caco-2 воздействие тестостерона (1 и 10 мкМ) в течение 24 ч снижало количество Pgp (метод вестерн-блот) по сравнению с контролем. Ингибитор PXR – кетоконазол (1 и 10 мкМ, экспозиция 24 ч) не влиял на количество Pgp, а ингибитор CAR – CINPA в концентрации 10 мкМ уменьшал содержание Pgp. Комбинация CINPA 10 мкМ и тестостерона 10 мкМ также снижала содержание Pgp, однако количество транспортера достоверно не отличалось от показателей групп изолированного применения тестостерона и CINPA. *In vivo* на кроликах-самцах породы Шиншилла показано, что однократное внутримышечное введение тестостерона ундеканоата в дозе 24 мг/кг массы повышало уровень тестостерона в сыворотке крови на 21-е сутки исследования по сравнению с контролем, а после выполнения орхиэктомии его содержание на 21-е сутки снижалось. Относительное количество Pgp и CAR в тощей кишке кроликов при введении тестостерона уменьшалось, а после выполнения орхиэктомии – увеличивалось. Количество PXR и AR в тощей кишке кроликов в указанных группах статистически значимо не изменялось. Таким образом, в опытах *in vitro* и *in vivo* показано, что тестостерон снижает количество белка-транспортера Pgp, ингибируя CAR.

Ключевые слова: Р-гликопротеин, тестостерон, клетки линии Caco-2, прегнан Х рецептор, конститутивный андростановый рецептор, андрогенный рецептор, вестерн-блот

DOI: 10.31857/S0869813922090059

Р-гликопротеин (Pgp, ABCB1), белок суперсемейства ABC-транспортёров, который экспрессируется в цитоплазматических мембранах и препятствует проникновению своих субстратов внутрь клеток, выводя их в межклеточное пространство и биологические жидкости [1]. Доказана локализация Pgp в энтероцитах кишечника, гепатоцитах, эпителии почечных канальцев, эндотелии гистогематических барьеров, эндокринных и опухолевых клетках. При этом максимальная экспрессия

гена *MDR1*, кодирующего данный белок, обнаружена в надпочечниках и тонком кишечнике [2]. Исходя из данной локализации, принято считать, что основными функциями Pgp являются транспорт эндогенных веществ (стероидные, тиреоидные гормоны), развитие резистентности опухолей к химиотерапевтическим агентам (за счет их эффлюкса из опухолевых клеток) и участие в фармакокинетике (всасывании, распределении и выведении) лекарственных веществ [3].

Показано, что активность Pgp может изменяться под действием ряда веществ и факторов внешней и внутренней среды. Так, гипоксия [4], окислительный стресс [5], рифампицин [6] повышают активность транспортера, а прогестерон [7], кононазол и амиодарон [6] ее снижают. Регуляция активности Pgp имеет важное практическое значение. Ингибиторы синтеза и активности транспортера могут использоваться в комплексной терапии онкологических заболеваний (подавление функционирования Pgp повышает проникновение цитостатиков внутрь клеток) [8], а изучение влияния лекарственных веществ на активность Pgp важно для прогнозирования межлекарственных взаимодействий. Ингибирование транспортера в клетках кишечника, печени и почек может привести к повышению в крови концентрации его субстратов и развитию побочных эффектов фармакотерапии (посредством повышения всасывания и замедления выведения), а повышение активности Pgp в данных органах – наоборот, к уменьшению уровня субстратов и снижению эффективности лечения (путем снижения всасывания и ускорения выведения) [3]. Наибольшее клиническое значение имеют субстраты Pgp антикоагулянты – дабигатрана этексилат, ривароксабан, изменение концентрации которых в плазме крови может привести к кровотечению или к развитию тромбозов соответственно [6]. Поэтому актуальным является тестирование принадлежности лекарственных и биологически активных веществ к субстратам, индукторам и ингибиторам Pgp.

В ряде исследований было показано, что тестостерон может влиять на активность и количество Pgp. В эксперименте на рогах новозеландских кроликов было установлено, что тестостерон в концентрациях 100 и 150 мкМ не влиял на опосредованный Pgp транспорт эритромицина через рога, однако в концентрациях 250 и 500 мкМ ингибировал активность белка-транспортера, при этом IC_{50} (концентрация, ингибирующая активность Pgp на 50%) составила 241 ± 27.6 мкМ [9]. В эксперименте на культуре клеток 2780AD (карцинома яичника человека, вариант, резистентный к лекарственной терапии) показано, что тестостерон в концентрациях 50–150 мкМ ингибировал активность Pgp, оцениваемую по эффлюксу субстрата белка-транспортера – даунорубина [10]. В исследовании на линии клеток VBL-resistant cell lines, J7.VI-1 выявлено, что тестостерон в концентрации 50 мкМ уменьшал содержание белка-транспортера в мембранах микросом на 45% [11]. В опытах на изолированных участках двенадцатиперстной, тощей и подвздошной кишок крыс установлено, что тестостерон в концентрации 20 мкМ повышал всасывание субстрата Pgp – винбластина в двенадцатиперстной и тощей кишках, что свидетельствует о его способности ингибировать белок-транспортер [12]. В эксперименте на самках крыс линии Sprague-Dawley было показано, что введение им тестостерона в дозе 10 мг/день в течение 7 дней приводило к снижению экспрессии (вестерн-блот) и активности Pgp, оцениваемой по билиарному клиренсу доксорубина до показателей самцов [13]. На кроликах породы Шиншилла нами было показано, что введение тестостерона вызывало уменьшение количества и активности Pgp в тонком кишечнике, а орхиэктомия, наоборот, повышала количество и активность транспортера [14, 15].

Таким образом, в большинстве исследований доказано, что тестостерон снижает активность и количество Pgp. Однако механизмы выявленных изменений на данный момент не известны. Цель исследования – изучить механизмы влияния тестос-

стерона на функционирование белка-транспортера Pgr, в частности оценить роль андрогенного, прегнан X и конститутивного андростанового рецепторов в данном процессе.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Все процедуры выполнены с участием животных и соответствовали этическим стандартам, утвержденным правовыми актами РФ, принципам Базельской декларации. Протокол исследования был рассмотрен и утвержден на заседании биоэтической комиссии Рязанского государственного медицинского университета Минздрава России № 12 от 08.04.16 г.

Исследование выполнено *in vitro* и *in vivo*. Для экспериментов *in vitro* использовалась линия клеток аденокарциномы ободочной кишки человека (Caco-2) (ЦКП “Коллекция культур клеток позвоночных”, Санкт-Петербург, Россия). Клетки культивировали при 37°C и 5%-ном содержании CO₂ в инкубаторе WS-189C (“World Science”, Корея) в среде Игла, модифицированной Дульбекко (DMEM), с высоким содержанием глюкозы (4.5 г/л) (“Sigma-Aldrich”, Германия), с добавлением 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. Для определения количества Pgr клетки культивировали в 6-луночных планшетах в течение 21 сут, поскольку при данном сроке происходит их спонтанная дифференцировка в энтероцитоподобные клетки, гиперэкспрессирующие Pgr [16].

В ходе исследования *in vitro* было сформировано пять экспериментальных групп. При выполнении каждого эксперимента было выполнено по 3 повторения ($n = 3$). Первая группа – контроль, представлена клетками линии Caco-2, которые инкубировали в питательной среде без добавления тестируемых веществ ($n = 3$). Вторая группа – оценка влияния тестостерона на количество Pgr, включала клетки линии Caco-2, которые инкубировали с тестостероном в концентрациях 1 и 10 мкМ в течение 24 ч ($n = 3$). Третья группа – изучение влияния ингибирования прегнан X рецептора (PXR) на количество Pgr, представляла собой клетки линии Caco-2, которые инкубировали с кетоконазолом (ингибитор PXR, “Sigma Aldrich”, Германия) в концентрациях 1 и 10 мкМ в течение 24 ч ($n = 3$) [17]. Четвертая группа – исследование влияния ингибирования конститутивного андростанового рецептора (CAR) на количество Pgr – клетки линии Caco-2 инкубировали с 5-[(Диэтиламино)ацетил]-10,11-дигидро-5H-добензо[b,f]азепин-3-[ил]этиловым эфиром карбаминовой кислоты (CINPA 1, ингибитор CAR, “Tocris”, Великобритания) в концентрациях 1 и 10 мкМ в течение 24 ч ($n = 3$) [18]. Выбор данного ингибитора обусловлен его селективностью по отношению к CAR и отсутствием влияния на PXR, например, в отличие от другого ингибитора 1-(2-хлорофенил)-N-метил-N-(1-метилпропил)-3-изохинолинкарбоксамид (PK11195). Пятая группа – оценка влияния комбинации 10 мкМ CINPA и 10 мкМ тестостерона при длительности инкубации 24 ч на количество Pgr ($n = 3$).

После окончания экспозиции клетки снимали с лунок раствором трипсин-ЭДТА (“Sigma-Aldrich”, Германия), трижды промывали раствором фосфатного буфера (“BioRad”, США) и лизировали в NP40 Cell Lysis Buffer Thermo (“Thermo Fisher Scientific”, США) с добавлением смеси ингибиторов протеиназ (“Sigma-Aldrich”, Германия) в течение 30 мин при 4°C и постоянном перемешивании из расчета 10⁷ клеток на 100 мкл буфера. Полученный лизат центрифугировали при 22440 g в течение 10 мин (“AvantiJXN-3”, “BeckmanCoulter”, США). Супернатант использовали для анализа.

Исследование *in vivo* выполнено на кроликах-самцах породы Шиншилла, массой 3000–3500 г, в возрасте 7–10 мес. Выбор вида животных обусловлен наибольшей схожестью механизмов регуляции Pgr у человека и кроликов [19, 20]. Все животные были разделены на 4 экспериментальные группы. Первая группа (контроль 1) – интактные кролики, которым внутримышечно вводили физиологический раствор в объеме, эквивалентном объему раствора тестостерона, и через 21 сутки выводили из эксперимента ($n = 5$). Вторая группа – кролики, которым однократно внутримышечно вводили тестостерона ундеcanoат (раствор для внутримышечного введения “Небидо” 250 мг/мл (“Bayer Pharma AG”, Германия) в дозе 24 мг/кг массы [21] и выводили из эксперимента на 21-е сутки ($n = 5$). Третья группа (контроль 2) – интактные кролики, которым выполняли “ложную” операцию и через 21 сутки выводили из эксперимента ($n = 5$). Четвертая группа – кролики, которым выполняли орхиэктомию и выводили из эксперимента на 21-е сутки после операции ($n = 5$). Длительность наблюдения и доза тестостерона ундеcanoата выбраны на основе ранее полученных результатов об изменении активности и количества Pgr при повышении и снижении уровня тестостерона [14, 15].

Оперативные вмешательства проводили в условиях операционной вивария Рязанского государственного медицинского университета с соблюдением методов асептики и антисептики под наркозом, который осуществляли в/м введением ксилазина гидрохлорида (“Рометар”, “СПОФА”, Чехия) в дозе 4.0–6.0 мг/кг массы и золетила-50 (“Virbac”, Франция) в дозе 5–10 мг/кг массы [22]. У всех животных перед выведением из эксперимента из ушной вены забиралась кровь и в сыворотке определяли концентрацию тестостерона радиоиммунным методом с использованием тест-систем “IMMUNOTECH” (Чехия). Концентрацию тестостерона выражали в нмоль/л.

При завершении эксперимента животных каждой серии выводили из него передозировкой золетила (“Золетил 100”, “Virbac S.A.”, Франция) в дозе 30 мг/кг массы. Для исследования забирали образец тощей кишки. Полученные образцы измельчали и гомогенизировали в NP40 Cell Lysis Buffer Thermo (“Thermo Fisher Scientific”, США) с добавлением смеси ингибиторов протеиназ (“Sigma-Aldrich”, Германия) с помощью гомогенизатора Поттера (16–20 ударов) в соотношении масса ткани (мг) : объем буфера (мл) 1 : 1, а затем инкубировали в течение 3 ч при 4°C и постоянном перемешивании. Полученный гомогенат центрифугировали при 22440 g в течение 10 мин (“AvantiJXN-3”, “BeckmanCoulter”, США). Супернатант использовали для анализа.

В полученных лизатах и гомогенатах методом вестерн-блот оценивали относительное количество Pgr, CAR, PXR и андрогенного рецептора (AR). Для этого белки (30 мкг, количество белка анализировали методом Брэдфорда) подвергали электрофорезу с использованием TGX Stain-Free FastCast Acrylamide Kit (“Bio-Rad”) в буферной системе Laemmli (“BioRad”). Перед загрузкой образцы обрабатывали в соответствии с протоколом Bio-Rad. Их смешивали с буфером для образцов Laemmli (“Bio-Rad”), содержащем 2.5% 2-меркаптоэтанола (“Bio-Rad”) в соотношении 1 : 3, инкубировали 5 мин при температуре 70°C. Гели прогоняли при 100 В в течение 90 мин. Для определения относительного количества Pgr, CAR, PXR и AR методом вестерн-блот использовали первичные мышиные моноклональные антитела P-Glycoprotein Antibody MA5-13854 (“Invitrogen”, США), MB67 CAR Monoclonal Antibody (“Invitrogen”, США), MA5-31808 PXR Monoclonal Antibody (1D12G1) (“Invitrogen”), США, Anti-Androgen Receptor antibody [DHTR/882] (“Abcam”, США) в разведении 1 : 200. Визуализацию первичных антител осуществляли с использованием вторичных кроличьих антител (Rabbit anti-Mouse IgG (H + L) Secondary Antibody, HRP, “Invitrogen”, США) в разведении 1 : 4000. Белки визуализировали хемилюминесценцией с помощью Chemi Doc XRS+ (“Bio-Rad”, США). Молекулярная

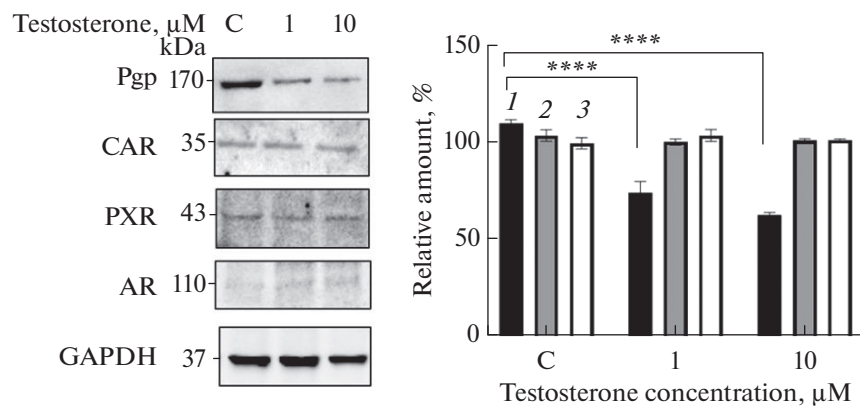


Рис. 1. Относительное количество гликопротеина-Р (Pgr, 1), конститутивного андростанового рецептора (CAR, 2), прегнан-Х-рецептора (PXR, 3), андрогенного рецептора (AR) в клетках линии Saco-2 при воздействии тестостерона в концентрациях 1 и 10 мкМ в течение 24 ч ($M \pm SD$, $n = 3$). **** $p < 0.0001$ по сравнению с контролем (С) (критерий Фишера).

масса белков была подтверждена путем сравнения с маркерами молекулярной массы (Precision plus protein standards Dual Color, “Bio-Rad”, США). Интенсивность полученных полос (бэндов) анализировали денситометрически с помощью программного обеспечения ImageLab (“Bio-Rad”, США). Количество Pgr, CAR, PXR, AR оценивали относительно содержания белка домашнего хозяйства GAPDH (первичные GAPDH Loading Control Monoclonal Antibody (GA1R), DyLight 68, “Invitrogen”, США, разведение 1 : 1000, вторичные антитела – вторичные кроличьи антитела к первичным антителам GAPDH – Rabbitanti-Mouse IgG (H + L) Secondary Antibody, HRP, “Invitrogen”, США, разведение 1 : 4000).

Полученные результаты анализировали с помощью программы GgraphPadPrism 8. Характер распределения данных оценивали с помощью критерия Шапиро–Уилка. Учитывая, что данные имели нормальное распределение, для оценки статистической значимости различий использовали дисперсионный анализ (ANOVA) для несвязанных выборок, попарные сравнения выполняли с помощью критерия Фишера. Статистически значимыми считали различия при $p < 0.05$. Результаты представлены в виде $M \pm SD$.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Воздействие тестостерона на клетки линии Saco-2 в течение 24 ч приводило к снижению количества Pgr в концентрации 1 мкМ на 32.4% ($p < 0.0001$), 10 мкМ на 42.9% ($p < 0.0001$) по сравнению с контролем (рис. 1). В то же время уровень CAR и PXR достоверно не изменялся, а AR практически не детектировался (рис. 1).

Специфические ингибиторы CAR и PXR оказывали следующее влияние на уровень Pgr. Ингибитор PXR – кетоконазол в концентрациях 1 и 10 мкМ и экспозиции 24 ч не влиял на количество Pgr, а ингибитор CAR – CINPA в концентрации 10 мкМ снижал содержание Pgr на 37.6% ($p < 0.0001$) по сравнению с контролем (рис. 2).

Комбинация 10 мкМ CINPA и 10 мкМ тестостерона также снижала содержание Pgr в клетках линии Saco-2 по сравнению с показателями контроля на 44.3% ($p < 0.0001$), однако количество транспортера достоверно не отличалось от показателей групп изолированного применения тестостерона и CINPA (рис. 2).

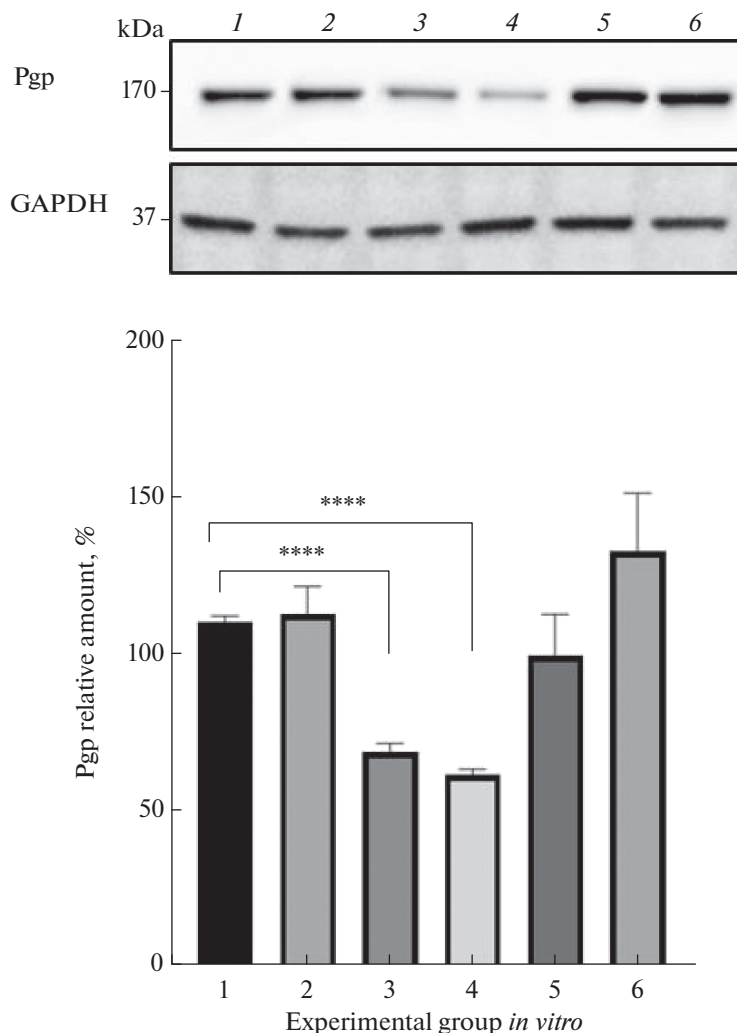


Рис. 2. Относительное количество гликопротеина-P (Pgp) в клетках линии Saco-2 в контроле (1), при воздействии CINPA 1 мкМ (2) и 10 мкМ (3), сочетанном применении тестостерона 10 мкМ и CINPA 10 мкМ (4), при инкубации с кетоконазолом 1 мкМ (5) и 10 мкМ (6) в течение 24 ч ($M \pm SD$, $n = 3$). **** $p < 0.0001$ по сравнению с контролем (критерий Фишера).

В эксперименте *in vivo* установлено, что внутримышечное введение тестостерона ундеканоата кроликам в дозе 24 мг/кг массы приводило к повышению уровня тестостерона в сыворотке крови на 21-е сутки исследования на 166.7% ($p = 0.001$) по сравнению с контролем 1. После выполнения орхиэктомии содержание тестостерона в сыворотке крови на 21-е сутки снижалось на 92.9% ($p = 0.012$) относительно контроля 2 (рис. 3).

Относительное количество Pgp в тощей кишке кроликов при введении тестостерона ундеканоата снижалось на 35.5% ($p < 0.001$), а при выполнении орхиэктомии — увеличивалось на 50.9% ($p < 0.01$) (рис. 4а). Содержание CAR в тощей кишке при использовании тестостерона ундеканоата снижалось на 30.4% ($p < 0.001$), а при выполнении орхиэктомии увеличивалось на 100% ($p < 0.0001$) (рис. 4б).

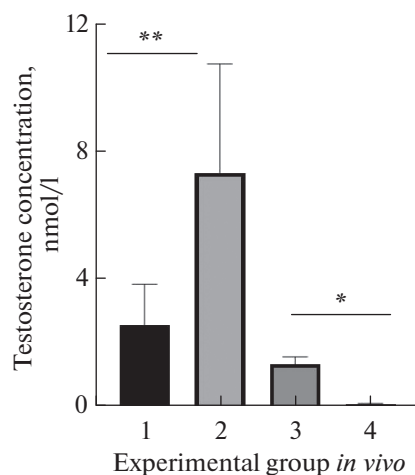


Рис. 3. Концентрация тестостерона в сыворотке крови кроликов-самцов при внутримышечном введении физиологического раствора (1), при внутримышечном введении тестостерона ундеcanoата в дозе 24 мг/кг массы (2), при проведении “ложной” операции (3), при орхиэтомии (4) на 21-е сутки ($M \pm SD$, $n = 5$). * $p \leq 0.01$; ** $p \leq 0.001$ по сравнению с соответствующим контролем (критерий Фишера).

Количество PXR в тощей кишке кроликов оставалось на уровне контроля при изменении сывороточной концентрации тестостерона. AR детектировался в следовых количествах.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Pgp (ABCB1) – самый изученный белок-транспортер из суперсемейства ABC-транспортеров. Он играет важную роль в феномене резистентности опухолей к цитостатикам, удаляя их из клеток в межклеточное пространство, а также обеспечивает транспорт экзогенных и эндогенных веществ [3, 8]. Механизмы регуляции Pgp активно изучаются с целью разработки подходов к преодолению множественной лекарственной устойчивости опухолей, а также для улучшения доставки фармакологических активных веществ и прогнозирования развития фармакокинетических межлекарственных взаимодействий.

На данный момент выделяют следующие механизмы регуляции Pgp [23]: изменение экспрессии гена *MDR1* посредством влияния на его промотор; полиморфизм гена *MDR1*; увеличение дозы гена – амплификация участка генома, содержащего ген *MDR1*; стабилизация мРНК гена *MDR1*; влияние микроРНК на экспрессию Pgp; передача Pgp между клетками; изменение активности синтезированного белка-транспортера; влияние на гидролиз АТФ; изменение свойств цитоплазматических мембран. В ряде работ было показано, что тестостерон обладает способностью ингибировать активность Pgp без влияния на его количество. Согласно другим данным, тестостерон снижает и количество изучаемого белка-транспортера [9, 10, 14, 15].

В настоящем исследовании на клетках линии Сасо-2 при воздействии тестостерона в концентрациях 1 и 10 мкМ и инкубации 24 ч, а также на кроликах-самцах породы Шиншилла при внутримышечном введении тестостерона ундеcanoата в дозе 24 мг/кг массы в тощей кишке было подтверждено снижение количества Pgp. Для изучения механизмов влияния тестостерона на уровень Pgp было оценено ко-

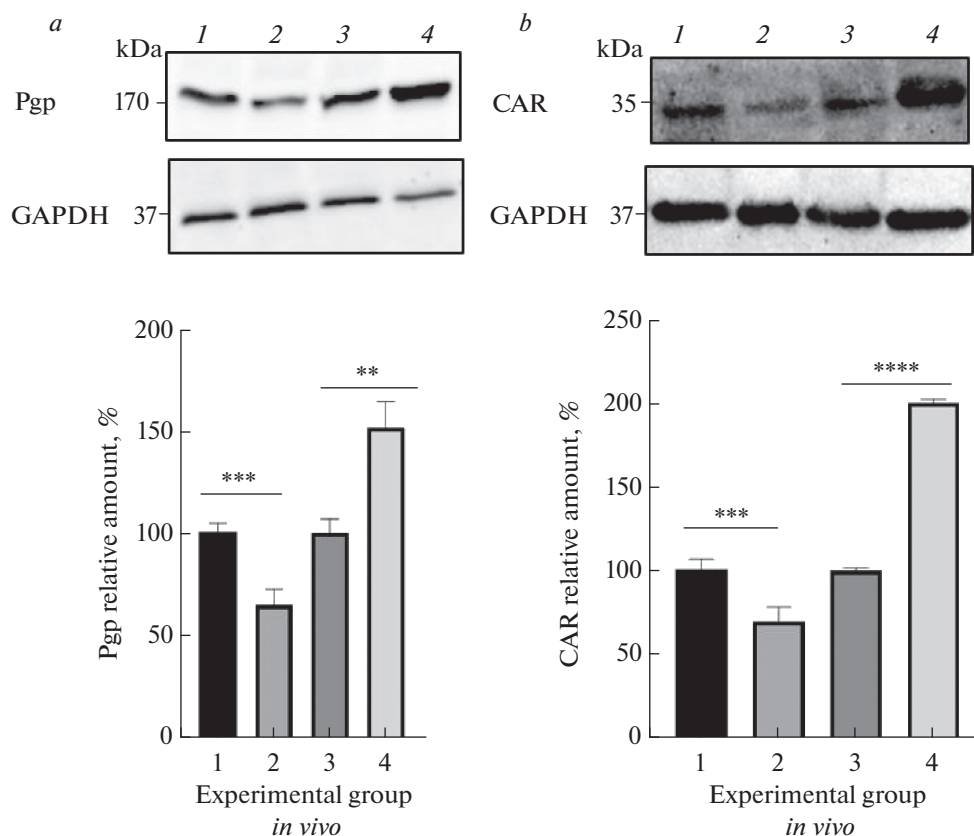


Рис. 4. Относительное количество гликопротеина-P (Pgp) (a), конститутивного андростанового рецептора (CAR) (b) в тощей кишке кроликов-самцов при внутримышечном введении физиологического раствора (1), при внутримышечном введении тестостерона ундеcanoата в дозе 24 мг/кг массы (2), при проведении “ложной” операции (3), при орхиэктомии (4) на 21-е сутки ($M \pm SD$, $n = 5$). ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$; **** $p < 0.0001$ по сравнению с соответствующим контролем (критерий Фишера).

личество AR, PXR и CAR. PXR и CAR являются членами суперсемейства ядерных рецепторов. Показано, что они стимулируют экспрессию генов, которые кодируют белки, участвующие в метаболизме и элиминации ксенобиотиков, таких как цитохромы P450, глюкуронозилтрансферазы, сульфотрансферазы и белки множественной лекарственной устойчивости [24, 25]. В опытах *in vitro* уровень CAR и PXR при воздействии тестостерона достоверно не изменялся, а AR практически не детектировался. Известно, что индукторы/ингибиторы CAR и PXR могут влиять на данные транскрипционные факторы без изменения их количества [26, 27]. То есть тестостерон теоретически может влиять на Pgp через ингибирование CAR и PXR. Для проверки данной гипотезы на клетках линии Caco-2 были выполнены эксперименты с использованием прямых ингибиторов CAR и PXR. В ходе исследования было выявлено, что ингибитор CAR – CINPA в концентрации 10 мкМ снижал количество Pgp, при этом комбинация CINPA и тестостерона также вызывала снижение уровня белка-транспортёра, причем на том же уровне, что и изолированное применение ингибитора CAR. Ингибирование PXR не оказывало достоверного

влияния на уровень Pgr, это свидетельствует о том, что указанный рецептор не играет существенной роли в реализации влияния тестостерона на количество белка-транспортера.

В экспериментах *in vivo* снижение уровня тестостерона в сыворотке крови, вызванное орхиэктомией, сопровождалось повышением количества Pgr и CAR в тощей кишке. И наоборот, повышение концентрации тестостерона в сыворотке крови, вызванное внутримышечным введением тестостерона ундеcanoата в дозе 24 мг/кг вызывало снижение количества белка-транспортера и CAR.

Как и в культуре клеток Caco-2, в тощей кишке кроликов AR практически не детектировался, а концентрация PXR достоверно не изменялась в ходе эксперимента. Полученные данные *in vitro* и *in vivo* в совокупности свидетельствуют о том, что тестостерон оказывает влияние на уровень Pgr в энтероцитах, скорее всего, через CAR. Полученные результаты косвенно подтверждаются данными литературы. Так, на культурах клеток g2ca9-3 и HepG2 показано, что андростанол, андростенол, тестостерон и андростендион (1–10 мкМ) подавляли активность CAR [28, 29]. В исследованиях на мышах выявлено, что орхиэктомия приводила к повышению синтеза CAR [29]. В то же время в исследовании на клетках линии hCMEC/D3 установлено, что ингибирование не только CAR, но и PXR уменьшало экспрессию Pgr [30].

Отсутствие значения PXR в регуляции Pgr, выявленное в нашем исследовании, может быть связано с разными линиями клеток, использованными в экспериментах. Механизм влияния андрогенов на CAR окончательно не установлен. Предполагается, что андростанол и андростенол ингибируют CAR, способствуя высвобождению коактиватора из лиганд-связывающего домена рецептора [28]. Ограничением исследования является то, что роль CAR в регуляции Pgr *in vivo* была доказана лишь косвенно, по анализу уровня орфанного рецептора при изменении уровня тестостерона. Для подтверждения полученных данных требуются дальнейшие исследования, в частности эксперименты на животных с нокаутом CAR.

Таким образом, *in vitro* на клетках линии Caco-2 и *in vivo* на кроликах показано, что тестостерон снижает количество белка-транспортера Pgr, ингибируя конститутивный андростановый рецептор. Полученные результаты можно рассматривать как способ преодоления множественной лекарственной устойчивости опухолевых клеток, обусловленной гиперэкспрессией данного белка-транспортера, а конститутивный андростановый рецептор – как возможную фармакологическую мишень для реализации этой цели.

ИСТОЧНИК ФИНАНСИРОВАНИЯ

Исследование выполнено при поддержке грантов РФФИ № 18-415-623001 и № 16-04-00320.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы декларируют отсутствие явных и потенциальных конфликтов интересов, связанных с публикацией настоящей статьи.

ВКЛАД АВТОРОВ

Идея работы и планирование эксперимента (А.В.Щ. и Е.Н.Я.), сбор данных (Ю.В.А., Н.М.П.), обработка данных (А.А.С.), написание и редактирование манускрипта (А.В.Щ., Е.Н.Я.).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Mollazadeh S, Sahebkar A, Hadizadeh F, Behravan J, Arabzadeh S (2018) Structural and functional aspects of P-glycoprotein and its inhibitors. *Life Sci* 214: 118–123. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2018.10.048>
2. Chin KV, Liu B (1994) Regulation of the multidrug resistance (MDR1) gene expression (Review). *In Vivo* 8(5): 835–841.
3. Gessner A, König J, Fromm MF (2019) Clinical Aspects of Transporter-Mediated Drug-Drug Interactions. *Clin Pharmacol Ther* 105(6): 1386–1394. <https://doi.org/10.1002/cpt.1360>
4. Zhang J, Zhang M, Zhang J, Wang R (2020) Enhanced P-glycoprotein expression under high-altitude hypoxia contributes to increased phenytoin levels and reduced clearance in rats. *Eur J Pharm Sci* 1(153): 105490. <https://doi.org/10.1016/j.ejps.2020.105490>
5. Shchulkin AV, Abalenikhina YV, Erokhina PD, Chernykh IV, Yakusheva EN (2021) The Role of P-Glycoprotein in Decreasing Cell Membranes Permeability during Oxidative Stress. *Biochemistry (Mosc)* 86(2): 197–206. <https://doi.org/10.1134/S0006297921020085>
6. Шулькин АВ, Якушева ЕН, Попова НМ (2013) Роль гликопротеина-Р в рациональной фармакотерапии в кардиологии. *Рационал фармакотер в кардиол* 9(6): 701–707. [Shchulkin AV, Yakusheva EN, Popova NM (2013) The role of glycoprotein-P in rational pharmacotherapy in cardiology. *Rational Pharmacother Cardiol* 9(6): 701–707. (In Russ)]. <https://doi.org/10.20996/1819-6446-2013-9-6-701-707>
7. Ерохина ПД, Абаленихина ЮВ, Шулькин АВ, Черных ИВ, Попова НМ, Слепнев АА, Якушева ЕН (2020) Изучение влияния прогестерона на активность гликопротеина-Р *in vitro*. *Рос мед-биол вестн им акад ИП Павлова* 28 (2): 135–142 [Erokhina PD, Abalenikhina YuV, Shchulkin AV, Chernykh IV, Popova NM, Slepnev AA, Yakusheva EN (2020) A study of influence of progesterone on activity of glycoprotein-P *in vitro*. *IPPavlov Rus Med Biol Herald* 28(2): 135–142. (In Russ)]. <https://doi.org/10.23888/PAVLOVJ2020282135-142>
8. Zhang H, Xu H, Ashby ChR, Assaraf YG, Chen Zh, Liu H (2021) Chemical molecular-based approach to overcome multidrug resistance in cancer by targeting P-glycoprotein (P-gp). *Med Res Rev* 41 (1): 525–555. <https://doi.org/10.1002/med.21739>
9. Dey S, Gunda S, Mitra AK (2004) Pharmacokinetics of erythromycin in rabbit corneas after single-dose infusion: role of P-glycoprotein as a barrier to *in vivo* ocular drug absorption. *J Pharmacol Exp Therap* 311 (1): 246–255. <https://doi.org/10.1124/jpet.104.069583>
10. Van Kalken CK, Broxterman HJ, Pinedo HM, Feller N, Dekker H, Lankelma J, Giaccone G (1993) Cortisol is transported by the multidrug resistance gene product P-glycoprotein. *Br J Cancer* 67(2): 284–289. <https://doi.org/10.1038/bjc.1993.54>
11. Yang CP, DePinho SG, Greenberger LM, Arceci RJ, Horwitz SB (1989) Progesterone interacts with P-glycoprotein in multidrug-resistant cells and in the endometrium of gravid uterus *J Biol Chem* 264: 782–788.
12. Nakayama A, Eguchi O, Hatakeyama M, Saitoh H, Takada M (1999) Different absorption behaviors among steroid hormones due to possible interaction with P-glycoprotein in the rat small intestine. *Biol Pharm Bull* 22: 535–538. <https://doi.org/10.1248/bpb.22.535>
13. Suzuki T, Zhao YL, Nadai M, Naruhashi K, Shimizu A, Takagi K, Takagi K, Hasegawa T (2006) Gender-related differences in expression and function of hepatic P-glycoprotein and multidrug resistance-associated protein (Mrp2) in rats. *Life Sci* 79(5): 455–461. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2006.01.024>
14. Shchulkin AV, Yakusheva EN, Chernykh IV, Nikiforov AA (2017) The role of testosterone in the regulation of P-glycoprotein functioning. *Biol Bull* 44: 524–530. <https://doi.org/10.1134/S1062359017050168>
15. Shchulkin AV, Yakusheva EN, Chernykh IV, Nikiforov AA, Popova NM (2017) Effects of testosterone on the functional activity of P-glycoprotein. *Pharm Chem J* 51(9): 743–747. <https://doi.org/10.1007/s11094-017-1685-1>
16. Hilgers AR, Conradi RA, Burton PS (1990) Caco-2 cell monolayers as a model for drug transport across the intestinal mucosa. *Pharmac Res* 7 (9): 902–910. <https://doi.org/10.1023/a:1015937605100>
17. Fuchs I, Hafner-Blumenstiel V, Markert C, Burhenne J, Weiss J, Haefeli WE, 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. <https://doi.org/10.1007/s00228-012-1388-1>

18. *Cherian MT, 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. <https://doi.org/10.1124/mol.115.097782>
19. *Moore LB, Maglich JM, McKee DD, Wisely B, Willson TM, Kliewer SA, Lambert MH, Moore JT* (2002) Pregnane X receptor (PXR), constitutive androstane receptor (CAR), and benzoate X receptor (BXR) define three pharmacologically distinct classes of nuclear receptors. *Mol Endocrinol* 16 (5): 977–986. <https://doi.org/10.1210/mend.16.5.0828>
20. *Гацанова МВ, Черных ИВ, Шулькин АВ, Якушева ЕН, Попова НМ* (2016). Можно ли оценивать принадлежность лекарственных веществ к субстратам гликопротеина-Р на самках кроликов породы шиншилла. *Наука молодых (Eruditio Juvenium)* 3: 5–10. [*Gaczanoga MV, Chernykh IV, Shul'kin AV, Yakusheva EN, Popova NM* (2016). Is it possible to assess the affiliation of medicinal substances to glycoprotein-P substrates on female chinchilla rabbits? *Nauka molodykh (Eruditio Juvenium)* 3: 5–10. (In Russ)].
21. *Zhao C, Moon DG, Park JK* (2013) Effect of testosterone undecanoate on hematological profiles, blood lipid and viscosity and plasma testosterone level in castrated rabbits. *Can Urol Assoc J* 7(3–4): 221–225. <https://doi.org/10.5489/cuaj.507>
22. *Разина АВ, Фролова АИ, Сергеев МА* (2010) Оптимизация общей анестезии на кроликах. Актуальн вопр ветерин и биол 1: 32–35. [*Razina AV, Frolova AI, Sergeev MA* (2010) Optimizaciya obshhej anestezii na krolikah. *Akt Vopr Veterinariii i Biol* 1: 32–35. (In Russ)].
23. *Якушева ЕН, Черных ИВ, Шулькин АВ, Попова НМ* (2014) Гликопротеин-Р: структура, физиологическая роль и молекулярные механизмы модуляции функциональной активности. *Успехи физиол наук* 45(4): 89–98. [*Yakusheva EN, Chernykh IV, Shul'kin AV, Popova NM* (2014) Glikoprotein-P: struktura, fiziologicheskaya rol' i molekulyarny'e mexanizmy' modulyacii funkcional'noj aktivnosti. *Uspexi fiziol nauk* 45(4): 89–98. (In Russ)]
24. *Buchtan CD, Chai SC, Chen TA* (2018) Current structural perspective on PXR and CAR in drug metabolism. *Exp Opin Drug Metab Toxicol* 14(6): 635–647. <https://doi.org/10.1080/17425255.2018.1476488>
25. *Burk O, Kuzikov M, Kronenberger T, Jeske J, Keminer O, Thasler WE, Schwab M, Wrenger C, Windshugel B* (2018) Identification of approved drugs as potent inhibitors of pregnane X receptor activation with differential receptor interaction profiles. *Arch Toxicol* 92(4): 1435–1451. <https://doi.org/10.1007/s00204-018-2165-4>
26. *Rigalli JP, Ruiz ML, Perdomo VG, Villanueva SS, Mottino AD, Catania VA* (2011) Pregnane X receptor mediates the induction of P-glycoprotein by spironolactone in HepG2 cells. *Toxicology* 285(1–2): 18–24. <https://doi.org/10.1016/j.tox.2011.03.015>
27. *Slosky LM, Thompson BJ, Sanchez-Covarrubias L, Zhang Y, Laracuenta ML, Vanderah TW, Ronaldson PT, Davis TP* (2013) Acetaminophen modulates P-glycoprotein functional expression at the blood-brain barrier by a constitutive androstane receptor-dependent mechanism. *Mol Pharmacol* 84(5): 774–786. <https://doi.org/10.1124/mol.113.086298>
28. *Forman BM, Tzameli I, Choi HS, Chen J, Simha D, Seol W, Evans RM, Moore DD* (1998) Androstane metabolites bind to and deactivate the nuclear receptor CAR-beta. *Nature* 395: 612–615. <https://doi.org/10.1038/26996>
29. *Kawamoto T, Kakizaki S, Yoshinari K, Negishi M* (2000) Estrogen activation of the nuclear orphan receptor CAR (constitutive active receptor) in induction of the mouse Cyp2b10 gene. *Mol Endocrinol* 14(11): 1897–1905. <https://doi.org/10.1210/mend.14.11.0547>
30. *Chan GNY, Hoque T, Cummins CL, Bendayan R* (2011) Regulation of P-glycoprotein by orphan nuclear receptors in human brain microvessel endothelial cells. *J Neurochem* 118 (2): 163–175. <https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2011.07288.x>

The Mechanism of the Influence of Testosterone on the Transport Protein P-Glycoprotein

A. A. Slepnev^a, A. V. Shchulkin^a, Yu. V. Abalenikhina^{a, *}, N. M. Popova^a,
I. V. Chernykh^a, and E. N. Yakusheva^a

^aRyazan State Medical University, Ryazan, Russia

*e-mail: abalenikhina88@mail.ru

P-glycoprotein (Pgp) is an efflux membrane transport-protein that plays an important role in the protection of tumor cells from cytostatics and the drugs pharmacokinetics. Some studies have shown that testosterone can reduce the activity and expression of Pgp,

but the mechanisms of these changes remain unexplored. The aim of this study was to evaluate the role of androgenic, pregnane X and constitutive androstane receptors in this process in experiments *in vitro* and *in vivo*. *In vitro* on Caco-2 cells testosterone (1 and 10 μM for 24 h) reduced the amount of Pgp (western blot method) compared to the control. The pregnane X receptor (PXR) inhibitor ketoconazole (1 and 10 μM , 24 h exposure) did not affect the amount of Pgp, while the constitutive androstane receptor (CAR) inhibitor CINPA at a concentration of 10 μM reduced the Pgp content. The combination of CINPA 10 μM and testosterone 10 μM also reduced the Pgp content, however, the amount of the transporter did not differ significantly from the values of the groups of isolated testosterone and CINPA. *In vivo* on male Chinchilla rabbits it was shown that single intramuscular injection of testosterone undecanoate at a dose of 24 mg/kg of body weight increased the level of testosterone in the blood serum on the 21-st day of the study compared to the control, and after orchietomy, its content decreased on the 21st day. The relative amount of Pgp and CAR in the jejunum of rabbits decreased with the introduction of testosterone, and increased with orchietomy. The amount of PXR and testosterone receptor in the jejunum of rabbits did not change significantly. Thus, *in vitro* and *in vivo* experiments have shown that testosterone reduces the amount of the Pgp transport protein by inhibiting the constitutive androstane receptor.

Keywords: P-glycoprotein, testosterone, Caco-2 cells, pregnan X receptor, constitutive androstane receptor, androgen receptor, western blot