



# Фармакоинформационные, фундаментальные и клинические исследования 7-гидроксиматаирезинола в контексте поиска эффективных и безопасных терапевтических подходов к лечению мастопатии

© Рубашкина А. Н.<sup>1</sup>, Торшин И. Ю.<sup>2</sup>, Громова О. А.<sup>2</sup>

<sup>1</sup> — ФГБОУ ВО «Ивановский государственный медицинский университет» Минздрава России, Иваново, Российская Федерация

<sup>2</sup> — ФГУ «Федеральный исследовательский центр «Информатика и управление» РАН» (ФИЦ ИУ РАН), Москва, Российская Федерация

## Аннотация

7-гидроксиматаирезинол (7(OH)MP) — основной лигнан экстрактов ели, характеризующийся онкопротективными и противовоспалительными свойствами. Результаты хемореактного моделирования позволили сформулировать молекулярные механизмы осуществления фармакологических эффектов 7(OH)MP для противовоспалительных (ингибирование 5-липоксигеназы, матричной металлопротеиназы MMP2, митоген-активируемой киназы p38-альфа, рецептора лейкотриена b4, рецептора простаглицлина), онкопротективных (антиоксидантный эффект за счёт ингибирования гемоксигеназы-2, ингибирование циклин-зависимых киназ 3 и 4, фактора роста эпидермиса, белка mTOR). Оценка транскриптомных эффектов 7(OH)MP в клетках рака молочной железы показала достоверные дозозависимые эффекты на транскрипцию 3468 из 12700 генов. Молекула 7(OH)MP, снижая экспрессию пролиферативных генов (401 ген) и хроническое воспаление (148 генов), параллельно повышая транскрипцию генов онкопротективного иммунитета (100 генов), тормозит пролиферацию опухолевых клеток. Эксперименты на солидной карциноме Эрлиха показали достоверный онкопротективный эффект 7(OH)MP в дозах 60, 120 мг/сут, даже на фоне приёма эстрогенов ( $p = 0,007$ ). Клиническое исследование показало, что 7(OH)MP (60 мг/сут, 1 мес.) способствует нормализации метаболизма эстрогенов (МЭ) и улучшению клинической симптоматики мастопатии.

**Ключевые слова:** мастопатия; лигнаны; патогенетическая терапия; фармакоинформатика; протеом человека; транскриптомика

## Для цитирования:

Рубашкина А. Н., Торшин И. Ю., Громова О. А. Фармакоинформационные, фундаментальные и клинические исследования 7-гидроксиматаирезинола в контексте поиска эффективных и безопасных терапевтических подходов к лечению мастопатии. *Фармакокинетика и фармакодинамика*. 2024;(1):66–76. <https://doi.org/10.37489/2587-7836-2024-1-66-76>. EDN: AQCTAJ

**Поступила:** 20.02.2024. **В доработанном виде:** 01.03.2024. **Принята к печати:** 23.03.2024. **Опубликована:** 31.03.2024.

## Pharmacoinformational, basic and clinical studies of 7-hydroxymatairesinol in the context of searching for effective and safe therapeutic approaches to the treatment of mastopathy

© Anna N. Rubashkina<sup>1</sup>, Ivan Yu. Torshin<sup>2</sup>, Olga A. Gromova<sup>2</sup>

<sup>1</sup> — FSBEI HE «Ivanovo State Medical University» of MOH of Russia, Ivanovo, Russian Federation

<sup>2</sup> — FRC "Computer Science and Control" RAS, Moscow, Russian Federation

## Abstract

7-hydroxymatairesinol (7(OH)MR) is the main lignan of spruce extracts, characterized by oncoprotective and anti-inflammatory properties. The results of chemoreactome modeling made it possible to formulate the molecular mechanisms of the pharmacological effects of 7(OH)MR for anti-inflammatory (inhibition of 5-lipoxygenase, matrix metalloproteinase MMP2, mitogen-activated kinase p38-alpha, leukotriene b4 receptor, prostacyclin receptor), oncoprotective (antioxidant effect due to inhibition heme oxygenase-2, inhibition of cyclin-dependent kinases 3 and 4, epidermal growth factor, mTOR protein). An assessment of the transcriptomic effects of 7(OH)MR in breast cancer cells showed significant dose-dependent effects on the transcription of 3468 of 12700 genes. The 7(OH)MR molecule, reducing the expression of proliferative genes (401 genes) and chronic inflammation (148 genes), while simultaneously increasing the transcription of oncoprotective immunity genes (100 genes), inhibits the proliferation of tumor cells. Experiments on solid Ehrlich carcinoma showed a significant oncoprotective effect of 7(OH)MR at doses of 60, 120 mg/day, even while taking estrogen ( $p = 0.007$ ). A clinical study showed that 7(OH)MR (60 mg/day, 1 month) helps normalize estrogen metabolism and improve the clinical symptoms of mastopathy.

**Keywords:** mastopathy; lignans; pathogenetic therapy; pharmacoinformatics; human proteome; transcriptomics

## For citations:

Rubashkina AN, Torshin IYu, Gromova OA. Pharmacoinformational, basic and clinical studies of 7-hydroxymatairesinol in the context of searching for effective and safe therapeutic approaches to the treatment of mastopathy. *Farmakokinetika i farmakodinamika = Pharmacokinetics and pharmacodynamics*. 2024;(1):66–76. (In Russ). <https://doi.org/10.37489/2587-7836-2024-1-66-76>. EDN: AQCTAJ

**Received:** 20.02.2024. **Revision received:** 01.03.2024. **Accepted:** 23.03.2024. **Published:** 31.03.2024.

## Введение / Introduction

7-гидроксиматаирезинол (7(OH)MP) и другие лигнаны растений (матаирезинол, ларициресинол, медиресинол, пинорезинол, сезаминол) проявляют антиоксидантные, противовоспалительные, противомикробные и онкопротективные свойства [1, 2]. Под воздействием кишечной флоры 7-гидроксиматаирезинол трансформируется в энтеролактон, способствующий снижению частоты сосудистых пароксизмов в перименопаузальном периоде [3].

Высокая безопасность применения 7(OH)MP является его важной особенностью. В исследованиях хронической токсичности 7(OH)MP был, по существу, нетоксичным при назначении крысам (2000 мг/кг/сут, 28 сут) и собакам (665 мг/кг/сут, 28 сут), несмотря на то, что 7(OH)MP хорошо всасывается (>50 % дозы) и быстро элиминируется. 7(OH)MP не влияет на репродуктивную функцию и не вызывает тератогенеза [4–6]. Дозы 7(OH)MP до 72 мг/сут в течение 8 недель были безопасными и хорошо переносились пациентками [3].

Результаты исследований (экспериментальных и клинических) указали на перспективность 7(OH)MP как противовоспалительного и онкопротективного средства. Однако молекулярные механизмы осуществления этих и других возможных фармакологических эффектов 7(OH)MP не вполне изучены.

В настоящей работе представлены результаты фармакоинформационных исследований 7-гидроксиматаирезинола: хемореактомного моделирования воздействия 7(OH)MP на протеом в сравнении с контрольными молекулами (молекулами сравнения — 17-эстрадиол, фитоэстроген, бетаситостирол, эпигаллокатехин-3-галлат) и хемотранскриптомного исследования (оценка воздействия на экспрессию генов). Результаты исследований *in silico* подтверждены экспериментальными и клиническими исследованиями.

## Материалы и методы / Materials and methods

Настоящее исследование включило изучение 7(OH)MP *in silico* (хемореактомный и хемотранскриптомный анализ), *in vivo* (изучение модели карциномы Эрлиха) и *in clinico* (сбор и анализ данных пациенток с мастопатией).

### Хемореактомный анализ / Chemoreactomic analysis

Анализ 7(OH)MP проведён на основе хемоинформационного подхода (сопоставление химической структуры молекулы-запроса с неизвестными фармакологическими свойствами со структурами молекул в базе данных, для которых свойства были изучены). Хемореактомный анализ основан на новейших технологиях машинного обучения (МО): комбинаторной

теории разрешимости и топологической теории распознавания [7–10]. Объектами исследования являются *хемографы* — особая разновидность графа (математического объекта, совокупности множества вершин и множества рёбер) [11]. На основании фундаментальных теоретических результатов (теорема о полноте инварианта и критериях разрешимости/регулярности и комбинаторное тестирование локальной полноты) определяется метрическое расстояние  $d_x(X_1, X_2)$  между хемографами  $X_1, X_2$ , которое используется для решения задачи поиска молекул, структурно схожих с 7(OH)MP. На основании списка схожих молекул осуществляется прогноз фармакологической активности.

### Хемотранскриптомный анализ / Chemotranscriptome analysis

Нами был выполнен хемотранскриптомный анализ. Результаты транскриптомных экспериментов в базе данных GEO (Gene Expression Omnibus, <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/>) представлены в виде таблиц, столбцам которой соответствуют гены, а строкам соответствующие воздействия на клетку (например, те или иные молекулы). При задании (1) типа клеток (например, фибробласты), (2) концентрации и (3) времени воздействия каждый столбец такой таблицы соответствует химической реакции «Ген<sub>*i*</sub> → мРНК<sub>*i*</sub>», в результате которой осуществляется синтез *i*-й молекулы мРНК<sub>*i*</sub>, соответствующей *i*-му гену (Ген<sub>*i*</sub>). Расстояние  $d_x$  является настраиваемой метрикой, т. к. содержит произвольно настраиваемые параметры — массы  $\omega_k$ . По этим данным настраиваются расстояния  $d_x(X_1, X_2)$  между хемографами, на основании которых затем и оцениваются изменения экспрессии каждого *i*-го гена. Более детальное описание методологии хемотранскриптомного анализа представлено в работе [12]. Списки генов с достоверным повышением или снижением экспрессии генов, которые были получены в результате применения хемотранскриптомного подхода, анализировались посредством метода функционального связывания [13, 14].

### Экспериментальные исследования 7(OH)MP на модели карциномы Эрлиха / Experimental studies 7(OH)MP on the Ehrlich carcinoma model

Детальное описание методологии приведено в работе [15]. Исследования проведены в 5 группах неродственно скрещиваемых мышей ( $n = 15$  в каждой группе) со свободным доступом к воде и корму. Трансплантацию солидной карциномы Эрлиха (СКЭ) проводили подкожным введением  $2,5 \cdot 10^6$  опухолевых клеток в 0,1 мл суспензии в область латеральной поверхности правого бедра. Группа 1: с 7 по 21-е сутки роста СКЭ ежедневно однократно внутривенно (в/ж) вводили 60 мг/кг 7(OH)MP. Группа 2: с 7 по 21-е сутки роста СКЭ ежедневно однократно в/ж вводили 7(OH)MP в дозе 120 мг/кг. Группа 3: на 5-е и 6-е сутки роста СКЭ вводили эстрадиол (0,51 мг/кг

Прогинова с добавлением TWIN 80, однократно в/ж), с 7 по 21-е сутки эстрадиол (0,51 мг/кг) и через 30 минут 120 мг/кг 7(OH)MP. Группа 4: с 7 по 21-е сутки однократно вводили эстрадиол (0,51 мг/кг). Группа 5: контроль, только модель СКЭ. Опухоли измеряли калипером, объём рассчитывали стандартно по формуле  $V = (L \times W^2) \times (\pi/6)$ . Строили кривые выживаемости Каплана–Мейера; оценки значимости проводили критерием Колмогорова–Смирнова, кривых выживаемости — по F-критерию Кокса. Расчёты выполнены с помощью программного пакета Statistica 7.0 (StatSoft Inc., США) и электронных таблиц Microsoft Excel.

**Клиническое исследование эффектов 7(OH)MP у пациенток с мастопатией / Clinical study of the effects of 7(OH)MP in patients with mastopathy**

В исследование включены пациентки с фиброзно-кистозной мастопатией (ФКМ,  $n = 60, 53 \pm 0,8$  лет) и контрольная группа участниц без патологии молочной железы ( $n = 30, 57 \pm 0,5$  лет). У каждой из участниц измерены метаболиты эстрогенов (16а-гидроксиэстроген-1, 2-гидроксиэстроген-2, 2-гидроксиэстроген-1, 2-оксометилэстроген-1, 4-оксометилэстроген-2, 4-гидроксиэстроген-1, соотношение 2-гидроксиэстроген-1/16а-гидроксиэстроген-1, 2-гидроксиэстроген-1/2-оксометилэстроген-1 и 4-оксометилэстроген-1/4-оксометилэстроген-1) в суточной моче с использованием иммуноферментного анализа. Пациентки получали 7(OH)MP (60 мг/сут, 1 мес.) в составе комплексной терапии. Сравнение прогнозируемых и наблюдаемых частот встречаемости исследуемых признаков проводилось с помощью критерия  $\chi$ -квадрат, Т-критерия Вилкоксона–Манна–Уитни и теста Стьюдента. Использовалась прикладная программа STATISTICA 10.0 и электронные таблицы Microsoft Excel. Используются новые математические подходы для установления интервалов информативных значений численных параметров, нахождение метрических сгущений в пространстве параметров биомедицинского исследования [16] и построения метрических карт [17].

**Результаты / Results**

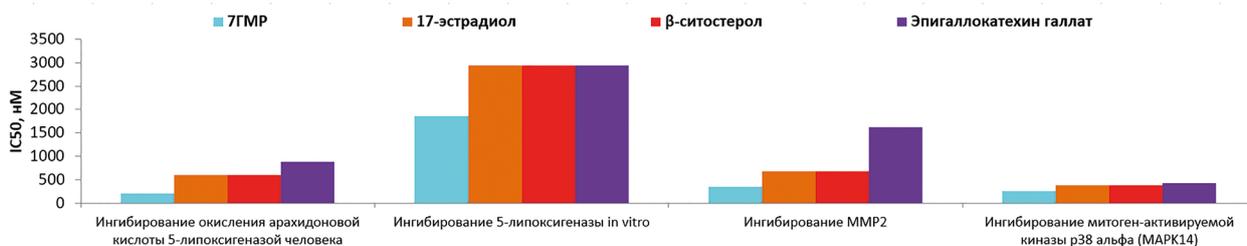
Фармакоинформационные исследования включили хемореактомное моделирование эффектов действия 7(OH)MP на протеом и хемотранскриптомный анализ молекулы. Результаты подтверждены экспериментальными и клиническими исследованиями.

**Хемореактомный анализ 7(OH)MP / Chemoreactomic analysis of 7(OH)MP**

Хемореактомный анализ молекулы 7-гидроксииматирезинола был проведён нами ранее. Хемореактомные оценки свойств молекулы 7(OH)MP сравнили с оценками для 17-эстрадиола, фитоэстрогена, бетаситостирола и эпигаллокатехин-3-галлата позволили сформулировать молекулярные механизмы противовоспалительных (ингибирование 5-липоксигеназы, матричной металлопротеиназы MMP2, митоген-активируемой киназы p38-альфа, рецептора лейкотриена b4, рецептора простаглицина), онкопротективных (антиоксидантный эффект за счёт ингибирования гемоксигеназы-2, ингибирование циклин-зависимых киназ 3 и 4, фактора роста эпидермиса, белка mTOR), вазодилаторных (ингибирование адренорецепторов и ренина), а также антибактериальных и противовирусных свойств молекулы 7(OH)MP. Рассмотрим противовоспалительные и онкопротективные эффекты [11].

**Хемореактомное моделирование: противовоспалительные свойства 7(OH)MP / Chemoreactomic modeling: anti-inflammatory properties of 7(OH)MP**

Результаты хемореактомного моделирования (ХМ) указали на *противовоспалительные эффекты 7(OH)MP*, обусловленные ингибированием окисления арахидоновой кислоты 5-липоксигеназой, матричной MMP2 и MAPK14 (рис. 1). Значение константы ингибирования 5-липоксигеназы было в несколько раз ниже для 7(OH)MP ( $IC_{50} = 213 \pm 169$  нМ), чем для молекул сравнения ( $IC_{50} = 608...887$  нМ). Ингибирование синтеза провоспалительных простагландинов в каскаде арахидоновой кислоты неизбежно сопровождается снижением отёка в каррагинановой модели (7(OH)MP — на 56 %, контроль: 6,4...37 %)



**Рис. 1.** Результаты хемореактомного моделирования противовоспалительных эффектов 7(OH)MP молекул сравнения

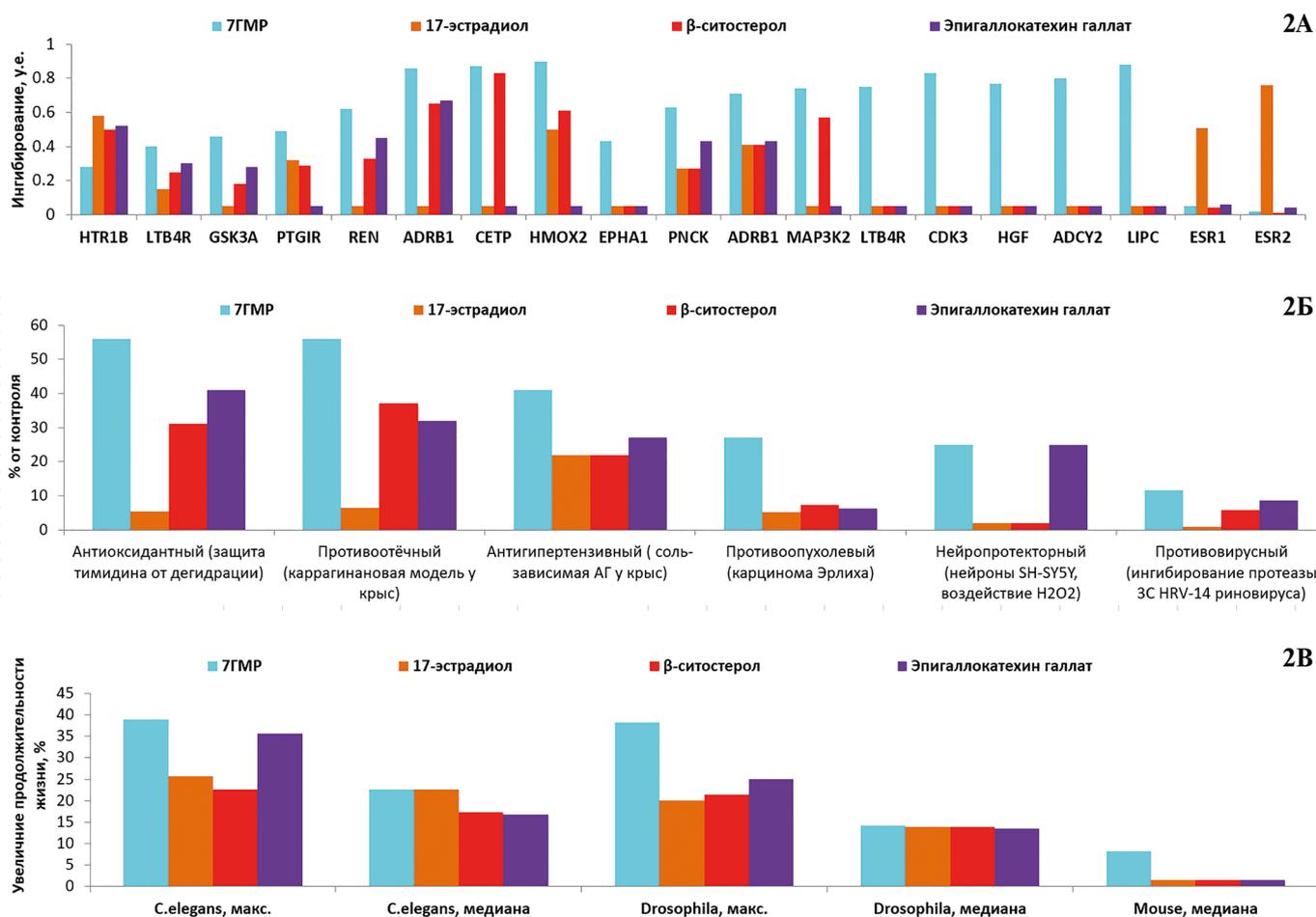
**Fig. 1.** Results of chemoreactomic modeling of anti-inflammatory effects 7(OH)MP of comparison molecules

Для 7(OH)MP характерно ингибирование киназы MAPK14 ( $IC_{50} = 261 \pm 292$  нМ, контрольные молекулы — 376...425 нМ). Известно, что MAP-киназы 11, 12, 13 и 14 участвуют в передаче сигнала от провоспалительных цитокинов, так что ингибиторы этих киназ — противовоспалительные средства [11].

Фармакопротеомное моделирование (т. е. хемореактомные оценки взаимодействий молекул с белками протеома) показало, что 7(OH)MP может связываться с рецептором лейкотриена b4 (LTB4R, противовоспалительное действие), рецептором простаглицина (PTGIR, противовоспалительное и вазодилаторное

действие), прооксидантным ферментом гемоксигеназой-2. Высокие значения вероятности ингибирования были получены для циклин-зависимой киназы CDK3 (онкопротективное действие) и киназы MAP3K2 (онкопротективное действие, рис. 2А) [11]. На рис. 2Б приведены примеры сравнительных оценок различных фармакологических активностей 7(OH)MP, связанных с ингибированием перечисленных выше белков.

Противовоспалительные эффекты 7(OH)MP могут способствовать увеличению продолжительности жизни модельных животных. На рис. 2В приведены хемореактомные оценки эффектов воздействия молекул



**Рис. 2.** Фармакопротеомное моделирование 7(OH)MP (оценки вероятности связывания различных белков протеома. А) Приведены оценки вероятностей связывания отдельных белков. Б) Примеры оценок фармакологических эффектов 7(OH)MP и других молекул. Указаны значения эффекта в процентах от контрольного эксперимента. В) Воздействие на продолжительность жизни

**Fig. 2.** Pharmacoproteomic modeling 7(OH)MP (estimates of the probability of binding of various proteins of the proteome. А) Estimates of the probabilities of binding of individual proteins are given. Б) Examples of assessments of pharmacological effects 7(OH)MP and other molecules. The effect values are indicated as a percentage of the control experiment. В) Impact on life expectancy

Обозначения: HTR1B, 5-гидрокситриптаминный рецептор-1b; LTB4R, Рецептор лейкотриена b4; GSK3A, Гликогенсинтетаза киназа-3 альфа; PTGIR, Рецептор простаглицина; REN, Ренин; ADRB1, Бета-1 адренергический рецептор; CETP, Белок-транспортёр холестерина эфиров; HMOX2, Гемоксигеназа-2; EPHA1, Эфринный рецептор-1; PNCK, Са-кальмодулин протеинкиназа 1b; ADRB1, Бета-1 адренергический рецептор; MAP3K2, Митоген-активированная протеинкиназа 2; LTB4R, Рецептор лейкотриена b4; CDK3, Циклинзависимая киназа 3.  
Designations: HTR1B, 5-hydroxytryptamine receptor-1b; LTB4R, Leukotriene receptor b4; GSK3A, Glycogen Synthetase kinase-3 alpha; PTGIR, Prostacyclin receptor; REN, Renin; ADRB1, Beta-1 adrenergic receptor; CETP, Cholesterol ester transporter protein; HMOX2, Hemoxxygenase-2; EPHA1, Ephrine the receptor-1; PNCK, Ca-calmodulin protein kinase 1b; ADRB1, Beta-1 adrenergic receptor; MAP3K2, Mitogen-activated protein kinase 2; LTB4R, Leukotriene receptor b4; CDK3, Cyclin-dependent kinase 3.

на продолжительность жизни червей *C. Elegans*, мух дрозофил и мышей. Очевидно, что среди исследованных молекул именно 7(OH)MP (в меньшей степени, эпигаллокатехин галлат) способствовал увеличению максимальной продолжительности жизни у *C. Elegans* и дрозофил. Только 7(OH)MP способствовал существенному увеличению медианной продолжительности жизни у мышей (+8 %).

Таким образом, ХМ указало на противовоспалительную активность 7(OH)MP, осуществляемую по различным молекулярным механизмам. Экспериментальные исследования подтверждают этот результат. В моноцитах 7(OH)MP дозозависимо ингибировал синтез/секрецию ФНО $\alpha$ , а в гранулоцитах — снижал уровни активных форм кислорода и провоспалительного интерлейкина IL-8 [18]. 7(OH)MP приводил к снижению ФНО $\alpha$ -индуцированной адгезии моноцитов к эндотелиоцитам сосудов, снижению активации NF- $\kappa$ B [19]. 7(OH)MP дозозависимо тормозил ФНО $\alpha$ -индуцированное фосфорилирование внеклеточной сигнально-регулируемой киназы 1/2 ERK (MAPK) и Akt, что важно для торможения роста опухолевых клеток (ОК) [2], повышал экспрессию ферментов антиоксидантной защиты [20].

#### Хемореактомное моделирование: онкопротективные эффекты 7(OH)MP / Chemoreactomic modeling: oncoprotective effects of 7(OH)MP

ХМ подтвердило наличие у молекул 7(OH)MP прямых онкопротективных эффектов и позволило установить наиболее вероятные молекулярные механизмы осуществления этих эффектов (рис. 3). Моделирование показало более выраженный про-апоптотический эффект в ОК НСТ116 (колоректальный рак, EC<sub>50</sub> = 59 нМ, контроль: EC<sub>50</sub> = 972...1735), K562 (лейкемия миелоидная, увеличение апоптоза на 44 %, контроль: 13...36 %), антиангиогенную активность (7(OH)MP — 65 %, контроль: 5...6 %) и торможение роста опухолей у мышей с СКЭ (на 27±15 %, контроль: 5...7 %)[11].

Хемореактомный анализ (ХА) показал, что 7(OH)MP может ингибировать циклин-зависимую киназу CDK4 (Ki = 1427 нМ, остальные: >3000 нМ), рецептор фактора роста эпидермиса (EGFR, IC<sub>50</sub> = 244 нМ, остальные:

255...477 нМ), белка mTOR (IC<sub>50</sub> = 632 нМ, остальные: >2000 нМ)[11]. Ингибиторы CDK4 используются в терапии опухолей [21]. Ингибиторы EGFR используются в терапии рака лёгких и прямой кишки [22]. Ингибиторы mTOR — группа онкопротективных средств, также проявляющих антигиперинсулинемические, противовоспалительные и геропротекторные свойства [23]. Таким образом, ХА указывает на выраженные онкопротективные эффекты 7(OH)MP.

#### Хемотранскриптомный анализ и долговременные механизмы осуществления онкопротективных эффектов 7(OH)MP / Chemotranscriptome analysis and long-term mechanisms of oncoprotective effects 7(OH)MP

ХА указал на возможные онкопротективные эффекты 7(OH)MP, связанные с ингибированием белков протеома. Установление эффектов онкопротективных средств на транскриптом (т. е. совокупность мРНК всех генов, экспрессируемых в заданном типе клеток) — важная процедура постгеномной фармакологии, необходимая для комплексной оценки желательных и нежелательных эффектов лекарств. Важной особенностью действия молекул-кандидатов на транскриптом является долговременность формируемых таким образом эффектов.

В результате проведения хемотранскриптомного анализа 7(OH)MP влияние на экспрессию генов в клетках опухоли МЖ (линия MCF7) было найдено для 27 % изученных генов (3468/12700). Лигнан 7(OH)MP снижал экспрессию пролиферативных генов ( $n = 401$ ), синтез и деградацию белка ( $n = 266$ ), энергетический метаболизм опухолевых клеток ( $n = 91$ ) и хроническое воспаление ( $n = 148$ ), повышая экспрессию генов онкопротективного иммунитета ( $n = 100$ ). Примеры функциональных групп генов, транскрипция которых достоверно изменялась приведены на рис. 4.

Установленные изменения транскрипции важны для: (1) снижения интенсивности внутриклеточного гомеостаза белков (что косвенно снижает синтез АТФ), (2) прямого снижения обеспеченности опухолевых клеток АТФ (снижение транскрипции генов, функционирующих в митохондриях), (3) ингибирования генов, непосредственно вовлечённых в пролиферацию

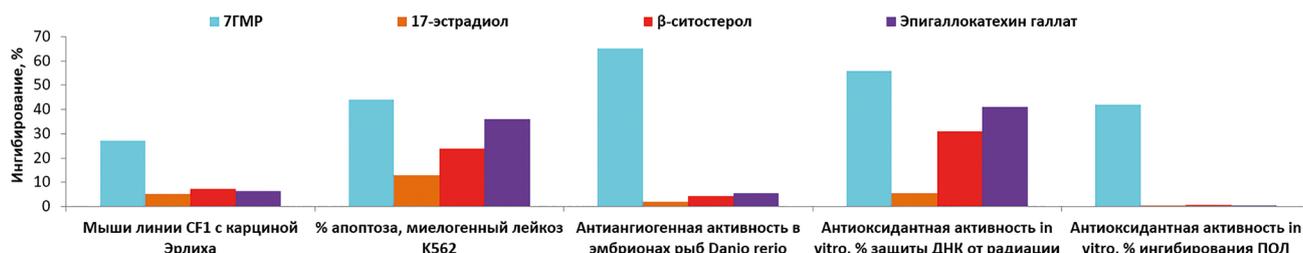
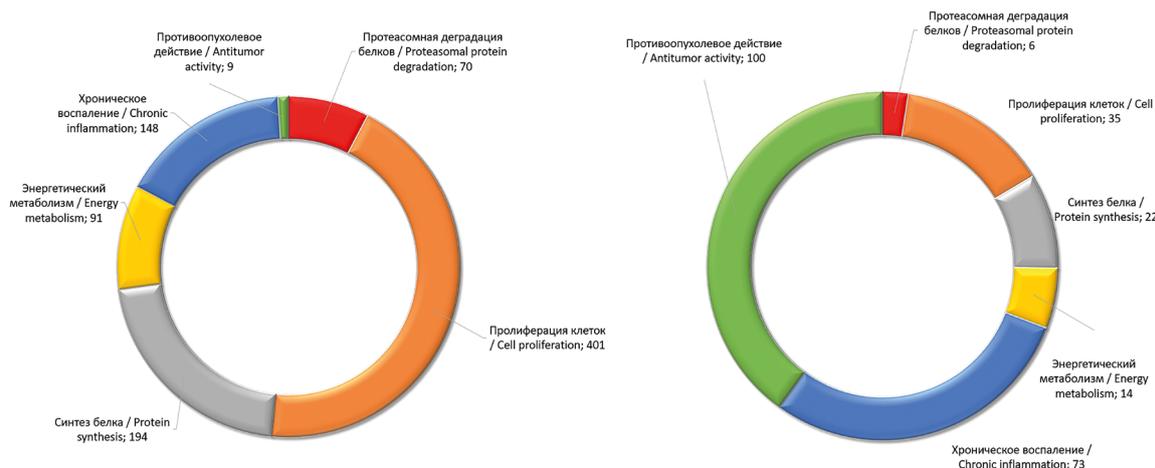


Рис. 3. Результаты хемореактомного моделирования онкопротективных эффектов 7(OH)MP

Fig. 3. Results of chemoreactomic modeling of oncoprotective effects of 7(OH)MP

Сокращение: ПОЛ — перекисное окисление липидов.

Abbreviation: ПОЛ — lipid peroxidation.



**Рис. 4.** Процентные соотношения встречаемости функциональных групп генов со сниженной (слева) и с повышенной (справа) транскрипцией при воздействии 7(ОН)МР на онкоклетки линии MCF7 (по результатам хемотранскриптомного анализа)

**Fig. 4.** Percentages of occurrence of functional groups of genes with reduced (left) and increased (right) transcription when exposed to 7 (OH)MR for MCF7 cancer cells (based on the results of chemotranscriptome analysis)

(поддержание теломер, ремонт и репликация ДНК, деление клеток), (4) ингибирования каскада NF-κB посредством предотвращения деградации белка IκB, ингибирующего NF-κB, (5) повышения транскрипции онкопротективных генов. К белкам, кодируемым онкопротективными генами, относятся, в частности, интерферон-гамма (стимулирует апоптоз опухолевых клеток), ферменты биосинтеза тиреоидных гормонов (ингибируют рост онкоклеток линии MCF7) [24], рецепторные системы онкопротективных витаминов А, D и С (стимулирует апоптоз опухолевых клеток MCF7 [25]) и др.

В эксперименте онкопротективный эффект 7(ОН)МР наблюдался в дозе 5 мг/кг/сут [26]. Показано, что 7(ОН)МР и его метаболит энтеролактон уменьшают рост и метастазирование опухолей печени [27], предстательной железы [28], матки [29] и аденоматозной полипозной кишечной неоплазии [30]. Приём 30 мг/кг/сут 7(ОН)МР ингибировал рост опухолей МЖ у крыс. 7(ОН)МР уменьшал образование полипов и предотвращал накопление бета-катенина в ядре (патологическая метка образования полипов) [2, 30].

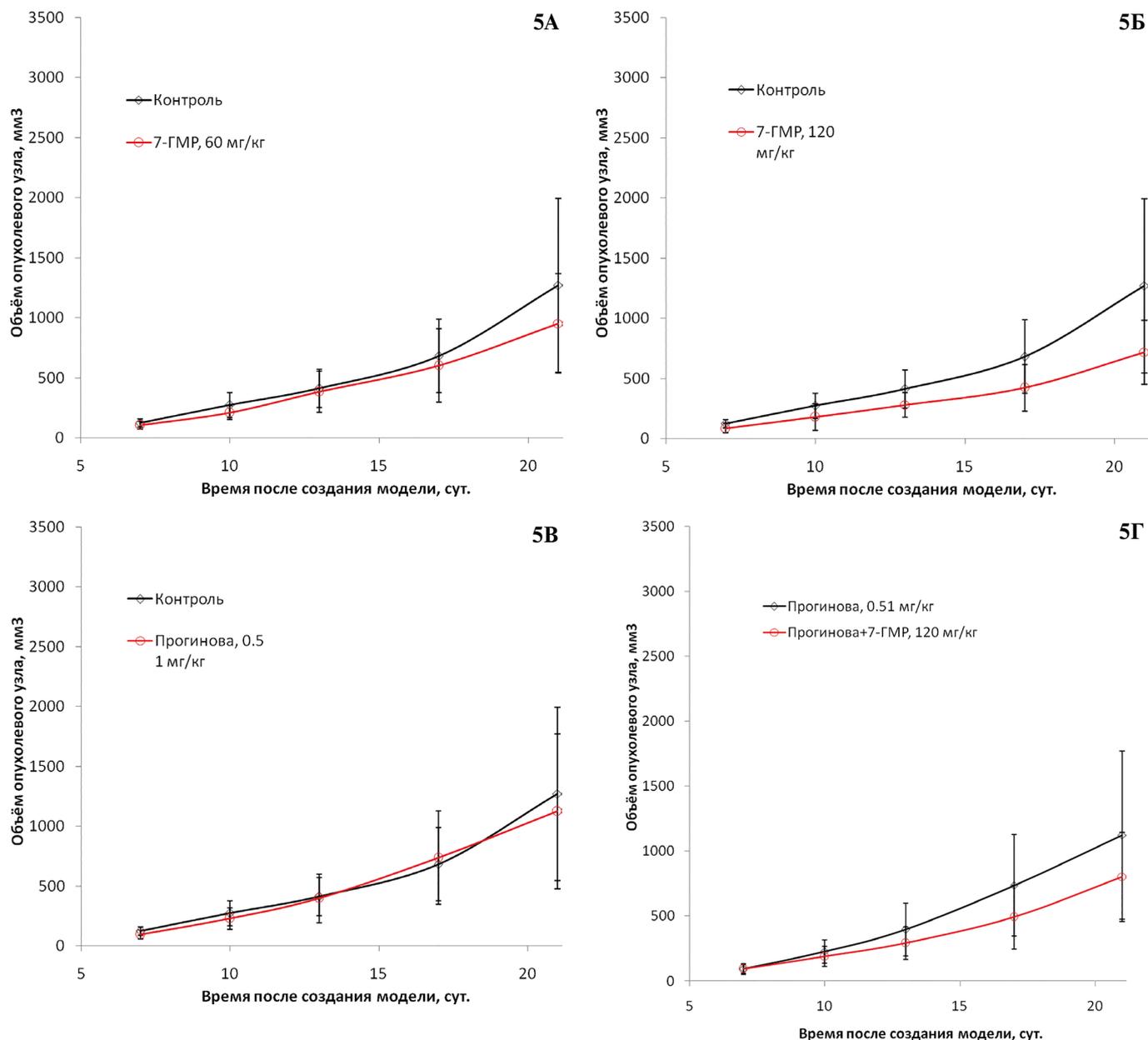
Нами было проведено экспериментальное исследование, показавшее, что 7(ОН)МР в дозах 60 и 120 мг/сут тормозит рост СКЭ даже при провокации эстрадиолом. Онкопротективный эффект 7(ОН)МР был наиболее выражен при использовании более высокой дозы (120 мг/сут): на 21-е сутки объём опухолевого узла (ОУ) снижался, в среднем, на 620 мм<sup>3</sup> по сравнению с контролем ( $p = 0,00036$ ). Анализ динамики ОУ показал, что применение 7(ОН)МР тормозило скорость роста опухолей (рис. 5А, Б). Приём 120 мг/сут 7(ОН)МР достоверно тормозил интенсивность роста ОУ на фоне приёма эстрогенов [11] (рис. 5В, Г). Различия

были статистически достоверны на 10-е, 13-е, 17-е и 21-е сутки.

Анализ выживаемости мышей при приёме 7(ОН)МР показал, что у единичных особей, получавших 7(ОН)МР, отмечалось существенное повышение продолжительности жизни (рис. 6). Два из 14 животных, получавших 120 мг/сут 7(ОН)МР на фоне приёма эстрадиола, выживали в течение 3 мес. после начала эксперимента. В контроле все животные погибли через 90 суток от начала эксперимента. Данный результат интересно сопоставить с результатами ХА, указавшим на выраженный эффект 7(ОН)МР на увеличение продолжительности жизни модельных животных (рис. 3В). Таким образом, препарат 7(ОН)МР в дозах 60 и 120 мг/кг/сут оказывает достоверное онкопротективное воздействие на рост СКЭ.

#### **О роли 7(ОН)МР в модуляции метаболизма эстрогенов и терапии мастопатии / About Role 7(OH)MR in the modulation of estrogen metabolism and mastopathy therapy**

Хемореактомный и хемотранскриптомный анализы, подтвержденные результатами экспериментальных исследований, показали перспективность клинических применений 7(ОН)МР у пациенток с предраковым состоянием — ФКМ. Исследование пациенток с ФКМ показало, что 7(ОН)МР в дозе 60 мг/сут (длительность курсового приёма 1 мес.) способствовал нормализации метаболизма эстрогенов и улучшению клинической симптоматики ФКМ. В ходе проведения исследования была собрана информация о возрасте, анамнезе, уровнях различных МЭ, до и после приёма 7(ОН)МР. В результате приёма 7(ОН)МР были отмечены комплексные изменения концентраций

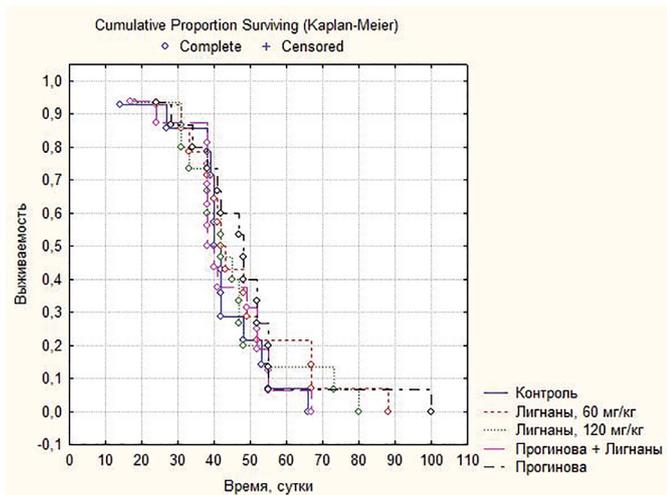


**Рис. 5.** Динамика роста среднего объёма опухолевого узла (усреднённые кривые) при воздействии 7(OH)MP. А) 60 мг/кг. Б) 120 мг/кг 7(OH)MP. В) на фоне приёма эстрогена (Прогинова, 0,51 мг/кг). Г) Эстрогены + 120 мг/кг 7(OH)MP. **Fig. 5.** Dynamics of growth of the average volume of the tumor node (averaged curves) under the influence of 7 (OH)MR. А) 60 mg/kg. Б) 120 mg/kg 7(OH)MR. В) against the background of taking estrogen (Proginova, 0.51 mg / kg). Г) Estrogens + 120 mg/kg

МЭ в суточной моче. Для представления динамики этих изменений в целом мы построили метрические карты, точки которых соответствуют определённым МЭ [31] (рис. 7).

В результате анализа метрических диаграмм на день «0» и день «30» очевидно, что комплексным изменениям уровней МЭ соответствовало «центростремительное» движение точек, обозначающих отдельные метаболиты, в область центрального кластера [31]. Другими словами, на день «0» значения параметров,

соответствующих точкам на диаграмме (уровни различных метаболитов эстрогенов), были достаточно хаотично распределены на плоскости, что указывает на слабые корреляции между этими параметрами и, соответственно, на нарушения эстрогенового метаболизма. В результате лечения 7(OH)MP точки-параметры в некотором роде «концентрировались» в центре диаграммы, формируя кластер высококоррелирующих между собой параметров (рис. 7Б). Таким образом, 7(OH)MP способствовал повышению координации

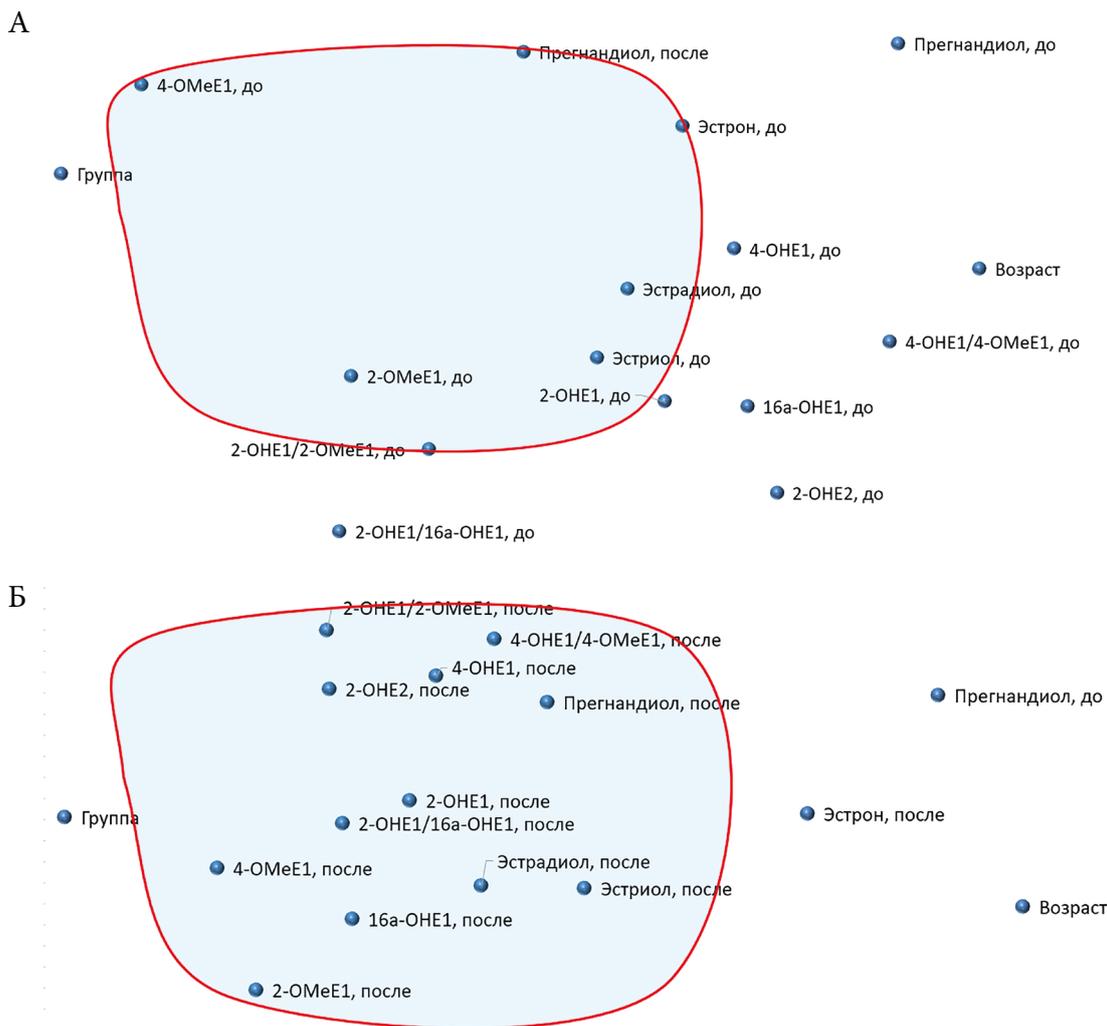


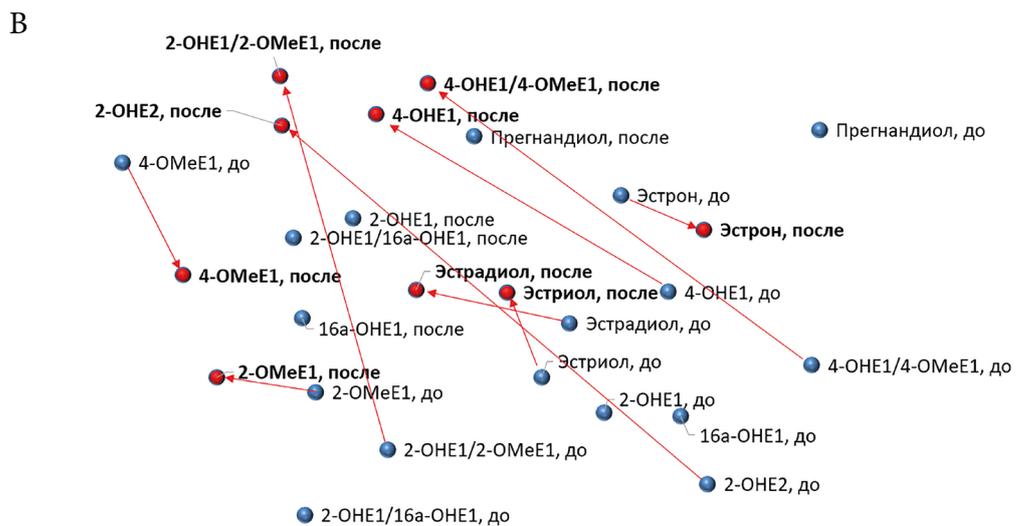
**Рис. 6.** Диаграммы выживаемости Каплана–Мейера мышей-опухоленосителей в экспериментальных группах  
**Fig. 6.** Kaplan-Meier survival diagrams of tumor-bearing mice in experimental groups

метаболизма эстрогенов и, как следствие, гармонизации метаболизма эстрогенов.

По результатам ХА, молекула 7(ОН)МР способствовала повышению транскрипции генов LATS1 (негативный регулятор сигнального пути Hippo, ограничивающий пролиферацию клеток и стимулирующий регенерацию рецептора эстрогенов ESR1 [33]), NR2C2 и SAFB2 (ко-репрессоры рецепторов эстрогенов [34]), BCAR3 (адаптерный белок, снижающий пролиферацию клеток при РМЖ за счёт анти-эстрогенового действия [35]). Описанные изменения транскрипции соответствуют усилению контроля МЭ и усилению корреляций между уровнями различных МЭ [31] (на что и указывает «центробежное» движение точек на диаграмме на рис. 7).

В результате применения 7(ОН)МР ранее, нами было выявлено снижение содержания  $C_{18}H_{24}O_2$  (исх.  $14,05 \pm 4,5$  мкг/сут.; после приёма 7(ОН)МР —  $1,57 \pm 0,1$  мкг/сут.; контроль —  $2,91 \pm 0,9$  мкг/сут.;  $p_{\text{исх.-после.леч.}} < 0,05$ ),  $C_{18}H_{22}O_2$ , (исх. —  $13,59 \pm 3,01$  мкг/сут.;





**Рис. 7.** Метрическая карта взаимодействий комплексных изменений концентраций МЭ в динамике лечения пациенток с ФКМ. Расстояние между любой парой точек на диаграмме соответствует степени «взаимодействия» показателей: чем ближе точки, тем сильнее взаимодействуют (коррелируют) соответствующие показатели. Выделен кластер, соответствующий корреляциям концентраций МЭ. А) Метрическая диаграмма, день «0»; Б) Метрическая диаграмма, день «30»; В) Динамика перемещения точек, соответствующих различным метаболитам эстрогенов. Стрелками отмечены статистически достоверные изменения показателей МЭ

**Fig. 7.** Metric map of interactions of complex changes in ME concentrations in the dynamics of treatment of patients with FCM. The distance between any pair of points on the diagram corresponds to the degree of "interaction" of the indicators: the closer the points are, the more strongly they interact (correlate) relevant indicators. A cluster corresponding to correlations of ME concentrations has been identified. A) Metric chart, day "0"; B) Metric chart, day "30"; C) Dynamics of movement of points corresponding to different metabolites of estrogens. The arrows indicate statistically significant changes in ME indicators

после приёма Л. —  $2,37 \pm 0,01$  мкг/сут.; контроль —  $2,23 \pm 0,75$  мкг/сут.;  $p_{\text{исх.-после}} < 0,05$ ) и  $C_{18}H_{24}O_3$  в суточной моче (исх. —  $13,58 \pm 2,58$  мкг/сут.; после леч. —  $3,17 \pm 0,35$  мкг/сут.; контроль —  $6,48 \pm 0,04$  мкг/сут.;  $p_{\text{исх.-после леч.}} < 0,05$ ;  $p_{\text{исх.-контроль}} < 0,05$ ) в группе пациенток с ФКМ [31].

С клинической точки зрения, применение 7(OH)MP в группе пациенток с ФКМ приводил к снижению (а) болевых ощущений в МЖ, (б) повышенной чувствительности кожи, (в) нагрубания и отёчности МЖ. Эти изменения соответствуют установленному снижению избыточной эстрогенной активности, подтверждённому результатами измерения МЭ в суточной моче пациенток [31].

### Заключение / Conclusion

Онкопротективные и противовоспалительные свойства 7-гидроксиматаирезинола, специфического лигнана ели обыкновенной, указывают на перспективность использования 7(OH)MP в клинической практике онколога и гинеколога. Хемоинформационный анализ 7(OH)MP показал, что схожие с 7(OH)MP

молекулы характеризуются онкопротективным, антибактериальным, противовирусным, гепатопротекторным, противовоспалительным, вазодилатирующим, гиполипидемическим, антитромботическим, антиоксидантным, противодиабетическим и нейропротекторным эффектами [11]. Хемотранскриптомный анализ 7(OH)MP в опухолевых клетках рака молочной железы (MCF7) указал на снижение транскрипции генов пролиферации, синтеза и протеасомной деградации белков, энергетического метаболизма и воспаления, при повышении экспрессии онкопротективных генов. Экспериментальные исследования 7(OH)MP показали достоверное снижение объёма опухолевого узла, даже при провокации эстрадиолом ( $p = 0,007$ ) и повышении продолжительности жизни мышей (более 3 мес.). Лигнан 7(OH)MP, влияя на профиль МЭ, способствует снижению опухолевых рисков, связанных с гиперэстрогенией при мастопатии. Таким образом, 7(OH)MP является перспективной молекулой-кандидатом для лечения фиброзно-кистозной мастопатии и профилактики рака молочной железы, особенно в климактерическом периоде.

## ДОПОЛНИТЕЛЬНАЯ ИНФОРМАЦИЯ

### Участие авторов

Авторы декларируют соответствие своего авторства международным критериям ICMJE. Все авторы в равной степени участвовали в подготовке публикации: разработка концепции статьи, получение и анализ фактических данных, написание и редактирование текста статьи, проверка и утверждение текста статьи..

### Финансирование

Работа выполнена по гранту Российского научного фонда (проект №23-21-00154).

## ADDITIONAL INFORMATION

### Authors' participation

The authors declare the compliance of their authorship according to the international ICMJE criteria. All authors made a substantial contribution to the conception of the work, acquisition, analysis, interpretation of data for the work, drafting and revising the work, final approval of the version to be published and agree to be accountable for all aspects of the work.

### Financing

This work was supported by a grant from the Russian Science Foundation (project No23-21-00154).

## СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ / ABOUT THE AUTHORS

### Рубашкина Анна Николаевна

аспирант ФГБОУ ВО Ивановский ГМУ  
Минздрава России, Иваново, Российская  
Федерация  
ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0002-9639-2525>

### Anna N. Rubashkina

graduate student of the FSBEI HE «Ivanovo SMU»  
of MOH of Russia, Ivanovo, Russian Federation  
ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0002-9639-2525>

### Торшин Иван Юрьевич

к. ф-м. н., к. х. н., в. н. с. ФИЦ ИУ РАН, Москва,  
Российская Федерация  
ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0002-2659-7998>  
РИНЦ SPIN-код: 1375-1114

### Ivan Yu. Torshin

PhD, Cand. Physico-Mathematical Sci., Cand.  
Chemical Sci., Leading researcher FRC CSC RAS,  
Moscow, Russian Federation  
ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0002-2659-7998>  
RSCI SPIN code: 1375-1114

### Громова Ольга Алексеевна

**Автор, ответственный за переписку**  
д. м. н, профессор, в. н. с. ФИЦ ИУ РАН, Москва,  
Российская Федерация  
e-mail: [unesco.gromova@gmail.com](mailto:unesco.gromova@gmail.com)  
ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0002-7663-710X>  
РИНЦ SPIN-код: 6317-9833

### Olga A. Gromova

**Corresponding author**  
Dr. Sci. (Med.), Professor, Leading researcher FRC  
CSC RAS, Moscow, Russian Federation  
e-mail: [unesco.gromova@gmail.com](mailto:unesco.gromova@gmail.com)  
ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0002-7663-710X>  
RSCI SPIN code: 6317-9833

## Список литературы / References

1. Gerstenmeyer E, Reimer S, Berghofer E, et al. Effect of thermal heating on some lignans in flax seeds, sesame seeds and rye. *Food Chem.* 2013 Jun 1;138(2-3):1847-55. doi: 10.1016/j.foodchem.2012.11.117.
2. Громова О.А., Торшин И.Ю., Рубашкина А.Н., и др. Систематический анализ фундаментальных и клинических исследований лигнана 7-гидроксиматаирезинола. *Эффективная фармакотерапия.* 2019;15(13):34-41. [Gromova OA, Torshin IYu, Rubashkina AN, et al. Systematic Analysis of Fundamental and Clinical Studies of Lignan 7-Hydroxymatairesinol. *Effective pharmacotherapy.* 2019;15(13):34-41. (In Russ.)]. doi: 10.33978/2307-3586-2019-15-13-34-41.
3. Udani JK, Brown DJ, Tan MO, Hardy M. Pharmacokinetics and bioavailability of plant lignan 7-hydroxymatairesinol and effects on serum enterolactone and clinical symptoms in postmenopausal women: a single-

blinded, parallel, dose-comparison study. *J Am Coll Nutr.* 2013;32(6):428-35. doi: 10.1080/07315724.2013.849578.

4. Lina B, Korte H, Nyman L, Unkila M. A thirteen week dietary toxicity study with 7-hydroxymatairesinol potassium acetate (HMRlignan) in rats. *Regul Toxicol Pharmacol.* 2005 Feb;41(1):28-38. doi: 10.1016/j.yrtph.2004.09.001.

5. Wolterbeek AP, Roberts A, Korte H, et al. Prenatal developmental toxicity study with 7-hydroxymatairesinol potassium acetate (HMRlignan) in rats. *Regul Toxicol Pharmacol.* 2004 Aug;40(1):1-8. doi: 10.1016/j.yrtph.2004.04.001.

6. Saarinen NM, Wärrä A, Mäkelä SI, et al. Hydroxymatairesinol, a novel enterolactone precursor with antitumor properties from coniferous tree (*Picea abies*). *Nutr Cancer.* 2000;36(2):207-16. doi: 10.1207/S15327914NC3602\_10.

7. Журавлёв Ю.И., Рудаков К.В., Торшин И.Ю. Алгебраические критерии локальной разрешимости и регулярности как инструмент

исследования морфологии аминокислотных последовательностей. *Труды МФТИ*. 2011;3(4):67-76. [Zhuravlev YuI, Rudakov KV, Torshin IYu. Algebraic criteria of local solvability and regularity as a tool for studying the morphology of amino acid sequences. *Proceedings of MIPT*. 2011;3(4):67-76. (In Russ.)].

8. Torshin IYu, Rudakov KV. On the application of the combinatorial theory of solvability to the analysis of chemographs. Part 1: fundamentals of modern chemical bonding theory and the concept of the chemograph. *Pattern Recognition and Image Analysis (Advances in Mathematical Theory and Applications)*. 2014;24(1):11-23. doi: 10.1134/S1054661814010209.

9. Torshin IYu. On solvability, regularity, and locality of the problem of genome annotation. *Pattern Recognition and Image Analysis*. 2010;20(3):386-395. doi: 10.1134/S1054661810030156.

10. Торшин И.Ю., Громова О.А. Экспертный анализ данных в молекулярной фармакологии. М.: МЦНМО, 2012. 747 с. [Torshin IYu, Gromova OA. Expert data analysis in molecular pharmacology. Moscow: Ed. MCNMO, 2012. (In Russ.)]. ISBN 978-5-4439-0051-3.

11. Торшин И.Ю., Рубашкина А.Н., Лапочкина Н.П., Громова О.А. Хемореактивный анализ 7-гидроксиматаирезинола, 17-эстрадиола, фитостерола  $\beta$ -ситостерола и эпигаллокатехин-3-галлата. *Акушерство, Гинекология и Репродукция*. 2020;14(3):347-360. [Torshin IYu, Rubashkina AN, Lapochkina NP, Gromova OA. Chemoreactome analysis of 7-hydroxymatairesinol, 17-estradiol, phytoestrogen  $\beta$ -sitosterol and epigallocatechin-3-gallate. *Akusherstvo, Ginekologiya i Reprodukcija = Obstetrics, Gynecology and Reproduction*. 2020;14(3):347-360. (In Russ.)]. doi: 10.17749/2313-7347/ob.gyn.rep.2020.152.

12. Торшин И.Ю., Громова О.А., Фролова Д.Е., Гришина Т.Р., Лапочкина Н.П. Дозозависимый хемотранскриптомный анализ дифференциального действия витамина D на экспрессию генов в клетках предшественников нейронов NPC и в опухолевых клетках MCF7 человека. *Фармакокинетика и Фармакодинамика*. 2018;(2):35-51. [Torshin IYu, Gromova OA, Frolova DE, Grishina TR, Lapochkina NP. Dose-dependent chemotranscriptomics analysis of the differential effects of vitamin D3 on gene expression in human neuronal progenitor cells NPC and in MCF7 tumor cells. *Pharmacokinetics and Pharmacodynamics*. 2018;(2):35-51. (In Russ.)]. doi: 10.24411/2587-7836-2018-10013.

13. Torshin IYu. Bioinformatics in the post-genomic era: sensing the change from molecular genetics to personalized medicine. New York: Nova biomedical books, 2009. ISBN: 978-1-60692-217.

14. Торшин И.Ю., Рубашкина А.Н., Громова О.А. Хемотранскриптомный анализ эффектов молекулы 7-гидроксиматаирезинола на опухолевые клетки молочной железы человека линии MCF7. *Акушерство, Гинекология и Репродукция*. 2023;17(5):584-596. [Torshin IYu, Rubashkina AN, Gromova OA. Chemotranscriptomic analysis of 7-hydroxymatairesinol-related effects on MCF7 human breast tumor cells. *Obstetrics, Gynecology and Reproduction*. 2023;17(5):584-596. (In Russ.)]. doi: 10.17749/2313-7347/ob.gyn.rep.2023.409.

15. Громова О.А., Фролова Д.Е., Торшин И.Ю., и др. Противопухольные эффекты витамина B<sub>12</sub> *in vitro*, *in vivo*, *in silico*. *ФАРМАКОЭКОНОМИКА. Современная фармакоэкономика и фармакоэпидемиология*. 2024; [принятая рукопись]. [Gromova OA, Frolova DE, Torshin IYu, et al. Antitumor effects of vitamin B12 *in vitro*, *in vivo*, *in silico*. *FARMAKOEKONOMIKA. Sovremennaya farmakoeconomika i farmakoe-pidemiologiya / FARMAKOEKONOMIKA. Modern Pharmacoeconomics and Pharmacoepidemiology*. 2024; [accepted manuscript]. (In Russ.)]. doi: 10.17749/2070-4909/farmakoeconomika.2024.231.

16. Torshin IYu, Rudakov KV. On metric spaces arising during formalization of problems of recognition and classification. part 2: density properties. *Pattern Recognition and Image Analysis (Advances in Mathematical Theory and Applications)*. 2016;26(3):483-496. doi: 10.1134/S1054661816030202

17. Torshin IYu, Rudakov KV. Combinatorial analysis of the solvability properties of the problems of recognition and completeness of algorithmic models. part 2: metric approach within the framework of the theory of classification of feature values. *Pattern Recognition and Image Analysis (Advances in Mathematical Theory and Applications)*. 2017;27(2):184-199. doi: 10.1134/S1054661817020110.

18. Cosentino M, Marino F, Maio RC, et al. Immunomodulatory activity of the lignan 7-hydroxymatairesinol potassium acetate (HMR/lignan)

extracted from the heartwood of Norway spruce (*Picea abies*). *Int Immunopharmacol*. 2010 Mar;10(3):339-43. doi: 10.1016/j.intimp.2009.12.005.

19. Spilioti E, Holmbom B, Papavassiliou AG, Moutsatsou P. Lignans 7-hydroxymatairesinol and 7-hydroxymatairesinol 2 exhibit anti-inflammatory activity in human aortic endothelial cells. *Mol Nutr Food Res*. 2014 Apr;58(4):749-59. doi: 10.1002/mnfr.201300318.

20. Yang D, Xiao CX, Su ZH, Huang MW, Qin M, Wu WJ, Jia WW, Zhu YZ, Hu JF, Liu XH. (-)-7(S)-hydroxymatairesinol protects against tumor necrosis factor- $\alpha$ -mediated inflammation response in endothelial cells by blocking the MAPK/NF- $\kappa$ B and activating Nrf2/HO-1. *Phytomedicine*. 2017 Aug 15;32:15-23. doi: 10.1016/j.phymed.2017.04.005.

21. Samson K. LEE011 CDK Inhibitor Showing Early Promise in Drug-Resistant Cancers. *Oncology Times*. 2014;36(3):39-40. doi: 10.1097/01.COT.0000444043.33304.c1.

22. Liang W, Wu X, Fang W, et al. Network meta-analysis of erlotinib, gefitinib, afatinib and icotinib in patients with advanced non-small-cell lung cancer harboring EGFR mutations. *PLoS One*. 2014 Feb 12;9(2):e85245. doi: 10.1371/journal.pone.0085245.

23. Lamming DW, Ye L, Sabatini DM, Baur JA. Rapalogs and mTOR inhibitors as anti-aging therapeutics. *J Clin Invest*. 2013 Mar;123(3):980-9. doi: 10.1172/JCI64099. PMID: 23454761.

24. Rogowski M, Gollahon L, Chellini G, Assadi-Porter FM. Uptake of 3-iodothyronamine hormone analogs inhibits the growth and viability of cancer cells. *FEBS Open Bio*. 2017 Mar 6;7(4):587-601. doi: 10.1002/2211-5463.12205. Erratum in: *FEBS Open Bio*. 2017 May 22;7(6):887.

25. Aouad P, Saikali M, Abdel-Samad R, et al. Antitumor activities of the synthetic retinoid ST1926 in two-dimensional and three-dimensional human breast cancer models. *Anticancer Drugs*. 2017 Aug;28(7):757-770. doi: 10.1097/CAD.0000000000000511.

26. Saarinen NM, Huovinen R, Wärrä A, et al. Uptake and metabolism of hydroxymatairesinol in relation to its anticarcinogenicity in DMBA-induced rat mammary carcinoma model. *Nutr Cancer*. 2001;41(1-2):82-90. doi: 10.1080/01635581.2001.9680616.

27. Miura D, Saarinen NM, Miura Y, et al. Hydroxymatairesinol and its mammalian metabolite enterolactone reduce the growth and metastasis of subcutaneous AH109A hepatomas in rats. *Nutr Cancer*. 2007;58(1):49-59. doi: 10.1080/01635580701308133.

28. Bylund A, Saarinen N, Zhang JX, et al. Anticancer effects of a plant lignan 7-hydroxymatairesinol on a prostate cancer model *in vivo*. *Exp Biol Med (Maywood)*. 2005 Mar;230(3):217-23. doi: 10.1177/153537020523000308.

29. Katsuda S, Yoshida M, Saarinen N, et al. Chemopreventive effects of hydroxymatairesinol on uterine carcinogenesis in Donryu rats. *Exp Biol Med (Maywood)*. 2004 May;229(5):417-24. doi: 10.1177/153537020422900510.

30. Oikarinen SI, Pajari A, Mutanen M. Chemopreventive activity of crude hydroxymatairesinol (HMR) extract in Apc(Min) mice. *Cancer Lett*. 2000 Dec 20;161(2):253-8. doi: 10.1016/s0304-3835(00)00662-5.

31. Рубашкина А.Н., Лапочкина Н.П., Торшин И.Ю., Громова О.А. Роль 7-гидроксиматаирезинола в модуляции метаболизма эстрогенов и терапии мастопатии. *Гинекология*. 2020;22(4):43-48. [Rubashkina AN, Lapochkina NP, Torshin IYu, Gromova OA. The role of 7-hydroxymatairesinol in modulation of estrogen metabolism and therapy for mastopathy. *Gynecology*. 2020;22(4):43-48. (In Russ.)]. doi: 10.26442/20795696.2020.4.200183.

32. Kangas L, Saarinen N, Mutanen M, et al. Antioxidant and antitumor effects of hydroxymatairesinol (HM-3000, HMR), a lignan isolated from the knots of spruce. *Eur J Cancer Prev*. 2002 Aug;11 Suppl 2:S48-57.

33. Britschgi A, Duss S, Kim S, et al. The Hippo kinases LATS1 and 2 control human breast cell fate via crosstalk with ER $\alpha$ . *Nature*. 2017 Jan 26;541(7638):541-545. doi: 10.1038/nature20829.

34. Lee YF, Young WJ, Lin WJ, Shyr CR, Chang C. Differential regulation of direct repeat 3 vitamin D3 and direct repeat 4 thyroid hormone signaling pathways by the human TR4 orphan receptor. *J Biol Chem*. 1999 Jun 4;274(23):16198-205. doi: 10.1074/jbc.274.23.16198.

35. van Agthoven T, van Agthoven TL, Dekker A, et al. Identification of BCAR3 by a random search for genes involved in antiestrogen resistance of human breast cancer cells. *EMBO J*. 1998 May 15;17(10):2799-808. doi: 10.1093/emboj/17.10.2799.