

Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение
высшего образования
«Рязанский государственный медицинский университет
имени академика И.П. Павлова»
Министерства здравоохранения Российской Федерации

На правах рукописи

ТРАНОВА ЮЛИЯ

**РАЗРАБОТКА МЕТОДИКИ ТЕСТИРОВАНИЯ ЛЕКАРСТВЕННЫХ
ВЕЩЕСТВ НА ПРИНАДЛЕЖНОСТЬ К СУБСТРАТАМ, ИНГИБИТОРАМ
И ИНДУКТОРАМ БЕЛКА-ТРАНСПОРТЕРА VSCRP *IN VITRO***

3.3.6. Фармакология, клиническая фармакология

Диссертация

на соискание ученой степени кандидата биологических наук

Научный руководитель:

доктор медицинских наук,

профессор

Якушева Елена Николаевна

РЯЗАНЬ – 2023

3.1 Разработка и валидация методик количественного определения субстратов BCRP	52
3.1.1 Разработка и валидация методики количественного определения метотрексата в транспортный среде методом ВЭЖХ-МС/МС	52
3.1.2 Разработка и валидация методики количественного определения митоксантрона в транспортный среде методом ВЭЖХ-МС/МС	62
3.1.3 Разработка и валидация методики количественного определения кверцетина в транспортной среде методом ВЭЖХ-МС/МС	72
3.2 Оценка транспорта метотрексата, митоксантрона и кверцетина через монослой клеток линии Caco-2.....	82
3.2.1 Влияние резерпина - ингибитора BCRP на транспорт метотрексата и митоксантрона через билипидный слой клеток Caco-2	88
3.3 Модификация и валидация методики количественного определения этилметилгидроксипиридина сукцината в транспортный среде методом ВЭЖХ-УФ	92
3.4 Оценка принадлежности этилметилгидроксипиридина сукцината к субстратам и модуляторам активности BCRP	98
3.4.1 Оценка влияния этилметилгидроксипиридина сукцината на количество BCRP	102
ГЛАВА 4. ЗАКЛЮЧЕНИЕ.....	104
ВЫВОДЫ.....	114
ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ.....	115
ПЕРСПЕКТИВЫ ДАЛЬНЕЙШЕЙ РАЗРАБОТКИ ТЕМЫ	116
СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ.....	117
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.....	119

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность темы исследования

Нежелательные лекарственные реакции являются одной из основных причин госпитализаций, особенно у пожилых пациентов и лиц с полипрагмазией. По данным систематического обзора, включающего 45 исследований, выполненных с 2000 по 2013 годы, госпитализация в результате нежелательных лекарственных реакций встречалась в 7% (2,4–14,9%) случаев [21].

В развитии осложнений фармакотерапии важную роль играют фармакокинетические межлекарственные взаимодействия на уровне изоферментов цитохрома P450 и белков-транспортеров.

Учитывая данные обстоятельства, FDA с 1997 года рекомендует все новые лекарственные препараты тестировать на принадлежность к субстратам и ингибиторам цитохрома P450, а с 2006 года также к субстратам и ингибиторам белков-транспортеров, аналогичные рекомендации используются в России и Японии с 2014 года.

Белок устойчивости рака молочной железы человека (BCRP, ABCG2) это эффлюксный трансмембранный белок-транспортер, относящийся к суперсемейству ABC-транспортеров [166].

BCRP был первоначально обнаружен в 1998 году в клетках рака молочной железы резистентной линии MCF-7/AdrVp, которые не содержали гликопротеин-P (Pgp) и белок-транспортер 1, ассоциированный с множественной лекарственной устойчивостью (MRP1), однако проявляли полирезистентность и характеризовались активным выбросом противоопухолевых субстратов из цитоплазмы [19]. На данный момент установлено, что BCRP в большом количестве представлен в синцитиотрофобластах плаценты человека, в меньшей степени в апикальной мембране эпителия тонкой кишки, в канальцевой мембране печени, на поверхности эндотелиальных клеток микрососудов головного мозга человека, в

стволовых клетках, яичниках, надпочечниках, легких [15, 100, 176], а также в опухолевых клетках [2-3, 13, 86].

Подобная локализация белка в органах и тканях указывает на то, что BCRP играет важную роль в абсорбции, распределении и удалении из организма лекарственных веществ, являющихся его субстратами. Учитывая локализацию BCRP в кишечнике и печени, он, аналогично Pgp, служит барьером для резорбции лекарственных средств, что ограничивает их пероральную биодоступность, а также опосредует выведение через гепатобилиарную систему [185].

На данный момент известно более 200 субстратов BCRP. Субстратами белка-транспортера являются противоопухолевые средства, такие как, метотрексат, митоксантрон, производные камптотецина (топотекан, иринотекан, дифломотекан), некоторые ингибиторы протеинтирозинкиназы (иматиниб, gefитиниб, нилотиниб) и ряд лекарственных средств других фармакологических групп (празозин, глибурид, циметидин, сульфасалазин, нитрофурантоин, розувастатин) [126].

Воздействие лекарственных веществ может модулировать активность BCRP. Ингибиторы белка-транспортера снижают его функциональную активность, что в ряде случаев ассоциировано с развитием нежелательных лекарственных реакций. Индукторы, напротив, могут повышать активность белка-транспортера, что снижает эффективность проводимой фармакотерапии.

К ингибиторам BCRP относятся противогрибковые препараты (кетоконазол, итраконазол, флуконазол), блокаторы протонной помпы (омепразол, пантопразол), ингибиторы протеазы ВИЧ (нелфинавир, саквинавир, ритонавир), ингибиторы тирозинкиназы (gefитиниб, иматиниб), ингибиторы протеазы вируса герпеса С (боцепревир), блокаторы кальциевых каналов (нимодипин, никардипин), дипиридамол, циклоспорин А, такролимус, сиролимус, резерпин, тамоксифен, некоторые флавоноиды (биоханин А и др.) [1, 126]. На данный момент веществ, являющимися индукторами BCRP, обнаружено мало; к ним относятся: теллапревир, риоцигуат, венлафаксин [179].

Учитывая вышеизложенное, актуальной задачей является разработка, валидация и апробация методики оценки новых и широко применяющихся лекарственных препаратов на клетках линии Caco-2 на принадлежность к субстратам и модуляторам активности белка-транспортера BCRP.

Степень разработанности проблемы

На кафедре фармакологии ФГБОУ ВО РязГМУ Минздрава России с 2010 года выполняются исследования по оценке принадлежности лекарственных веществ к субстратам, индукторам и ингибиторам АТФ-зависимых белков-транспортеров [6]. Отработаны методики тестирования лекарственных веществ на принадлежность к субстратам, индукторам и ингибиторам гликопротеина-P *in vivo* и *in vitro*. Протестирован ряд оригинальных отечественных лекарственных средств, таких как мексидол, ноопепт, афобазол и др.

BCRP - АТФ-зависимый, клинически значимый белок-транспортер, также играющий важную роль в фармакокинетике лекарственных веществ и развитии межлекарственных взаимодействий. Поэтому логичным продолжением научного направления кафедры фармакологии является разработка методики тестирования лекарственных веществ на принадлежность к субстратам, ингибиторам и индукторам белка-транспортера BCRP.

Цель исследования – разработать и апробировать методику тестирования лекарственных веществ на принадлежность к субстратам, ингибиторам и индукторам белка-транспортера BCRP на клетках аденокарциномы ободочной кишки человека (Caco-2).

Задачи исследования

Для достижения поставленной цели решались следующие задачи:

1. Разработать и валидировать методики количественного определения метотрексата, митоксантрона и кверцетина в транспортной среде методом высокоэффективной жидкостной хроматографии с тандемным масс-спектрометрическим детектированием (ВЭЖХ-МС/МС).

2. Оценить транспорт метотрексата, митоксантрона и кверцетина через билипидную мембрану клеток линии Сасо-2.

3. Модифицировать и валидировать методику количественного определения этилметилгидроксипиридина сукцината в транспортной среде методом ВЭЖХ с ультрафиолетовым детектированием (ВЭЖХ-УФ).

4. Протестировать этилметилгидроксипиридина сукцинат на принадлежность к субстратам и модуляторам активности BCRP и оценить его влияние на относительное количество BCRP в клетках линии Сасо-2.

Научная новизна

1. Разработаны и валидированы методики количественного определения метотрексата, митоксантрона и кверцетина методом ВЭЖХ-МС/МС в транспортной среде.

2. Оценен транспорт метотрексата и митоксантрона в концентрациях 5, 10 и 50 мкМ и кверцетина в концентрации 50 мкМ через билипидную мембрану клеток линии Сасо-2.

3. Показано, что метотрексат в концентрации 5 мкМ и митоксантрон в концентрации 10 мкМ являются наиболее оптимальными субстратами BCRP в предложенных условиях транспортного эксперимента на клетках линии Сасо-2 и могут быть использованы для оценки принадлежности тестируемых веществ к ингибиторам белка-транспортера.

4. Модифицированная и валидированная методика количественного определения этилметилгидроксипиридина сукцината методом ВЭЖХ-УФ пригодна для его анализа в транспортной среде.

5. С помощью разработанной методики на клетках линии Сасо-2 установлено, что этилметилгидроксипиридина сукцинат не относится к субстратам BCRP, но является ингибитором белка-транспортера.

6. Доказано, что этилметилгидроксипиридина сукцинат не изменяет относительное количество BCRP в клетках линии Сасо-2 при инкубации в течение

24 часов, поэтому ингибирование транспортного белка не связано с уменьшением его количества в клетках.

Теоретическая и практическая значимость

В ходе исследования была разработана методика тестирования лекарственных веществ на принадлежность к субстратам, ингибиторам и индукторам BCRP *in vitro* на клетках линии Caco-2, в которой в качестве веществ-субстратов BCRP предлагается использовать метотрексат в концентрации 5 мкМ или митоксантрон в концентрации 10 мкМ, а в качестве ингибитора BCRP – резерпин в концентрации 50 мкМ. С помощью разработанной методики было установлено, что этилметилгидроксипиридина сукцинат в экспериментах *in vitro* не относится к субстратам BCRP, но является его ингибитором. Таким образом, этилметилгидроксипиридина сукцинат можно считать безопасным препаратом при его использовании с модуляторами активности BCRP, однако требуется учитывать возможность изменения фармакокинетики субстратов белка-транспортера при их совместном применении с ним. Разработанная методика позволяет тестировать вещества, на принадлежность к субстратам BCRP, и оценивать участие белка-транспортера в фармакокинетике новых и известных лекарственных веществ. Методика позволяет устанавливать вещества, влияющие на функциональную активность BCRP и прогнозировать возможность их участия в межлекарственных взаимодействиях, которые имеют клиническое значение для эффективной и безопасной фармакотерапии.

Методология и методы исследования

Транспортные эксперименты *in vitro* выполняли на клеточной линии аденокарциномы ободочной кишки человека (линии Caco-2) с использованием трансвелл-систем.

В качестве веществ-субстратов BCRP применяли метотрексат, митоксантрон и кверцетин, концентрацию которых определяли методом ВЭЖХ-МС/МС.

Апробацию разработанной методики проводили с использованием этилметилгидроксипиридина сукцината, в качестве вещества-субстрата применяли митоксантрон, как наиболее оптимальный. Количественный анализ этилметилгидроксипиридина сукцината осуществляли с помощью ВЭЖХ-УФ. Относительное количество BCRP анализировали методом вестерн-блот.

Полученные результаты обрабатывали адекватными методами математической статистики с помощью программ «Stat Soft Statistica 13.0» (США, № лицензии JPZ811I521319AR25ACD-W) и «Microsoft Excel 2021».

Положения, выносимые на защиту

1. Разработаны и валидированы методики количественного определения в транспортной среде методом ВЭЖХ-МС/МС метотрексата в аналитическом диапазоне 60 – 10000 нМ, митоксантрона в диапазоне 50 – 1000 нМ и кверцетина в диапазоне 5 – 500 нМ целевого вещества.

2. Оптимальными субстратами, показавшими наибольшую асимметрию транспорта в трансвелл-системе для методики тестирования лекарственных веществ на принадлежность к субстратам, ингибиторам и индукторам BCRP на клетках линии Сасо-2 являются метотрексат (5 мкМ) и митоксантрон (10 мкМ).

3. В исследовании *in vitro* установлено, что этилметилгидроксипиридина сукцинат не относится к субстратам BCRP, но является ингибитором белка-транспортера, не изменяя его относительное количество в клетках линии Сасо-2.

Степень достоверности и апробация результатов

Высокая степень достоверности полученных результатов обусловлена достаточным объемом экспериментальных данных, полученных с использованием адекватных и современных методов исследования, выполненных на сертифицированном оборудовании с последующим анализом, систематизацией и статистической обработкой в соответствии с международными и отечественными рекомендациями.

Основные положения диссертации представлены, доложены, обсуждены и опубликованы в материалах конференций: III Всероссийской конференции студентов и молодых ученых с международным участием «Естественнонаучные основы медико-биологических знаний» (Рязань, 2021); VII Всероссийской научной конференции молодых специалистов, аспирантов, ординаторов «Инновационные технологии в медицине: взгляд молодого специалиста» (Рязань, 2021); Всероссийской научно-практической конференции с международным участием «Биохимические научные чтения памяти академика РАН Е.А. Строева» (Рязань, 2022); Всероссийской школы-конференции «Коллекции культур клеток человека и животных: современные вызовы и сетевые решения» (Санкт-Петербург, 2022); XVIII Международной / XXVII Всероссийской Пироговской научной медицинской конференции студентов и молодых ученых (Москва, 2023); XIX Международной Бурденковской научной конференции, посвященной десятилетию науки и технологий (Воронеж, 2023).

Апробация работы состоялась 22 июня 2023 года на заседании кафедр фармакологии, биологической химии с курсом клинической лабораторной диагностики ФДПО, фармацевтической химии, управления и экономики фармации, фармакогнозии ФГБОУ ВО РязГМУ Минздрава России.

Внедрение результатов исследования в практику

Основные результаты диссертационной работы успешно внедрены и используются в учебном процессе при обучении студентов и аспирантов на кафедрах фармакологии и фармацевтической химии, а также внедрены в деятельность центральной научно-исследовательской лаборатории ФГБОУ ВО РязГМУ Минздрава России.

Личный вклад автора

Автор самостоятельно подготовил обзор литературы по теме диссертационной работы; провел транспортные эксперименты *in vitro*; разработал и валидировал методики количественного анализа; обработал и интерпретировал

полученные результаты; подготовил печатные работы по изучаемой теме. В целом личный вклад автора в исследование превышает 80%.

Сведения о публикациях по теме диссертации

По результатам диссертации опубликовано 5 работ, в том числе 4 статьи в рецензируемых журналах, рекомендованных ВАК при Минобрнауки России и входящих в международные цитатно-аналитические базы Web of Science и Scopus; 4 тезиса докладов в материалах всероссийских и международных конференций.

Структура и объем диссертации

Диссертационная работа изложена на 146 страницах и включает в себя следующие разделы: введение, обзор литературы, материалы и методы исследования, результаты исследования, заключение, выводы, практические рекомендации, перспективы дальнейшей разработки темы, список сокращений, список литературы. Диссертация иллюстрирована 38 рисунками и 21 таблицей. Список литературы представлен 209 источниками, из них 15 отечественных и 194 зарубежных авторов.

Благодарности

Автор выражает глубокую признательность д.м.н., профессору Шулькину А.В., д.б.н., доценту Черных И.В., к.б.н., доценту Абаленихиной Ю.В. и к.б.н., ассистенту Мыльникову П.Ю. за всестороннюю помощь на всех этапах исследования, при подготовке и публикации печатных работ.

ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1 История открытия белка резистентности рака молочной железы

Белок резистентности рака молочной железы человека (*англ.*: breast cancer resistance protein, BCRP, ABCG2) является вторым членом подсемейства G белков АТФ-связывающих кассетных транспортеров (*англ.*: ABC-transporters) [125]. В настоящее время идентифицированы четыре члена подсемейства G белков, а именно ABCG1, ABCG2, ABCG5 и ABCG8 [49, 125].

ABCG1 участвует в регуляции липидного обмена макрофагов за счет транспорта клеточных липидов, включая холестерин и фосфолипиды [22]. ABCG5 и ABCG8 также выводят холестерин и растительные стеринны [28, 123, 135].

Abcg3 обнаружен у грызунов, но его функции пока не изучены, предполагается, что он играет важную роль в реализации иммунного ответа, так как локализуется в тимусе и селезенке и/или выполняет защитную функцию, так как имеет схожую гомологическую последовательность с Abcg2 [31, 63]. Также была отмечена роль Abcg3 в защите насекомых от инсектицидов и других токсичных для них веществ [52]. Следует отметить, что ген *Abcg3* грызунов не имеет аналогов в геноме человека [63].

Белок-транспортер BCRP был первоначально обнаружен в 1998 году в клетках рака молочной железы (MCF-7/AdrVp), которые не содержали Pgp и MRP1, но проявляли лекарственную резистентность и характеризовались активным эффлюксом антрациклиновых противоопухолевых препаратов из цитоплазмы [19]. Почти идентичный транспортер, названный белком устойчивости к митоксантрону (*англ.*: mitoxantrone resistance protein, MXR), был обнаружен в 1998 году в клеточной линии карциномы толстой кишки человека с высокой резистентностью к данному препарату [136]. В этом же году была выделена кДНК белка суперсемейства ABC-транспортеров, локализованного в человеческой плаценте (*англ.*: placental ABC-protein, ABCP), которая оказалась идентичной кДНК BCRP и кДНК MXR. ABCP был назван так, чтобы отразить его большое количество в клетках плаценты человека [18]. Из описанного следует, что BCRP, MXR и ABCP

– один и тот же транспортный белок с небольшими различиями в аминокислотной последовательности.

1.2 Структура белка резистентности рака молочной железы

BCRP представляет собой мембранный белок массой 75 кДа, преимущественно локализованный на плазматической мембране клеток и состоящий из 655 аминокислотных остатков [18, 137, 176].

Данный белок, в отличие от Pgp и белка MRP1, является полутранспортером. Он содержит один нуклеотидсвязывающий домен (NBDs) (остатки ~ 1 – 396), расположенный на N-конце белка, за которым следует один трансмембранный домен (TMDs) (остатки ~397–655), состоящий из 6 трансмембранных сегментов (ТМ или α -спиралей) [18-19, 202]. Интересно, что типичная структура большинства ABC-транспортеров предполагает обратную последовательность доменов: TMDs, за которым следует NBDs [12, 126, 166].

Аминокислотная последовательность TMDs BCRP значительно отличается от таковой у других представителей ABC-транспортеров, поэтому в течение длительного времени не удавалось построить гомологичных моделей данного белка-транспортера [62]. Аминокислотная последовательность TMDs соответствует структуре бактериальных импортеров с короткими трансмембранными спиральями, что приводит к близости NBDs к внутренней поверхности плазматической мембраны [166].

Топологические модели подтвердили, что внеклеточные петли TMDs относительно короткие, за исключением третьей внеклеточной петли между ТМ5 и ТМ6 [154], в которой находится единственный известный сайт *N*-гликозилирования в положении 596 (аспарагин - Asn⁵⁹⁶) [29], расположенный по «правилу 12+14»; то есть акцепторный сайт аспарагина во внеклеточных петлях удален как минимум на 12 остатков от проксимального и на 14 остатков от дистального отделов ТМ (Рисунок 1) [127].

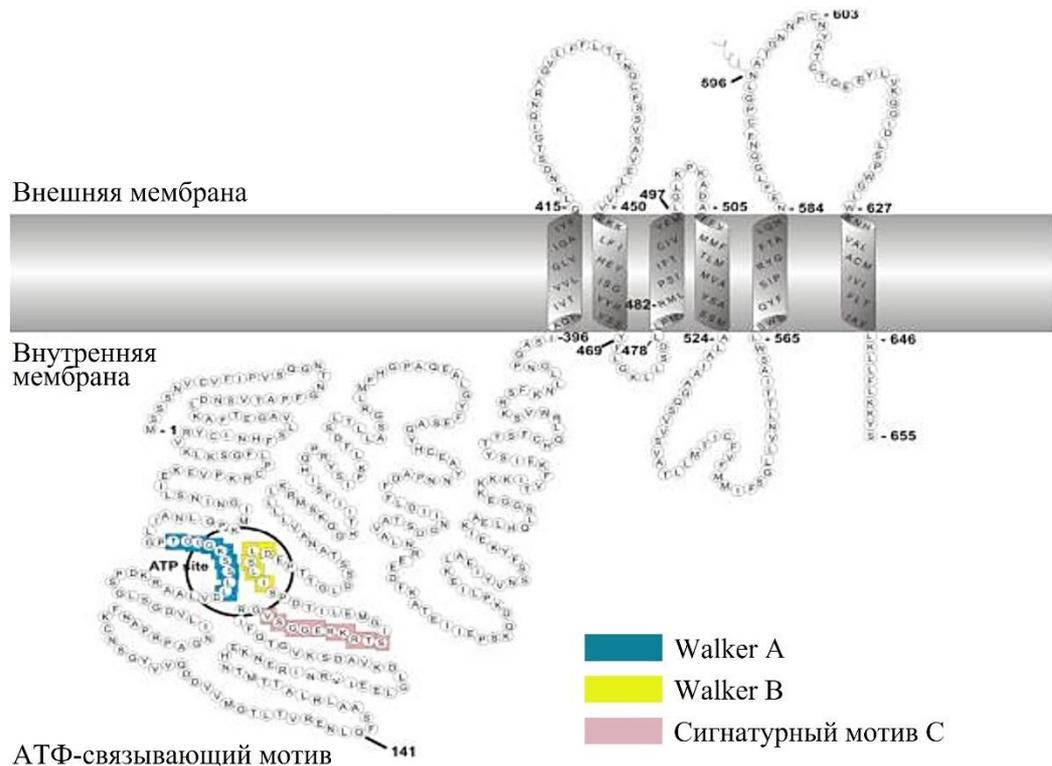


Рисунок 1 – Схематическая иллюстрация топологии BCRP

Примечание: граница трансмембранных спиралей является приблизительной и основана на экспериментальном определении топологии BCRP. Указаны АТФ-связывающий мотив (Walker A и Walker B) и сигнатурный мотив С. Arg⁴⁸² является критическим компонентом, характеризующим субстратную специфичность и транспортную активность BCRP. Asn⁵⁹⁶ представляет собой сайт N-связанного гликозилирования. Cys⁶⁰³ участвует в димеризации/олигомеризации белка через межмолекулярные дисульфидные связи [173]

BCRP может функционировать как гомодимер за счет образования межмолекулярных дисульфидных связей между остатками цистеина (Cys⁶⁰³) и как олигомер высокого порядка, среди которых в цитоплазматической мембране преобладают тетрамеры [42, 151, 173]. Межмолекулярная цистеинилдисульфидная связь (Cys⁶⁰³) не влияет на мембранную локализацию и транспортную активность белка, тогда как внутримолекулярная дисульфидная связь Cys⁵⁹² - Cys⁶⁰⁸ необходима для правильного сворачивания и стабильности белка [98, 113].

В функциональном гомодимере TM2, TM5, TM2' и TM5' расположены в центре трансмембранного домена, образуя границу между двумя протомерами.

TM1 взаимодействует с TM2 того же протомера и с TM5' противоположного протомера, в то время как TM3, TM4 и TM6 охватывают центральные четыре спирали (TM2, TM5, TM2' и TM5'), которые образуют основной карман для связывания субстратов [172, 174]. Внутриклеточные области TMDs BCRP обладают структурными свойствами, отличными от других представителей суперсемейства ABC-транспортёров. Внутриклеточные концы трансмембранных спиралей «полных» транспортёров имеют соединительную спираль с NBDs, а внутриклеточные петли полутранспортёра BCRP не имеет связывающей спирали с NBDs, так как TM2 и TM3 связаны между собой, TM4 и TM5 слишком короткие и, вероятно, не покидают билипидный слой мембраны (Рисунок 2) [62]. Важнейшим интерфейсом между TMDs и NBDs является Phe¹⁴², взаимодействующий с соединительной спиралью (с аминокислотами Lys³⁸² и Arg³⁸³) [166].

Структура и аминокислотная последовательность NBDs строго консервативна. Он содержит несколько АТФ-связывающих мотивов: мотивы Walker-A и Walker-B, консервативную специфическую последовательность LSGGQ (С-мотив) и вторую каноническую сигнатуру LSGGE в позиции 352-356 (С2-последовательность), участвующую в связывании и/или гидролизе АТФ, но не связанную с субстратной специфичностью [190].

В структуре BCRP имеется щелевидная полость (полость 1), образованная TM2 и TM5' двух мономеров (Рисунок 3). Эта полость открыта как в цитоплазму, так и во внутрь мембраны и занимает более половины билипидного мембранного слоя до остатков L⁵⁵⁴ и L^{554'} противоположного мономера. Остатки лейцина образуют пробку, разделяющую полость 1 и полость 2, которая менее доступна для субстратов и имеет к ним низкий аффинитет из-за снижения гидрофобности [174, 179].

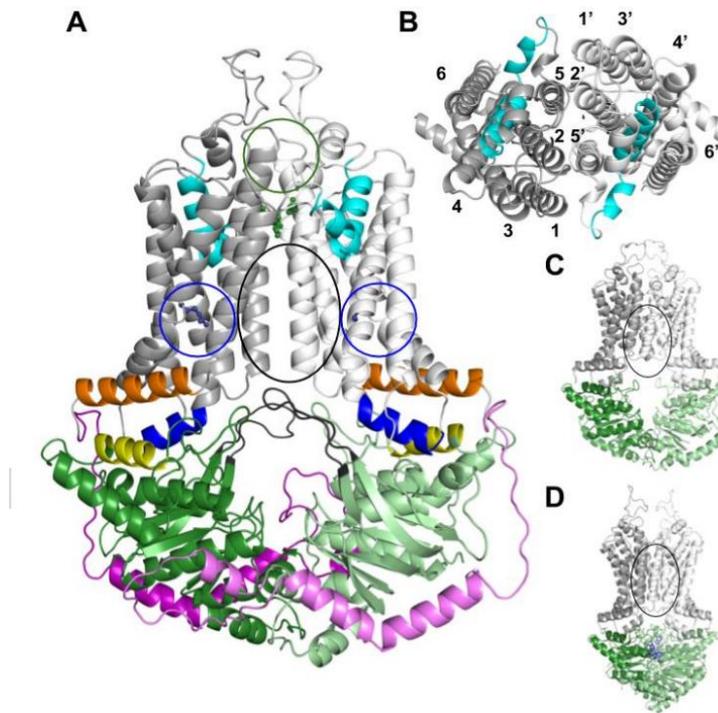


Рисунок 2 – Конформации BCRP, наблюдаемые с помощью криоэлектронной микроскопии

Примечание: А - вид сбоку и Б - вид сверху обращенной внутрь структуры BCRP, определенные в присутствии антитела против BCRP и в отсутствие АТФ. Серый – TMD; светло-серый – TMD'; зеленый – NBD; светло-зеленый – NBD'; голубой – входная G-петля; синий и оранжевый – соединительные спирали; желтый – Q141-спираль; темно-серый – регуляторная вставка (RI); фиолетовый и малиновый – области компоновки; цифры – нумерация спиралей ТМ; синие палочки и шарики – R⁴⁸²; синие круги – карман R⁴⁸²; зеленые палочки и шарики – лейциновый клапан; зеленый круг – полость 2; синий круг – полость 1 (центральный карман для связывания). С и D показывают структуры BCRP в отсутствие антитела и АТФ и в присутствии АТФ, соответственно. Черные круги указывают на отсутствие полости 1 в этих конформациях [166]

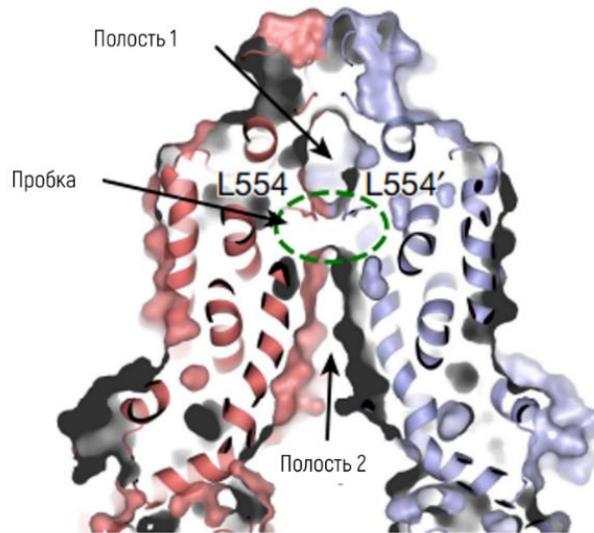


Рисунок 3 – Сагиттальный разрез изображения TMD BCRP с указанием полостей 1 и 2 и лейциновой пробки [174]

Для транспортировки во внеклеточную среду субстрат перемещается из полости 1 в полость 2. Полость 1 представляет собой две молекулы холестерина, образуя конформацию, обращенную во внутрь, что указывает на возможное место связывания таких субстратов, как эстрон-3-сульфат. Предлагаемый транспортный механизм происходит путем связывания АТФ с NBDs, что вызывает конформационные изменения, тем самым преобразуя конформацию, обращенную во внутрь и связанную с субстратом, в конформацию, обращенную наружу и с последующим высвобождением субстрата из сайта связывания. После гидролиза АТФ полость 1 снова открывается в цитоплазму и свободна для связывания другой молекулы субстрата [26, 174].

Структурный анализ BCRP показал, что связывание веществ с полостью 1 оказывает различное влияние на активность АТФазы. Связывание холестерина с полостью 1 увеличивает активность АТФазы, в то время как MZ29 – мощный ингибитор BCRP (модифицированная форма Ko143, в которую добавлена О-циклопентильная группа в положение С9) снижает активность АТФазы при связывании с той же полостью и в той же конформации [172].

Таким образом, BCRP имеет структурные отличия от других белков суперсемейства ABC-транспортеров, а именно является полутранспортером и

образует гомодимер из двух белковых цепей, содержащих два основных домена (NBDs, TMDs).

1.3 Локализация и функции белка резистентности рака молочной железы

У человека большое содержание BCRP наблюдается на апикальной мембране эпителия тонкой и толстой кишки [176]. Данный белок-транспортёр выявлен в гистогематических барьерах человека. Наибольшее количество BCRP отмечается в гематоплацентарном барьере на апикальной мембране синцитиотрофобласта [5, 121, 176]. Кроме того, BCRP локализуется в гематоэнцефалическом (на люминальной мембране эндотелиальных клеток микрососудов головного мозга), гематоофтальмическом (в эндотелиальных клетках капилляров сетчатки глаза) и гематотестикулярном барьерах [7, 122, 164]. BCRP локализован также на канальцевой мембране гепатоцитов, в клетках почечных канальцев и в альвеолярных эпителиальных клетках лактирующей молочной железы [112, 176, 184]. Причем количество белка-транспортёра у человека на апикальной мембране проксимальных канальцев почек ниже, чем в клетках печени и кишечника [115, 186]. Помимо вышеперечисленного, расположение BCRP было иммуногистохимически определено в альвеолярных клетках легких, клетках сальных желез, в эндоцервикальных клетках матки, в плоском эпителии шейки матки и в сетчатой зоне коры надпочечников [124].

Следует отметить, что тканевое сосредоточение человеческого BCRP аналогично для его гомолога – *Vscrp1* у мышей и крыс [126].

Описанная локализация BCRP подразумевает, что белок-транспортёр играет важную роль в ограничении всасывания субстратов в тонком кишечнике, их проникновении через тканевые барьеры и облегчении выведения печенью и почками [126].

Локализуясь в кишечнике, BCRP принимает участие в абсорбции лекарственных средств, при этом количество белка в кишечнике человека равно или даже выше, чем количество *Pgp*, что определяет ключевую роль данного

транспортера в межлекарственных взаимодействиях на этапе всасывания [55, 88]. Так, например, совместное пероральное введение элакридара – ингибитора BCRP и топотекана – субстрата белка-транспортера, значительно повышало биодоступность последнего с 40 до 97% [103]. BCRP играет важную роль в таких межлекарственных взаимодействиях, как аторвастатин и типранавир/ритонавир, розувастатин и типранавир/ритонавир, розувастатин и атазанавир/ритонавир, розувастатин и лопинавир/ритонавир, розувастатин и циклоспорин, розувастатин и элтромбопаг, розувастатин и GSK1292263, симвастатин и GSK1292263, сульфасалазин и куркумин, метотрексат и ингибиторы протонной помпы (омепразол, лансопразол или пантопразол) [56, 67, 70, 75, 83, 109, 126, 147]. FDA признало BCRP одним из ключевых переносчиков лекарственных средств, участвующих в межлекарственных взаимодействиях, которые приводят к увеличению AUC (*англ.* area under the curve, площадь под кинетической кривой), C_{max} (*англ.* maximum concentration, максимальная концентрация) и/или клиренса субстратов белка-транспортера при пероральном введении препаратов [171].

Высокий уровень BCRP в гематоплацентарном барьере обуславливает защиту плода от воздействия лекарственных веществ и ксенобиотиков, обеспечивая их эффлюкс из эмбрионального компартмента в кровоток матери. Участие Bcrp1 в проникновении веществ через гематоплацентарный барьер было продемонстрировано на мышах с нокаутом белка-транспортера для топотекана, нитрофурантоина, глибурида и генистеина. Отсутствие Bcrp1 приводило к 2-5-кратному увеличению концентраций тестируемых веществ в плазме крови плода [82, 183, 203]. Однако, только несколько исследований прямо указывают на роль BCRP в развитии фетотоксического действия лекарственных средств и ксенобиотиков [104].

Известно, что, локализуясь в гематоплацентарном барьере, BCRP защищает трофобласты плаценты от окислительного повреждения. Обнаружено, что синтез BCRP в плаценте снижен при задержке внутриутробного роста плода, которая связана с чрезмерным окислительным стрессом [137, 182].

Следует отметить, что на данный момент не установлено зависимости между количеством плацентарного BCRP у человека и животных и сроком беременности [85, 203].

Значительный уровень BCRP в гематоэнцефалическом барьере (ГЭБ) свидетельствует об его участии в проникновении субстратов в головной мозг. Например, концентрация субстрата BCRP сорафениба (ингибитора тирозинкиназы) в головном мозге увеличивалась в четыре раза у мышей с нокаутом *Vscrp1* по сравнению с мышами дикого типа [198]. Так как и *Pgp*, и *Vscrp1* локализованы в ГЭБ, то во многих исследованиях наблюдается синергетический эффект между переносчиками, т.е. проникновение в головной мозг двойного субстрата *Pgp* и BCRP у мышей с нокаутом *Pgp/Vscrp1* намного выше, чем у мышей с одинарным нокаутом *Pgp* или *Vscrp1* [33].

Вероятно, субстратами BCRP являются полипептиды бета-амилоида ($A\beta_{1-40}$), значительное накопление которых в головном мозге приводит к развитию болезни Альцгеймера. Так у мышей с нокаутом *Vscrp1* значительно увеличивалось количество $A\beta_{1-40}$ в головном мозге по сравнению с мышами дикого типа. Также индукция белка-транспортера в головном мозге наблюдается при болезни Альцгеймера с церебральной амилоидной ангиопатией [194].

Наличие BCRP в эндотелиальных клетках капилляров сетчатки способствует ее защите от фототоксинов – феофорбида А и протопорфирина IX, являющихся субстратами BCRP. Выявлено, что использование ингибитора BCRP Ko143 значительно снижало накопление феофорбида А в клетках капилляров сетчатки крыс (TR-iBRB2) [122, 184].

BCRP в апикальной мембране эндотелиальных клеток капилляров и в апикальных мембранах миоидных клеток, окружающих семенные каналы, препятствует проникновению субстратов белка-транспортера через гематотестикулярный барьер [164]. У мышей с нокаутом *Vscrp1* концентрация в семенниках субстратов белка-транспортера – 2-амино-1-метил-6-фенилимидазо[4,5-*b*]пиридина (PhIP), дантролена, празозина и фитоэстрогенов (дайдзеина, генистеина и куместрола) - значительно повышалась по сравнению с

мышами дикого типа [104, 155]. Особенно важна роль BCRP в проникновении через гематотестикулярный барьер фитоэстрогенов, поскольку данные соединения влияют на репродуктивную функцию, снижая массу яичек и количество сперматозоидов [16].

Локализуясь в гепатоцитах и клетках почечных канальцев, BCRP способствует выведению лекарственных веществ и ксенобиотиков с желчью и мочой. Известны межлекарственные взаимодействия с участием данного белка-транспортера на этапе выведения препаратов. Так ингибитор BCRP – пантопразол значительно снижал клиренс метотрексата (субстрата BCRP) у мышей дикого типа при внутривенном введении препаратов, при этом уменьшение клиренса метотрексата не происходило у мышей с нокаутом *Bcrp1* [128].

Известно, что синтез BCRP в молочной железе значительно увеличивается в лактационный период у людей, мышей, коров и овец [184, 204]. Было показано, что в грудное молоко с помощью BCRP активно транспортируются лекарственные средства (топотекан, циметидин), ксенобиотики (PhIP) и витамины (рибофлавин, фолиевая кислота, витамин K₃). При этом BCRP способствует выведению субстратов из организма матери, что, однако, может оказать токсическое действие на ребенка [139, 184]. Причем эффлюкс умеренного количества пищевых ксенобиотиков в молоко матери способствует активации детоксицирующих механизмов в организме ребенка и/или снижает вероятность развития аллергии в более позднем возрасте [50, 139]. Следует отметить, что несмотря на участие BCRP в транспорте рибофлавина, фолиевой кислоты и витамина K₃ в молоко матери, их количество в грудном молоке у мышей с нокаутом *Bcrp1* снижалось незначительно [58, 139, 192].

Известна роль BCRP в развитии подагры, поскольку белок-транспортер участвует в выведении мочевой кислоты с мочой и желчью [72]. У мышей с нокаутом *Bcrp1* наблюдалось снижение кишечной экскреции мочевой кислоты и повышение ее концентрации в плазме крови. Использование линии клеток аденокарциномы ободочной кишки человека (Caco-2) подтвердило вклад BCRP в транспорт мочевой кислоты в просвет кишечника, который значительно снижался

при использовании ингибитора Pgp и BCRP – элакридара и селективного ингибитора BCRP – Ko134, при этом верапамил – селективный ингибитор Pgp не влиял на выведение мочевой кислоты [90].

Локализуясь на плазматической мембране зрелых эритроцитов, Bcrp1 снижает уровень клеточного протопорфирина IX. Повышенное накопление гема и протопорфирина IX в эритроидных клетках приводит к образованию активных форм кислорода, которые повреждают липидный слой мембран, поэтому, предполагается, что BCRP может играть важную роль в защите клеток от окислительного повреждения путем снижения количества порфиринов в клетках [188]. Было показано, что нулевые аллели BCRP определяют новую группу крови Jr(a-) [143].

BCRP обнаружен в стволовых клетках различных тканей человека, включая кровь, островки поджелудочной железы и печень [81, 140, 168]. Количество BCRP повышается в условиях гипоксии, что способствует защите гемопоэтических стволовых клеток от накопления гема, вызывающего гибель митохондрий. Также прямая корреляция между уровнем BCRP и выживаемостью клеток в условиях гипоксии была продемонстрирована *in vitro*, при этом показатели выживаемости снижались при использовании резерпина – ингибитора BCRP [200].

BCRP оказывает негативное влияние на результаты лечения онкологических заболеваний, так как локализуется в опухолевых клетках и влияет на фармакокинетику противоопухолевых средств [2-3, 11, 165]

Данный белок-транспортёр играет важную роль в формировании лекарственной резистентности при гематологических злокачественных новообразованиях, поскольку он часто располагается в мембранах злокачественных гемопоэтических и лимфоидных клеток, а некоторые из препаратов, используемых для лечения этих видов опухолей, являются субстратами BCRP. Кроме того, BCRP синтезируется в раковых стволовых клетках при лейкемии, что вызывает их устойчивость к большому количеству противоопухолевых препаратов [61, 165]. При этом белок-транспортёр увеличивает выживаемость опухолевых клеток, которые после химиотерапии

способны к дифференцировке [170]. Количество BCRP в лейкоцитах также повышается при остром лимфобластном лейкозе В-клеточного и Т-клеточного типов у детей и взрослых [46].

BCRP был обнаружен в клетках рака молочной железы MCF-7 с множественной лекарственной устойчивостью, где он локализовался на плазматической мембране [10, 19]. К тому же клетки рака молочной железы способны образовывать внеклеточные везикулы, содержащие BCRP, MRP1 и Pgp, которые удаляют противоопухолевые средства из цитоплазмы в просвет везикулы, что снижает их концентрацию в клетках [93].

BCRP участвует в транспорте противобластомных средств и, следовательно, вызывает химиорезистентность опухолей пищеварительного тракта [86].

Установлено, что при гепатоцеллюлярной карциноме количество BCRP в опухолевых клетках выше, чем в здоровых гепатоцитах, уровень мРНК BCRP в недифференцированных клетках выше, чем в дифференцированных [23].

BCRP локализуется в апикальной мембране холангиоцитов и эпителиальных клетках желчного пузыря, что указывает на его защитную роль против потенциально токсичных соединений, присутствующих в желчи. Повышенная резистентность к 5-фторурацилу – субстрату BCRP, наблюдалась у пациентов с холангиокарциномой при высоком уровне BCRP, MDR1 и Pgp [86, 181].

Выявлено, что содержание BCRP в гепатоцитах снижается у пациентов с гепатобластомой и увеличивается после её лечения цисплатином и доксорубицином [130].

Показано, что BCRP локализуется в плазматической мембране и внутриклеточном компартменте опухолевых клеток при аденокарциноме желудка [86]. Кроме того, в исследованиях *in vitro* выявили повышенный уровень его мРНК в клетках аденокарциномы желудка, подвергшихся воздействию цисплатина [51].

BCRP в небольшом количестве выявлен в здоровых клетках поджелудочной железы. При этом наблюдается вариабельность его количества при аденокарциноме протоков поджелудочной железы. С помощью иммуногистохимического анализа обнаружено наличие BCRP в опухолевых

клетках поджелудочной железы в 73% образцов, и установлена связь между высоким уровнем белка-транспортера, ранним рецидивом и смертностью больных, получавших адъювантную химиотерапию на основе гемцитабина [159].

Таким образом, BCRP участвует во всех этапах фармакокинетики, что имеет важное значение при совместном применении лекарственных средств, являющимися субстратами и/или модуляторами активности белка. Совместное использование субстрата и ингибитора белка-транспортера может привести к риску развития побочных эффектов вещества-субстрата. Применение субстрата с индуктором BCRP может повлечь снижение биодоступности субстрата и снизить эффективность проводимой фармакотерапии. Поэтому следует определять принадлежность новых лекарственных средств к субстратам и/или модуляторам активности BCRP на этапе доклинических и подтверждать на этапе клинических исследований.

1.4 Субстраты белка резистентности рака молочной железы

На данный момент известно более 200 субстратов BCRP, но не установлено точной связи между структурой вещества и его принадлежностью к субстратам белка-транспортера [126].

Первоначально в качестве субстратов BCRP были выявлены противоопухолевые средства, такие как, метотрексат, митоксантрон, производные камптотецина (топотекан, иринотекан и дифломотекан), флавопиридол и некоторые ингибиторы протеинкиназы (иматиниб, gefитиниб и нилотиниб) [120, 138, 160, 176]. Другие противоопухолевые препараты, например, винбластин, цисплатин и паклитаксел не являются субстратами BCRP [170].

На эпителиальных клетках почек собак Madin-Darby (MDCKII-BCRP) и клетках рака легких Льюиса (LLC-BCRP) была продемонстрирована принадлежность топотекана к субстратам BCRP и Pgp, его отношение коэффициентов кажущейся проницаемости (Papp b-a/Papp a-b) в клетках MDCKII-BCRP было более 6,4, а в клетках LLC-BCRP – более 4,2 [193]. Также было показано, что роль BCRP в транспорте топотекана через монослой клеток Caco-2

значительнее, чем роль Pgp, так как при добавлении ингибитора BCRP – Ko143 значение Papp b-a/Papp a-b снижалось с 6,9 до 1,6, а при использовании ингибитора Pgp – зосувида Papp b-a/Papp a-b уменьшалось с 26 до 13,1 [38].

Выявлено, что BCRP выводит также токсические метаболиты метотрексата – 7-гидроксиметотрексат, моно- и полиглутаматы [91].

Субстраты BCRP не ограничиваются противоопухолевыми средствами. К ним также относятся розувастатин, грепафлоксацин, ацикловир, циметидин, сульфасалазин, глибурид, нитрофурантоин, празозин, пантопразол, зидовудин и ламивудин [30, 105, 128, 146, 183-184]. Анализ внутриклеточного метаболизма зидовудина на Т-лимфоцитарной неопластической клеточной линии показал, что BCRP участвует в эффлюксе не только зидовудина, но и его метаболита 5'-монофосфата [105].

Исследования транспорта сульфасалазина были выполнены на клетках Caco-2, его Papp b-a/Papp a-b составило 87 и снижалось до 2,6 в присутствии фумитреморгина С (FTC) – ингибитора BCRP [36]. Также установлено, что в транспорте сульфасалазина активное участие принимает белок-транспортер 2, ассоциированный с множественной лекарственной устойчивостью (MRP2), поскольку добавление МК-571 – ингибитора MRP2, приводило к уменьшению транспорта изучаемого препарата через монослой клеток Caco-2, а ингибиторы Pgp – верапамил и хинидин не оказывали влияния на его перенос [36, 60].

Транспорт празозина изучался на клеточной линии MDCKII-BCRP - коэффициент чистого потока составил 20,28 [59]. Также в экспериментах на клетках Caco-2 было продемонстрировано незначительное участие Pgp в транспорте празозина [187].

Различные фотосенсибилизаторы, такие как феофорбид А, протопорфирин IX и их родственные соединения (мезопорфирин цинка) являются субстратами BCRP [24]. Выявлено, что у мышей с нокаутом по *Bcrp1* наблюдалось накопление феофорбида А (продукта расщепления хлорофилла) в коже и эритроцитах [185]. Позже было подтверждено активное участие BCRP человека в транспорте данного вещества [149].

Среди субстратов BCRP, обладающих флуоресценцией, выделяют BODIPY-празозин и Hoechst 33342, которые можно использовать для количественной оценки белка-транспортера в клеточных линиях. Флуоресцентные красители, такие как родамин 123 и Lyso-Tracker Green, являются субстратами BCRP с R482G и R482T мутациями, при этом, не являясь субстратами белка-транспортера дикого типа [17, 191].

BCRP участвует в выведении из организма PhIP, 2-амино-3-метилимидазо [4,5-f] хинолина и 3-амино-1,4-диметил-5Н-пиридо [4,3-b] индола, афлатоксина В1 и сульфатных метаболитов бензопирена [32, 47, 199]. PhIP является канцерогеном, который играет ключевую роль в развитии рака молочной железы и простаты [66].

Было показано, что PhIP транспортируется через монослой клеток MDCKII-BCRP с показателем Papp b-a/Papp a-b равным 15,8 [193]. На клетках Caco-2 продемонстрировано снижение транспорта PhIP в присутствии двойного ингибитора BCRP и Pgp - элакридара [32]. В экспериментах на клеточной линии LLC-Mdr1a (Pgp) транспорт PhIP был незначительный, но биодоступность вещества у крыс с дефицитом Mrp2 была существенно повышена [155]. Таким образом, можно предположить, что PhIP также является низкоаффинным субстратом Pgp и MRP2. Однако последующие исследования не показали корреляции между уровнем MRP2 и переносом PhIP через плаценту человека [25].

BCRP участвует в эффлюксе женских половых гормонов и их глюкуронидов. Установлено, что транспортер активно переносит эстрон глюкуронида, эстриол-3-глюкуронид, а эстрон-3-сульфат является специфичным и высокоаффинным субстратом BCRP. MRP2 и Pgp не участвуют в транспорте глюкуронидов эстрогена, в отличие от белка-транспортера 3, ассоциированного с множественно лекарственной устойчивостью (MRP3), который имеет сродство к этим веществам, но транспорт веществ происходит с более низкой скоростью, чем с участием BCRP [78, 87]

Эстрон-3-сульфат (E3S) считается субстратом BCRP. Транспорт E3S через монослой клеток Caco-2 оценивался в трех исследованиях, в соответствии с которыми Papp b-a/Papp a-b были равны 12,8, 22,7 и 8,98 и снижались при

использовании ингибиторов BCRP [48, 89]. Установлено, что количество E3S в клетках Caco-2, нокаутированных по Pgp, возрастало по сравнению с клетками Caco-2 дикого типа, при этом Papp b-a/Papp a-b уменьшалось при добавлении зосувида – ингибитора Pgp [69]. Показана низкая проницаемость E3S через монослой клеток MDCKII-BCRP и LLC-BCRP [167, 193]. Активный транспорт E3S в клетках MDCKII наблюдался при совместном присутствии BCRP и полипептидного транспортера органических анионов (OATP2B1) [145].

К субстратам BCRP относится ряд веществ растительного происхождения: кверцетин, генистеин, дайдзеин, куместрол и ресвератрол [43-44, 132, 193]. Исследование транспорта кверцетина было выполнено на клетках MDCKII-BCRP, его Papp b-a/Papp a-b составило 97,5 и снижалось до 8,37 в присутствии кемпферола – ингибитора BCRP [35].

В исследованиях оценки транспорта генистеина через монослой клеток MDCKII-BCRP были получены противоречивые результаты. В одном эксперименте Papp b-a/Papp a-b равнялось 2,36 и коэффициент чистого потока 1,95, а в другом сообщалось о более высоких значениях Papp b-a/Papp a-b (6,9) и коэффициента чистого потока (6,1) [82, 193]. В клетках Caco-2 отношение коэффициентов кажущейся проницаемости было 3,5, и снижалось до 1,1 при добавлении FTC – ингибитора BCRP, при этом добавление ингибитора Pgp – зосувида не оказывало влияния на транспорт генистеина (Papp b-a/Papp a-b = 3,3) [69].

Показатель Papp b-a/Papp a-b дайдзеина в клетках MDCKII-BCRP составил 4,12, а коэффициент чистого потока 3,0 [82]. Установлено, что дайдзеин не транспортируется с помощью Pgp, что позволяет предположить, что он является специфическим субстратом BCRP. В экспериментах на клетках Caco-2 Papp b-a/Papp a-b составил 1,1, поэтому исследований с использованием ингибиторов BCRP не проводилось [82, 111]. Следует отметить, что метаболиты второй фазы генистеина и дайдзеина, которые образуются в кишечнике, активно переносятся белком-транспортером, что свидетельствует о его значительной роли во всасывании данных веществ [43-44].

Транспорт куместрола в клетках MDCKII-BCRP оценивался в двух исследованиях, по результатам которых $P_{app} b-a/P_{app} a-b$ равнялись 5,1 и 3,26, а коэффициенты чистого потока – 3,9 и 2,3 соответственно [82, 193].

BCRP участвует в выведении уратов почками и кишечником [72]. Установлено также значительное повышение накопления мочевой кислоты в эндотелиальных клетках пупочной вены, трансфицированных BCRP [117].

Таким образом, BCRP имеет широкую субстратную специфичность, которая существенно перекрывается, но в то же время отличается от Pgp или MRP1, MRP2, MRP3, OATP2B1 [125, 170]. Данный белок-транспортер способен переносить как липофильные вещества (например, митоксантрон), так и гидрофильные органические соединения (например, сульфатированные конъюгаты), тогда как Pgp участвует в транспорте преимущественно липофильных субстанций [57, 173]. Ряд субстратов BCRP - глибурид, иматиниб, празозин - также являются субстратами Pgp. Перекрытие субстратной специфичности между BCRP и Pgp может привести к усилению эффлюкса лекарственных веществ и ограничить их проникновение через тканевые барьеры, в частности, через ГЭБ [33, 116].

1.5 Ингибиторы и индукторы белка резистентности рака молочной железы

Ряд лекарственных веществ может модулировать активность BCRP. Ингибиторы снижают его функциональную активность, что ассоциировано с развитием нежелательных лекарственных реакций. Индукторы, напротив, повышают активность белка-транспортера, что может приводить к снижению эффективности проводимой фармакотерапии.

На данный момент выявлено несколько индукторов BCRP, к которым относятся телапревир, риоцигуат, венлафаксин [126, 179]. Телапревир показал индуцирующую способность в отношении BCRP в экспериментах на клеточной линии аденокарциномы толстой кишки человека (LS180) [208]. Риоцигуат – стимулятор растворимой гуанилатциклазы, индуцировал экспрессию мРНК гена *BCRP* при концентрации 20 мкМ на клеточной линии LS180 [163]. Венлафаксин

снижал Pgp a-b родамина-123 (субстрата BCRP и Pgp) в клетках линии Caco-2, что обусловлено усилением синтеза BCRP и Pgp [106].

К ингибиторам BCRP относится ряд антиретровирусных препаратов, такие как ингибиторы протеазы ВИЧ (нелфинавир, саквинавир, ритонавир, паритапревир и дазабувир) [96], нуклеозидные ингибиторы обратной транскриптазы (абакавир, ампренавир, атазанавир, делавирдин, эфавиренц, лопинавир) [134] и ингибитор протеазы вируса гепатита С – боцепревир [101]. Ритонавир, паритапревир и дазабувир проявляли ингибирующие свойства в отношении BCRP, Pgp, OATP1B1 и OATP1B3, при этом ритонавир преимущественно ингибировал Pgp, а паритапревир – BCRP [129]. Установлено, что омбитасвир не влиял на активность ни одного из четырех указанных транспортеров [129].

Активность BCRP подавляют противоопухолевые средства из группы ингибиторов тирозинкиназы (гефитиниб, иматиниб, лапатиниб, фостаматиниб, авапритиниб, алектиниб, дазатиниб, понатиниб, сорафениб, тивозаниб) [39, 94, 179], тамоксифен и его производные [162].

Установлено, что лапатиниб уменьшал транспорт циметидина (субстрата BCRP) в клетках MDCKII-BCRP (IC_{50} – концентрация полумаксимального ингибирования = 0,025 мкМ), а транспорт дигоксина (субстрата Pgp) в клетках MDCKII-MDR1 (Pgp) ингибировал в меньшей степени (IC_{50} 3,9 мкМ) [196]. При этом в исследовании на эмбриональных клетках почек человека (HEK293), гиперэкспрессирующих ген *MRP2*, и на клетках мышинных фибробластов, трансфицированных геном белка-транспортера 4, ассоциированного с множественной лекарственной устойчивостью (*MRP4*) лапатиниб не проявлял ингибирующие свойства в отношении этопозиды (субстрата *MRP2*) и 6-меркаптопурина (субстрата *MRP4*) [118]. Таким образом, лапатиниб проявляет селективность в отношении BCRP *in vitro* [27]. В экспериментах *in vivo* было показано, что данный препарат ингибирует BCRP в дозировке 250 мг, а в дозировке 1250 мг может оказывать влияние на активность OATP2B1 и некоторых изоферментов цитохрома P450 [45].

Исследования фостаматиниба в качестве ингибитора BCRP, показали, что он способен увеличивать AUC розувастатина (субстрата BCRP) на 96% и C_{max} на 88% [77]. Также фостаматиниб является ингибитором Pgp, поскольку он увеличивал эффлюкс дигоксина (субстрата Pgp) на 37% [76].

Некоторые иммунодепрессивные средства – циклоспорин, такролимус и сиролимус – также являются ингибиторами BCRP [41]. Циклоспорин ингибировал BCRP-опосредованный транспорт PhIP (субстрата BCRP) в клетках MDCKII-BCRP с IC₅₀ 11,1 мкМ [193]. В экспериментах на клетках Caco-2 циклоспорин снижал Papp b-a/Papp a-b E3S (субстрата BCRP) с 11 до 3,8 [36]. Циклоспорин также является ингибитором Pgp, поскольку он уменьшал транспорт дигоксина (субстрата Pgp) в клетках LLC-MDR1 (Pgp) с IC₅₀ 1,4 мкМ, а Papp b-a/Papp a-b с 11 до 1 [36]. При этом циклоспорин снижал MRP2-опосредованный транспорт карбоксидихлорфлуоресцеина (субстрата MRP2) с IC₅₀ 5,4 мкМ, однако не влиял на эффлюкс микофеноловой кислоты (субстрата MRP4) в клетках HEK293, гиперэкспрессирующих ген *MRP4* [53, 158]. Таким образом, циклоспорин является ингибитором ряда белков-транспортёров, однако более выражено подавляет активность Pgp, чем BCRP и MRP2 [27]. В экспериментах *in vivo* также была продемонстрирована способность циклоспорина ингибировать активность OATP и ряда изоферментов цитохрома P450 [71].

Антиагрегант дипиридамола проявлял ингибирующую активность в отношении BCRP в экспериментах на клетках HEK293-BCRP. IC₅₀ дипиридамола составила 6,4±0,9 мкМ. В исследованиях транспорта дипиридамола через монослой клеток MDCKII-BCRP, отношение Papp b-a/Papp a-b дипиридамола снижалось при использовании верапамила (ингибитора Pgp), и не менялось при применении FTC – ингибитора BCRP, что свидетельствует о принадлежности дипиридамола к субстратам Pgp [41].

Блокаторы протонной помпы (омепразол, пантопразол, рабепразол, лансопразол) [52, 56, 128] проявляют ингибирующую активность в отношении BCRP, однако пантопразол и рабепразол не оказали сильного влияния на фармакокинетику субстратов BCRP сульфасалазина и розувастатина [142, 144].

Блокаторы медленных кальциевых каналов, относящиеся по химическому строению к производным дигидропиридина (нимодипин, нитрендипин, никардипин) являются ингибиторами BCRP. Тогда как другие блокаторы медленных кальциевых каналов, не имеющие в структуре дигидропиридина, не проявляют ингибирующую активность в отношении данного белка-транспортера. Никардипин, нитрендипин и нимодипин ингибировали BCRP-опосредованный эффлюкс митоксантрона (субстрата BCRP) в исследованиях на трансфицированных клетках HEK293-BCRP. При этом никардипин проявлял более сильную ингибирующую способность в сравнении с другими производными дигидропиридина: IC₅₀ никардипина и нифедипина составили $4,8 \pm 1,3$ мкМ и $13,7 \pm 3,8$ мкМ соответственно [41].

Антигипертензивные средства – резерпин, лозартан, кандесартан цилексетил и телмисартан – также являются ингибиторами BCRP [108]. Телмисартан и кандесартан цилексетил ингибировали эффлюкс феофорбида А (субстрата BCRP) на клетках MDCKII-BCRP: значение IC₅₀ для телмисартана составило $16,97 \pm 0,04$ мкМ. Телмисартан и кандесартан цилексетил снижали эффлюкс субстрата Pgp – ацетометоксипроизводного кальцеина (кальцеина-AM) в клеточной линии моноцитарного лейкоза мышей с повышенным уровнем *mdr1a/1b* (P388/dx), телмисартан уменьшал транспорт флуоресцентного красителя CDCF (субстрата MRP2) в мембранных везикулах, содержащих MRP2. Таким образом, телмисартан и кандесартан цилексетил не являются селективными ингибиторами BCRP [108].

К ингибиторам BCRP относятся некоторые противогрибковые препараты – кетоконазол, итраконазол, флуконазол, изавуконазол, позаконазол, амфотерицин В, каспофунгин и микафунгин, противомалярийные препараты, такие как, артемизин, атоваквон, хлорохин, дигидроартемизин, люмефантрин, мефлохин, прогуанил, хинин [107, 154]. Атоваквон показал высокую ингибирующую активность в отношении BCRP в исследованиях на клетках HEK293-BCRP: IC₅₀ атоваквона составила 0,23 мкМ. Хинин и хлорохин, помимо BCRP, ингибировали также Pgp. Мефлохин помимо ингибирования BCRP, снижал активность Pgp, MRP1 и MRP3 [154].

Ингибиторами BCRP также являются противомикробные препараты: новобиоцин, сульфасалазин, рифампифин и фузидиевая кислота [92, 161, 207].

Новобиоцин в дозе 30 мкМ полностью ингибировал транспорт иринотекана – субстрата BCRP в клетках MDCKII-BCRP [73]. Он показал значения IC₅₀ 0,064 мкМ и 0,095 мкМ в везикулах, полученных из инфицированных бакуловирусом клеток насекомых (Sf9-BCRP) и в везикулах клеток HEK293-BCRP соответственно [73]. При этом новобиоцин в дозе 60 мкМ существенно не ингибировал активность Pgp, оцененную по транспорту кальцеина-АМ даунорубицинового красителя – субстратов Pgp, а в дозе 300 мкМ не влиял на Pgp в клетках MDCKII-MDR1 (Pgp) [169, 178]. Таким образом, новобиоцин является селективным ингибитором BCRP [27].

Сульфасалазин ингибировал BCRP-опосредованный транспорт E3S (субстрата BCRP) в везикулах клеток HEK293-BCRP [207]. При этом препарат частично снижал MRP2-опосредованный транспорт эстрадиола-17β-глюкуронида и увеличивал АТФазную активность MRP2 [99, 102]. Низкая проницаемость сульфасалазина в клеточных системах на основе MDCKII и других клеточных линий делает его неоптимальным для использования в качестве ингибитора BCRP *in vitro* [27, 99, 193].

Агонист тромбопоэтиновых рецепторов - элтромбопаг ингибировал BCRP-опосредованный транспорт PhIP (субстрата BCRP) в клетках MDCKII-BCRP с IC₅₀ равной 35,7 мкМ, а в клетках Caco-2 снижал транспорт розувастатина (субстрата BCRP) со значением абсолютной константы ингибирования (K_i, *англ.* absolute inhibition constant) 2,1 мкМ [169, 193]. Исследования по ингибированию АТФ-зависимого поглощения E3S и метотрексата (субстрата BCRP) в мембранные везикулы показали значения IC₅₀ 3,4 мкМ и 3,1 мкМ соответственно [193]. Элтромбопаг не оказывал влияния на Pgp-зависимое поглощение родамина 123 (субстрата Pgp) клетками LLC, трансфицированными кДНК Pgp человека, поэтому он не относится к модуляторам активности Pgp. При этом элтромбопаг ингибирует OATP1B1 со значением IC₅₀ равным 0,1 мкМ и белок-транспортер органических катионов OCT1 с IC₅₀ равной 39 мкМ [27, 109].

К ингибиторам BCRP, не являющимися лекарственными средствами, относятся элакридар, тарикридар и FTC [134, 152]. Элакридар ингибировал BCRP-опосредованный транспорт PhIP (субстрата BCRP) в клетках MDCKII-BCRP с IC₅₀ 0,16 мкМ, а в клетках Caco-2 при концентрации 2 мкМ он снижал Papp b-a/Papp a-b E3S (субстрата BCRP) с 8,1 до 1,5 [89, 193]. Исследования по подавлению АТФ-зависимого поглощения E3S и метотрексата (субстрата BCRP) в мембранные везикулы показали незначительную зависимость ингибирующих свойств элакридара от используемого субстрата, поскольку наблюдалась 4-кратная разница в значениях IC₅₀ для изучаемых веществ (0,15 мкМ и 0,60 мкМ) [193]. Элакридар ингибировал транспорт дигоксина (субстрата Pgp) в клетках Caco-2 значительнее, чем в клетках MDCKII-MDR1 (Pgp), однако не влиял на MRP2-опосредованный транспорт винбластина (субстрата MRP2) в клетках MDCKII-MRP2. Таким образом, элакридар относится к специфическим ингибиторам Pgp и BCRP [114].

Типичным примером селективного ингибитора BCRP является FTC, секретируемый грибами *Aspergillus fumigatus* со значением IC₅₀ ~ 1 мкМ [160]. Однако высокая нейротоксичность FTC исключает его использование в исследованиях *in vivo*. FTC снижал BCRP-опосредованный транспорт PhIP (субстрата BCRP) в клетках MDCKII-BCRP с IC₅₀ 0,20 мкМ [193]. Также было показано ингибирование АТФ-зависимого поглощения E3S и метотрексата (субстратов BCRP) в мембранные везикулы с IC₅₀ 0,25 мкМ и 0,45 мкМ соответственно [193]. В экспериментах с использованием клеток Caco-2 FTC в концентрации 1 мкМ полностью блокировал транспорт E3S и генистеина (субстратов BCRP), а в концентрации 10 мкМ снижал Papp b-a/Papp сульфасалазина (субстрата BCRP) с 87 до 2,6. При этом в эксперименте на той же клеточной линии в концентрации 10 мкМ он частично ингибировал перенос субстратов Pgp – дигоксина и паклитаксела [36, 69]. Однако в клетках линии MDCKII-MDR1 FTC в концентрации 10 мкМ не оказывал влияния на транспорт дигоксина и паклитаксела [69]. Таким образом, специфичность ингибирующей активности FTC зависит от используемой клеточной системы [27].

При исследовании синтетических аналогов FTC: Ko132, Ko134 и Ko143, обладающих более низкой нейротоксичностью, было отмечено усиление их ингибирующих свойств и более высокая селективность (со значениями IC₅₀ 0,1–0,2 мкМ) [156]. В эксперименте на эпителиальных клетках рака молочной железы человека, гиперэкспрессирующих ген *BCRP*, (MCF7-MX) Ko134 ингибировал BCRP-опосредованный транспорт Hoechst33342 – флуоресцентного субстрата BCRP (IC₅₀ 0,06 мкМ) и Pgp-опосредованный транспорт кальцеина-AM (IC₅₀ 2,04 мкМ), что подтверждает его селективность по отношению к BCRP [177]. Ko143 подавлял BCRP-опосредованный транспорт PhIP в клетках MDCKII-BCRP с IC₅₀ 0,020 мкМ [193]. В экспериментах по ингибированию АТФ-зависимого поглощения E3S и метотрексата в мембранные везикулы показана зависимость концентрации Ko143 от используемого субстрата: значения IC₅₀ составили 0,015 мкМ и 0,052 мкМ соответственно [193]. Ko143 ингибировал в эксперименте на клеточной линии MCF7-MX BCRP-опосредованный эффлюкс Hoechst33342 со значением IC₅₀ 0,06 мкМ, и Pgp-опосредованный эффлюкс кальцеина-AM со значением IC₅₀ 8,74 мкМ, что подтверждает его селективность в отношении BCRP [177].

Большое количество флавоноидов, таких как, апигенин, биоханин А, генистеин, гесперидин, кемпферол, нарингенин, кверцетин, хризин, дейдзейн, ресвератрол, силимарин, и флаван также могут снижать активность BCRP [14, 205, 209].

Природное вещество куркумин ингибировал BCRP-опосредованный транспорт сульфасалазина с IC₅₀ 0,7 мкМ, а Pgp с IC₅₀ 5,8 мкМ [64, 147]. Кроме того, куркумин является субстратом Mgp2 у крыс и снижает активность MRP2 в везикулах Sf9-MRP2 с IC₅₀ 5 мкМ [110, 119]. При этом показано, что в клетках MDCKII, трансфицированных по MRP1 или MRP2, ингибирование обоих транспортеров под влиянием куркумина уменьшалось что, вероятно, являлось следствием образования метаболитов с глутатионом в интактных клеточных линиях [110]. Считается, что куркумин является более сильным ингибитором BCRP, чем Pgp или MRP2 [27].

К ингибиторам BCRP относятся халкон, хромон и их производные [54]. Были синтезированы производные хромона, которые являются более активными, селективными и нетоксичными ингибиторами белка-транспортера (со значением IC₅₀ равным 0,11 мкМ) [133].

Таким образом, большинство выявленных ингибиторов BCRP являются неселективными, поскольку способны подавлять активность других белков суперсемейства ABC-транспортеров. В течении последних 10 лет был синтезирован ряд химических веществ – производных уже известных ингибиторов, таких как ресвератрол, тариквидар, хромон и халкон, обладающих более высокой селективностью в отношении ингибирования BCRP, однако поиск селективных, эффективных и безопасных ингибиторов данного белка-транспортера ведется и в настоящее время.

1.6 Тестирование веществ на принадлежность к субстратам и ингибиторам белка резистентности рака молочной железы

Одним из методов идентификации ингибиторов BCRP является проточная цитометрия, с помощью которой обнаружено большое количество блокаторов данного белка-транспортера, например, нуклеозидные ингибиторы обратной транскриптазы, блокаторы медленных кальциевых каналов и др [179]. В данном методе используют трансфицированные клеточные линии или клеточные линии, отобранные по способности участвовать в транспорте вещества-субстрата BCRP. Трансфицированные клетки гиперэкспрессируют только ген *BCRP* и представляют собой высокоселективную модель для идентификации ингибиторов транспортера, которая исключает влияние других белков-переносчиков. Для проведения данного метода применяют субстраты, способные к флуоресценции. Определяемая с помощью проточной цитометрии, внутриклеточная флуоресценция зависит от активности BCRP: ингибитор будет увеличивать флуоресценцию, так как способность вещества-субстрата проникать в клетку повышается при снижении активности белка-транспортера. Свойство вещества ингибировать BCRP может быть указано в процентах ингибирования по отношению к контролю, где в качестве

контроля применяется эталонный ингибитор, чаще всего это Ко143 или клеточная линия, не содержащая BCRP [131, 133].

Для выявления ингибиторов BCRP также используют метод химиорезистентности, основанный на способности противоопухолевых средств, транспортируемых BCRP, вызывать гибель клеток. В качестве таких субстратов могут использоваться митоксантрон и активный метаболит иринотекана. Клеточная линия, не содержащая BCRP (родительская клеточная линия) и клеточная линия, содержащая повышенное количество BCRP, подвергаются действию цитотоксического агента с концентрацией, которая вызывает снижение роста клеток на 50% (IG50 – концентрация полуингибирования роста клеток). Если тестируемое вещество является ингибитором изучаемого белка-транспортера, то значение IG50 в клеточной линии, содержащей повышенное количество BCRP, снижается, потому что BCRP менее активно участвует в эффлюксе цитотоксического агента из клеток. Полное ингибирование BCRP-опосредованного транспорта наблюдается, когда значение IG50 на клетках, содержащих повышенное количество транспортера, приближенно к значению IG50 на родительской клеточной линии [131, 195].

Поскольку транспорт лекарственных средств с участием BCRP зависит от гидролиза АТФ, то анализ активности АТФазы может косвенно определить является ли анализируемое вещество ингибитором белка-транспортера. Активность АТФазы измеряется на клеточных мембранах млекопитающих или насекомых [153]. Считается, что субстраты BCRP повышают активность АТФазы, а функциональные ингибиторы ее подавляют. Многие ингибиторы BCRP действительно снижают активность АТФазы, например, Ко143. Однако некоторые из них, например, порфирин, слабо уменьшают ее активность, не влияют, как индено-[1,2- b]-индол, или увеличивают, как метоксистильбены и аналоги куркумина [20, 133, 148].

Еще одним методом для определения принадлежности лекарственных веществ к субстратам или ингибиторам BCRP является оценка двунаправленного транспорта вещества через монослой клеточной линии, содержащей повышенное

количество данного белка. Для проведения анализа используют трансвелл-системы, состоящие из базолатеральной камеры и, погруженной в нее, апикальной камеры, разделенных полупроницаемой мембраной, на которую высеиваются клетки. Клеточные линии, применяемые в данном методе, могут экспрессировать гены и других белков-транспортёров, участвующие в транспорте анализируемых веществ, тогда следует проводить эксперименты с участием селективного ингибитора BCRP, который будет менять транспорт вещества-субстрата [206]. Этот метод рекомендуется регулирующими организациями разных стран для оценки влияния новых лекарственных препаратов на белки-транспортёры на этапе доклинических исследований.

Таким образом, тестирование веществ на принадлежность к субстратам и ингибиторам белка резистентности рака молочной железы оптимальнее всего проводить с применением транспортного эксперимента, однако следует подобрать вещества-субстраты BCRP, которые показывают интенсивный двунаправленный транспорт через монослой клеток, содержащих BCRP, при низких концентрациях и не оказывают существенного влияния на их жизнеспособность.

ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

2.1 Клеточная линия и условия культивирования

Клеточная линия аденокарциномы ободочной кишки человека (Caco-2) была закуплена в ЦКП «Коллекция культур клеток позвоночных», Федеральное государственное бюджетное учреждение науки «Институт цитологии Российской академии наук», г. Санкт-Петербург, Россия, а им была получена из Американской коллекции типовых клеточных культур (*англ.*: American Type Culture Collection), США. Использовали пассажи 10, 12 и 15. Данная клеточная линия имеет морфологические и функциональные сходства с кишечными (абсорбирующими) энтероцитами человека после дифференцировки в течение 21 дня [95]. Клетки Caco-2 культивировали в Дульбекко модифицированной среде Игла (DMEM), содержащей глюкозу 4500 мг/л, с добавлением L-глутамина (4 ммоль/л) («Sigma-Aldrich», Германия), 15% фетальной бычьей сыворотки (FBS) («Sigma-Aldrich», Германия) и по 100 ЕД/мл пенициллина и стрептомицина («ПанЭко», Россия) соответственно. Клетки инкубировали в течение 21 дня с 5% содержанием углекислого газа при температуре 37°C. Смену питательной среды выполняли каждые 24 часа. Проводили по 3 повторения на каждый эксперимент.

2.2 Методики количественного определения метотрексата, митоксантрона и кверцетина методом ВЭЖХ-МС/МС и их валидация

Концентрацию тестируемых веществ (метотрексата, митоксантрона и кверцетина) анализировали с помощью высокоэффективной жидкостной хроматографии с тандемным масс-спектрометрическим детектированием. Работа выполнена на высокоэффективном жидкостном хроматографе «Ultimate 3000» («Thermo Fisher», США), оснащенном градиентным насосом, дегазатором, автосемплером и тандемным масс-селективным детектором TSQ Fortis («Thermo Fisher», США). Управление совмещенной системой ВЭЖХ-МС/МС и обработку данных проводили при помощи программного обеспечения «Thermo Scientific Xcalibur (ver. 4.2.47)». В исследовании использовали обращенно-фазную колонку

UCT Selectra C18 4,6 мм*100 мм 5 мкм, 100 А, предколонку Selectra C18 Guard Cartridges SLC-18 GDC46-5UM.

Диапазон концентраций тестируемых веществ выбирали исходя из концентраций, полученных после выполнения пилотного исследования. Концентрации целевых соединений в анализируемых пробах определяли методом абсолютной калибровки по площади пика. Условия проведения анализа представлены в Таблицах 1 и 2. В описанных методиках внутренний стандарт не использовался. Более подробно разработанные методики количественного определения тестируемых веществ описаны в разделе «Результаты».

Таблица 1 – Параметры хроматографирования метотрексата, митоксантрона и кверцетина

Параметр хроматографирования	Анализируемое вещество		
	Метотрексат	Митоксантрон	Кверцетин
Объем вводимой пробы, мкл	2	5	5
Скорость потока подвижной фазы, мл/мин	0,3	0,3	0,5
Температура разделения, °С	35	35	35
Время анализа, мин	10	10	11
Состав подвижной фазы	0,1% раствор муравьиной кислоты и ацетонитрил	0,1% раствор муравьиной кислоты и метанол	0,1% раствор муравьиной кислоты и ацетонитрил
Режим элюирования	Градиентный	Градиентный	Градиентный
Время удерживания, мин	3,11±0,023	5,51±0,013	3,91±0,033
Аналитический диапазон, нМ	60–10000	50–1000	5–500

Таблица 2 – Масс-спектрометрические параметры детектирования метотрексата, митоксантрона и кверцетина

Параметр детектирования	Анализируемое вещество		
	Метотрексат	Митоксантрон	Кверцетин
Режим ионизации	положительный	положительный	негативный
Напряжение электроспрея, В	3500	3700	3000
Sheath gas (оболочечный газ), Arb	35	50	50
Aux gas (вспомогательный газ), Arb	7	10	10
Sweep gas (продувочный газ), Arb	0	1	10
Температура трубки для переноса ионов, °С	300	300	300
Температура испарителя, °С	350	350	350
Переходы масс	455 m/z → 308,1 m/z и 455 m/z → 174,9 m/z	455 m/z → 88,2 m/z и 455 m/z → 358,1 m/z	301 m/z → 150,9 m/z и 301 m/z → 178,9 m/z
Энергия столкновения, В	23 и 20	25 и 18	22 и 17
Фрагментация источника	5	0	5
Давление аргона, мТорр	2	2	1

В качестве матрицы использовали транспортную среду, представляющую собой раствор Хэнкса с 25 мМ Хепес и 1% раствором диметилсульфоксида, после инкубации с клетками линии Сасо-2 в течение 3 часов.

Приготовление матричного раствора и калибровочных растворов.

Метотрексат. Матричный раствор: 2,3 мг метотрексата (в виде гидрата) («Sigma Aldrich», Германия) растворяли в 5 мл метанола для получения раствора с концентрацией 0,46 мг/мл или 10^{-6} моль/мл или 1 мМ, а затем к 1 мл полученного раствора добавляли 9 мл смеси воды и метанола в соотношении 1:1 для получения

раствора с концентрацией 100 мкМ. Матричный раствор хранили при температуре -20°C . В работе использовали следующие калибровочные стандарты: 60, 100, 200, 600, 1000, 2000 и 10 000 нМ. Калибровочные стандарты для валидации были приготовлены путем последовательного разбавления матричного раствора транспортной средой.

Митоксантрон. Матричный раствор: 1,3 г митоксантрона (в виде гидрохлорида) («Sigma Aldrich», Германия) растворяли в 1,3 мл метанола для получения раствора с концентрацией 1 мг/мл, что соответствует 2200 мкМ, 440 мкл полученного раствора добавляли к 560 мкл метанола для получения раствора с концентрацией 1000 мкМ, его хранили при температуре -20°C . Калибровочные растворы с концентрациями 50, 100, 200, 400, 600, 800 и 1000 нМ готовили путем разбавления матричного раствора транспортной средой.

Кверцетин. Матричный раствор: 2,6 мг кверцетина («Sigma Aldrich», Германия) растворяли в 2,6 мл метанола для получения раствора с концентрацией 1,0 мг/мл, что соответствует 3310 мкМ, а затем 300 мкл полученного раствора добавляли к 700 мкл метанола для получения раствора с концентрацией 1000 мкМ. Матричный раствор хранили при температуре -20°C . Из него путем разбавления транспортной средой готовили калибровочные растворы с концентрациями 5, 10, 20, 50, 100, 200 и 500 нМ.

Пробоподготовка заключалась в осаждении белков транспортной среды, после инкубации с клетками: для метотрексата ее осуществляли смесью метанола и воды в соотношении 1:1 (50 мкл пробы и 950 мкл смеси), митоксантрона – метанолом (200 мкл пробы и 800 мкл метанола), кверцетина - смесью ацетонитрила и воды в соотношении 1:1 (50 мкл пробы и 950 мкл смеси). Далее образцы тщательно перемешивали на встряхивателе Vortex («Heidolph», Германия), после чего центрифугировали в течение 10 мин при 13000 g на центрифуге Avanti JXN-3 («Beckman Coulter», США). Надосадочную жидкость переносили в вials и помещали в автосемплер.

Биоаналитические методики были валидированы по следующим параметрам: селективность (избирательность), нижний предел количественного определения,

линейность, внутри- и межцикловая правильность (точность) и прецизионность, стабильность образцов в процессе заморозки/разморозки, отсутствие переноса пробы и матричного эффекта в соответствии с Правилами проведения исследований биоэквивалентности лекарственных препаратов в рамках Евразийского экономического союза.

Селективность проверяли путем анализа холостой пробы транспортной среды без добавления стандарта анализируемого вещества и образцов транспортной среды с добавлением анализируемого вещества до конечных концентраций, соответствующих НПКО. На хроматограммах образцов холостой транспортной среды не должно наблюдаться пиков со временем удерживания, соответствующим времени удерживания анализируемых веществ.

Нижним пределом количественного определения (НПКО) анализируемого вещества является наименьшая концентрация, при которой правильность и прецизионность не превышает 20% и отношение сигнала к шуму не ниже 10.

Калибровочные кривые строили в трех повторностях по не менее 6 точкам, соответствующим концентрациям калибровочных растворов. По полученным значениям были построены калибровочные графики зависимости площади пика от концентрации вещества и получены уравнения регрессии не менее трех. Рассчитанные коэффициенты корреляции должны быть не менее 0,99. Экспериментально рассчитанные концентрации калибровочных стандартов должны быть в пределах $\pm 15\%$ от номинальных значений, для НПКО это значение должно быть в пределах $\pm 20\%$.

Правильность (точность) аналитической методики выражает близость полученных с помощью нее значений к номинальным концентрациям анализируемого вещества. *Прецизионность* – это степень близости результатов между отдельными повторными измерениями, выражающаяся в виде относительного стандартного отклонения (коэффициента вариации). Для определения точности и прецизионности готовили серию растворов контроля качества независимо от калибровочных растворов, используя предварительно приготовленные исходные растворы. Использовали четыре рекомендованные

концентрации, входящие в диапазон методики: НПКО, тройная величина НПКО (нижний уровень), около 30-50% от верхней границы определяемых концентраций (средний уровень), не менее 75% от верхней границы определяемых концентраций (верхний уровень). Параметры внутри цикла определяли с помощью первого уравнения регрессии путем анализа не менее 5 образцов одной концентрации для 4 растворов контроля качества. Параметры между циклами определяли с помощью трех уравнений регрессии (полученных в течение 3 дней) путем анализа аналогичных концентраций. Полученные величины прецизионности и точности должны быть не более 20% для НПКО и не более 15% – для остальных точек.

Стабильность анализируемого вещества в исследуемом образце оценивали, используя образцы нижнего и верхнего уровня концентраций растворов контроля качества, которые исследовали сразу после их пробоподготовки, после трехкратной заморозки-разморозки при температуре -80°C , после хранения при температуре -80°C в течение 60 суток и после кратковременного хранения в условиях комнатной температуры. Правильность для каждой из концентраций (для средних значений) должна находиться в пределах $\pm 15\%$ от номинального значения.

Эффект переноса оценивали, вводя холостые пробы после образцов с высокой концентрацией, лежащей в диапазоне методики. Перенос не должен превышать 20% величины нижнего предела количественного определения.

Матричный эффект оценивали путем вычисления отношения максимальной площади пика в присутствии матрицы (определяется путем анализа подготовленного холостого образца с добавленной известной концентрации анализируемого вещества) к максимальной площади пика в отсутствие матрицы (чистый раствор анализируемого вещества в той же концентрации) для каждой серии матрицы для всех анализируемых веществ. Относительное стандартное отклонение эффекта матрицы, рассчитанного для 6 образцов, не должно превышать 15%.

2.3 Методика количественного определения этилметилгидроксипиридина сукцината методом ВЭЖХ-УФ и ее валидация

Количественный анализ этилметилгидроксипиридина сукцината проводили с помощью высокоэффективной жидкостной хроматографии по методике, разработанной ранее для определения вещества в плазме крови крыс и кроликов [9]. В работе использовали высокоэффективный жидкостный хроматограф «Стайер» (Россия), оснащенный УФ-спектрофотометрическим детектором, ввод пробы осуществляли вручную шприцем. Детектирование проводили при длине волны 296 нм в изократическом режиме. При анализе использовали хроматографическую колонку Beckman Coulter (США) 4,6*150 мм (зернение 5 мкм). Модификация методики состояла в изменении состава и скорости потока подвижной фазы и температуры разделения. Подвижная фаза состояла из ацетонитрила и воды в объемном отношении 20:80 с добавлением уксусной кислоты до pH 3,25. Температура разделения – 35°C. Скорость потока – 0,8 мл/мин. Вышеперечисленные изменения позволили уменьшить время удерживания этилметилгидроксипиридина сукцината с 18,1 мин до 5,5 мин.

Матричный раствор готовили путем растворения 1 мг этилметилгидроксипиридина сукцината («ФАРМАСОФТ», Россия) в 1 мл метанола, что соответствует концентрации 4000 мкМ, затем к 0,25 мл полученного раствора добавляли 9,75 мл смеси вода: метанол (1:1) для получения раствора с концентрацией 100 мкМ. Из него готовили калибровочные растворы с концентрациями 400, 2140, 4280, 12860, 25720, 44780, 89560 нМ путём последовательного разбавления матричного раствора транспортной средой. Матричный раствор хранили при температуре -20°C. Диапазон концентраций этилметилгидроксипиридина сукцината выбирали, исходя из концентраций, полученных после пилотного исследования. Количественное определение проводили методом абсолютной калибровки по площади пиков.

Методику валидировали по параметрам: селективность, линейность, нижний предел количественного определения, правильность, прецизионность, перенос

образцов и стабильность образцов в соответствии с валидацией, описанной выше в подразделе 2.2.

2.4 Методика оценки участия BCRP в транспорте метотрексата, митоксантрона и кверцетина через монослой клеток линии Caco-2

Эксперименты по оценке участия BCRP в транспорте метотрексата, митоксантрона и кверцетина через монослой клеток линии Caco-2 показывают принадлежность тестируемых веществ к субстратам белка-транспортера. Транспортные эксперименты проводили с использованием трансвелл-систем (12 mm Transwell® with 0,4 µm Pore Polycarbonate Membrane Insert, Sterile, «Corning», США) (Рисунок 4), которые состоят из двух камер: апикальной (внутренней) и базолатеральной (внешней). Камеры разделены между собой полупроницаемой мембраной с размером пор 0,4 мкм. Клетки Caco-2 высевали на полупроницаемую поликарбонатную мембрану и культивировали в питательной среде в течение 21 дня при температуре 37°C с 5% содержанием CO₂, смену питательной среды производили каждые 24 часа.

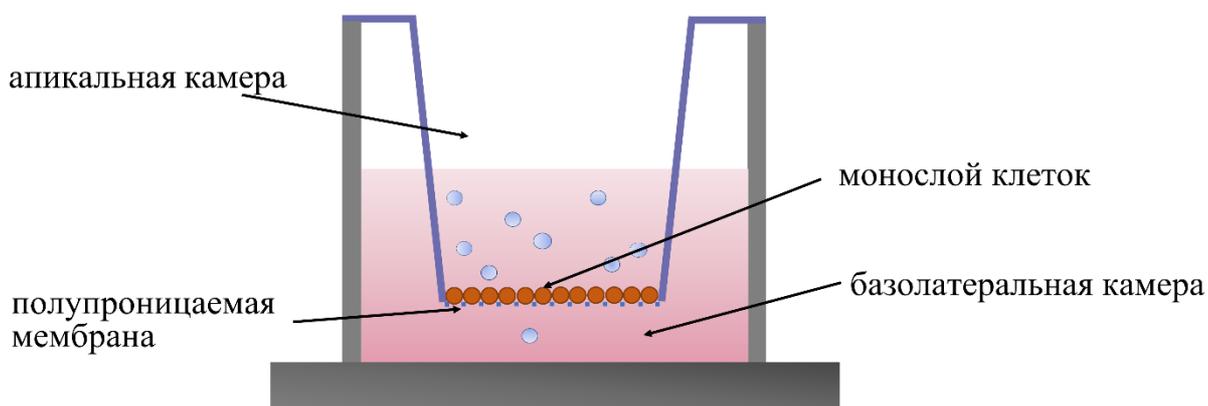


Рисунок 4 – Трансвелл-система (схема)

Транспортные эксперименты проводили на 22-е сутки после достижения плотных межклеточных контактов и формирования монослоя клеток на полупроницаемой мембране. Целостность клеточного монослоя оценивали с помощью вольтметра Millicell ERS-2 («Millipore», США) по величине

трансэпителиального сопротивления (TEER). Транспортные эксперименты выполняли при значении TEER выше $500 \text{ мОм} \cdot \text{см}^2$ [180].

Для проведения транспортных экспериментов питательную среду заменяли на транспортную, представляющую собой раствор Хэнкса («ПанЭко», Россия) с 25 mM Хепес («Gipco», №2026999, Англия) и 1% диметилсульфоксида (ДМСО) («ПанЭко», Россия), лунки промывали от питательной среды раствором Хэнкса («ПанЭко», Россия). В апикальную камеру (камера-донор) трансвелл-системы добавляли один из тестируемых субстратов BCRP (метотрексат, митоксантрон, кверцетин), разведенный в транспортной среде с концентрациями 1, 5, 10, 50 мкМ. Маточный раствор готовили растворением тестируемых веществ в ДМСО. Далее проводили забор проб через 1, 2 и 3 часа из базолатеральной камеры (камера-реципиент) в объеме 100 мкл. Транспорт из апикальной камеры в базолатеральную (транспорт a-b) веществ осуществляется путем пассивной диффузии против функционирования BCRP.

На следующем этапе оценивали транспорт субстратов тех же концентраций из базолатеральной камеры в апикальную (транспорт b-a), добавляя субстрат в базолатеральную камеру (камера-донор) и забирая пробы объемом 100 мкл из апикальной камеры (камера-реципиент) через указанные выше промежутки времени. Данный транспорт реализуется не только путем пассивной диффузии, но и с помощью белков-транспортёров, в частности BCRP [206]. Пробы замораживали и хранили при температуре -80°C до проведения анализа количества тестируемых субстратов методом ВЭЖХ-МС/МС.

Транспортные эксперименты в присутствии ингибитора BCRP проводили аналогично на 22-ые сутки, изначально в обеих камерах трансвелл-системы заменяли питательную среду на раствор резерпина – известного ингибитора BCRP с концентрацией 50 мкМ [80] в транспортной среде и инкубировали в течение 1 часа при 37°C и 5% содержании CO_2 . После предварительной инкубации в камерах-донорах заменяли транспортную среду с ингибитором на растворы метотрексата или митоксантрона с концентрациями 5 и 10 мкМ соответственно с добавлением резерпина (в той же концентрации, которая использовалась для предварительной

инкубации) и производили забор проб через 1, 2 и 3 часа из камер-реципиентов в объеме 100 мкл. Пробы также замораживали и хранили при -80°C до проведения анализа ВЭЖХ-МС/МС.

Транспорт тестируемых веществ из базолатеральной камеры в апикальную (транспорт b-a) и в противоположном направлении (транспорт a-b) оценивали по формуле 1 [206]:

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

где P_{app} – коэффициент кажущейся проницаемости (apparent permeability coefficient);

dQ/dt – изменение концентрации вещества в камере реципиенте за время инкубации, $\text{мкМ} \cdot \text{с} \cdot \text{см}^3$;

A – площадь полупроницаемой мембраны лунки в трансвелл-системе, на которой культивируются клетки, см^2 ;

C_0 – начальная концентрация субстрата в камере-доноре, мкМ . Значения P_{app} были рассчитаны на основе одного временного момента – 3 часа.

Далее рассчитывали отношение коэффициентов кажущейся проницаемости по формуле 2.

$$\text{Отношение коэффициентов} = \frac{P_{app} \text{ b-a}}{P_{app} \text{ a-b}} \quad (2)$$

Данный параметр является интегральным и оценивает общий вклад BCRP в транспорт веществ через билипидную мембрану (так как используется клеточная линия, содержащая именно данный белок-транспортер).

При отношении коэффициентов более «2» делают вывод об участии эффлюксного белка BCRP в транспорте тестируемых веществ. При показателе меньше «2» транспорт вещества происходит преимущественно путем пассивной диффузии.

Если на фоне добавления ингибитора BCRP фиксируется снижение коэффициентов кажущейся проницаемости P_{app} b-a и отношения коэффициентов P_{app} b-a / P_{app} a-b, делают заключение о принадлежности тестируемого вещества к субстратам транспортера. Если на фоне добавления ингибитора эти показатели

не изменяются, данный белок-транспортёр не играет существенной роли в транспорте тестируемого вещества, а его перемещение осуществляется другими транспортёрами, например, гликопротеином-Р (Pgp) [6].

2.5 Методика тестирования этилметилгидроксипиридина сукцината на принадлежность к субстратам и/или модуляторам активности BCRP на клетках линии Caco-2

Для анализа принадлежности этилметилгидроксипиридина сукцината к субстратам BCRP выполняли транспортный эксперимент, используя трансвелл-систему (12 mm Transwell® with 0,4 µm Pore Polycarbonate Membrane Insert, Sterile, «Corning», США). Оценивали транспорт этилметилгидроксипиридина сукцината через моноклой клеток линии Caco-2 по методике, описанной для метотрексата, митоксантрона и кверцетина в подразделе 2.4, добавляя его поочередно в апикальную и базолатеральную камеры. Транспортные эксперименты проводили на 22-е сутки после образования клеточного монослоя и определения TEER. Перед экспериментом лунки трансвелл-системы промывали раствором Хэнкса, в камеры-реципиенты добавляли транспортную среду, а в камеры-доноры – раствор этилметилгидроксипиридина сукцината с концентрациями 10, 100 и 250 мкМ в транспортной среде. Далее проводили забор проб через 1, 2 и 3 часа из камеры-реципиента в объеме 50 мкл. Полученные пробы хранили при температуре -80°C до проведения количественного анализа этилметилгидроксипиридина сукцината методом ВЭЖХ-УФ. Транспорт этилметилгидроксипиридина сукцината через билипидный слой клеток линии Caco-2 оценивали по формуле расчета коэффициентов кажущейся проницаемости и их отношения, приведенных ранее в подразделе 2.4.

Далее проводили транспортный эксперимент для оценки влияния этилметилгидроксипиридина сукцината на активность BCRP.

В качестве субстрата BCRP использовали митоксантрон с концентрацией 10 мкМ и этилметилгидроксипиридина сукцинат в качестве потенциального модулятора активности BCRP с концентрациями 50 и 100 мкМ. Для этого в

камерах-реципиентах питательную среду после промывки раствором Хэнкса заменяли транспортной средой с добавлением этилметилгидроксипиридина сукцината в указанных концентрациях. После предварительной инкубации с этилметилгидроксипиридина сукцинатом в течение 30 минут в камеры-доноры вносили раствор митоксантрона с концентрацией 10 мкМ в транспортной среде с добавлением этилметилгидроксипиридина сукцината с концентрациями 50 и 100 мкМ. Через 1, 2 и 3 часа проводили забор проб в объеме 100 мкл из камеры-реципиента. Полученные пробы замораживали и хранили при температуре - 80°C до проведения количественного анализа митоксантрона методом ВЭЖХ-МС/МС.

2.6 Методика определения относительного количества BCRP в лизате клеток линии Сасо-2 методом вестерн-блот

Относительное количество BCRP определяли в тотальном лизате клеток Сасо-2 до и после инкубации с тестируемым веществом - этилметилгидроксипиридина сукцинатом. Клетки линии Сасо-2 высевали на 6-ти луночные планшеты и культивировали при температуре 37°C с 5% содержанием CO₂ в питательной среде в количестве 1500 мкл в течение 3 недель, смену питательной среды производили через день. Далее клетки инкубировали в течение 24 часов с раствором этилметилгидроксипиридина сукцината разведенным в питательной среде с концентрациями 5, 10, 50, 100 и 500 мкМ. После инкубации клетки снимали струей питательной среды и переносили в эппендорфы, измеряли их количество с помощью счетчика и анализатора жизнеспособности клеток Countess II FL Automated Cell Counter («Thermo Fisher», США).

Для получения тотальных клеточных лизатов осаждали снятые клетки на центрифуге СМ-50 для пробирок Eppendorf («Eppendorf», Германия) при 5000 g в течение 5 минут. Надосадок сливали и к осадку добавляли по 1 мл Дульбекко фосфатно-солевого раствора (DPBS), центрифугировали при тех же параметрах, промывку повторяли трижды. После последней промывки к осадку добавляли лизирующий буфер NP-40 (Cell Lysis Buffer Thermo, «Thermo Fisher Scientific», США) с ингибиторами протеиназ («Sigma-Aldrich», Германия) из расчета 100 мкл

на 1×10^7 клеток/мл и выдерживали в течение 30 минут при температуре 40°C , перемешивая на встряхивателе Vortex («Heidolph», Германия) каждые 10 минут. Далее пробы центрифугировали при 13000 g при температуре 4°C в течение 10 минут (Avanti JXN-3, «BeckmanCoulter», США). Надосадок переносили в эппендорфы и хранили при -80°C до проведения анализа методом вестерн-блот.

Количество транспортера пересчитывали на общее содержание белка, которое определяли по методу Брэдфорда («Comassie Plus (Bladford) Assay Kit», США) [197].

Белки супернатанта в количестве 20 мкг подвергали электрофорезу с использованием TGX Stain-Free FastCast Acrylamide Kit («Bio-Rad», США) в буферной системе Laemmli («BioRad», США). Образцы смешивали с буфером Laemmli («Bio-Rad», США), содержащим 50 мМ 2-меркаптоэтанола («Bio-Rad», США) в соотношении 1:3, инкубировали 10 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», США) с использованием Mini Trans-Blot («Bio-Rad», США) в течение 10 мин при 20 В и 1,3 А. Белки на мембране блокировали 1%-ным раствором Casein Blocker («Bio-Rad», США), содержащим 0,1% Tween 20 («Sigma-Aldrich», Германия), при инкубации в течение 1 ч при комнатной температуре.

Детекцию белка BCRP проводили с использованием первичных мышечных моноклональных антител (CD338 (ABCG2) Monoclonal Antibody (5D3) «Invitrogen», США) в разведении 1 : 200 в блокирующем растворе Casein blocker («Bio-Rad», США) 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. Белки визуализировали хемилюминесценцией с помощью Chemi Doc XRS+ («Bio-Rad», США). Интенсивность полученных бэндов анализировали денситометрически с помощью программного обеспечения ImageLab («Bio-Rad»).

Содержание ВСРР оценивали относительно содержания белка домашнего хозяйства глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназы (GAPDH), первичные антитела GAPDH (Loading Control Monoclonal Antibody (GA1R), DyLight 68 («Invitrogen», США)), разведение 1:1000, вторичные кроличьи антитела (Rabbit-anti-Mouse IgG (H+L) Secondary Antibody, HRP («Invitrogen», США)), разведение 1:4000).

2.7 Статистическая обработка полученных данных

Статистическую обработку данных проводили с помощью программ «Stat Soft Statistica 13.0» (США) и «Microsoft Excel 2021».

Тип распределения данных определяли по критерию Шапиро-Уилка. Статистическую значимость различий оценивали с помощью теста ANOVA (нормальное распределение данных), попарное сравнение данных осуществляли с использованием критерия Фишера. Статистически значимыми считали различия при $p < 0,05$. Результаты приведены в виде среднего арифметического \pm стандартное отклонение среднего ($M \pm SD$).

ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

3.1 Разработка и валидация методик количественного определения субстратов BCRP

3.1.1 Разработка и валидация методики количественного определения метотрексата в транспортный среде методом ВЭЖХ-МС/МС

В работе использовали высокоэффективный жидкостный хроматограф «Ultimate 3000» («Thermo Fisher», США), оснащенный градиентным насосом, дегазатором, автосемплером и tandemным масс-спектрометрическим детектором TSQ Fortis («Thermo Fisher», США) с применением обращенно-фазной колонки UCT Selectra C18 4,6 мм*100 мм 5 мкм, 100 Å, и предколонки Selectra C18 Guard Cartridges SLC-18 GDC46-5UM.

Масс-спектрометрические параметры методики подбирали путем прямого шприцевого ввода в детектор стандартного раствора метотрексата в концентрации 100 нг/мл в метаноле.

Анализ структуры метотрексата показал наличие вторичных и третичных атомов азота, способных к реакции протонирования, обуславливающих положительный заряд молекулы и некоторых ее фрагментов (Рисунок 5). Поэтому запись масс-спектра проводили в положительном режиме ионизации. Для подтверждения подлинности метотрексата полученный в ходе анализа масс-спектр сравнивали с библиотечными данными базы NIST (National Institute of Standards and Technology), США.

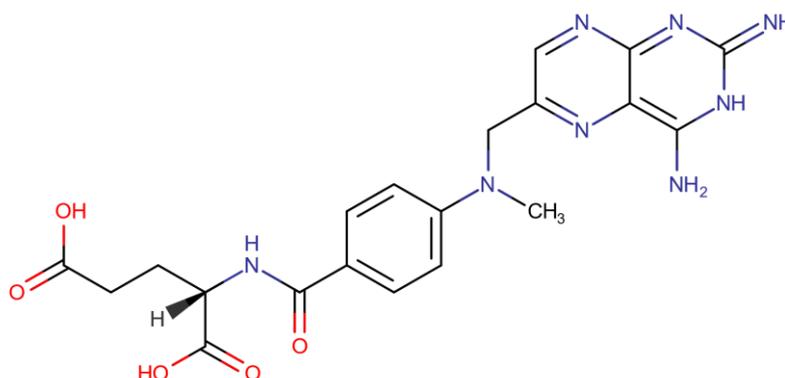


Рисунок 5 – Структурная формула метотрексата

Анализ масс-спектра метотрексата показал наличие множества дочерних ионов, из которых были выбраны три наиболее интенсивные с массой 308,2 m/z, 175,0 m/z и 134,3 m/z (Рисунок 6) для последующей оптимизации параметров детектирования: давления аргона в диапазоне от 0,5 до 3 мТорр, значений энергий столкновения в диапазоне от 0 до 55 В (Рисунок 7). В итоге для детектирования метотрексата были отобраны дочерние ионы массой 308,2 m/z и 175,0 m/z, из которых первый был использован для количественного анализа, а второй – для подтверждения подлинности метотрексата на хроматограмме.

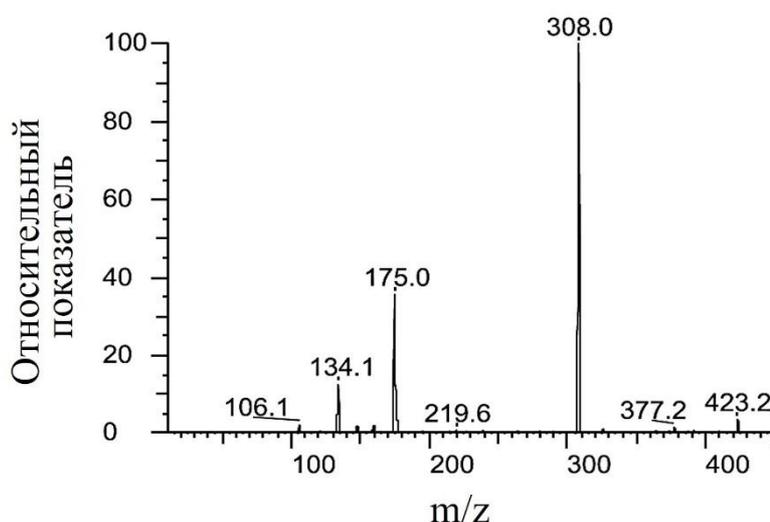


Рисунок 6 – Масс-спектр дочерних ионов метотрексата в положительном режиме ионизации (ион-предшественник 455,15 m/z)

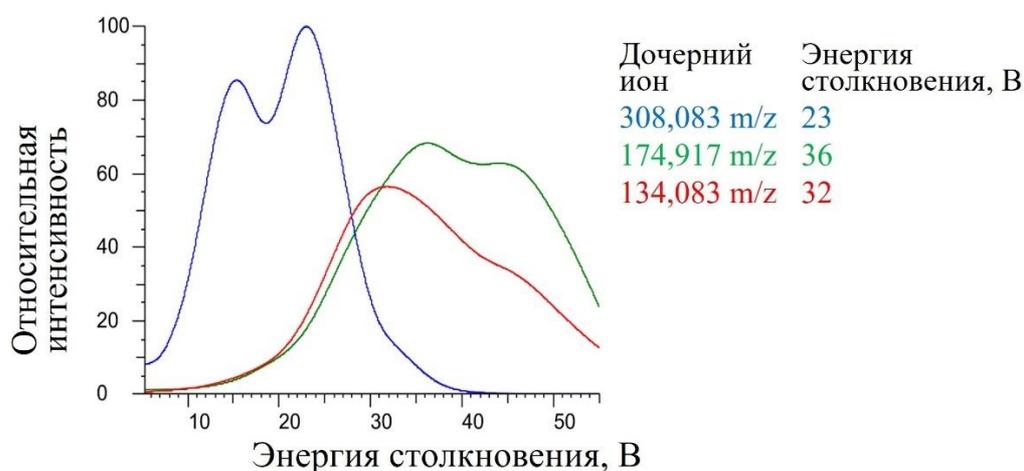


Рисунок 7 – Кривая зависимости интенсивности дочерних ионов метотрексата от энергии столкновения

При разработке методики хроматографирования использовали режим градиентного элюирования, так как данный режим позволяет добиться более симметричных хроматографических параметров пика. Для составления профиля элюирования сначала вводили пробу при изократическом режиме хроматографии для оценки влияния содержания органического растворителя в подвижной фазе на процесс элюирования аналита с колонки. Определение метотрексата осуществляли сначала на подвижной фазе с преобладанием водного компонента (соотношение вода:ацетонитрил 80:20), а затем с преобладанием органического компонента (соотношение вода:ацетонитрил 20:80). Исходя из полученных результатов, составляли профиль градиентного элюирования. Основным принципом составления профиля элюирования являлось уравнивание колонки растворителем с меньшей элюирующей силой (вода) с последующей сменой на растворитель с большей элюирующей силой (ацетонитрил). После выхода пика метотрексата проводили смену соотношения ацетонитрила и воды на режим для уравнивания колонки, которое проводили в течение 3-4 минут перед вводом новой пробы. Профиль элюирования представлен в Таблице 3.

Таблица 3 – Соотношение компонентов подвижной фазы в зависимости от времени, прошедшего с начала хроматографического анализа

Время, мин	0,1% раствор муравьиной кислоты	Ацетонитрил
0,0	75%	25%
0,4	60%	40%
6,0	20%	80%
8,0	75%	25%

Таким образом, были подобраны следующие условия анализа: градиентный режим элюирования с использованием в качестве подвижной фазы: смесь 0,1% раствора муравьиной кислоты и ацетонитрила в соотношении 0,0 мин – 75% к 25%; 0,4 мин – 60% к 40%; 6,0 мин – 20% к 80%; 8,0 мин – 75% к 25%, объем вводимой пробы составил 2 мкл при скорости потока подвижной фазы 0,3 мл/мин и температуре разделения 35°C. Время анализа – 10 мин. Время удерживания

метотрексата составило $3,11 \pm 0,023$ мин. Ионизацию молекул проводили в режиме положительной ионизации на электроспрее при напряжении 3500 В. Режим детектирования: sheath gas 35 Arb (arbitrary unit – относительная единица измерения, показывающая отношение величины к заданному эталону), aux gas 7 Arb, sweep gas 0 Arb, температура трубки для переноса ионов 300°C , температура испарителя 350°C . Переходы масс метотрексата $455,15\text{ m/z} \rightarrow 308,125\text{ m/z}$ при энергии столкновения 22,99 В и $455,15\text{ m/z} \rightarrow 174,98\text{ m/z}$ при энергии столкновения 19,74 В, фрагментация источника 5, при давлении аргона (CID gas - Collision induced dissociation) 2 мТорр.

Валидацию биоаналитической методики проводили в соответствии с Правилами проведения исследований биоэквивалентности лекарственных препаратов в рамках Евразийского экономического союза по следующим параметрам: селективность, предел количественного определения, линейность, правильность (внутри и между циклами), прецизионность (внутри и между циклами), перенос пробы, матричный эффект и стабильность.

Селективность. Проводили анализ холостой пробы транспортной среды без добавления стандарта метотрексата и образцов транспортной среды с добавлением метотрексата до конечных концентраций от 60 до 10000 нМ. На хроматограммах образцов холостой транспортной среды не наблюдалось пиков со временем удерживания, соответствующим времени удерживания метотрексата (Рисунки 8, 9).

Нижний предел количественного определения метотрексата составил 60 нМ. При этом отношение сигнала к шуму было не ниже 10, а правильность и прецизионность определения не превышали 20%. Предел обнаружения метотрексата в транспортной среде составил 20 нМ, при этом соотношение сигнала к шуму было не менее 3.

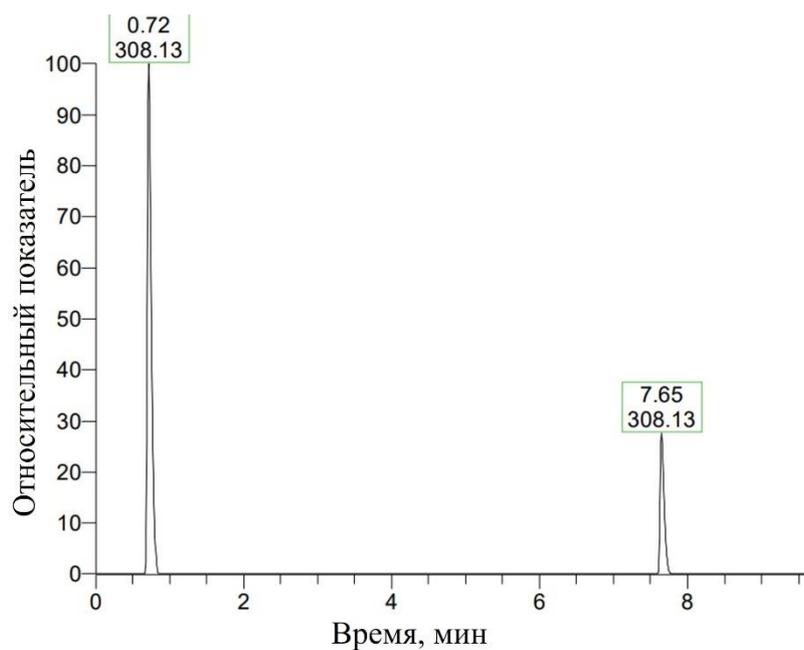


Рисунок 8 – Хроматограмма холостой пробы транспортной среды

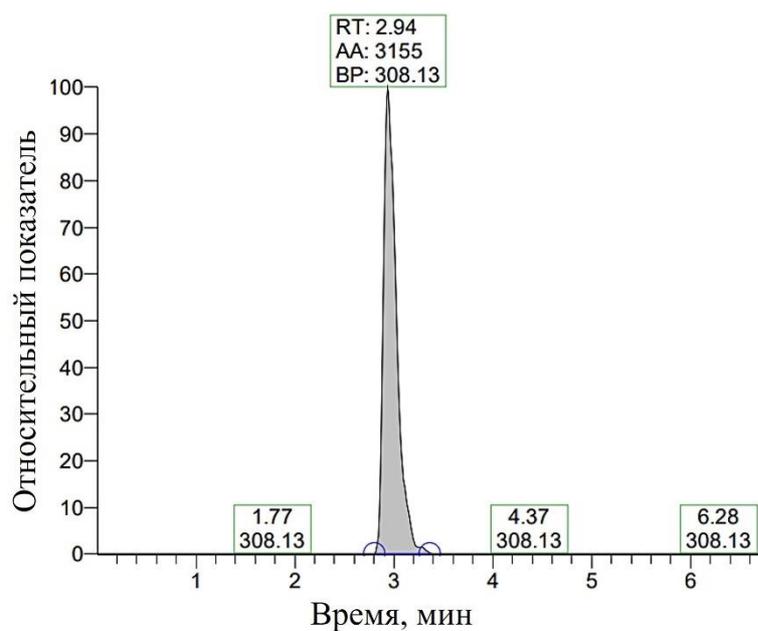


Рисунок 9 – Хроматограмма транспортной среды с добавлением стандарта метотрексата до конечной концентрации 60 нМ

Примечание: RT – retention time, время удерживания; AA – automatic area, площадь пика; BP – base peak, молекулярная масса основного продукта распада молекулярного иона

Калибровочная кривая. Проводили анализ 7 образцов холостой транспортной среды с добавлением матричного раствора метотрексата до получения концентраций: 60, 100, 200, 600, 1000, 2000, 10 000 нМ. По полученным значениям

были построены калибровочные графики в координатах площадь пика – концентрация метотрексата, один из образцов калибровочного графика представлен на Рисунке 10. Были получены следующие уравнения линейной регрессии: $y=276,898+31,4557*x$, $R^2=0,9993$, $W=1/x$ – взвешенный фактор (англ. weighting factor); $y=92,2803+50,3247*x$, $R^2=0,9959$, $W=1/x$; $y=-98,8244+31,5429*x$, $R^2=0,9989$, $W=1/x$. Рассчитанные коэффициенты корреляции соответствовали принятой норме (не менее 0,99). Отклонения концентраций калибровочных образцов, рассчитанные по уравнению линейной зависимости, от номинальных значений, приведены в Таблице 4.

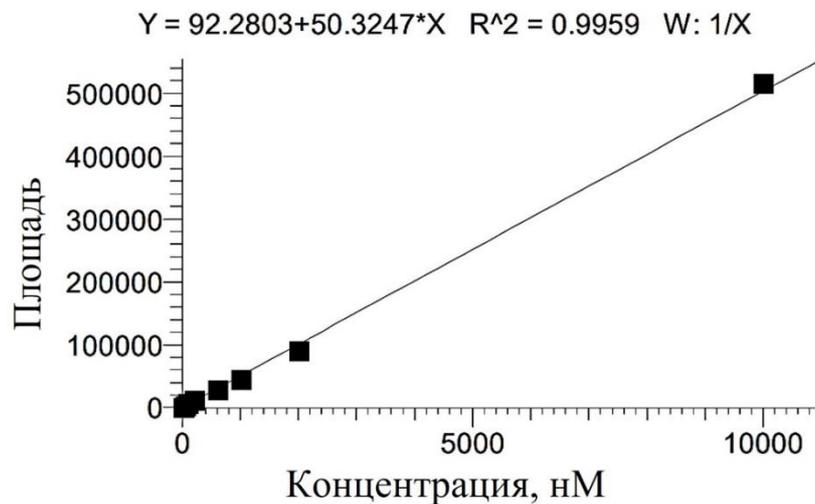


Рисунок 10 – Образец калибровочного графика зависимости «концентрация метотрексата – площадь пика»

Правильность и прецизионность. Выполняли анализ образцов транспортной среды с добавлением стандартных растворов метотрексата до получения концентраций 60, 200, 4800 и 8000 нМ. Анализ выполняли в рамках трех циклов. В первом цикле оценивали прецизионность и правильность внутри цикла, для этого анализировали по 5 образцов для каждой концентрации метотрексата. Во втором и третьем цикле тестировали прецизионность и правильность между циклами. Полученные величины прецизионности (относительного стандартного отклонения) и правильности (относительной погрешности) соответствовали принятым нормам (не более 20% для нижнего предела количественного определения и не более 15% – для остальных точек) (Таблицы 5, 6).

Таблица 4 – Отклонения концентраций метотрексата в калибровочных образцах от их номинальных значений

Концентрация номинальная, нМ	Серия 1		Серия 2		Серия 3	
	Концентрация рассчитанная, нМ	Точность, %	Концентрация рассчитанная, нМ	Точность, %	Концентрация рассчитанная, нМ	Точность, %
60,0	59,8	0,4	70,4	17,3	65,9	9,8
100,0	100,1	0,1	96,8	3,2	102,9	2,9
200,0	191,4	4,3	193,7	3,2	184,1	8,0
600,0	658,0	9,7	572,1	4,7	626,8	4,5
1000,0	948,7	5,1	968,4	3,2	947,9	5,2
2000,0	1999,9	0,01	1907,9	4,6	1891,1	5,4
10 000,0	10 002,1	0,02	10 150,7	1,5	10 141,2	1,4

Таблица 5 – Правильность и прецизионность методики количественного определения метотрексата в транспортной среде внутри цикла

Концентрация номинальная, нМ	Концентрация рассчитанная, нМ	Правильность, %	Средняя концентрация, нМ	Средняя правильность, %	SD	Прецизионность, %
60,0	69,5	15,8	67,2	11,9	3,1	5,1
	63,6	6,1				
	71,1	18,5				
	65,2	8,7				
	66,4	10,7				
200,0	209,9	4,9	210,5	5,3	7,7	8,8
	211,9	5,9				
	222,3	11,1				
	181,6	9,2				
	227,0	13,5				
4800,0	5148,1	7,3	4990,2	3,9	21,9	2,5
	4937,3	2,9				
	4825,6	0,5				
	4982,1	3,8				
	5058,1	5,4				

Продолжение таблицы 5

Концентрация номинальная, нМ	Концентрация рассчитанная, нМ	Правильность, %	Средняя концентрация, нМ	Средняя правильность, %	SD	Прецизионность, %
8000,0	7806,3	2,4	7717,6	3,5	67,1	3,3
	7768,6	2,9				
	7266,2	9,2				
	7767,6	2,9				
	7979,5	0,26				

Таблица 6 – Правильность и прецизионность методики количественного определения метотрексата в транспортной среде между циклами

Концентрация номинальная, нМ	Концентрация рассчитанная, нМ	Правильность, %	Среднее, нМ	Средняя правильность, %	SD	Прецизионность, %
60,0	67,2	11,9	68,1	13,6	1,9	3,1
	66,9	11,5				
	70,3	17,3				
200,0	210,5	5,3	195,2	2,4	14,4	7,2
	181,9	9,02				
	193,1	3,5				
4800,0	4990,2	3,9	4877,5	1,6	97,6	2,0
	4818,2	0,4				
	4824,2	0,5				
8000,0	7717,6	3,5	7761,9	2,9	38,4	0,5
	7783,1	2,7				
	7785,2	2,7				

Стабильность. Для оценки стабильности метотрексата в транспортной среде при хранении готовили образцы с концентрацией метотрексата 200 и 8000 нМ. Часть образцов анализировали в количестве трех повторов при краткосрочном хранении в условиях комнатной температуры, трехкратной заморозке-разморозке при -80°C , хранении при -80°C в течение 60 суток, после пробоподготовки и хранения в автосемплере в течение 24 ч. Правильность для каждой концентрации (для средних значений) находилась в пределах 15% от номинальных значений.

Перенос пробы. При последовательном анализе пробы с концентрацией метотрексата 10 000 нМ и образца чистой транспортной среды на хроматограмме чистой транспортной среды отсутствовали пики, соответствующие по времени удерживания пикам метотрексата.

Матричный эффект оценивали по площади пиков метотрексата в присутствии транспортной среды и в метаноле с концентрациями 60 нМ и 8000 нМ. Относительное стандартное отклонение эффекта матрицы, взятой из 6 отдельных лунок планшета, не превышало 15%.

Аналитический диапазон методики составил для метотрексата 60 – 10000 нМ целевого вещества.

3.1.2 Разработка и валидация методики количественного определения митоксантрона в транспортной среде методом ВЭЖХ-МС/МС

Количественное определение митоксантрона проводили с использованием хроматографической системы, аналогичной для анализа метотрексата.

Параметры детектирования митоксантрона подбирали путем прямого шприцевого ввода в масс-спектрометр стандартного раствора митоксантрона в метаноле в концентрации 100 нг/мл.

Наличие в структуре митоксантрона вторичных атомов азота алифатической цепи обуславливает способность соединения к протонированию, в результате которого оно приобретает положительный заряд (Рисунок 11).

Поэтому запись масс-спектра проводили в положительном режиме ионизации. Подтверждение подлинности митоксантрона осуществляли путем сравнения масс-спектров, полученных в ходе анализа, с библиотечными данными базы NIST.

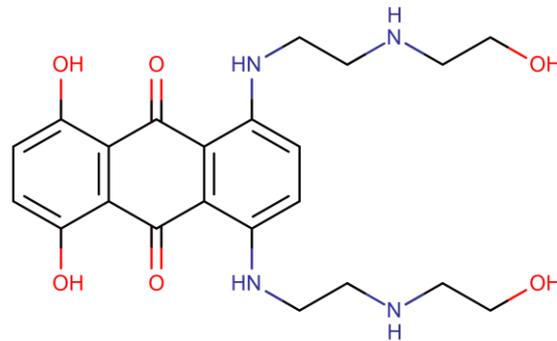


Рисунок 11 – Структурная формула митоксантрона

Анализ масс-спектра митоксантрона показал наличие множества дочерних ионов, из которых были выбраны три наиболее интенсивных иона с массой 358,0 m/z, 324,4 m/z и 88,2 m/z (Рисунок 12) для последующей оптимизации параметров детектирования: давления аргона в диапазоне от 0,5 до 3 мТорр, значений энергий столкновения в диапазоне от 0 до 55 В (Рисунок 13). Таким образом, для детектирования митоксантрона были отобраны дочерние ионы массой 358,0 m/z и 88,2 m/z, по которым подтверждали подлинность митоксантрона на хроматограммах, а количественный анализ проводили по иону массой 88,2 m/z.

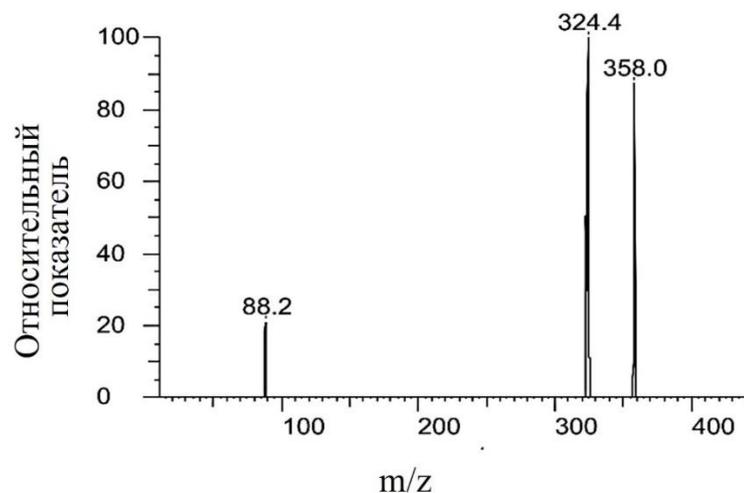


Рисунок 12 – Масс-спектр дочерних ионов митоксантрона в положительном режиме ионизации (ион-предшественник 455 m/z)

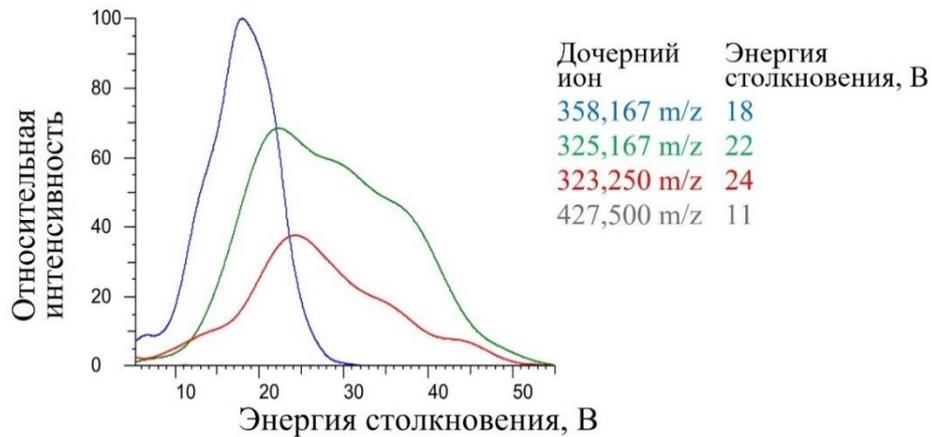


Рисунок 13 – Кривая зависимости интенсивности дочерних ионов митоксантрона от энергии столкновения

Подбор параметров хроматографирования начинали с определения профиля элюирования, как указано в разделе «Разработка и валидация методики количественного определения метотрексата в транспортной среде методом ВЭЖХ-МС/МС» (Таблица 7). В качестве органического компонента фазы использовали метанол, так как в данных условиях достигались более оптимальные хроматографические параметры пика митоксантрона. При разработке методики возникла проблема с переносом определяемого вещества в последующую пробу. Использование водно-метанольных и водно-ацетонитрильных промывочных растворов с разной концентрацией органической фазы, а также чистых растворителей не позволило устранить данный эффект, поэтому между пробами митоксантрона дополнительно вводили пробу воды, после которой в последующей пробе наблюдали отсутствие пика митоксантрона.

Таблица 7 – Соотношение компонентов подвижной фазы в зависимости от времени, прошедшего от начала хроматографического анализа

Время, мин	0,1 % раствор муравьиной кислоты	Метанол
0,0	70%	30%
0,3	10%	90%
6,0	70%	30%

Таким образом, количественный анализ митоксантрона проводили с использованием градиентного режима элюирования: соотношение раствора 0,1% муравьиной кислоты и метанола: 0,0 мин – 70% и 30%; 0,3 мин – 10% и 90%; 6,0 мин – 70% и 30%. Скорость потока подвижной фазы составила 0,3 мл/мин при температуре разделения 35°C и объеме вводимой пробы 5 мкл. Время анализа одной пробы равнялось 10 мин. В данных условиях время удерживания митоксантрона составило $5,52 \pm 0,013$ мин. Молекулы митоксантрона ионизировали в положительном режиме на электроспрее при напряжении 3700 В, sheath gas 50 Arb, aux gas 10 Arb, sweep gas 1 Arb, температуре трубки для переноса ионов 300°C, температуре испарителя 350°C. Для детектирования митоксантрона использовали переходы масс: $455 \text{ m/z} \rightarrow 88,2 \text{ m/z}$ при энергии столкновения 25 В и $455 \text{ m/z} \rightarrow 358,1 \text{ m/z}$ при энергии столкновения 18 В, фрагментация источника 0, давление аргона (CID gas) 2 мТорр.

Валидацию биоаналитической методики проводили на основе Правил проведения исследований биоэквивалентности лекарственных препаратов в рамках Евразийского экономического союза по следующим параметрам: селективность, предел количественного определения, линейность, правильность (внутри и между циклами), прецизионность (внутри и между циклами), перенос пробы, матричный эффект и стабильность.

Селективность разработанной нами методики определяли, анализируя холостую пробу транспортной среды без добавления стандарта митоксантрона и образцы транспортной среды с добавлением митоксантрона до конечных концентраций 50, 150, 400 и 800 нМ. На хроматограммах образцов холостой транспортной среды не наблюдали пиков со временем удерживания, соответствующим времени удерживания целевого вещества (Рисунки 14, 15).

Нижний предел количественного определения митоксантрона составил 50 нМ. При этом отношение сигнала к шуму было не ниже 10, а правильность и прецизионность определения не превышали 20%. Предел обнаружения митоксантрона в транспортной среде составил 10 нМ, при этом отношение сигнала к шуму превышало 3.

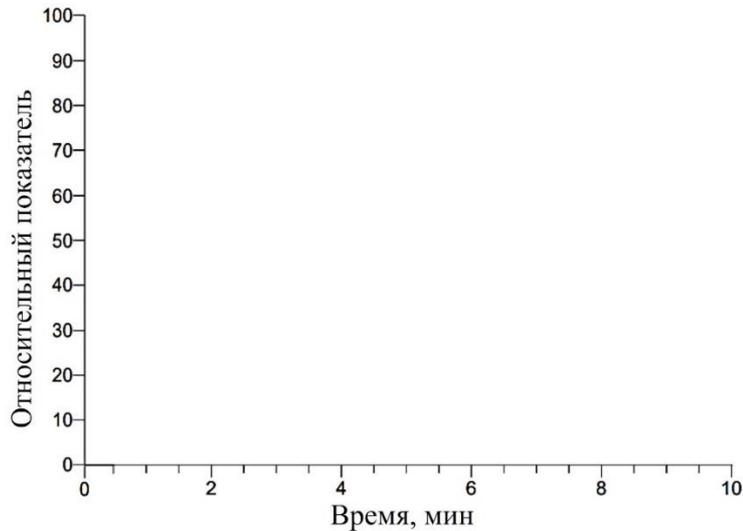


Рисунок 14 – Хроматограмма холостой пробы транспортной среды

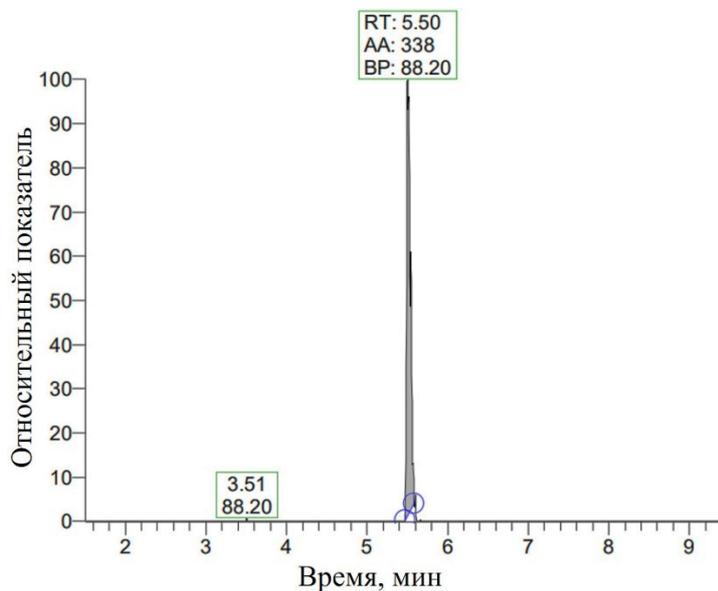


Рисунок 15 – Хроматограмма транспортной среды с добавлением стандарта митоксантрона до конечной концентрации 50 нМ

Примечание: RT – retention time, время удерживания; AA – automatic area, площадь пика; BP – base peak, молекулярная масса основного продукта распада молекулярного иона

Калибровочную кривую строили, анализируя 7 калибровочных растворов митоксантрона в концентрациях 50, 100, 200, 400, 600, 800 и 1000 нМ. С помощью полученных значений были построены калибровочные графики в координатах площадь пика – концентрация митоксантрона (образец одного из графиков приведен на Рисунке 16). По результатам анализа нескольких серий

калибровочных растворов были получены следующие уравнения линейной регрессии: $y = -133,844 + 8,395 \cdot x$, $R^2 = 0,9972$, $W = 1/x$; $y = -217,449 + 9,438 \cdot x$, $R^2 = 0,9987$, $W = 1/x$; $y = -289,597 + 9,62134 \cdot x$, $R^2 = 0,9989$, $W = 1/x$. Полученные коэффициенты корреляции соответствовали принятой норме (не менее 0,99).

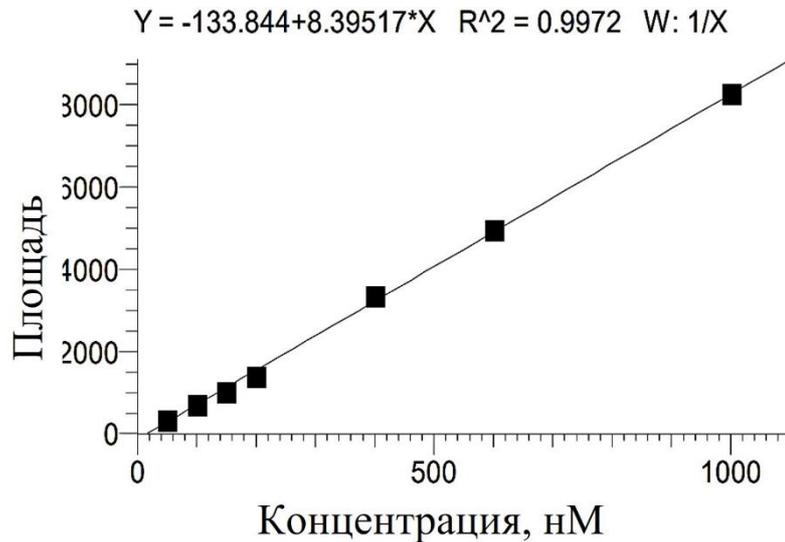


Рисунок 16 – Образец калибровочного графика зависимости «концентрация митоксантрона – площадь пика»

Отклонения концентраций калибровочных образцов, рассчитанные по уравнению линейной зависимости, от номинальных значений, приведены в Таблице 8. Данные, приведенные в таблице, дополнительно характеризуют линейность и демонстрируют близость каждой точки к калибровочной кривой. Экспериментально рассчитанные концентрации градуировочных стандартов должны лежать в пределах $\pm 15\%$ от номинальных значений (за исключением концентрации, соответствующей нижнему пределу количественного определения, для которой эти значения могут находиться в пределах $\pm 20\%$).

Правильность и прецизионность оценивали, выполняя анализ образцов стандартных растворов митоксантрона с концентрациями 50, 150, 400 и 800 нМ в рамках трех циклов: параметры оценивали внутри и между циклами. Полученные величины прецизионности (относительного стандартного отклонения) и правильности (относительной погрешности) соответствовали принятым нормам (не более 20% для нижнего предела количественного определения и не более 15% – для остальных точек) (Таблицы 9, 10).

Таблица 8 – Отклонения концентраций митоксантрона в калибровочных образцах от их номинальных значений

Концентрация номинальная, нМ	Серия 1		Серия 2		Серия 3	
	Концентрация рассчитанная, нМ	Точность, %	Концентрация рассчитанная, нМ	Точность, %	Концентрация рассчитанная, нМ	Точность, %
50,0	56,2	12,5	44,2	11,6	50,9	1,7
100,0	99,4	0,6	90,7	9,3	96,5	3,5
200,0	183,0	8,5	204,6	2,3	208,2	4,1
400,0	415,9	4,0	418,8	4,7	418,3	4,6
600,0	606,7	1,1	618,6	3,1	614,4	2,4
800,0	697,6	12,9	819,2	2,4	811,2	1,4
1000,0	1001,7	0,2	967,6	3,2	956,7	4,3

Таблица 9 – Правильность и прецизионность методики количественного определения митоксантрона в транспортном среде внутри цикла

Концентрация номинальная, нМ	Концентрация рассчитанная, нМ	Правильность, %	Средняя концентрация, нМ	Средняя правильность, %	SD	Прецизионность, %
50,0	58,8	17,7	52,6	13,2	7,1	13,4
	45,8	8,4				
	44,2	11,6				
	58,4	16,8				
	55,8	11,5				
150,0	130,7	12,8	143,4	4,9	8,2	5,7
	148,9	0,74				
	142,7	4,8				
	152,2	1,5				
	142,6	4,9				
400,0	412,9	3,2	397,9	6,5	31,9	8,0
	427,7	6,9				
	351,4	12,2				
	378,7	5,3				
	418,6	4,7				

Продолжение таблицы 9

Концентрация номинальная, нМ	Концентрация рассчитанная, нМ	Правильность, %	Средняя концентрация, нМ	Средняя правильность, %	SD	Прецизионность, %
800,0	828,8	3,6	794,9	3,7	43,3	5,4
	792,8	0,9				
	836,5	4,6				
	727,3	9,1				
	789,3	1,3				

Таблица 10 – Правильность и прецизионность методики количественного определения митоксантрона в транспортной среде между циклами

Концентрация номинальная, нМ	Концентрация рассчитанная, нМ	Правильность, %	Средняя концентрация, нМ	Средняя правильность, %	SD	Прецизионность, %
50,0	49,2	3,3	53,6	14,9	5,0	9,4
	52,6	13,2				
	59,1	18,2				
150,0	151,4	4,4	147,7	4,4	4,0	2,7
	143,4	5,0				
	148,3	3,9				
400,0	430,5	10,9	406,7	8,8	20,8	5,1
	397,9	7,9				
	391,8	7,7				
800,0	771,4	5,9	784,3	4,6	11,9	1,5
	794,9	3,9				
	786,6	4,2				

Стабильность растворов митоксантрона с концентрациями 150 и 800 нМ в транспортной среде анализировали при краткосрочном хранении в условиях комнатной температуры, трехкратной заморозке-разморозке при -80°C , хранении при -80°C в течение 60 суток, после пробоподготовки и нахождения в автосемплере в течение 24 ч. Выполняли по 3 повтора для анализа каждого вида стабильности. Правильность для каждой концентрации (для средних значений) находилась в пределах 15% от номинальных значений.

При последовательном анализе пробы с концентрацией митоксантрона 1000 нМ и образца холостой транспортной среды на хроматограмме последней отсутствовали пики, соответствующие по времени удерживания пикам митоксантрона, т.е. *переноса проб* не происходило.

Матричный эффект оценивали по площади пиков митоксантрона в присутствии транспортной среды и в метаноле с концентрациями 50 нМ и 800 нМ. Относительное стандартное отклонение эффекта матрицы, взятой из 6 отдельных лунок планшета, не превышало 15%.

Аналитический диапазон методики составил для митоксантрона 50 – 1000 нМ целевого вещества.

3.1.3 Разработка и валидация методики количественного определения кверцетина в транспортной среде методом ВЭЖХ-МС/МС

Количественное определение кверцетина проводили с использованием ранее указанной хроматографической системы.

Параметры детектирования кверцетина определяли путем прямого ввода шприцем в масс-спектрометр стандартного раствора кверцетина в концентрации 100 нг/мл в метаноле.

Подбор условий детектирования кверцетина проводили как в положительном режиме ионизации, так и в негативном, так как в структуре молекулы имеются фенольные гидроксильные группы, которые способны депротонироваться с образованием анионов сопряженных оснований, а также обладают достаточной

основностью для протонирования с переходом в катионную форму (Рисунок 17). Дальнейший анализ проводили в негативном режиме ионизации, поскольку в данном случае наблюдался более низкий уровень шума, что позволяло получить более высокое значение отношения сигнал/шум при более низких концентрациях кверцетина.

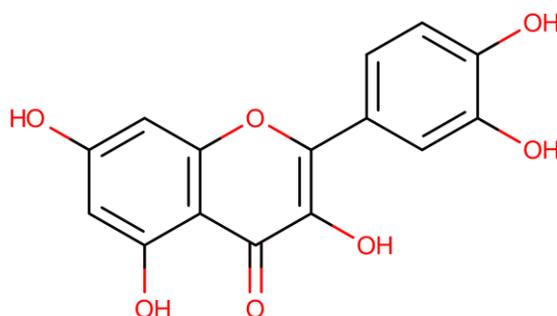


Рисунок 17 – Структурная формула кверцетина

Анализ масс-спектра кверцетина показал наличие множества дочерних ионов, что позволило выбрать наиболее интенсивные из них: 150,9 m/z и 178,9 m/z (Рисунок 18). Оптимизацию параметров детектирования проводили по двум массам по показателям давление аргона в диапазоне от 0,5 до 3 мТорр и по значению энергий столкновения в диапазоне от 0 до 55 В (Рисунок 19). Таким образом, дальнейшее подтверждение подлинности кверцетина проводили по ионам массой 150,9 m/z и 178,9 m/z , а количественный анализ по иону массой 150,9 m/z .

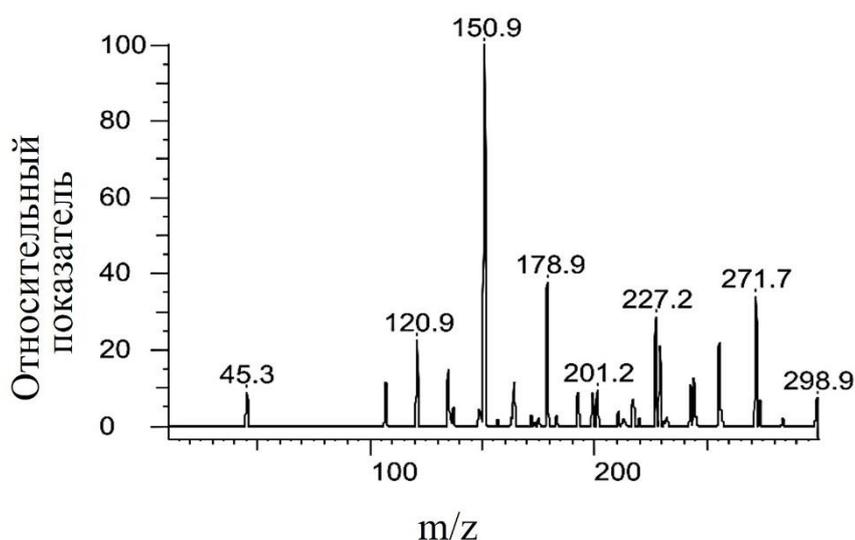


Рисунок 18 – Масс-спектр дочерних ионов кверцетина в негативном режиме ионизации (ион-предшественник = 301 m/z)

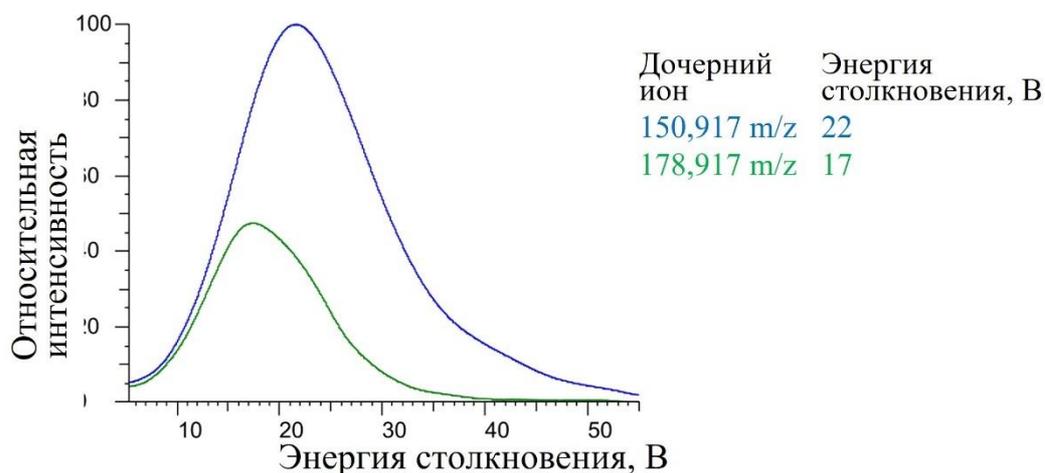


Рисунок 19 – Кривая зависимости интенсивности дочерних ионов кварцетина от энергии столкновения

При подборе подвижной фазы были проверены элюенты, содержащие и не содержащие муравьиную кислоту, т.е. с кислым и нейтральным значениями pH, поскольку ионизация ионов в негативном режиме ухудшается при кислом значении pH. Однако отсутствие кислоты приводило к ухудшению хроматографических параметров пика кварцетина, поэтому для дальнейшего анализа была использована подвижная фаза, содержащая муравьиную кислоту. В качестве подвижной фазы использовали смесь 0,1% водного раствора муравьиной кислоты и ацетонитрила (Таблица 11).

Таблица 11 – Соотношение компонентов подвижной фазы в зависимости от времени, прошедшего с начала хроматографического анализа

Время, мин	0,1 % раствор муравьиной кислоты	Ацетонитрил
0,0	70%	30%
0,3	30%	70%
4,0	1%	99%
9,0	70%	30%

Таким образом, дальнейший хроматографический анализ кварцетина проводили в указанном градиентном режиме: соотношение раствора 0,1% муравьиной кислоты и ацетонитрила составило на 0,0 мин 70% и 30%; 0,3 мин 30% и 70%; 4,0 мин 1% и 99%; 9,0 мин 70% и 30%. Скорость потока элюента – 0,5

мл/мин, температура разделения – 35°C, объем вводимой пробы – 5 мкл. Продолжительность анализа – 11 мин, при данных условиях время удерживания кверцетина составило $3,91 \pm 0,033$ мин. Ионизацию молекул проводили в режиме негативной ионизации на электроспрее, напряжение которого составило 3000 В. Sheath gas 50 Arb, aux gas 10 Arb, sweep gas 10 Arb, температура трубки для переноса ионов 300°C, температура испарителя 350 °C. Использовали следующие переходы масс $301 \text{ m/z} \rightarrow 150,9 \text{ m/z}$ при энергии столкновения 22 В и $301 \text{ m/z} \rightarrow 178,9 \text{ m/z}$ при энергии столкновения 17 В, фрагментация источника 5В, при давлении аргона (CID gas) 1 мТорр.

Валидацию биоаналитической методики проводили на основе Правил проведения исследований биоэквивалентности лекарственных препаратов в рамках Евразийского экономического союза по указанным параметрам: селективность, предел количественного определения, линейность, правильность (внутри и между циклами), прецизионность (внутри и между циклами), перенос пробы, матричный эффект и стабильность.

Селективность. Проводили анализ холостой пробы транспортной среды без добавления стандарта кверцетина и образцов транспортной среды с добавлением кверцетина до конечных концентраций 5-500 нМ. На хроматограммах образцов холостой транспортной среды не наблюдалось пиков со временем удерживания, соответствующим времени удерживания кверцетина (Рисунки 20, 21).

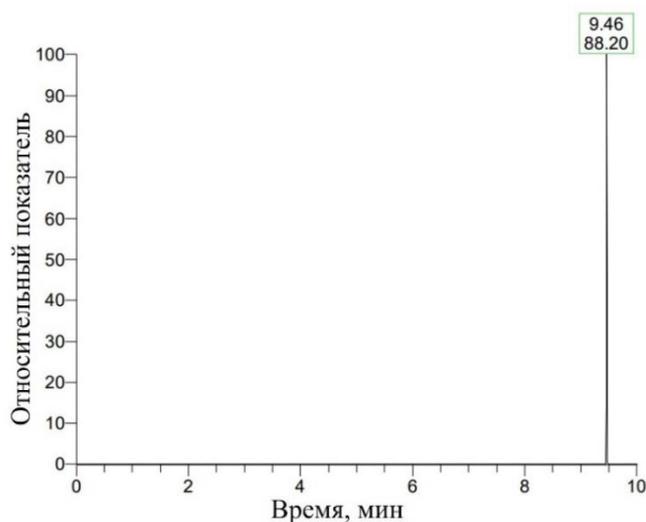


Рисунок 20 – Хроматограмма холостой пробы транспортной среды

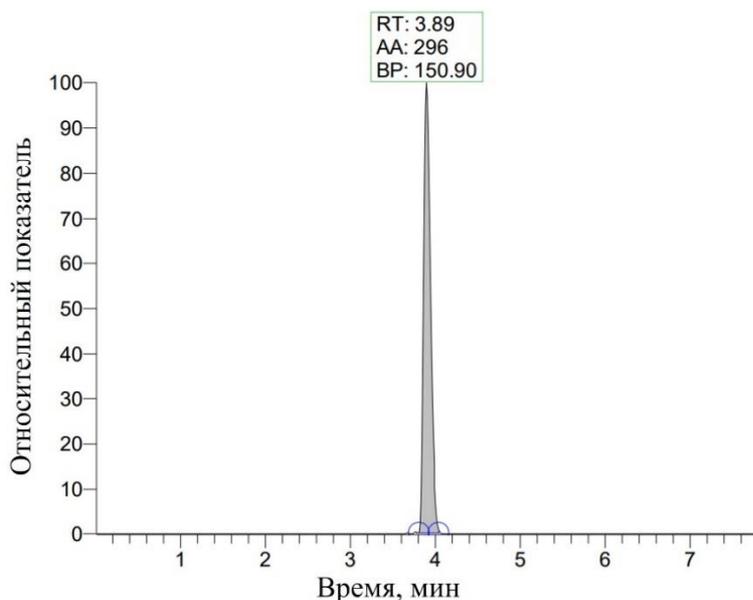


Рисунок 21 – Хроматограмма транспортной среды с добавлением стандарта кверцетина до конечной концентрации 5 нМ

Примечание: RT – retention time, время удерживания; AA – automatic area, площадь пика; BP – base peak, молекулярная масса основного продукта распада молекулярного иона

Нижний предел количественного определения кверцетина составил 5 нМ. При этом отношение сигнала к шуму было не ниже 10, а правильность и прецизионность определения не превышали 20%. Предел обнаружения кверцетина в транспортной среде составил 1 нМ, при этом соотношение сигнала к шуму (базовой линии) было не менее 3.

Калибровочная кривая. Проводили анализ 7 образцов холостой транспортной среды с добавлением матричного раствора кверцетина до получения концентраций 5, 10, 20, 50, 100, 200 и 500 нМ. По полученным значениям были построены калибровочные графики в координатах площадь пика кверцетина – концентрация кверцетина (образец калибровочного графика представлен на Рисунке 22). Были получены следующие уравнения линейной регрессии: $y=31,0517+65,1779*x$, $R^2=0,9987$, $W=1/x$; $y=25,6809+35,643*x$, $R^2=0,9960$, $W=1/x$; $y=-77,6652+58,3289*x$, $R^2=0,9947$, $W=1/x$. Рассчитанные коэффициенты корреляции соответствовали принятой норме (не менее 0,99). Отклонения концентраций калибровочных

образцов, рассчитанные по уравнению линейной зависимости, от номинальных значений, приведены в Таблице 12.

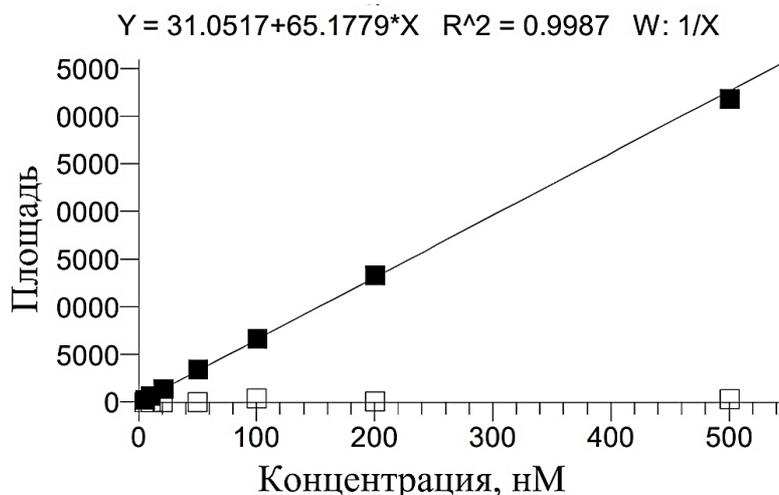


Рисунок 22 – Образец калибровочного графика зависимости «концентрация кверцетина – площадь пика»

Правильность и прецизионность. Выполняли анализ образцов стандартных растворов кверцетина с концентрациями 5, 20, 200 и 400 нМ. Анализ выполняли в рамках трех циклов. Прецизионность и правильность оценивали внутри цикла, для этого анализировали по 5 образцов для каждой концентрации кверцетина. Далее тестировали прецизионность и правильность между циклами. Полученные величины прецизионности (относительного стандартного отклонения) и точности (относительной погрешности) соответствовали принятым нормам (не более 20% для нижнего предела количественного определения и не более 15% – для остальных точек) (Таблицы 13, 14).

Стабильность. Для оценки стабильности кверцетина при хранении в различных условиях готовили образцы с концентрацией кверцетина 20 и 400 нМ. Стабильность определяли при трехкратной заморозке-разморозке при -80°C , хранении при -80°C в течение 60 суток, краткосрочном хранении в условиях комнатной температуры, после пробоподготовки и нахождения в автосемплере в течение 24 ч. Исследовали по 3 независимых образца. Рассчитанные концентрации кверцетина до и после заморозки статистически значимо не различались.

Таблица 12 – Отклонения концентраций кварцетина в калибровочных образцах от их номинальных значений

Концентрация номинальная, нМ	Серия 1		Серия 2		Серия 3	
	Концентрация рассчитанная, нМ	Точность, %	Концентрация рассчитанная нМ	Точность, %	Концентрация рассчитанная нМ	Точность, %
5,0	4,	17,6	5,4	8,6	5,2	4,3
10,0	9,9	0,5	8,6	14,0	11,1	11,0
20,0	22,5	12,3	17,9	10,4	21,7	8,4
50,0	53,0	6,1	55,0	8,0	43,9	12,2
100,0	101,6	1,6	104,2	4,2	88,1	11,9
200,0	204,9	2,4	215,6	7,8	204,9	2,4
500,0	489,2	2,2	479,2	4,2	514,1	2,8

Таблица 13 – Правильность и прецизионность методики количественного определения кверцетина в транспортной среде внутри цикла

Концентрация номинальная, нМ	Концентрация рассчитанная нМ	Правильность, %	Концентрация средняя, нМ	Средняя правильность, %	SD	Прецизионность, %
5,0	4,1	18,6	5,5	17,6	0,8	14,7
	5,9	19,3				
	5,8	15,8				
	5,9	18,1				
	5,8	16,2				
20,0	21,4	7,1	22,1	10,3	0,5	2,1
	22,3	11,6				
	22,1	10,7				
	22,6	13,1				
	21,9	9,4				
200,0	214,5	7,2	208,8	7,0	14,3	6,9
	193,9	3,0				
	224,0	12,0				
	218,4	9,2				
	193,1	3,4				

Продолжение таблицы 13

Концентрация номинальная, нМ	Концентрация рассчитанная нМ	Правильность, %	Концентрация средняя, нМ	Средняя правильность, %	SD	Прецизионность, %
400,0	429,5	7,4	433,9	8,5	20,1	4,6
	435,9	8,9				
	402,4	0,6				
	447,6	11,9				
	454,2	13,5				

Таблица 14 – Правильность и прецизионность методики количественного определения кварцегина в транспортной среде между циклами

Концентрация номинальная, нМ	Концентрация рассчитанная нМ	Правильность, %	Концентрация средняя, нМ	Средняя правильность, %	SD	Прецизионность, %
5,0	5,5	10,2	5,5	11,0	0,3	4,6
	5,3	6,3				
	5,8	16,6				
20,0	22,1	10,4	21,8	8,9	0,4	1,7
	21,9	9,4				
	21,4	6,8				
200,0	208,8	4,4	210,6	5,3	5,8	2,7
	205,9	2,9				
	217,0	8,5				
400,0	433,9	8,5	441,4	10,3	7,9	1,8
	449,6	12,4				
	440,6	10,2				

Перенос пробы. При последовательном анализе пробы с концентрацией кверцетина 500 нМ и образца матрицы на хроматограмме матрицы отсутствовали пики, соответствующие по времени удерживания пикам кверцетина.

Матричный эффект. Определяли площади пиков образца с добавлением кверцетина с концентрацией 5 нМ и 400 нМ в присутствии транспортной среды и чистого раствора кверцетина в той же концентрации в отсутствие матрицы. Относительное стандартное отклонение эффекта матрицы, рассчитанное для 6 образцов транспортной среды, не превышало 15%.

Аналитический диапазон методики составил для кверцетина 5–500 нМ целевого вещества.

3.2 Оценка транспорта метотрексата, митоксантрона и кверцетина через монослой клеток линии Сасо-2

Изучали транспорт метотрексата, митоксантрона и кверцетина в концентрациях 1, 5, 10 и 50 мкМ через монослой клеток линии Сасо-2 в трансвелл-системе.

При добавлении метотрексата и митоксантрона в концентрации 1 мкМ, а кверцетина в концентрациях 1–10 мкМ как в апикальную, так и в базолатеральную камеры их содержание в камере-реципиенте было ниже НПКО разработанных методик количественного определения веществ.

При оценке транспорта метотрексата в концентрациях 5, 10 и 50 мкМ были получены результаты, представленные на Рисунках 23, 24. Количество метотрексата возрастало с повышением концентрации вещества и с течением времени как в апикальной, так и в базолатеральной камерах, что свидетельствует о дозозависимом транспорте вещества через монослой клеток Сасо-2.

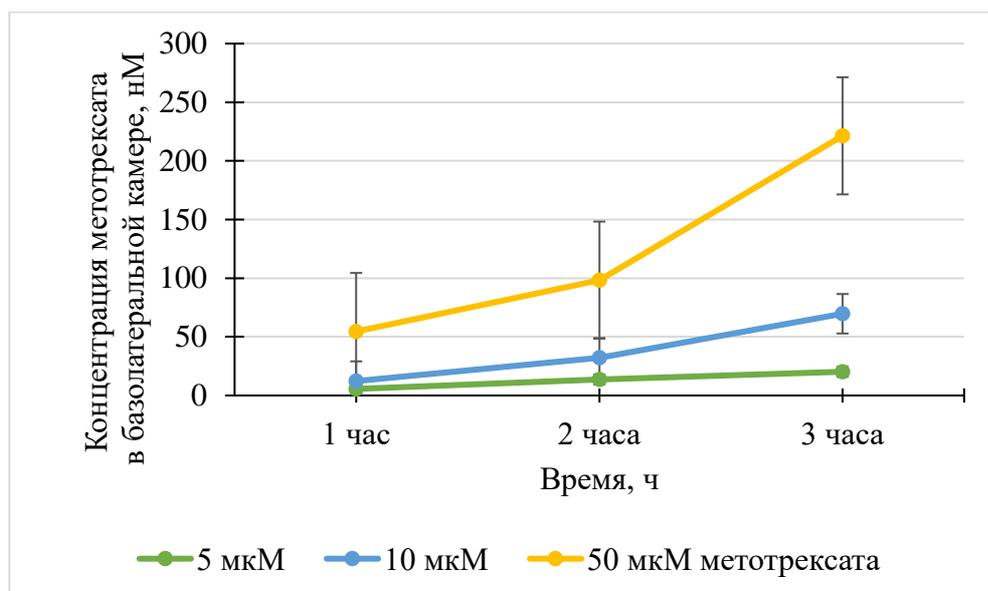


Рисунок 23 – Динамика уровня метотрексата в базолатеральной камере трансвелл-системы при его использовании в концентрациях 5,10 и 50 мкМ в течение 3 часов

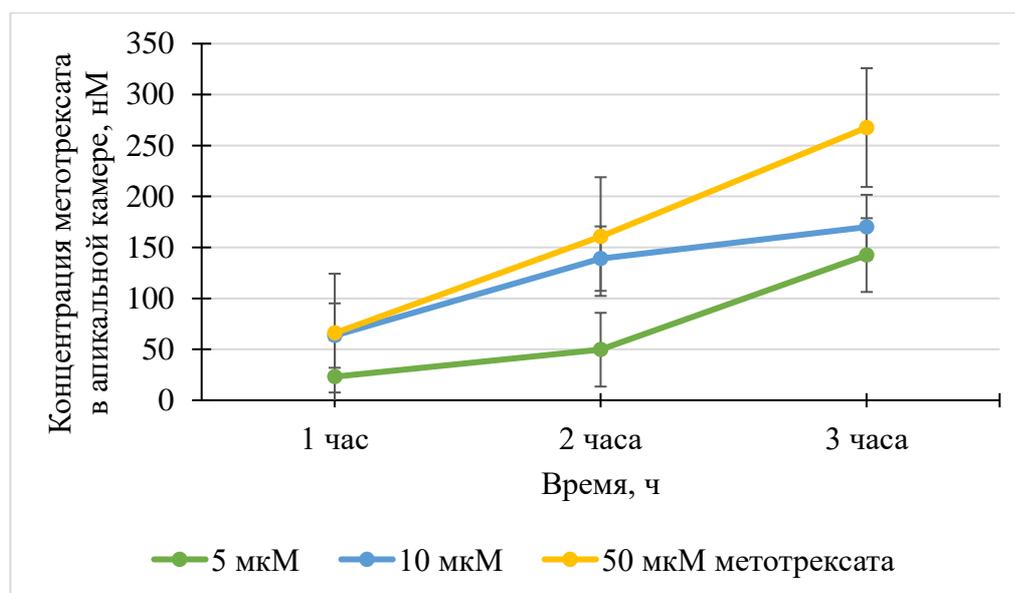


Рисунок 24 – Динамика уровня метотрексата в апикальной камере трансвелл-системы при его использовании в концентрациях 5,10 и 50 мкМ в течение 3 часов

Рассчитанные для метотрексата коэффициенты кажущейся проницаемости и их отношение представлены в Таблице 15.

Таблица 15 – Транспорт субстратов BCRP – метотрексата, митоксантрона и кверцетина через монослой клеток линии Caco-2 при воздействии в течение 3 часов ($M \pm SD$)

Серия		Рарр р b-a, * 10^{-6} см/сек	Рарр а-b, * 10^{-6} см/сек	Рарр b-a/ Рарр а-b
метотрексат	1 мкМ	Не рассчитывались, т.к. концентрации вещества были ниже НПКО		
	5 мкМ	1,46±0,58	0,44±0,18	3,38±0,078
	10 мкМ	0,41±0,13*	1,38±0,18*	0,30±0,052*
	50 мкМ	0,41±0,14*	0,98±0,033*#	0,42±0,14*
митоксантрон	1 мкМ	ниже НПКО	ниже НПКО	ниже НПКО
	5 мкМ	2,23±0,090	0,82±0,080	2,72±0,16
	10 мкМ	1,57±0,32*	0,25±0,045*	6,18±0,17*
	50 мкМ	0,75±0,018*#	0,34±0,054*	2,22±0,30*#
кверцетин	1 мкМ	ниже НПКО	ниже НПКО	ниже НПКО
	5 мкМ	ниже НПКО	ниже НПКО	ниже НПКО
	10 мкМ	ниже НПКО	ниже НПКО	ниже НПКО
	50 мкМ	0,035±0,015	0,02±0,014	1,93±0,46

Примечание: серым цветом выделены значения отношения Рарр b-a/Рарр а-b, превышающее «2», свидетельствующие об участии эффлюксного транспортера BCRP в трансцеллюлярном переносе вещества

* – $p < 0,05$ – достоверные различия со значениями при концентрации вещества 5 мкМ; # – $p < 0,05$ – достоверные различия со значениями при концентрации вещества 10 мкМ

Для метотрексата в концентрации 5 мкМ наблюдалась выраженная асимметрия трансцеллюлярного транспорта вещества: коэффициент кажущейся проницаемости Рарр b-a составил $1,46 \pm 0,58 \cdot 10^{-6}$ см/сек, Рарр а-b – $0,44 \pm 0,18 \cdot 10^{-6}$ см/сек, а их отношение Рарр b-a/Рарр а-b превышало «2» и составило 3,38, что свидетельствует об участии эффлюксного белка BCRP в транспорте вещества. При добавлении метотрексата в камеру-донор в концентрациях 10 и 50 мкМ

отношение коэффициентов кажущейся проницаемости достоверно снижалось по сравнению с данным параметром при использовании концентрации 5 мкМ до значений ниже единицы ($p=0,00023$, $p=0,00024$ соответственно), что свидетельствует о снижении транспорта метотрексата в направлении из клеток в апикальную камеру (соответствует эффлюксу в просвет кишечника за счет функционирования BCRP) (Рисунок 25).

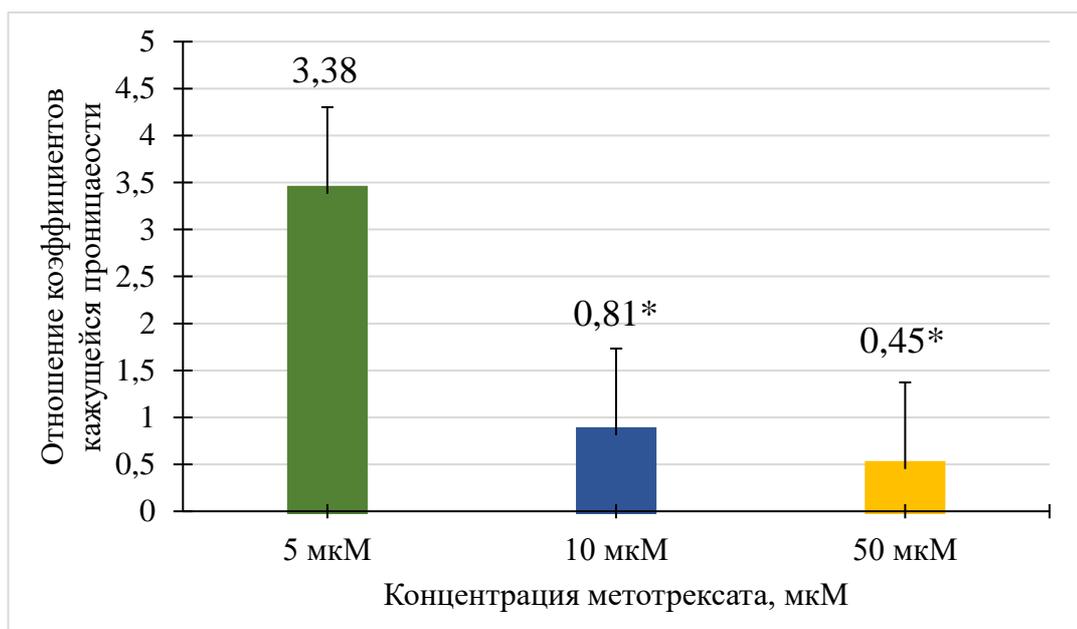


Рисунок 25 – Изменение отношения коэффициентов кажущейся проницаемости $P_{app} b-a/P_{app} a-b$ при использовании метотрексата в концентрациях 5, 10 и 50 мкМ в течение 3 часов в клетках линии Caco-2

Примечание: * - $p \leq 0,05$ – достоверные различия со значениями при концентрации метотрексата 5 мкМ

На Рисунках 26 и 27 представлены результаты транспортных экспериментов для митоксантрона при его использовании в концентрациях 5, 10 и 50 мкМ в течение 3 часов. При повышении концентрации субстрата и при увеличении времени инкубирования повышалось его количество в обеих камерах трансвелл-системы, что подтверждает трансцеллюлярный перенос вещества через клеточный монослой в обоих направлениях.

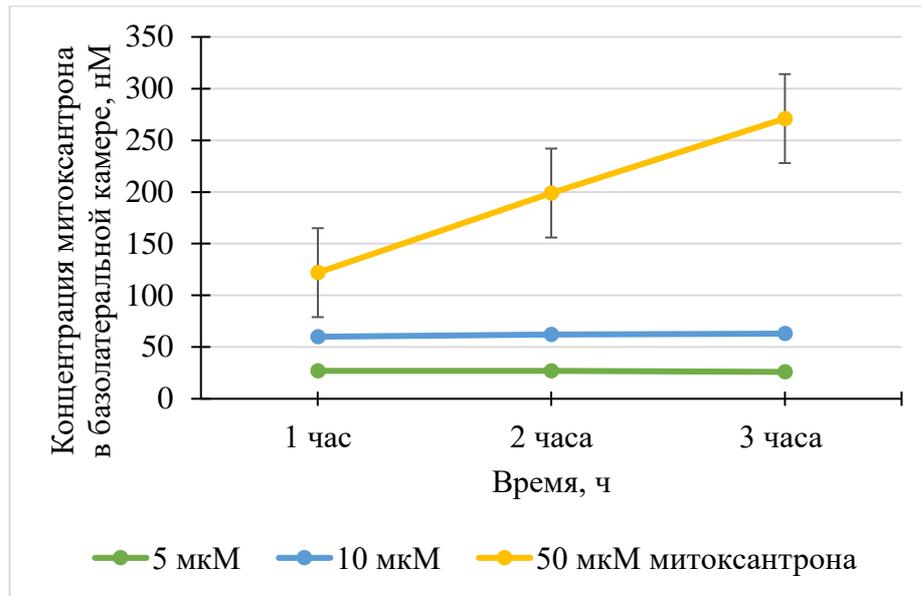


Рисунок 26 – Динамика уровня митоксантрона в базолатеральной камере трансвелл-системы при его использовании в концентрациях 5, 10 и 50 мкМ в течение 3 часов

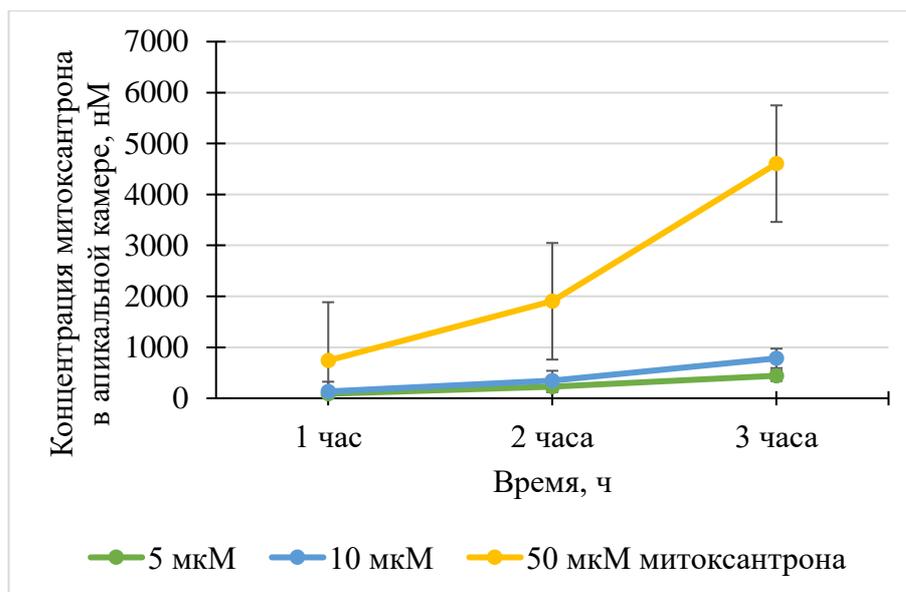


Рисунок 27 – Динамика уровня митоксантрона в апикальной камере трансвелл-системы при его использовании в концентрациях 5, 10 и 50 мкМ в течение 3 часов

Коэффициенты кажущейся проницаемости и отношение этих коэффициентов для митоксантрона представлены в Таблице 15. Для митоксантрона в концентрации 5 мкМ наблюдалась выраженная асимметрия трансцеллюлярного транспорта вещества: коэффициент кажущейся

проницаемости Papp b-a составил $2,23 \pm 0,090 \cdot 10^{-6}$ см/сек, Papp a-b – $0,82 \pm 0,080 \cdot 10^{-6}$ см/сек, а их отношение Papp b-a/Papp a-b составило – 2,72, т.е. превышало «2», что свидетельствует об участии эффлюксного белка BCRP в транспорте вещества.

Повышение концентрации митоксантрона в транспортной среде до 10 мкМ приводило к достоверному снижению коэффициентов кажущейся проницаемости Papp b-a и Papp a-b и к росту отношения коэффициентов кажущейся проницаемости по сравнению с данным параметром при концентрации 5 мкМ до 6,18 ($p=0,00024$), что характеризует увеличение асимметрии транспорта митоксантрона. При содержании вещества 50 мкМ показатель отношения коэффициентов кажущейся проницаемости Papp b-a/Papp a-b снижался по сравнению с сериями 5 мкМ ($p=0,0297$) и 10 мкМ ($p=0,00023$) митоксантрона, однако оставался выше критического значения «2», т.е. асимметрия транспорта вещества сохранялась, но, возможно, происходило субстратное насыщение BCRP (Рисунок 28).

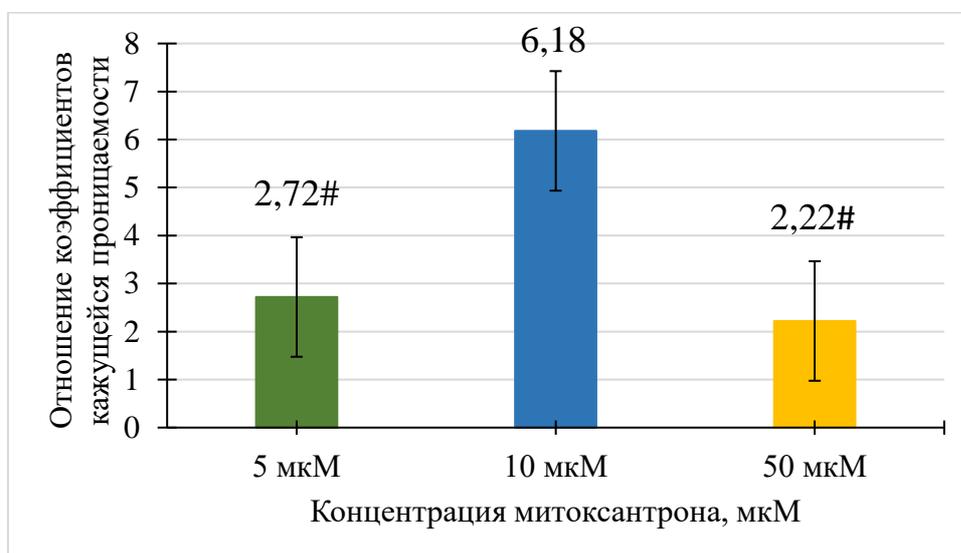


Рисунок 28 – Изменение отношения коэффициентов кажущейся проницаемости Papp b-a/Papp a-b при использовании митоксантрона в концентрациях 5, 10 и 50 мкМ в течение 3 часов в клетках линии Сасо-2

Примечание: # – $p < 0,05$ – достоверные различия со значениями при концентрации вещества 10 мкМ

При добавлении кверцетина в камеру-донор вещество не детектировалось в камере-реципиенте при использовании концентраций 1, 5 и 10 мкМ (Таблица 15). При внесении кверцетина в базолатеральную камеру трансвелл-системы в концентрации 50 мкМ вещество детектировалось в камере-реципиенте в количестве менее 1% от его содержания в камере-доноре, что свидетельствует о его низкой проницаемости через клеточный монослой. При этом наблюдалась незначительная асимметрия транспорта кверцетина (Papp b-a/Papp a-b составил 1,93), недостаточная для того, чтобы утверждать о значимом участии BCRP в эффлюксе субстрата в предложенных условиях.

Таким образом, результаты исследования показали, что метотрексат (5 мкМ) и митоксантрон (10 мкМ) являются наиболее оптимальными субстратами BCRP в используемых условиях транспортного эксперимента на клетках линии Caco-2.

3.2.1 Влияние резерпина - ингибитора BCRP на транспорт метотрексата и митоксантрона через билипидный слой клеток Caco-2

Дальнейшее исследование проводили с целью подтверждения участия белка-транспортера BCRP в трансцеллюлярном переносе изученных веществ. В качестве субстратов BCRP использовали метотрексат и митоксантрон в концентрациях 5 и 10 мкМ соответственно, что связано с выявленными в сериях предшествующего эксперимента максимальными показателями отношения коэффициентов кажущейся проницаемости, превышающими значение «2». Анализ заключался в оценке интенсивности переноса указанных веществ через клеточный монослой в присутствии ингибитора BCRP – резерпина в концентрации 50 мкМ.

В серии экспериментов без добавления ингибитора BCRP отношение Papp b-a/Papp a-b метотрексата составило 3,38, что показывает выраженную асимметрию транспорта субстрата. Концентрация метотрексата в обеих камерах трансвелл-системы снижалась при инкубации с резерпином в течение 3 часов (Рисунки 29, 30).

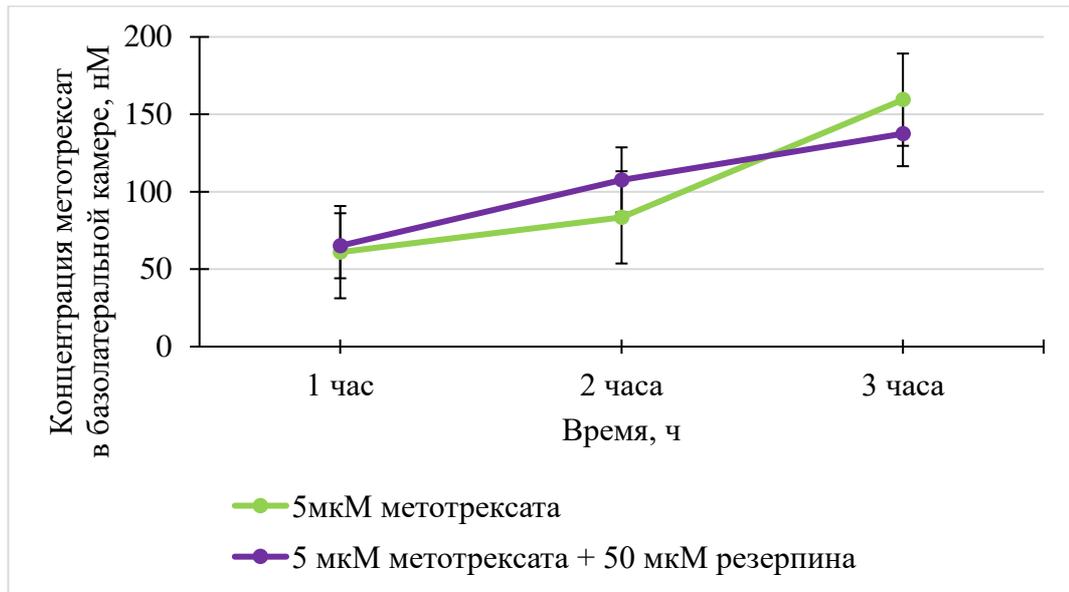


Рисунок 29 – Динамика уровня метотрексата в базолатеральной камере трансвелл-системы при его использовании в концентрации 5 мкМ в течение 3 часов на фоне ингибитора BCRP – резерпина в концентрации 50 мкМ и без добавления ингибитора

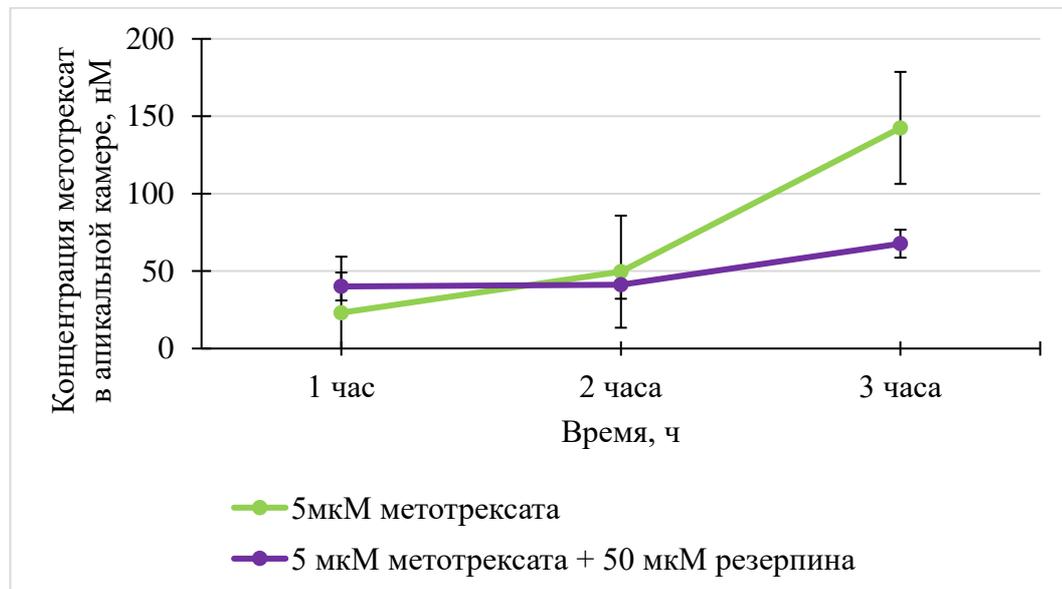


Рисунок 30 – Динамика уровня метотрексата в апикальной камере трансвелл-системы при его использовании в концентрации 5 мкМ в течение 3 часов на фоне ингибитора BCRP – резерпина в концентрации 50 мкМ и без добавления ингибитора

Резерпин снижал коэффициент кажущейся проницаемости Papp b-a метотрексата в 2,75 раза (уровень тенденции: $p=0,053$), достоверно не изменял коэффициент кажущейся проницаемости Papp a-b ($p=0,539$). Отношение Papp b-a/Papp a-b при этом снижалось в 3,31 раза ($p=0,0002$) и составило - 1,02, что свидетельствует об устранении асимметрии транспорта вещества, характерной для участия эффлюксного белка-транспортера BCRP в данном процессе. Полученные результаты подтверждают возможность использования метотрексата в концентрации 5 мкМ для оценки принадлежности лекарственных веществ к ингибиторам BCRP. Полученные результаты приведены в Таблице 16.

Таблица 16 – Влияние ингибитора BCRP резерпина (50 мкМ) на транспорт метотрексата (5 мкМ) и митоксантрона (10 мкМ) через монослой клеток линии Caco-2 при воздействии в течение 3 часов ($M \pm SD$)

Серия	Papp b-a, *10 ⁻⁶ см/сек	Papp a-b, *10 ⁻⁶ см/сек	Papp b-a/ Papp a-b
Метотрексат 5 мкМ	1,46±0,58	0,44±0,18	3,38±0,08
Метотрексат 5 мкМ + резерпин 50 мкМ	0,53±0,13*	0,56±0,27	1,02±0,29*
Митоксантрон 10 мкМ	1,57±0,32	0,25±0,045	6,18±0,17
Митоксантрон 10 мкМ + резерпин 50 мкМ	0,39±0,057*	0,21±0,025	1,84±0,052*

Примечание: * – $p < 0,05$ – достоверные различия со значениями серии без добавления резерпина

В экспериментах без добавления ингибитора BCRP - резерпина отношение Papp b-a/Papp a-b митоксантрона составило 6,18, что подтверждает значительную асимметрию транспорта данного субстрата. Концентрация митоксантрона в обеих камерах трансвелл-системы снижалась при инкубации с резерпином в течение 1, 2 и 3 часов (Рисунки 31, 32).

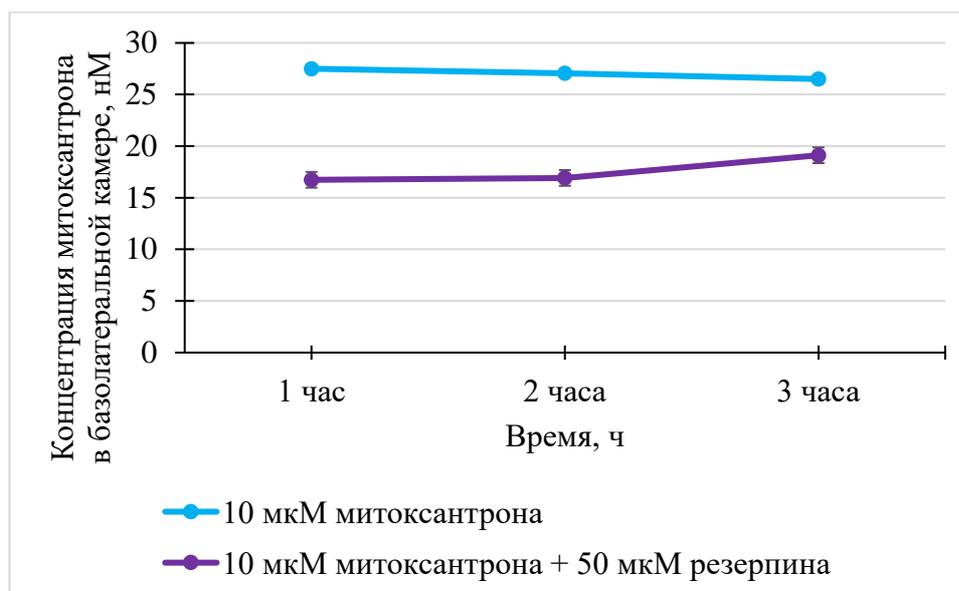


Рисунок 31 – Динамика уровня митоксантрона в базолатеральной камере трансвелл-системы при его использовании в концентрации 10 мкМ в течение 3 часов на фоне ингибитора ВСРР – резерпина в концентрации 50 мкМ и без добавления ингибитора

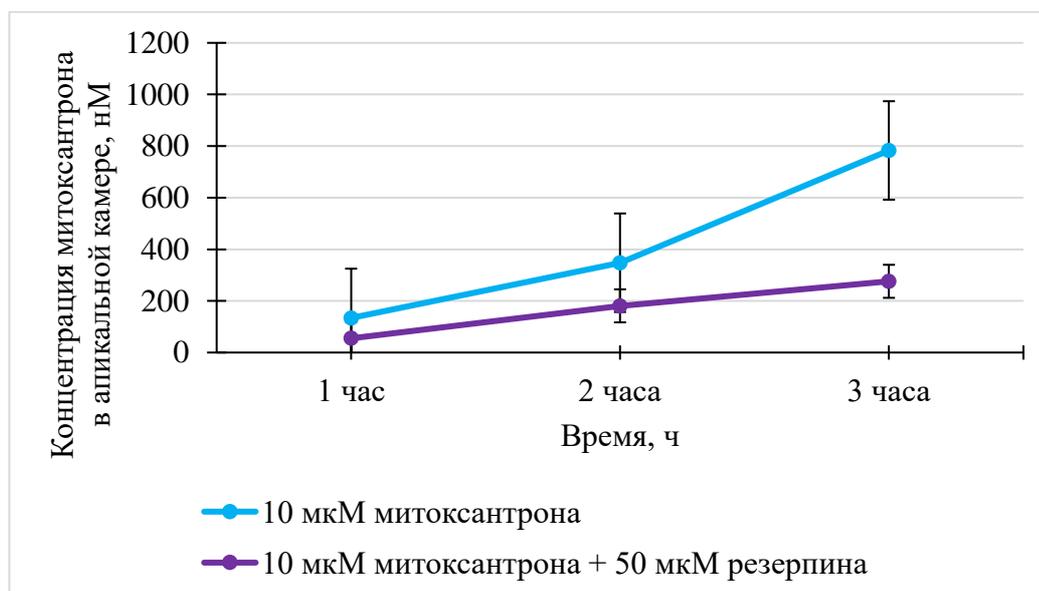


Рисунок 32 – Динамика уровня митоксантрона в апикальной камере трансвелл-системы при его использовании в концентрации 10 мкМ в течение 3 часов на фоне ингибитора ВСРР – резерпина в концентрации 50 мкМ и без добавления ингибитора

При концентрации митоксантрона 10 мкМ резерпин снижал его коэффициент кажущейся проницаемости P_{app} b-a в 4,03 раза ($p=0,0033$), не влиял

достоверно на коэффициент кажущейся проницаемости P_{app} a-b и уменьшал отношение коэффициентов кажущейся проницаемости в 3,36 раза ($p < 0,0001$), P_{app} b-a/ P_{app} a-b составило 1,84 (Таблица 16). Полученные данные подтверждают участие BCRP в трансцеллюлярном переносе митоксантрона и позволяют рекомендовать данное вещество в концентрации 10 мкМ в качестве субстрата для оценки влияния лекарственных средств на активность изучаемого белка-транспортера.

3.3 Модификация и валидация методики количественного определения этилметилгидроксипиридина сукцината в транспортный среде методом ВЭЖХ-УФ

Методика количественного определения этилметилгидроксипиридина сукцината в транспортной среде была модифицирована на основе разработанных ранее методик и адаптирована для использования на хроматографе «Стайер» (Россия), оснащенный УФ-спектрофотометрическим детектором. Описание методики приведено в главе 2 «Материалы и методы». Валидацию выполняли согласно требованиям к валидации биоаналитических методик по параметрам: селективность, нижний предел количественного определения, линейность, правильность и прецизионность, стабильность, перенос пробы.

Селективность. На хроматограммах образцов холостой транспортной среды не наблюдалось пиков со временем удерживания, соответствующим времени удерживания этилметилгидроксипиридина сукцината (Рисунки 33, 34).

Нижний предел количественного определения этилметилгидроксипиридина сукцината составил 400 нМ. При этом отношение сигнала к шуму было не ниже 10, а правильность и прецизионность определения не превышали 20%. Предел обнаружения этилметилгидроксипиридина сукцината в транспортной среде составил 100 нМ, при этом соотношение сигнала к шуму (базовой линии) было не менее 3.

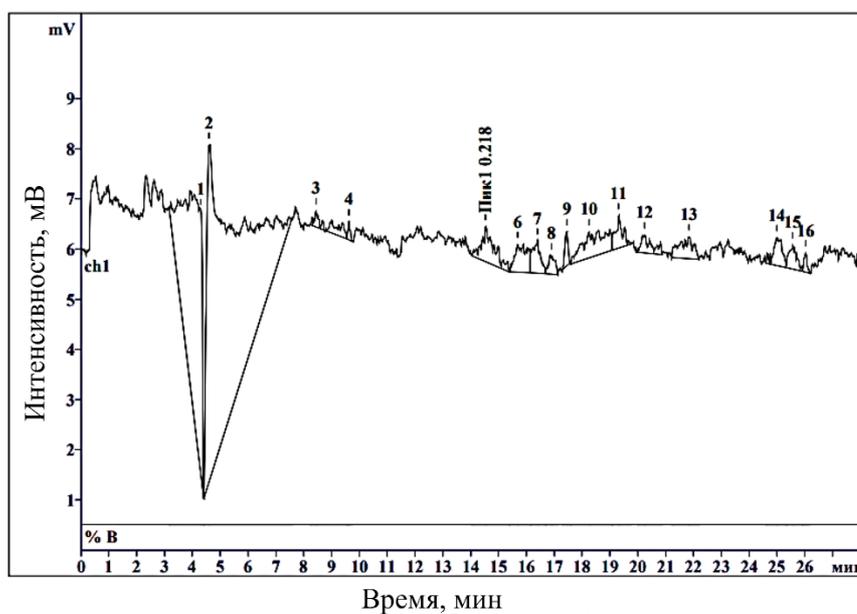


Рисунок 33 – Хроматограмма холостой пробы транспортной среды

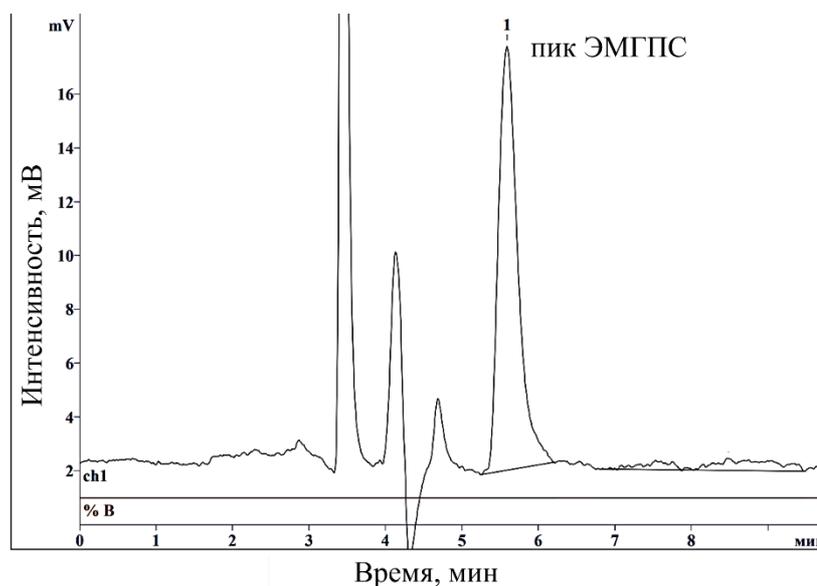


Рисунок 34 – Хроматограмма транспортной среды с добавлением этилметилгидроксипиридина сукцината (ЭМГПС) до конечной концентрации 4280 нмоль/мл

Калибровочная кривая. Проводили анализ 7 образцов холостой транспортной среды с добавлением матричного раствора этилметилгидроксипиридина сукцината до получения концентраций 400, 2140, 4280, 12860, 25720, 44780, 89560 нМ. По полученным значениям были построены калибровочные графики в координатах площадь пика – концентрация этилметилгидроксипиридина сукцината, один из образцов калибровочного

графика представлен на Рисунке 35. Были получены следующие уравнения линейной регрессии: $y=90,061*x-7,7044$, $R^2=0,9999$, $y=83,404*x-0,1416$, $R^2=0,9986$, $y=87,97*x+5,3828$, $R^2=0,9991$. Рассчитанные коэффициенты корреляции соответствовали принятой норме (не менее 0,99) (Таблица 17).

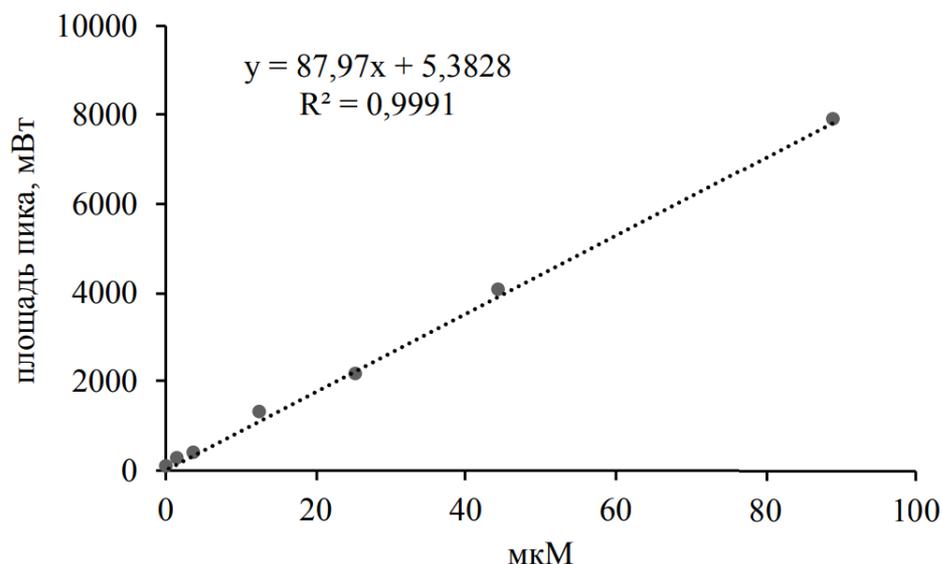


Рисунок 35 – Образец калибровочного графика зависимости

«концентрация этилметилгидроксипиридина сукцината – площадь пика»

Правильность и прецизионность. Выполняли анализ образцов транспортной среды с добавлением стандартных растворов этилметилгидроксипиридина сукцината до получения концентраций 400, 12860, 44780 нМ. Анализ выполняли в рамках трех циклов. В первом цикле оценивали прецизионность и правильность внутри цикла, для этого анализировали по 5 образцов для каждой концентрации этилметилгидроксипиридина сукцината (Таблица 18). С использованием трех циклов тестировали прецизионность и правильность между циклами (Таблица 19). Полученные величины прецизионности и точности соответствовали принятым нормам (не более 20% для нижнего предела количественного определения и не более 15% – для остальных точек).

Таблица 17 – Отклонения концентраций этилметилгидроксипиридина сукцината в калибровочных образцах от их номинальных значений

Концентрация номинальная, нМ	Серия 1		Серия 2		Серия 3	
	Концентрация рассчитанная, нМ	Точность, %	Концентрация рассчитанная нМ	Точность, %	Концентрация рассчитанная нМ	Точность, %
400,0	480,0	19,4	470,0	18,4	340,0	14,2
2140,0	2390,0	11,5	2450,0	14,6	2250,0	5,0
4280,0	4320,0	1,02	4300,0	0,51	4150,0	2,9
12860,0	13190,0	2,5	14270,0	10,9	14240,0	10,7
25720,0	24970,0	3,0	23280,0	9,5	24000,0	6,7
44780,0	44560,0	0,48	45500,0	1,6	45570,0	1,8
89560,0	89790,0	0,26	89860,0	0,34	89850,0	0,33

Таблица 18 – Правильность и прецизионность методики количественного определения этилметилгидроксипиридина сукцината в транспортной среде внутри цикла

Концентрация номинальная, нМ	Концентрация рассчитанная нМ	Правильность, %	Концентрация средняя, нМ	Средняя правильность, %	SD	Прецизионность, %
400,0	370,0	6,9	430,0	7,4	0,06	14,0
	480,0	19,4				
	470,0	17,9				
	470,0	17,9				
	350,0	10,9				
12860,0	12100,0	6,0	12300,0	14,4	0,87	7,1
	12900,0	0,53				
	13400,0	4,5				
	11600,0	10,0				
	11400,0	11,1				
44780,0	46100,0	2,9	45500,0	1,6	1,06	2,3
	44000,0	1,6				
	44900,0	0,24				
	46800,0	4,5				

Таблица 19 – Правильность и прецизионность методики количественного определения этилметилгидроксипиридина сульфата в транспортной среде между циклами

Концентрация номинальная, нМ	Концентрация рассчитанная нМ	Правильность, %	Концентрация средняя, нМ	Средняя правильность, %	SD	Прецизионность, %
400,0	370,0	7,5	370,0	8,3	0,025	6,29
	340,0	15,0				
	390,0	2,5				
12860,0	12100,0	5,9	13230,0	2,9	1,3	9,8
	13000,0	1,1				
	14600,0	13,5				
44780,0	46100,0	2,9	46800,0	4,5	2,72	6,1
	49800,0	11,2				
	44500,0	0,63				

Стабильность. Для оценки стабильности этилметилгидроксипиридина сукцината в транспортной среде при хранении готовили образцы с концентрациями 400 и 44780 нМ. Стабильность проверяли по 3 независимым образцам при хранении при -80°C в течение 2 месяцев, трехкратном цикле разморозки-заморозки, кратковременном хранении при комнатной температуре. Рассчитанные концентрации этилметилгидроксипиридина сукцината до и после заморозки статистически значимо не различались.

Перенос пробы. При последовательном анализе пробы с концентрацией этилметилгидроксипиридина сукцината 89560 нМ и образца чистой транспортной среды на хроматограмме чистой транспортной среды отсутствовали пики, соответствующие по времени удерживания пикам этилметилгидроксипиридина сукцината.

Аналитический диапазон методики составил для этилметилгидроксипиридина сукцината 400-89560 нМ целевого вещества.

3.4 Оценка принадлежности этилметилгидроксипиридина сукцината к субстратам и модуляторам активности BCRP

Для оценки принадлежности этилметилгидроксипиридина сукцината к субстратам BCRP выполняли транспортный эксперимент, используя трансвелл-систему с монослоем клеток Caco-2. Анализировали транспорт этилметилгидроксипиридина сукцината в диапазоне концентраций 10, 100 и 250 мкМ, значение коэффициентов кажущейся проницаемости и отношение этих коэффициентов представлены в Таблице 20.

Таблица 20 – Транспорт этилметилгидроксипиридина сукцината в концентрациях 10, 100 и 250 мкМ через монослой клеток линии Сасо-2 при воздействии в течение 3 часов ($M \pm SD$)

Концентрация этилметилгидроксипиридина сукцината	$P_{app} \text{ b-a,}$ $*10^{-6} \text{ см/сек}$	$P_{app} \text{ a-b,}$ $*10^{-6} \text{ см/сек}$	$P_{app} \text{ b-a/}$ $P_{app} \text{ a-b}$
10 мкМ	$7,56 \pm 2,98^*$	$7,66 \pm 1,71^*$	$0,99 \pm 0,32$
100 мкМ	$6,63 \pm 2,15^*$	$7,05 \pm 2,15^*$	$0,94 \pm 0,039$
250 мкМ	$16,5 \pm 4,16$	$22,3 \pm 1,99$	$0,75 \pm 0,26$

Примечание: * – $p < 0,05$ – достоверные различия со значениями при концентрации этилметилгидроксипиридина сукцината 250 мкМ

Значения $P_{app} \text{ b-a}$ при концентрациях этилметилгидроксипиридина сукцината 10 мкМ и 100 мкМ составили $7,56 \pm 2,98 * 10^{-6} \text{ см/сек}$ и $6,63 \pm 2,15 * 10^{-6} \text{ см/сек}$ соответственно, а значения $P_{app} \text{ a-b}$ – $7,66 \pm 1,71 * 10^{-6} \text{ см/сек}$ и $7,05 \pm 2,15 * 10^{-6} \text{ см/сек}$ соответственно. При данных показателях коэффициентов кажущейся проницаемости их отношения составили менее «2» (0,99 и 0,94 соответственно). Значения $P_{app} \text{ b-a}$ и $P_{app} \text{ a-b}$ этилметилгидроксипиридина сукцината при использовании концентрации 250 мкМ, были достоверно выше, чем в предшествующих сериях, и равнялись $16,5 \pm 4,16 * 10^{-6} \text{ см/сек}$ и $22,3 \pm 1,99 * 10^{-6} \text{ см/сек}$ соответственно. Значение $P_{app} \text{ b-a} / P_{app} \text{ a-b}$ было менее «2» и равнялось 0,75, что свидетельствует об отсутствии участия белка-транспортера - BCRP в переносе тестируемого вещества во всех исследованных сериях. Исходя из полученных результатов, транспортные эксперименты с использованием ингибитора BCRP – резерпина не проводились.

Принадлежность этилметилгидроксипиридина сукцината к модуляторам активности BCRP оценивали с помощью транспортного эксперимента с использованием в качестве субстрата митоксантрона с концентрацией 10 мкМ. График изменения концентрации митоксантрона в

обеих камерах трансвелл-системы при добавлении этилметилгидроксипиридина сукцината и без него представлен на Рисунках 36, 37.

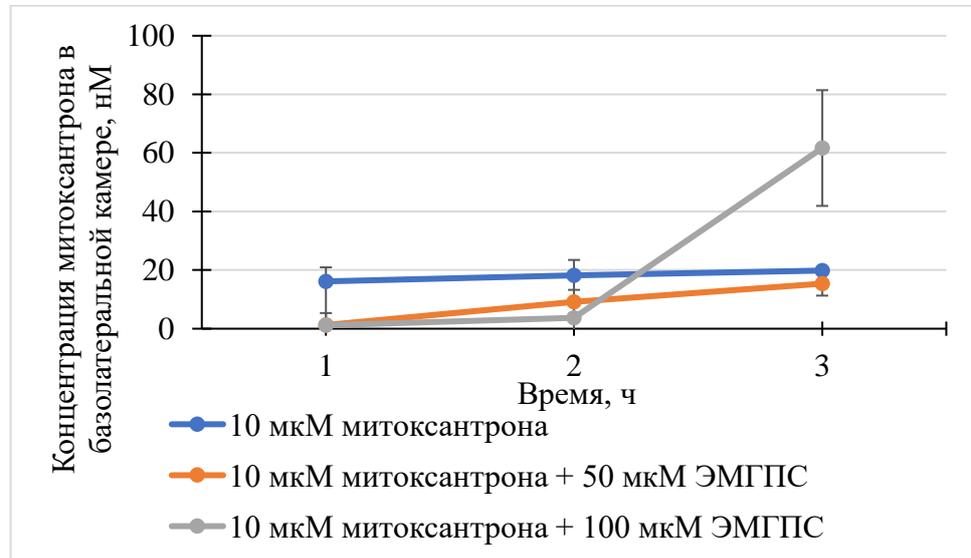


Рисунок 36 – Динамика уровня митоксантрона в базолатеральной камере трансвелл-системы в концентрации 10 мкМ в течение 3 часов и на фоне этилметилгидроксипиридина сукцината (ЭМГПС) в концентрациях 50 мкМ и 100 мкМ

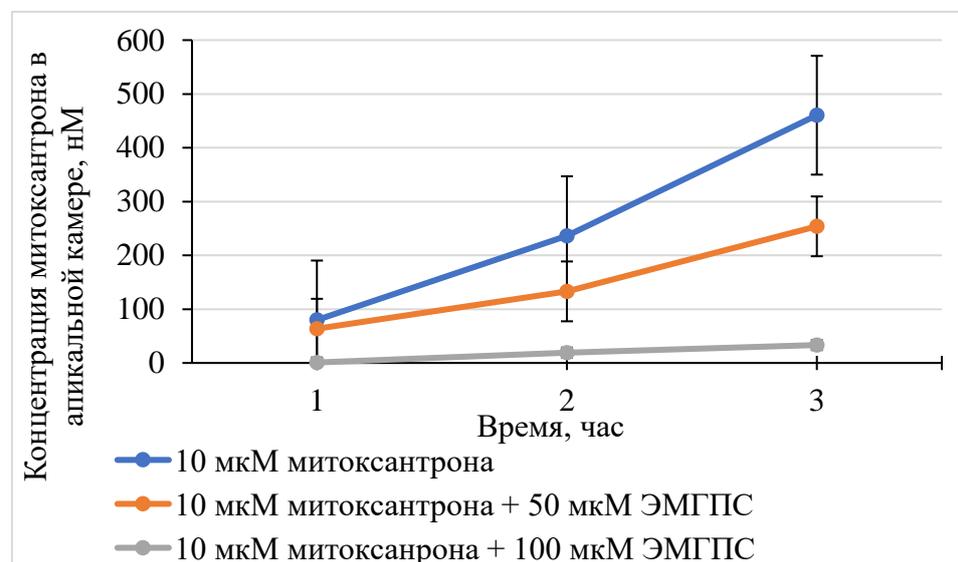


Рисунок 37 – Динамика уровня митоксантрона в апикальной камере трансвелл-системы в концентрации 10 мкМ в течение 3 часов и на фоне этилметилгидроксипиридина сукцината (ЭМГПС) в концентрациях 50 мкМ и 100 мкМ

Для митоксантрона с концентрацией 10 мкМ наблюдалась выраженная асимметрия трансцеллюлярного транспорта вещества: коэффициент кажущейся проницаемости P_{app} b-a составил $1,06 \pm 0,16 \cdot 10^{-6}$ см/сек, P_{app} a-b – $0,21 \pm 0,046 \cdot 10^{-6}$ см/сек, а их отношение P_{app} b-a/ P_{app} a-b превышало «2» и составило $4,98 \pm 0,37$, что доказывает участие эффлюксного белка BCRP в транспорте вещества и соответствует результатам, полученным ранее (Таблица 21).

При добавлении этилметилгидроксипиридина сукцината с концентрацией 50 мкМ коэффициент P_{app} b-a митоксантрона снижался до $0,63 \pm 0,039 \cdot 10^{-6}$ см/сек ($p=0,040161$), а значение P_{app} a-b и отношение коэффициентов P_{app} b-a/ P_{app} a-b статистически значимо не изменялись (P_{app} a-b = $0,16 \pm 0,040 \cdot 10^{-6}$ см/сек, P_{app} b-a/ P_{app} a-b = 3,97).

Таблица 21 – Влияние этилметилгидроксипиридина сукцината в концентрациях 50 и 100 мкМ на транспорт митоксантрона в концентрации 10 мкМ через монослой клеток линии Caco-2 ($M \pm SD$)

Серия	P_{app} b-a, $\cdot 10^{-6}$ см/сек	P_{app} a-b, $\cdot 10^{-6}$ см/сек	P_{app} b-a/ P_{app} a-b
Митоксантрон 10 мкМ	$1,06 \pm 0,16$	$0,21 \pm 0,046$	$4,98 \pm 0,37$
Митоксантрон 10 мкМ + этилметилгидроксипиридина сукцинат 50 мкМ	$0,63 \pm 0,039^*$	$0,16 \pm 0,040$	$3,97 \pm 0,86$
Митоксантрон 10 мкМ + этилметилгидроксипиридина сукцинат 100 мкМ	$0,083 \pm 0,0087^*$	$0,66 \pm 0,096^*$	$0,127 \pm 0,0066^*$

Примечание: * – $p < 0,05$ – достоверные различия со значениями серии митоксантрона 10 мкМ

Значение P_{app} b-a митоксантрона при добавлении этилметилгидроксипиридина сукцината в концентрации 100 мкМ уменьшалось в 12,8 раза ($p=0,003879$), а P_{app} a-b митоксантрона

увеличивалось в 3 раза ($p=0,008526$), при этом отношение $P_{app} \text{ b-a}/P_{app} \text{ a-b}$ существенно уменьшилось и составило $0,127 \pm 0,0066$ ($p=0,000337$).

Таким образом, этилметилгидроксипиридина сукцинат снижал коэффициент кажущейся проницаемости $P_{app} \text{ b-a}$ при концентрациях 50 и 100 мкМ, при этом отношение коэффициентов кажущейся проницаемости $P_{app} \text{ b-a}/P_{app} \text{ a-b}$ уменьшилось при увеличении концентрации этилметилгидроксипиридина сукцината до 100 мкМ, что показывает принадлежность тестируемого вещества к ингибиторам BCRP.

3.4.1 Оценка влияния этилметилгидроксипиридина сукцината на количество BCRP

Оценку влияния этилметилгидроксипиридина сукцината на количество BCRP выполняли с помощью метода вестерн-блот.

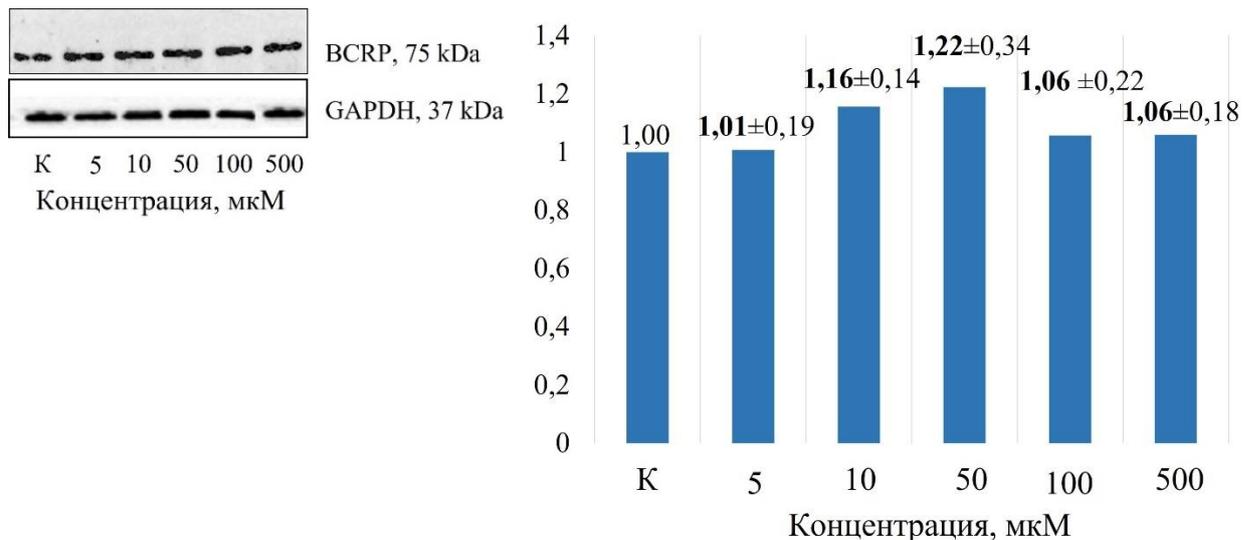


Рисунок 38 – Изменение относительного количества BCRP в клетках линии Caco-2 при воздействии этилметилгидроксипиридина сукцината в концентрациях 5, 10, 50, 100, 500 мкМ в течение 24 ч ($M \pm SD$, $n=6$ – для каждой серии экспериментов)

Примечание: К – контроль; слева – фото бендов, полученных с помощью ChemiDocXRS+; справа – результаты денситометрического анализа, выполненного с помощью программного обеспечения Microsoft Office

При воздействии этилметилгидроксипиридина сукцината в концентрациях 5, 10, 50, 100, 500 мкМ на клетки линии Сасо-2 в течение 24 ч количество ВСРР достоверно по сравнению с контролем не изменялось, $p > 0,05$ (Рисунок 38).

Таким образом, этилметилгидроксипиридина сукцинат не влияет на количество ВСРР в клетках линии Сасо-2 при инкубации в течение 24 часов.

ГЛАВА 4. ЗАКЛЮЧЕНИЕ

BCRP является вторым членом подсемейства G белков АТФ-связывающих кассетных транспортеров [125]. Локализация белка в тканях организма (плаценте, кишечнике, печени, эндотелии сосудов и др.) указывает на то, что BCRP играет важную роль в абсорбции, распределении и выведении из организма лекарственных веществ, являющихся его субстратами [19, 121-122, 176]. BCRP ограничивает пероральную биодоступность и опосредует выведение субстратов через гепатобилиарную систему [88, 185].

BCRP имеет широкий спектр веществ-субстратов из разных фармакологических групп, который постоянно увеличивается с момента открытия транспортера [126]. Некоторые соединения способны влиять на активность BCRP: увеличение активности белка может привести к снижению эффективности проводимой фармакотерапии, а снижение активности BCRP приводит к увеличению абсорбции веществ и риску развития побочных эффектов. В связи с этим, Управление по надзору за качеством пищевых продуктов и медикаментов (Food and Drug Administration, FDA (США)) рекомендует все новые лекарственные средства тестировать на принадлежность к субстратам и ингибиторам семейств цитохромов P450 и к субстратам и ингибиторам белков-транспортеров [6]. Учитывая данные обстоятельства, растет потребность в проведении доклинических испытаний *in vitro* с использованием клеточных линий, экспрессирующих гены белков-транспортеров, что позволяет сократить временные и материальные затраты на исследование.

Для разработки методики тестирования лекарственных веществ на принадлежность к субстратам, ингибиторам и индукторам BCRP использовали клеточную линию Caco-2. Она является наиболее широко охарактеризованной моделью для изучения двунаправленного транспорта лекарственных веществ и процессов абсорбции [40], так как клетки Caco-2 подвергаются спонтанной дифференцировке в энтероциты кишечного

эпителия из-за их способности поляризоваться при образовавшемся монослоем и плотных межклеточных контактах. Также определяемые показатели проницаемости вещества в клетках Caco-2 сопоставимы с результатами, полученными в экспериментах *in vivo* [37]. В клетках Caco-2 представлены такие белки-транспортёры, как BCRP, Pgp и MRP2, но не локализуются белки OATP и концентрирующие транспортёры нуклеозидов [68, 84, 88, 157]. Количество и функциональная активность белков-транспортёров может варьироваться в зависимости от происхождения клеток, количества пассажей и условий культивирования [40, 68, 84, 89].

В клетках Caco-2 наблюдается образование как мономера BCRP (75 кДа), так и его димера (150 кДа), которые локализуются на апикальной плазматической мембране, но до момента слияния клеток (до пяти дней) BCRP также локализуется на базолатеральной мембране и в цитоплазме. После образования монослоя общее количество BCRP не изменяется. Однако количество белка зависит от числа пассажей, так, уровень мономера BCRP был в 3 раза выше, а уровень димера – в 10 раз выше в раннем пассаже, чем в позднем пассаже при высеивании клеток на трансвелл-систему [89, 189]. Исходя из вышеизложенного, следует оценивать транспорт вещества-субстрата на тех клетках, с которыми будет проводиться непосредственный эксперимент по оценке принадлежности лекарственных веществ к модуляторам активности белков-транспортёров.

Таким образом, линия клеток Caco-2 является тест-системой, которую можно использовать в анализе двунаправленного транспорта вещества для оценки принадлежности лекарственных веществ к субстратам, ингибиторам и/или индукторам BCRP *in vitro*.

В качестве тестируемых веществ были выбраны метотрексат, митоксантрон и кверцетин, которые по данным научной литературы относятся к субстратам BCRP [126].

На первом этапе исследования его задачей была разработка методик количественного определения метотрексата, митоксантрона и кверцетина в транспортной среде методом ВЭЖХ МС/МС. Выбор метода был обусловлен его высокой чувствительностью и селективностью, также возможностью использовать для анализа небольшое количество пробы тестируемого образца (50 мкл) и проводить его в короткий период времени (10-11 минут на одну пробу).

Была разработана и валидирована методика количественного определения метотрексата (субстрата BCRP) в транспортной среде клеток линии Сасо-2. Экстракция метотрексата выполнялась добавлением к пробе смеси метанола и воды в соотношении 1:1. Количественное определение проводилось методом ВЭЖХ-МС/МС. Разработанная методика была валидирована по следующим валидационным параметрам: селективность, линейность, точность, прецизионность, предел количественного определения, перенос пробы, стабильность образцов. Подтвержденный аналитический диапазон методики составил 60 – 10 000 нМ. Полученный аналитический диапазон позволяет применять разработанную методику для оценки концентрации метотрексата в транспортной среде при изучении влияния тестируемых веществ на активность белка-транспортера BCRP.

Была разработана чувствительная ВЭЖХ-МС/МС методика количественного анализа митоксантрона (субстрата BCRP) в транспортной среде. Данная методика валидирована по следующим параметрам: селективность, линейность, нижний предел количественного определения, правильность, прецизионность, матричный эффект, перенос пробы и стабильность. Аналитический диапазон методики составляет 50 – 1000 нМ, что позволяет использовать ее для определения концентрации митоксантрона при оценке его транспорта через монослой клеток линии Сасо-2 с целью анализа тест-веществ на принадлежность к модуляторам активности белка-транспортера BCRP.

Разработана и валидирована методика количественного определения кверцетина (субстрата BCRP) в транспортной среде клеток линии Caco-2. Количественное определение проводилось методом ВЭЖХ-МС/МС. Разработанная методика была валидирована по следующим валидационным параметрам: селективность, линейность, точность, прецизионность, предел количественного определения, перенос пробы, матричный эффект, стабильность образцов. Подтвержденный аналитический диапазон методики составил 5 – 500 нМ. Полученный аналитический диапазон позволяет применять разработанную методику для оценки концентрации кверцетина при изучении влияния тестируемых веществ на активность белка-транспортера BCRP.

Таким образом, разработаны и валидированы чувствительные методики количественного определения метотрексата, митоксантрона и кверцетина в транспортной среде клеток линии Caco-2 методом ВЭЖХ МС/МС. Полученный аналитический диапазон позволяет применять разработанные методики для оценки концентрации указанных субстратов при изучении влияния тестируемых веществ на активность белка-транспортера BCRP.

На следующем этапе исследования решалась задача оценки транспорта метотрексата, митоксантрона и кверцетина через билипидную мембрану клеток линии Caco-2 с участием BCRP.

Ранее для оценки активности белка-транспортера метотрексат применяли в качестве субстрата BCRP в экспериментах *in vitro* с использованием клеток Caco-2 [89], HEK293 [141], также мембранных везикул, выделенных из клеток насекомых, гиперэкспрессирующих ген *BCRP*. В экспериментах на клетках MDCKII-BCRP метотрексат показал низкую проницаемость [193]. В данных экспериментах применяли метотрексат в низких концентрациях (от 0,02 мкМ) [141].

Для проведения транспортных экспериментов на клеточной линии Caco-2 использовали метотрексат в концентрациях 1, 5, 10 и 50 мкМ. Однако, при

добавлении метотрексата в концентрации 1 мкМ как в апикальную, так и в базолатеральную камеры его содержание в камере-реципиенте было ниже НПКО разработанной методики, диапазон которой составил 60 – 10000 нМ или 0,06 – 10 мкМ.

При использовании метотрексата в концентрации 5 мкМ наблюдалась выраженная асимметрия трансцеллюлярного транспорта вещества, отношение коэффициентов кажущейся проницаемости $P_{app\ b-a}/P_{app\ a-b}$ превышало «2», что свидетельствует об участии BCRP в транспорте вещества. При добавлении метотрексата в камеру-донор в концентрациях 10 и 50 мкМ отношение $P_{app\ b-a}/P_{app\ a-b}$ достоверно уменьшалось по сравнению с параметром серии при использовании 5 мкМ до значений ниже единицы ($p=0,00023$, $p=0,00024$ соответственно), что показывает снижение транспорта метотрексата в направлении из клеток в апикальную камеру (соответствует эффлюксу в просвет кишечника). Скорее всего, полученные данные характеризуют насыщение белка-транспортера BCRP.

Таким образом, в предложенных условиях эксперимента на клетках линии Caco-2 метотрексат может быть использован в качестве субстрата BCRP только в концентрации 5 мкМ.

Митоксантрон широко используется в экспериментах *in vitro* как субстрат BCRP, так как обладает свойством флуоресценции и может быть обнаружен в пробах флуоресцентными детекторами. Митоксантрон в качестве субстрата BCRP был использован в экспериментах на разных клеточных линиях. Например, на клетках MCF-7 оценивали влияние на BCRP индометацина и дексаметазона [79], пиперидинового алкалоида, выделенного из *Piper nigrum* [150]; на клетках аденокарциномы молочной железы человека (MDA-MB-231) оценивали ингибирующую способность алкалоида гармина в отношении BCRP [79]; на клетках MDCKII-BCRP изучали влияние флавоноидов на BCRP-опосредованный транспорт митоксантрона [34], на линии клеток бронхиального человеческого эпителия (Calu-3) изучали

функциональную активность белка при добавлении ингибиторов и без них [97], на клетках НЕК293 исследовали нилотиниб на принадлежность к ингибиторам BCRP [141]. В экспериментах с применением митоксантрона в качестве субстрата его использовали в концентрациях 2,5 – 20 мкМ [34, 65, 79, 97, 141, 150].

Для проведения транспортных экспериментов на клеточной линии Сасо-2 использовали митоксантрон в концентрациях 1, 5, 10 и 50 мкМ. Однако при добавлении митоксантрона в концентрации 1 мкМ как в апикальную, так и в базолатеральную камеры его содержание в камере-реципиенте было ниже НПКО разработанной методики, диапазон которой составил 50 – 1000 нМ (0,05–1 мкМ).

Наиболее асимметричный транспорт был зафиксирован при добавлении в камеру-донор митоксантрона в концентрации 10 мкМ ($P_{app\ b-a}/P_{app\ a-b} = 6,18$), показатели отношения коэффициентов кажущейся проницаемости по сравнению с этой серией были существенно ниже при добавлении митоксантрона в концентрациях 5 мкМ (2,72) и 50 мкМ (2,22), но оставались выше критического значения «2». Уменьшение отношения коэффициентов кажущейся проницаемости при использовании митоксантрона с концентрацией 50 мкМ может объясняться субстратным насыщением BCRP.

Таким образом, митоксантрон является оптимальным субстратом BCRP в концентрации 10 мкМ при использовании в предложенных условиях транспортного эксперимента на клетках линии Сасо-2.

Кверцетин представляет собой флавонол, широко распространенный в растениях, и был выбран в качестве безопасного и нетоксического субстрата BCRP для последующего его применения в экспериментах *in vivo*. В экспериментах на клетках MDCKII изучали транспорт кемпферола с использованием кверцетина как субстрата BCRP в концентрации 10 мкМ [35].

При выполнении транспортных экспериментов на клеточной линии Сасо-2 использовали кверцетин в концентрациях 1, 5, 10 и 50 мкМ. Однако, при

добавлении кверцетина в концентрациях 1, 5 и 10 мкМ как в апикальную, так и в базолатеральную камеры его содержание в камере-реципиенте было ниже НПКО разработанной методики, диапазон которой составил 5 – 500 нМ (0,005–0,5 мкМ). При добавлении кверцетина в концентрации 50 мкМ в камеру-донор трансвелл-системы вещество детектировалось в камере-реципиенте в количестве менее 1% от его содержания в камере-доноре, что свидетельствует о низкой проницаемости вещества через монослой клеток Caco-2 и учитывая, что эти клетки схожи с энтероцитами кишечника, объясняет низкую биодоступность кверцетина [201]. При этом наблюдалась незначительная асимметрия его транспорта ($P_{app\ b-a}/P_{app\ a-b} = 1,93$), недостаточная, для утверждения участия BCRP в регуляции данного процесса в предложенных условиях. Также на низкую проницаемость кверцетина через монослой клеток линии Caco-2 может влиять то, что кверцетин является ингибитором некоторых белков-транспортеров, локализованных в выбранной клеточной линии [74, 209].

Таким образом, использование кверцетина в качестве субстрата BCRP на клетках линии Caco-2 ограничено его низкой проницаемостью через монослой клеток.

Резерпин был выбран в качестве ингибитора BCRP, так как его достаточно широко используют в экспериментах на клетках линии Caco-2 как ингибитор в концентрациях 10, 25, 50 мкМ [80, 175]. Транспортные эксперименты проводили с добавлением резерпина в качестве ингибитора BCRP в концентрации 50 мкМ к метотрексату в концентрации 5 мкМ и митоксантрон в концентрации 10 мкМ, так как в именно в этих сериях наблюдалась максимальная асимметрия их транспорта. В указанных экспериментах резерпин снижал отношение $P_{app\ b-a}/P_{app\ a-b}$ более чем в 3 раза для метотрексата ($p=0,0002$) и для митоксантрона ($p<0,0001$), что дополнительно подтверждает субстратную принадлежность использованных веществ к белку-транспортеру BCRP.

Таким образом, резерпин может быть использован в качестве ингибитора BCRP на клеточной линии Caco-2 в концентрации 50 мкМ.

На следующем этапе исследования разработанная методика оценки принадлежности тестируемых веществ к модуляторам активности белка-транспортера BCRP на клеточной линии Caco-2 была апробирована с использованием этилметилгидроксипиридина сукцината, также было изучено его влияние на количество белка-транспортера.

Этилметилгидроксипиридина сукцинат («Мексидол», ООО НПК «Фармасофт», Россия) – оригинальный отечественный синтетический антиоксидант и антигипоксанта, обладающий высокой биологической активностью. Наиболее выраженный терапевтический эффект этилметилгидроксипиридина сукцинат оказывает при сосудистых и дегенеративных заболеваниях головного мозга, таких как ишемический и геморрагический инсульты, транзиторная ишемическая атака, дисциркуляторная энцефалопатия, болезни Альцгеймера и Паркинсона, травмы головного мозга, судорожные состояния, стрессы, алкогольная энцефалопатия [4]. Этилметилгидроксипиридина сукцинат используется в комплексной терапии представленных выше заболеваний, поэтому важно оценить его взаимодействие с другими лекарственными средствами на уровне белка-транспортера BCRP.

При изучении транспорта этилметилгидроксипиридина сукцината через монослой клеток Caco-2 было выявлено, что отношения коэффициентов кажущейся проницаемости $P_{app} \text{ b-a} / P_{app} \text{ a-b}$ при трех различных концентрациях тестируемого вещества (10, 100 и 250 мкМ) примерно равнялись «1», асимметрии транспорта не наблюдалось. Полученные результаты показывают, что проникновение этилметилгидроксипиридина сукцината в направлении из просвета кишки в энтероциты соответствует его транспорту в противоположном направлении. Экспериментальные данные свидетельствуют о том, что этилметилгидроксипиридина сукцинат не

является субстратом BCRP, не транспортируется указанным переносчиком, а механизмом его абсорбции является пассивная диффузия.

Принадлежность этилметилгидроксипиридина сукцината к модуляторам активности BCRP оценивали с помощью транспортного эксперимента с использованием в качестве субстрата митоксантрона в концентрации 10 мкМ. При добавлении этилметилгидроксипиридина сукцината в концентрации 50 мкМ коэффициент P_{app} b-a митоксантрона значимо снижался, показатель P_{app} a-b и отношение коэффициентов P_{app} b-a/ P_{app} a-b статистически значимо не изменялись, асимметрия транспорта митоксантрона сохранялась (P_{app} b-a/ P_{app} a-b составлял 3,97). При увеличении концентрации этилметилгидроксипиридина сукцината до 100 мкМ коэффициент P_{app} b-a митоксантрона существенно уменьшился, коэффициент P_{app} a-b увеличивался, отношение P_{app} b-a/ P_{app} a-b значимо уменьшилось и составило 0,127.

Таким образом, результаты эксперимента показывают, что этилметилгидроксипиридина сукцинат снижал коэффициент кажущейся проницаемости P_{app} b-a, который характеризует работу эффлюксного транспортера BCRP, при концентрациях 50 и 100 мкМ, при этом отношение коэффициентов кажущейся проницаемости P_{app} b-a/ P_{app} a-b уменьшилось при увеличении концентрации этилметилгидроксипиридина сукцината до 100 мкМ, что показывает принадлежность тестируемого вещества к ингибиторам BCRP.

При воздействии этилметилгидроксипиридина сукцината в концентрациях 5, 10, 50, 100, 500 мкМ на клетки линии Caco-2 в течение 24 ч количество BCRP, определяемое методом вестерн блот, достоверно по сравнению с контролем не изменялось.

Ранее на клетках линии Caco-2 было установлено, что этилметилгидроксипиридина сукцинат является прямым ингибитором эффлюксного транспортера гликопротеина-P и по своей активности сравним с

верапамилом, который считается классическим ингибитором белка-транспортера [8].

Ряд других лекарственных препаратов также способны ингибировать оба этих ABC-транспортера (элакридар, циклоспорин, телмисартан, вератиниб и др. [32, 36, 108, 179], что может увеличить вероятность развития нежелательных межлекарственных взаимодействий на уровне транспортных белков, особенно при наличии у пациента факторов риска, таких как полипрагмазия, пожилой возраст, заболевания печени и почек и при использовании для лечения субстратов этих транспортеров.

Механизмы ингибирования белков-транспортеров могут быть связаны с прямым конкурентным или неконкурентным ингибированием сайтов связывания субстратов или с их аллостерической модификацией, нарушением гидролиза АТФ в нуклеотид-связывающем домене, с изменением структуры клеточной мембраны [179]. Поскольку этилметилгидроксипиридина сукцинат не принадлежит к субстратам BCRP, то наиболее вероятным механизмом ингибирования транспортера может являться его аллостерическое взаимодействие с транспортным белком.

Следует также отметить, что этилметилгидроксипиридина сукцинат не влияет на количество BCRP, т.е. не изменяет синтез белка-транспортера.

Таким образом, разработана и апробирована на клетках линии Caco-2 методика тестирования лекарственных средств на принадлежность к субстратам и ингибиторам BCRP с использованием в качестве субстратов метотрексата (5 мкМ) и митоксантрона (10 мкМ), а в качестве ингибитора – резерпина (50 мкМ). В исследовании *in vitro* на клетках линии Caco-2 установлено, что этилметилгидроксипиридина сукцинат не принадлежит к субстратам BCRP, но является ингибитором белка-транспортера и не изменяет его количество в клетках Caco-2.

ВЫВОДЫ

1. Разработанные методики количественного анализа метотрексата, митоксантрона и кверцетина методом ВЭЖХ-МС/МС характеризуются высокой чувствительностью, соответствуют требованиям, предъявляемым к биоаналитическим методам, и могут быть использованы для определения целевого вещества в транспортной среде в установленном диапазоне концентраций.

2. Для методики тестирования лекарственных веществ на принадлежность к субстратам, ингибиторам и индукторам BCRP на клетках линии Caco-2 оптимальными субстратами, показавшими наибольшую асимметрию транспорта, превышающую 2,0 по показателю отношения коэффициентов кажущейся проницаемости в трансвелл-системе, являются метотрексат в концентрации 5 мкМ и митоксантрон в концентрации 10 мкМ.

3. Модифицированная и валидированная методика количественного определения этилметилгидроксипиридина сукцината в транспортной среде методом ВЭЖХ-УФ в аналитическом диапазоне 400-89560 нМ целевого вещества отличается составом подвижной фазы, скоростью потока, температурой разделения и снижением времени удерживания вещества до 5,5 мин.

4. В исследовании *in vitro* установлено, что этилметилгидроксипиридина сукцинат не принадлежит к субстратам BCRP, но является ингибитором белка-транспортера и не изменяет относительное количество BCRP, установленное методом вестерн-блот, в клетках линии Caco-2.

ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

1. Рекомендуется использовать разработанную методику оценки *in vitro* на клетках линии Caco-2 принадлежности тестируемых препаратов к субстратам и модуляторам активности BCRP на этапе доклинических исследований новых лекарственных препаратов и дополнительных исследований известных лекарственных препаратов с целью прогнозирования нежелательных фармакокинетических межлекарственных взаимодействий на уровне белков-транспортеров.

2. Рекомендуется продолжить доклиническое и провести клиническое исследование для подтверждения практического значения ингибирующего влияния этилметилгидроксипиридина сукцината на активность BCRP.

ПЕРСПЕКТИВЫ ДАЛЬНЕЙШЕЙ РАЗРАБОТКИ ТЕМЫ

Методики количественного анализа метотрексата, митоксантрона и кверцетина с помощью ВЭЖХ-МС/МС перспективно модифицировать для их определения в биологических жидкостях, тканях и фармацевтических препаратах.

Разработанные и апробированные методики оценки принадлежности лекарственных средств к субстратам, ингибиторам и индукторам белка-транспортера BCRP *in vitro* на клетках линии Caco-2 целесообразно использовать для оценки новых и широко применяющихся отечественных оригинальных препаратов для получения дополнительной информации, характеризующей их возможные межлекарственные взаимодействия.

Целесообразно разработать методику оценки *in vivo* принадлежности лекарственных средств к ингибиторам и индукторам BCRP и сопоставить данные *in vitro* и *in vivo*.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

- АТФ – аденозинтрифосфат
- ВЭЖХ – высокоэффективная жидкостная хроматография
- ГЭБ – гематоэнцефалический барьер
- ДМСО – диметилсульфоксид
- кальцеина-АМ – ацетометоксипроизводное кальцеина
- кДНК – комплементарная дезоксирибонуклеиновая кислота
- мРНК – матричная рибонуклеиновая кислота
- МС/МС – тандемная масс-спектрометрия
- НПКО – нижний предел количественного определения
- УФ – ультрафиолетовый
- АВС – АТФ-связывающие кассетные транспортеры (англ.: ATP-binding cassette)
- АВСР – белок суперсемейства АВС-транспортеров, локализованный в человеческой плаценте (англ.: placental ABC-protein)
- AUC – площадь под кинетической кривой (англ.: area under the curve)
- BCRP – белок устойчивости рака молочной железы (англ.: breast cancer resistance protein)
- Caco-2 – клетки аденокарциномы ободочной кишки человека (англ.: cancer coli, colon cancer)
- CID – давление аргона (англ.: collision induced dissociation)
- C_{max} – максимальная концентрация (англ.: maximum concentration)
- E3S – эстрон-3-сульфат (англ.: estrone-3-sulfate)
- FTC – фумитреморгин С (англ.: fumitremorgin C)
- GAPDH – глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназа (англ.: glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase)
- НЕК293 – эмбриональные клетки почек человека (англ.: human embryonic kidney 293)

IC50 – концентрация полумаксимального ингибирования (англ.: half maximal inhibitory concentration)

IG50 – концентрация полуингибирования роста клеток (англ.: concentration producing 50% growth inhibition)

LLC – клетки рака легких Льюиса (англ.: Lewis lung cancer)

MCF-7 – клетки рака молочной железы (англ.: breast cancer cell line или Michigan Cancer Foundation-7)

MDCKII – эпителиальные клетки почек собак Мадина-Дарби (англ.: Madin-Darby canine kidney)

MRP – белок-транспортер, ассоциированный с множественно лекарственной устойчивостью (англ.: multidrug resistance-associated protein)

MXR – белок устойчивости к митоксантрону (англ.: mitoxantrone resistance protein)

NBDs – нуклеотидсвязывающие домены (англ.: nucleotide binding domains)

OATP – полипептидный транспортер органических анионов (англ.: organic-anion-transporting polypeptide)

OCT1 – белок-транспортер органических катионов (англ.: organic cation transporter 1)

Papp – коэффициент кажущейся проницаемости (англ.: apparent permeability)

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

PhIP – 2-амино-1-метил-6-фенилимидазо [4,5-b] пиридин (англ.: 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo [4,5-b] pyridine)

TEER – трансэпителиальное сопротивление (англ.: transepithelial electrical resistance)

TM – трансмембранный сегмент

TMDs – трансмембранные домены (англ.: transmembrane domains)

Sf9 – клетки насекомых, инфицированные бакуловирусом (англ.: Spodoptera frugiperda cell line)

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Белки множественной лекарственной резистентности Pgp, MRP и BCRP как маркеры снижения эффективности тамоксифена при лечении рака молочной железы / Т.А. Богуш, Е.А. Дудко, Е.А. Богуш [и др.]. – Текст (визуальный) : непосредственный // Опухоли женской репродуктивной системы. – 2011. – №1. – С. 8-18.

2. Влияние экспрессии генов множественной лекарственной устойчивости на клиническое течение множественной миеломы / Ю.Б. Черных, А. К. Голенков, С.С. Шушанов [и др.] – Текст (визуальный) : непосредственный // Альманах клинической медицины. – 2016. – Т. 44, № 5. – С. 624-630.

3. Влияние экспрессии и функции транспортных белков множественной лекарственной устойчивости Р-гликопротеина и BCRP на лекарственную чувствительность *in vitro* при хроническом лимфоцитарном лейкозе / А.И. Свирновский, Т.Ф. Сергиенко, Т.В. Шман [и др.]. – Текст (визуальный) : непосредственный // Гематология и трансфузиология. – 2009. – Т. 54, № 1. – С. 10-14.

4. Воронина, Т.А. Мексидол: спектр фармакологических эффектов / Т.А. Воронина. – Текст (визуальный) : непосредственный // Журн. неврологии и психиатрии им. С.С. Корсакова. – 2012. – №12. – С. 86-90

5. Количественная оценка белка резистентности рака молочной железы при беременности у кроликов / Н.М. Попова, А.А. Слепнев, Ю.В. Абаленихина [и др.]. – Текст (визуальный) : непосредственный // Биомедицинская химия. – 2023. – Т.69, №1. – С. 72–77.

6. Метод анализа принадлежности лекарственных веществ к субстратам и ингибиторам белка-транспортера гликопротеина-Р *in vitro* / Е.Н. Якушева, А.В. Щулькин, И.В. Черных [и др.]. – Текст (визуальный) : непосредственный // Обзоры по клинической фармакологии и лекарственной терапии. – 2019. – Т.17, №1. – С. 71–78.

7. Моргун, А. В. Основные функции гематоэнцефалического барьера / А. В. Моргун. – Текст (визуальный) : непосредственный // Сибирский медицинский журнал (Иркутск). – 2012. – Т. 109, № 2. – С. 5-8.

8. Мыльников П.Ю. Влияние этилметилгидроксипиридина сукцината на функционирование гликопротеина-R в гематоэнцефалическом барьере в норме и при острой гипоксической гипобарической гипоксии : автореф. дис. ...канд.биол.наук : 3.3.6 / Мыльников Павел Юрьевич. – М., 2021. – 23 с.

9. Разработка ВЭЖХ методики количественного определения этилметилгидроксипиридина сукцината в плазме крови крыс и кроликов / И.В. Черных, А.В. Шулькин, М.В. Гацанога [и др.]. – Текст (визуальный) : непосредственный // Российский медико-биологический вестник имени академика И. П. Павлова. – 2015. – №1. – С. 62-66.

10. Роль белков-транспортеров семейства ABC в развитии химиорезистентности при раке молочной железы / И.Ю. Третьяк, Ю.Е. Демидчик, С.А. Костюк [и др.]. – Текст (визуальный) : непосредственный // Весці Нацыянальнай акадэміі навук Беларусі. – 2013. – № 3. – С. 91-96.

11. Связь эффективности химиотерапии с особенностями экспрессии трансмембранных белков Р-гликопротеина (ABCB1), MRP2 (abcc2), BCRP (ABCG2) у больных с инвазивным раком молочной железы / К.Ю. Христенко, С.В. Вторушин, В.М. Перельмутер [и др.]. – Текст (визуальный) : непосредственный // Сибирский онкологический журнал. – 2016. – Т.15, №4. – С. 40-44.

12. Смирнов Л.П. АТФ-связывающие транспортные белки семейства ABC (АТФ-binding cassette transporters). Номенклатура, структура, молекулярное разнообразие, функция, участие в функционировании системы биотрансформации ксенобиотиков / Л.П. Смирнов. – Текст (визуальный) : непосредственный // Труды Карельского научного центра Российской академии наук. – 2020. – Т. 3. – С. 5-19.

13. Факторы химиорезистентности при немелкоклеточном раке легкого / А.И. Шевченко, А.П. Колесник, А.В. Каджоян [и др.]. – Текст (визуальный) : непосредственный // Патология. – 2016. – Т. 36, № 1. – С. 4-9.
14. Федотчева, Т.А. Фармакологические способы преодоления множественной лекарственной устойчивости к химиотерапии / Т. А. Федотчева, Н. Л. Шимановский. – Текст (визуальный) : непосредственный // Химико-фармацевтический журнал. – 2022. – Т. 56, № 10. – С. 3-9.
15. Фенотипические признаки стволовых клеток - экспрессия мембранного транспортера *Vsrp1/Abcg2* и экспорт красителя Hoechst 33342 - у гепатоцитов при регенерации печени / И.В. Урываева, Е.Б. Цитрин, С.И. Городецкий [и др.]. – Текст (визуальный) : непосредственный // Доклады Академии наук. – 2004. – Т. 398, № 3. – С. 422-425.
16. 17beta-Estradiol and environmental estrogens significantly affect mammalian sperm function / S.A. Adeoia-Osiguwa, S. Markoulaki, V. Pocock [et al.]. – Text : visual // Hum Reprod. – 2003. – Vol. 18, N 1. – P. 100-107.
17. A functional assay for detection of the mitoxantrone resistance protein, MXR (ABCG2) / R.W. Robey, Y. Honjo, A. van de Laar [et al.]. – Text : visual // Biochim Biophys Acta. – 2001. – Vol. 1512, N 2. – P. 171-182.
18. A human placenta-specific ATP-binding cassette gene (ABCP) on chromosome 4q22 that is involved in multidrug resistance / R. Allikmets, L.M. Schriml, A. Hutchinson [et al.]. – Text : visual // Cancer Res. – 1998. – Vol. 58, N 23. – P. 5337-5339.
19. A multidrug resistance transporter from human MCF-7 breast cancer cells / L.A. Doyle, W. Yang, L.V. Abruzzo [et al.]. – Text : visual // Proc Natl Acad Sci U S A. – 1998. – Vol. 95, N 26. – P. 15665-15670.
20. A new porphyrin as selective substrate-based inhibitor of breast cancer resistance protein (BCRP/ABCG2) / I.F. Zattoni, T. Kronenberger, D.H. Kita [et al.]. – Text : visual // Chem Biol Interact. – 2022. – Vol. 351. – P. 109718.

21. A systematic review of hospitalization resulting from medicine-related problems in adult patients / A.A. Hamid, M. Ghaleb, H. Aljadhey [et al.]. – Text : visual // *Br J Clin Pharmacol.* – 2014. – Vol. 78, N 2. – P. 202-217.
22. ABCG1 (ABC8), the human homolog of the *Drosophila* white gene, is a regulator of macrophage cholesterol and phospholipid transport / J. Klucken, C. Büchler, E. Orsó [et al.]. – Text : visual // *Proc Natl Acad Sci U S A.* – 2000. – Vol. 97, N 2. – P. 817-822.
23. ABCG2 overexpression confers poor outcomes in hepatocellular carcinoma of elderly patients / Y.L. Chen, P.M. Chen, P.Y. Lin [et al.]. – Text : visual // *Anticancer Res.* – 2016. – Vol. 36, N 6. – P. 2983-2988.
24. ABCG2 transports and transfers heme to albumin through its large extracellular loop / E. Desuzinges-Mandon, O. Arnaud, L. Martinez [et al.]. – Text : visual // *J Biol Chem.* – 2010. – Vol. 285, N 43. – P. 33123-33133.
25. ABCG2/BCRP decreases the transfer of a food-born chemical carcinogen, 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-b]pyridine (PhIP) in perfused term human placenta / P. Myllynen, M. Kummu, T. Kangas [et al.]. – Text : visual // *Toxicol Appl Pharmacol.* – 2008. – Vol. 232, N 2. – P. 210-217.
26. ABCG2/BCRP transport mechanism revealed through kinetically excited targeted molecular dynamics simulations / B. Dudas, X. Decleves, S. Cisternino [et al.]. – Text : visual // *Comput Struct Biotechnol J.* – 2022. – Vol. 20. – P. 4195-4205.
27. ABCG2/BCRP: variants, transporter interaction profile of substrates and inhibitors / Z. Safar, E. Kis, F. Erdo [et al.]. – Text : visual // *Expert Opin Drug Metab Toxicol.* – 2019. – Vol. 15, N 4. – P. 313-328.
28. ABCG5 and ABCG8 are obligate heterodimers for protein trafficking and biliary cholesterol excretion / G.A. Graf, L. Yu, W.P. Li [et al.]. – Text : visual // *J Biol Chem.* – 2003. – Vol. 278, N 48. – P. 48275-48282.
29. Absence of N-linked glycosylation does not affect plasma membrane localization of breast cancer resistance protein (BCRP/ABCG2) / K.

Mohrmann, M.A. van Eijndhoven, AH. Schinkel [et al.]. – Text : visual // *Cancer Chemother Pharmacol.* – 2005. – Vol. 56, N 4. – P. 344-350.

30. Acyclovir Brain Disposition: Interactions with P-gp, Bcrp, Mrp2, and Oat3 at the Blood-Brain Barrier / Y. Shan, Y. Cen, Y. Zhang [et al.]. – Text : visual // *Eur J Drug Metab Pharmacokinet.* – 2022. – Vol. 47, N 2. – P. 279-289.

31. An ATP-binding cassette gene (ABCG3) closely related to the multidrug transporter ABCG2 (MXR/ABCP) has an unusual ATP-binding domain / L. Mickley, P. Jain, K. Miyake [et al.]. – Text : visual // *Mamm Genome.* – 2001. – Vol. 12, N 1. – P. 86-88.

32. An in vitro and in silico study on the flavonoid-mediated modulation of the transport of 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-b]pyridine (PhIP) through Caco-2 monolayers / M.E. Schutte, A.P. Freidig, J.M. van de Sandt [et al.]. – Text : visual // *Toxicol Appl Pharmacol.* – 2006. – Vol. 217, N 2. – P. 204-215.

33. An Unexpected Synergist Role of P-Glycoprotein and Breast Cancer Resistance Protein on the Central Nervous System Penetration of the Tyrosine Kinase Inhibitor Lapatinib (N-{3-Chloro-4-[(3-fluorobenzyl)oxy]phenyl}-6-[5-({[2-(methylsulfonyl)ethyl]amino}methyl)-2-furyl]-4-quinazolinamine; GW572016) / J.W. Polli, K.L. Olson, J.P. Chism [et al.]. – Text : visual // *Drug Metab Dispos.* – 2009. – Vol. 37, N 2. – P. 439-442.

34. An, G. Effects of single and multiple flavonoids on BCRP-mediated accumulation, cytotoxicity and transport of mitoxantrone in vitro / G. An, M.E. Morris. – Text : visual // *Pharm Res.* – 2010. – Vol. 27, N 7. – P. 1296-1308.

35. An, G. The bioflavonoid kaempferol is an Abcg2 substrate and inhibits Abcg2-mediated quercetin efflux /G. An, J. Gallegos, M.E. Morris – Text : visual // *Drug Metab Dispos.* – 2011. – Vol. 39, N 3. – P. 426-432.

36. Application and limitation of inhibitors in drug-transporter interactions studies / Q. Wang, R. Strab, P. Kardos [et al.]. – Text : visual // *Int J Pharm.* – 2008. – Vol. 356, N 1-2. – P. 12-18.

37. Artursson, P. Correlation between oral drug absorption in humans and apparent drug permeability coefficients in human intestinal epithelial (Caco-2) cells / P. Artursson, J. Karlsson. – Text : visual // *Biochem Biophys Res Commun.* – 1991. – Vol. 175, N 3. – P. 880-885.
38. Attenuation of intestinal absorption by major efflux transporters: quantitative tools and strategies using a Caco-2 model / X. Lin, S. Skolnik, X. Chen [et al.]. – Text : visual // *Drug Metab Dispos.* – 2011. – Vol. 39, N 2. – P. 265-274.
39. Avapritinib: A Selective Inhibitor of KIT and PDGFR α that Reverses ABCB1 and ABCG2-Mediated Multidrug Resistance in Cancer Cell Lines / C.P. Wu, S. Lusvardi, J.C. Wang [et al.]. – Text : visual // *Mol Pharm.* – 2019. – Vol. 16, N 7. – P. 3040-3052.
40. Balimane, P.V. Current industrial practices of assessing permeability and P-glycoprotein interaction / P.V. Balimane, Y.H. Han, S. Chong. – Text : visual // *AAPS J.* – 2006. – Vol. 8, N 1. – P. E1-13.
41. BCRP Transports Dipyrindamole and is Inhibited by Calcium Channel Blockers / Y. Zhang, A. Gupta, H. Wang [et al.]. – Text : visual // *Pharm Res.* – 2005. – Vol. 22, N 12. – P. 2023-2034.
42. Bhatia, A. Oligomerization of the human ABC transporter ABCG2: evaluation of the native protein and chimeric dimers / A. Bhatia, H.J. Schäfer, C.A. Hrycyna. – Text : visual // *Biochemistry.* – 2005. – Vol. 44, N 32. – P. 10893-10904.
43. Bioavailability of the glucuronide and sulfate conjugates of genistein and daidzein in breast cancer resistance protein 1 knockout mice / A.I. Álvarez, F. Vallejo, B. Barrera [et al.]. – Text : visual // *Drug Metab Dispos.* – 2011. – Vol. 39, N 11. – P. 2008-2012.
44. Breast cancer resistance protein (ABCG2) determines distribution of genistein phase II metabolites: reevaluation of the roles of ABCG2 in the disposition of genistein / Z. Yang, W. Zhu, S. Gao [et al.]. – Text : visual // *Drug Metab Dispos.* – 2012. – Vol. 40, N 10. – P. 1883-1893.

45. Breast cancer resistance protein (ABCG2) in clinical pharmacokinetics and drug interactions: practical recommendations for clinical victim and perpetrator drug-drug interaction study design / C.A. Lee, M.A. O'Connor, T.K. Ritchie [et al.]. – Text : visual // *Drug Metab Dispos.* – 2015. – Vol. 43, N 4. – P. 490-509.

46. Breast cancer resistance protein (BCRP/MXR/ABCG2) in adult acute lymphoblastic leukaemia: frequent expression and possible correlation with shorter disease-free survival / A. Suvannasankha, H. Minderman, K.L. O'Loughlin [et al.]. – Text : visual // *Br J Haematol.* – 2004. – Vol. 127, N 4. – P. 392-398.

47. Breast cancer resistance protein (Bcrp1/Abcg2) reduces systemic exposure of the dietary carcinogens aflatoxin B1, IQ and Trp-P-1 but also mediates their secretion into breast milk / A.E. van Herwaarden, E. Wagenaar, B. Karnekamp [et al.]. – Text : visual // *Carcinogenesis.* – 2006. – Vol. 27, N 1. – P. 123-130.

48. Breast Cancer Resistance Protein Abundance, but Not mRNA Expression, Correlates With Estrone-3-Sulfate Transport in Caco-2 / M.D. Harwood, S. Neuhoff, A. Rostami-Hodjegan [et al.]. – Text : visual // *J Pharm Sci.* – 2016. – Vol. 105, N 4. – P. 1370-1375.

49. Breast Cancer Resistance Protein: A Potential Therapeutic Target for Cancer / S. Mehendale-Munj, S Sawant. – Text : visual // *Curr Drug Targets.* – 2021. – Vol. 22, N 4. – P. 420-428.

50. Breast milk-mediated transfer of an antigen induces tolerance and protection from allergic asthma / V. Verhasselt, V. Milcent, J. Cazareth [et al.]. – Text : visual // *Nat Med.* – 2008. – Vol. 14, N 2. – P. 170-175.

51. Celastrol Inhibits the Proliferation and Decreases Drug Resistance of Cisplatin- Resistant Gastric Cancer SGC7901/DDP Cells / D. Zhan, T. Ni, H. Wang [et al.]. – Text : visual // *Anticancer Agents Med Chem.* – 2022. – Vol. 22, N 2. – P. 270-279.

52. Changes in the expression of four ABC transporter genes in response to imidacloprid in Bemisia tabaci Q (Hemiptera: Aleyrodidae) / C. He, J.

Liang, S. Liu [et al.]. – Text : visual // *Pestic Biochem Physiol.* – 2019. – Vol. 153. – P. 136-143.

53. Characterization of 5(6)-carboxy-2,'7'-dichlorofluorescein transport by MRP2 and utilization of this substrate as a fluorescent surrogate for LTC4 / K. Heredi-Szabo, E. Kis, E. Molnar [et al.]. – Text : visual // *J Biomol Screen.* – 2008. – Vol. 12, N 4. – P. 295-301.

54. Characterization of Potent ABCG2 Inhibitor Derived from Chromone: From the Mechanism of Inhibition to Human Extracellular Vesicles for Drug Delivery / G. Valdameri, D.H. Kita, J.P. Dutra [et al.]. – Text : visual // *Pharmaceutics.* – 2023. – Vol. 15, N 4. – P. 1259.

55. Clinical Relevance of Hepatic and Renal P-gp/BCRP Inhibition of Drugs: An International Transporter Consortium Perspective / K.S. Taskar, X. Yang, S. Neuhoff [et al.]. – Text : visual // *Clin Pharmacol Ther.* – 2022. – Vol. 112, N 3. – P. 573-592.

56. Co-administration of proton pump inhibitors delays elimination of plasma methotrexate in high-dose methotrexate therapy / K. Suzuki, K. Doki, M. Homma [et al.]. – Text : visual // *Br J Clin Pharmacol.* – 2009. – Vol. 67, N 1. – P. 44-49.

57. Comparison of ATP-Binding Cassette Transporter Interactions with the Tyrosine Kinase Inhibitors Imatinib, Nilotinib, and Dasatinib / M. Dohse, C. Scharenberg, S. Shukla [et al.]. – Text : visual // *Drug Metab Dispos.* – 2010. – Vol. 38, N 8. – P. 1371-1380.

58. Concept of Folic Acid in Health and Disease / Y. Shulpekova, V. Nechaev, S. Kardasheva [et al.]. – Text : visual // *Molecules.* – 2021. – Vol. 26, N 12. – P. 3731.

59. Correlation between Membrane Protein Expression Levels and Transcellular Transport Activity for Breast Cancer Resistance Protein / H. Liu, L. Huang, Y. Li [et al.]. – Text : visual // *Drug Metab Dispos.* – 2017. – Vol. 45, N 5. – P. 449-456.

60. Dahan, A. Small intestinal efflux mediated by MRP2 and BCRP shifts sulfasalazine intestinal permeability from high to low, enabling its colonic targeting / A. Dahan, G.L. Amidon [et al.]. – Text : visual // *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* – 2009. – Vol. 297, N 2. – P. G371-377.
61. Damiani, D. ABCG2 in Acute Myeloid Leukemia: Old and New Perspectives / D. Damiani, M. Tiribelli – Text : visual // *Int J Mol Sci.* – 2023. – Vol. 24, N 8. – P. 7147.
62. Dawson, R.P. Structure of a bacterial multidrug ABC transporter / R.P. Dawson, K.P. Locher. – Text : visual // *Nature.* – 2006. – Vol. 443, N 7108. – P. 180-185.
63. Dean, M. The human ATP-binding cassette (ABC) transporter superfamily / M. Dean, K. Moitra, R. Allikmets. – Text : visual // *Human Mutation.* – 2022. – Vol. 43, N 9. – P. 1162-1182.
64. Demethoxycurcumin modulates human P-glycoprotein function via uncompetitive inhibition of ATPase hydrolysis activity / Y.N. Teng, Y.W. Hsieh, C.C. Hung [et al.]. – Text : visual // *J Agric Food Chem.* – 2015. – Vol. 63, N 3. – P. 847-855.
65. Determination of mitoxantrone in rat plasma by liquid chromatography-tandem mass spectrometry method: Application to a pharmacokinetic study / P. Zhang, G. Ling, J. Sun [et al.]. – Text : visual // *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci.* – 2010. – Vol. 878, N 24. – P. 2260-2265.
66. Dietary meat mutagens intake and cancer risk: A systematic review and meta-analysis / Q. Reng, L.L. Zhu, L. Feng [et al.]. – Text : visual // *Front Nutr.* – 2022. – Vol. 9, N 962688.
67. Differential effects of tipranavir plus ritonavir on atorvastatin or rosuvastatin pharmacokinetics in healthy volunteers / P.A. Pham, C.L. la Porte, L.S. Lee [et al.]. – Text : visual // *Antimicrob Agents Chemother.* – 2009. – Vol. 53, N 10. – P. 4385-4392.

68. Differential multidrug resistance-associated protein 1 through 6 isoform expression and function in human intestinal epithelial Caco-2 cells / H.M. Prime-Chapman, R.A. Fearn, A.E. Cooper [et al.]. – Text : visual // *J Pharmacol Exp Ther.* – 2004. – Vol. 311, N 2. – P. 476-484.
69. Differential selectivity of efflux transporter inhibitors in Caco-2 and MDCK-MDR1 monolayers: a strategy to assess the interaction of a new chemical entity with Pgp, BCRP, and MRP2 / K. Mease, R. Sane, L. Podila [et al.]. – Text : visual // *J Pharm Sci.* – 2012. – Vol. 101, N 5. – P. 1888-1897.
70. Drug/Drug interaction between lopinavir/ritonavir and rosuvastatin in healthy volunteers / J.J. Kiser, J.G. Gerber, J.A. Predhomme [et al.]. – Text : visual // *J Acquir Immune Defic Syndr.* – 2008. – Vol. 47, N 5. – P. 570-578.
71. Drug-drug interactions between immunosuppressants and antidiabetic drugs in the treatment of post-transplant diabetes mellitus / T. Vanhove, Q. Remijsen, D. Kuypers [et al.]. – Text : visual // *Transplant Rev Orlando Fla.* – 2017. – Vol. 31, N 2. – P. 69-77.
72. Eckenstaler, R. The Role of ABCG2 in the Pathogenesis of Primary Hyperuricemia and Gout-An Update / R. Eckenstaler, R.A. Benndorf. – Text : visual // *Int J Mol Sci.* – 2021. – Vol. 22, N 13. – P. 6678.
73. Effect of poly (ethylene oxide)-poly (propylene oxide)-poly (ethylene oxide) micelles on pharmacokinetics and intestinal toxicity of irinotecan hydrochloride: potential involvement of breast cancer resistance protein (ABCG2) / S. Guo, X. Zhang, L. Gan [et al.]. – Text : visual // *J Pharm Pharmacol.* – 2010. – Vol. 62, N 8. – P. 973-984.
74. Effect of quercetin on the uptake and efflux of aristolochic acid I from Caco-2 cell monolayers / O. Kimura, Y. Fujii, K. Haraguchi [et al.]. – Text : visual // *J Pharm Pharmacol.* – 2016. – Vol. 68, N 7. – P. 883-889.

75. Effects of atazanavir/ritonavir or fosamprenavir/ritonavir on the pharmacokinetics of rosuvastatin / A.J. Busti, A.M. Bain, R.G. Hall [et al.]. – Text : visual // *J Cardiovasc Pharmacol.* – 2008. – Vol. 51, N 6. – P. 605-610.
76. Effects of Fostamatinib on the Pharmacokinetics of Digoxin (a P-Glycoprotein Substrate): Results From in Vitro and Phase I Clinical Studies / P. Martin, M. Gillen, D. Millson [et al.]. – Text : visual // *Clin Ther.* – 2015. – Vol. 37, N 12. – P. 2811-2822.
77. Effects of Fostamatinib on the Pharmacokinetics of Oral Contraceptive, Warfarin, and the Statins Rosuvastatin and Simvastatin: Results From Phase I Clinical Studies / P. Martin, M. Gillen, J. Ritter [et al.]. – Text : visual // *Drugs RD.* – 2016. – Vol. 16, N 1. – P. 93-107.
78. Efflux transport of estrogen glucuronides by human MRP2, MRP3, MRP4 and BCRP / E. Järvinen, F. Deng, H. Kidron [et al.]. – Text : visual // *J Steroid Biochem Mol Biol.* – 2018. – Vol. 178. – P. 99-107.
79. Elahian, F. Evaluation of indomethacin and dexamethasone effects on BCRP-mediated drug resistance in MCF-7 parental and resistant cell lines / F. Elahian, F. Kalalinia, J. Behravan. – Text : visual // *Drug Chem Toxicol.* – 2010. – Vol. 33, N 2. – P. 113-119.
80. Elucidation of the Intestinal Absorption Mechanism of Celastrol Using the Caco-2 Cell Transwell Model / H. Li, J. Li, L. Liu [et al.]. – Text : visual // *Planta Med.* – 2016. – Vol. 82, N 13. – P. 1202-1207.
81. Emerging Regulatory Mechanisms Involved in Liver Cancer Stem Cell Properties in Hepatocellular Carcinoma / D. Lv, L. Chen, L. Du [et al.]. – Text : visual // *Front Cell Dev Biol.* – 2021. – Vol. 9, N 691410.
82. Enokizono, J. Effect of breast cancer resistance protein (Bcrp/Abcg2) on the disposition of phytoestrogens / J. Enokizono, H. Kusuhara, Y. Sugiyama [et al.]. – Text : visual // *Mol Pharmacol.* – 2007. – Vol. 72, N 4. – P. 967-975.

83. Evaluation of drug interactions of GSK1292263 (a GPR119 agonist) with statins: from in vitro data to clinical study design / J.W. Polli, E. Hussey, M. Bush [et al.]. – Text : visual // *Xenobiotica*. – 2013. – Vol. 43, N 6. – P. 498-508.
84. Evidence for different ABC-transporters in Caco-2 cells modulating drug uptake / H. Gutmann, G. Fricker, M. Török [et al.]. – Text : visual // *Pharm Res*. – 1999. – Vol. 16, N 3. – P. 402-407.
85. Expression of breast cancer resistance protein (BCRP/ABCG2) in human placenta throughout gestation and at term before and after labor / D. Yeboah, M. Sun, J. Kingdom [et al.]. – Text : visual // *Can J Physiol Pharmacol*. – 2006. – Vol. 84, N 12. – P. 1251-1258.
86. Expression of Chemoresistance-Associated ABC Proteins in Hepatobiliary, Pancreatic and Gastrointestinal Cancers / J.G. Marin, M.J. Monte, R.R. Macias [et al.]. – Text : visual // *Cancers (Basel)*. – 2022. – Vol. 14, N 14. – P. 3524.
87. Expression of membrane transporters and metabolic enzymes involved in estrone-3-sulphate disposition in human breast tumour tissues / N. Banerjee, N. Miller, C. Allen et al.]. – Text : visual // *Breast Cancer Res Treat*. – 2014. – Vol. 145, N 3. – P. 647-661.
88. Expression of thirty-six drug transporter genes in human intestine, liver, kidney, and organotypic cell lines / C. Hilgendorf, G. Ahlin, A. Seithel [et al.]. – Text : visual // *Drug Metab Dispos*. – 2007. – Vol. 35, N 8. – P. 1333-1340.
89. Expression, localization, and functional characteristics of breast cancer resistance protein in Caco-2 cells / C.Q. Xia, N. Liu, D. Yang [et al.]. – Text : visual // *Drug Metab Dispos*. – 2005. – Vol. 33, N 5. – P. 637-643.
90. Extra-renal elimination of uric acid via intestinal efflux transporter BCRP/ABCG2 / A. Hosomi, T. Nakanishi, T. Fujita [et al.]. – Text : visual // *PloS One*. – 2012. – Vol. 7, N 2. – P. e30456.

91. Functionally overlapping roles of Abcg2 (Bcrp1) and Abcc2 (Mrp2) in the elimination of methotrexate and its main toxic metabolite 7-hydroxymethotrexate in vivo / M.L. Vlaming, Z. Pala, A. van Esch [et al.]. – Text : visual // Clin Cancer Res. – 2009. – Vol. 15, N 9. – P. 3084-3093.
92. Fusidic Acid Inhibits Hepatic Transporters and Metabolic Enzymes: Potential Cause of Clinical Drug-Drug Interaction Observed with Statin Coadministration / A. Gupta, J.J. Harris, J. Lin [et al.]. – Text : visual // Antimicrob Agents Chemother. – 2016. – Vol. 60, N 10. – P. 5986-5994.
93. Goler-Baron, V. Structure and function of ABCG2-rich extracellular vesicles mediating multidrug resistance / V. Goler-Baron, Y.G. Assaraf. – Text : visual // PLoS One. – 2011. – Vol. 6, N 1. – P. e16007.
94. High-Affinity Interaction of Tyrosine Kinase Inhibitors with the ABCG2 Multidrug Transporter / C. Özvegy-Laczka, T. Hegedűs, G. Várady Lee [et al.]. – Text : visual // Mol Pharmacol. – 2004. – Vol. 65, N 6. – P. 1485-1495.
95. Hilgers A.R. Caco-2 Cell Monolayers as a Model for Drug Transport Across the Intestinal Mucosa / A.R. Hilgers, R.A. Conradi, P.S. Burton [et al.]. – Text : visual // Pharm Res. – 1990. – Vol. 7, N 9. – P. 902-910.
96. HIV protease inhibitors are inhibitors but not substrates of the human breast cancer resistance protein (BCRP/ABCG2) / A. Gupta, Y. Zhang, J. Unadkat [et al.]. – Text : visual // J Pharmacol Exp Ther. – 2004. – Vol. 310, N 1. – P. 334-341.
97. Identification and functional characterization of breast cancer resistance protein in human bronchial epithelial cells (Calu-3) / D.K. Paturi, D. Kwatra, H.K. Ananthula [et al.]. – Text : visual // Int J Pharm. – 2010. – Vol. 384, N 1-2. – P. 32-38.
98. Identification of intra- and intermolecular disulfide bridges in the multidrug resistance transporter ABCG2 / U. Henriksen, J.U. Fog, T. Litman [et al.]. – Text : visual // J Biol Chem. – 2005. – Vol. 280, N 44. – P. 36926-36934.

99. Identification of novel specific and general inhibitors of the three major human ATP-binding cassette transporters Pgp, BCRP and MRP2 among registered drugs / P. Matsson, J.M. Pedersen, U. Norinder [et al.]. – Text : visual // Pharm Res. – 2009. – Vol. 26, N 8. – P. 1816-1831.

100. Impact of P-gp and BCRP on pulmonary drug disposition assessed by PET imaging in rats / S. Mairinger, I. Hernández-Lozano, T. Filip [et al.]. – Text : visual // J Control Release. – 2022. – Vol. 349. – P. 109-117.

101. In Vitro Assessment of Drug-Drug Interaction Potential of Boceprevir Associated with Drug Metabolizing Enzymes and Transporters / X. Chu, X. Cai, D. Cui [et al.]. – Text : visual // Drug Metab Dispos. – 2013. – Vol. 41, N 3. – P. 668-681.

102. In Vitro Assessment of the Effect of Antiepileptic Drugs on Expression and Function of ABC Transporters and Their Interactions with ABCC2 / G.K. Grewal, S. Kukal, N. Kanojia [et al.]. – Text : visual // Mol Basel Switz. – 2017. – Vol. 22, N 10. – P. E1484.

103. Increased oral bioavailability of topotecan in combination with the breast cancer resistance protein and P-glycoprotein inhibitor GF120918 / C.F. Kruijtzter, J.H. Beijnen, H. Rosing [et al.]. – Text : visual // J Clin Oncol. – 2002. – Vol. 20, N 13. – P. 2943-2950.

104. Induction of ABCG2/BCRP restricts the distribution of zidovudine to the fetal brain in rats / M.F. Filia, T. Marchini, J.M. Minoia [et al.]. – Text : visual // Toxicol Appl Pharmacol. – 2017. – Vol. 330. – P. 74-83.

105. Induction of cellular resistance to nucleoside reverse transcriptase inhibitors by the wild-type breast cancer resistance protein / X. Wang, T. Nitanda, M. Shi [et al.]. – Text : visual // Biochem Pharmacol. – 2004. – Vol. 68, N 7. – P. 1363-1370.

106. Induction of drug efflux protein expression by venlafaxine but not desvenlafaxine / C.J. Bachmeier, D. Beaulieu-Abdelahad, N.J. Ganey et al.]. – Text : visual // Biopharm Drug Dispos. – 2011. – Vol. 32, N 4. – P. 233-244.

107. Inhibitory Potential of Antifungal Drugs on ATP-Binding Cassette Transporters P-Glycoprotein, MRP1 to MRP5, BCRP, and BSEP / V.J. Lempers, J.J. van den Heuvel, F.G. Russel [et al.]. – Text : visual // *Antimicrob Agents Chemother.* – 2016. – Vol. 60, N 6. – P. 3372-3379.

108. Interaction of angiotensin receptor type 1 blockers with ATP-binding cassette transporters / J. Weiss, A. Sauer, N. Divac [et al.]. – Text : visual // *Biopharm Drug Dispos.* – 2010. – Vol. 31, N 2-3. – P. 150-161.

109. Interaction of novel platelet-increasing agent eltrombopag with rosuvastatin via breast cancer resistance protein in humans / K. Takeuchi, T. Sugiura, K. Matsubara [et al.]. – Text : visual // *Drug Metab Dispos.* – 2014. – Vol. 42, N 4. – P. 726-734.

110. Interplay between MRP inhibition and metabolism of MRP inhibitors: the case of curcumin / H.M. Wortelboer, M. Usta, A.E. van der Velde [et al.]. – Text : visual // *Chem Res Toxicol.* – 2003. – Vol. 16, N 12. – P. 1642-1651.

111. Intestinal absorbability of three Radix Puerariae isoflavones including daidzein, daidzin and puerarin / L. Zhang, A.K. Pan Siu, G. Lin [et al.]. – Text : visual // *Chin Med.* – 2011. – Vol. 6, N 41.

112. Jetter, A. Drugs and hepatic transporters: A review / A. Jetter, G.A. Kullak-Ublick. – Text : visual // *Pharmacol Res.* – 2020. – Vol. 154, N 104234.

113. Kage, K. Role of Cys-603 in dimer/oligomer formation of the breast cancer resistance protein BCRP/ABCG2 / K. Kage, T. Fujita, Y. Sugimoto. – Text : visual // *Cancer Sci.* – 2005. – Vol. 96, N 12. – P. 866-872.

114. Keogh, J.P. Development, validation and utility of an in vitro technique for assessment of potential clinical drug-drug interactions involving P-glycoprotein / J.P. Keogh, J.R. Kunta. – Text : visual // *Eur J Pharm Sci.* – 2006. – Vol. 27, N 5. – P. 543-554.

115. Kidney Drug Transporters in Pharmacotherapy / J. Łapczuk-Romańska, M. Drożdżik, S. Oswald [et al.]. – Text : visual // *Int J Mol Sci.* – 2023. – Vol. 24, N 3. – P. 2856.

116. Kinetic Analysis of the Cooperation of P-Glycoprotein (Pgp/Abcb1) and Breast Cancer Resistance Protein (Bcrp/Abcg2) in Limiting the Brain and Testis Penetration of Erlotinib, Flavopiridol, and Mitoxantrone / H. Kodaira, H. Kusuhara, J. Ushiki [et al.]. – Text : visual // *J Pharmacol Exp Ther.* – 2010. – Vol. 333, N 3. – P. 788-796.
117. Komori, H. Hyperuricemia enhances intracellular urate accumulation via down-regulation of cell-surface BCRP/ABCG2 expression in vascular endothelial cells / H. Komori, K. Yamada, I. Tamai. – Text : visual // *Biochim Biophys Acta Biomembr.* – 2018. – Vol. 1860, N 5. – P. 973-980.
118. Lapatinib antagonizes multidrug resistance-associated protein 1-mediated multidrug resistance by inhibiting its transport function / S.L. Ma, Y.P. Hu, F. Wang [et al.]. – Text : visual // *Mol Med.* – 2014. – Vol. 20, N 1. – P. 390-399.
119. Lee, J.H. Biliary excretion of curcumin is mediated by multidrug resistance-associated protein 2 / J.H. Lee, J.H. Oh, Y.J. Lee. – Text : visual // *Biol Pharm Bull.* – 2012. – Vol. 35, N 5. – P. 777-780.
120. Lemos, C. Drug transporters: recent advances concerning BCRP and tyrosine kinase inhibitors / C. Lemos, G. Jansen, G.J. Peters – Text : visual // *Br J Cancer.* – 2008. – Vol. 98, N 5. – P. 857-862.
121. Liu, L. Contributions of Drug Transporters to Blood-Placental Barrier / L. Liu, X. Liu. – Text : visual // *Adv Exp Med Biol.* – 2019. – Vol. 1141. – P. 505-548.
122. Liu, L. Roles of Drug Transporters in Blood-Retinal Barrier / L. Liu, X. Liu. – Text : visual // *Adv Exp Med Biol.* – 2019. – Vol. 1141. – P. 467-504.
123. Liu, X. ABC Family Transporters / X. Liu. – Text : visual // *Adv Exp Med Biol.* – 2019. – Vol. 1141. – P. 13-100.

124. Localization of the ABCG2 mitoxantrone resistance-associated protein in normal tissues / P.A. Fetsch, A. Abati, T. Litman [et al.]. – Text : visual // *Cancer Lett.* – 2006. – Vol. 235, N 1. – P. 84-92.
125. Mao, Q. Role of the breast cancer resistance protein (ABCG2) in drug transport / Q. Mao, J.D. Unadkat. – Text : visual // *AAPS J.* – 2005. – Vol. 7, N 1. – P. E118-133.
126. Mao, Q. Role of the breast cancer resistance protein (BCRP/ABCG2) in drug transport--an update / Q. Mao, J.D. Unadkat. – Text : visual // *AAPS J.* – 2015. – Vol. 17, N 1. – P. 65-82.
127. Mapping the ends of transmembrane segments in a polytopic membrane protein. Scanning N-glycosylation mutagenesis of extracytosolic loops in the anion exchanger, band 3 / M. Popov, L.Y. Tam, J. Li [et al.]. – Text : visual // *J Biol Chem.* – 1997. – Vol. 272, N 29. – P. 18325-18332.
128. Mechanism of the pharmacokinetic interaction between methotrexate and benzimidazoles: potential role for breast cancer resistance protein in clinical drug-drug interactions / P. Breedveld, N. Zelcer, D. Pluim [et al.]. – Text : visual // *Cancer Res.* – 2004. – Vol. 64, N 16. – P. 5804-5811.
129. Mechanisms and Predictions of Drug-Drug Interactions of the Hepatitis C Virus Three Direct-Acting Antiviral Regimen: Paritaprevir/Ritonavir, Ombitasvir, and Dasabuvir / M. Shebley, J. Liu, O. Kavetskaia [et al.]. – Text : visual // *Drug Metab Dispos.* – 2017. – Vol. 45, N 7. – P. 755-764.
130. Mechanisms of Anticancer Drug Resistance in Hepatoblastoma / J.G. Marin, C. Cives-Losada, M. Asensio [et al.]. – Text : visual // *Cancers (Basel)*. – 2019. – Vol. 11, N 3. – P. 407.
131. Mechanistic basis of breast cancer resistance protein inhibition by new indeno[1,2-b]indoles / D.H. Kita, N. Guragossian, I.F. Zattoni [et al.]. – Text : visual // *Sci Rep.* – 2021. – Vol. 11, N 1. – P. 1788.

132. Metabolism of cis- and trans-Resveratrol and Dihydroresveratrol in an Intestinal Epithelial Model / V. Jarosova, O. Vesely, I. Doskocil [et al.]. – Text : visual // *Nutrients*. – 2020. – Vol. 12, N 3. – P. 595.
133. Methoxy stilbenes as potent, specific, untransported, and noncytotoxic inhibitors of breast cancer resistance protein / G. Valdameri, L. Pereira Rangel, C. Spatafora [et al.]. – Text : visual // *ACS Chem Biol*. – 2012. – Vol. 7, N 2. – P. 322-330.
134. Modulation of human BCRP (ABCG2) activity by anti-HIV drugs / J. Weiss, J. Rose, C.H. Storch [et al.]. – Text : visual // *J Antimicrob Chemother*. – 2007. – Vol. 59, N 2. – P. 238-245.
135. Molecular basis of cholesterol efflux via ABCG subfamily transporters / Y. Sun, J. Wang, T. Long [et al.]. – Text : visual // *Proc Natl Acad Sci U S A*. – 2021. – Vol. 118, N 34. – P. e2110483118.
136. Molecular cloning of cDNAs which are highly overexpressed in mitoxantrone-resistant cells: demonstration of homology to ABC transport genes / K. Miyake, L. Mickley, T. Litman [et al.]. – Text : visual // *Cancer Res*. – 1999. – Vol. 59, N 1. – P. 8-13.
137. Multidrug efflux transporter ABCG2: expression and regulation / S. Kukal, D. Guin, C. Rawat [et al.]. – Text : visual // *Cell Mol Life Sci*. – 2021. – Vol. 78, N 21-22. – P. 6887-6939.
138. Multidrug transporter ABCG2 prevents tumor cell death induced by the epidermal growth factor receptor inhibitor Iressa (ZD1839, Gefitinib) / N.B. Elkind, Z. Szentpetery, A. Apati [et al.]. – Text : visual // *Cancer Res*. – 2005. – Vol. 65, N 5. – P. 1770-1777.
139. Multidrug transporter ABCG2/breast cancer resistance protein secretes riboflavin (vitamin B2) into milk / A.E. van Herwaarden, E. Wagenaar, G. Merino [et al.]. – Text : visual // *Mol Cell Biol*. – 2007. – Vol. 27, N 4. – P. 1247-1253.

140. Nestin-positive progenitor cells derived from adult human pancreatic islets of Langerhans contain side population (SP) cells defined by expression of the ABCG2 (BCRP1) ATP-binding cassette transporter / A. Lechner, C.A. Leech, E.J. Abraham [et al.]. – Text : visual // *Biochem Biophys Res Commun.* – 2002. – Vol. 293, N 2. – P. 670-674.
141. Nilotinib (AMN107, Tasigna) reverses multidrug resistance by inhibiting the activity of the ABCB1/Pgp and ABCG2/BCRP/MXR transporters / A.K. Tiwari, K. Sodani, S.R. Wang [et al.]. – Text : visual // *Biochem Pharmacol.* – 2009. – Vol. 78, N 2. – P. 153-161.
142. No effects of pantoprazole on the pharmacokinetics of rosuvastatin in healthy subjects / J. Huguet, J. Lu, F. Gaudette [et al.]. – Text : visual // *Eur J Clin Pharmacol.* – 2016. – Vol. 72, N 8. – P. 925-931.
143. Null alleles of ABCG2 encoding the breast cancer resistance protein define the new blood group system Junior / C. Saison, V. Helias, B.A. Ballif [et al.]. – Text : visual // *Nat Genet.* – 2012. – Vol. 44, N 2. – P. 174-177.
144. Oral sulfasalazine as a clinical BCRP probe substrate: pharmacokinetic effects of genetic variation (C421A) and pantoprazole coadministration / K.K. Adkison, S.S. Vaidya, D.Y. Lee [et al.]. – Text : visual // *J Pharm Sci.* – 2010. – Vol. 99, N 2. – P. 1046-1062.
145. Organic anion transporting polypeptide 2B1 and breast cancer resistance protein interact in the transepithelial transport of steroid sulfates in human placenta / M. Grube, S. Reuther, H. Meyer Zu Schwabedissen [et al.]. – Text : visual // *Drug Metab Dispos.* – 2007. – Vol. 35, N 1. – P. 30-35.
146. Pharmacokinetic herb-drug interactions: Altered systemic exposure and tissue distribution of ciprofloxacin, a substrate of multiple transporters, after combined treatment with *Polygonum capitatum* Buch.-Ham. ex D. Don extracts / Z. Li, X. Du, S. Tian [et al.]. – Text : visual // *Front Pharmacol.* – 2022. – Vol. 13, N 1033667.

147. Pharmacokinetic interaction study of sulphasalazine in healthy subjects and the impact of curcumin as an *in vivo* inhibitor of BCRP / H. Kusuhara, H. Furuie, A. Inano [et al.]. – Text : visual // *Br J Pharmacol.* – 2012. – Vol. 166, N 6. – P. 1793-1803.
148. Phenolic indeno[1,2-b]indoles as ABCG2-selective potent and non-toxic inhibitors stimulating basal ATPase activity / G.J. Gozzi, Z. Bouaziz, E. Winter [et al.]. – Text : visual // *Drug Des Devel Ther.* – 2015. – Vol. 9. – P. 3481-3495.
149. Pheophorbide a is a specific probe for ABCG2 function and inhibition / R.W. Robey, K. Steadman, O. Polgar [et al.]. – Text : visual // *Cancer Res.* – 2004. – Vol. 64, N 4. – P. 1242-1246.
150. Piperine, a piperidine alkaloid from *Piper nigrum* re-sensitizes P-gp, MRP1 and BCRP dependent multidrug resistant cancer cells / S. Li, Y. Lei, Y. Jia [et al.]. – Text : visual // *Phytomedicine.* – 2011. – Vol. 19, N 1. – P. 83-87.
151. Plasma membrane dynamics and tetrameric organisation of ABCG2 transporters in mammalian cells revealed by single particle imaging techniques / K. Wong, S.J. Briddon, N.D. Holliday [et al.]. – Text : visual // *Biochim Biophys Acta.* – 2016. – Vol. 1863, N 1. – P. 19-29.
152. Potent and Selective Inhibitors of Breast Cancer Resistance Protein (ABCG2) Derived from the p-Glycoprotein (ABCB1) Modulator Tariquidar / M. Kühnle, M. Egger, C. Müller [et al.]. – Text : visual // *J Med Chem.* – 2009. – Vol. 52, N 4. – P. 1190-1197.
153. Pozza, A. Overexpression of homogeneous and active ABCG2 in insect cells / A. Pozza, J.M. Pérez-Victoria, A. Di Pietro. – Text : visual // *Protein Expr Purif.* – 2009. – Vol. 63, N 2. – P. 75-83.
154. Purification and 3D structural analysis of oligomeric human multidrug transporter ABCG2 / C.A. McDevitt, R.F. Collins, M. Conway [et al.]. – Text : visual // *Structure.* – 2006. – Vol. 14, N 11. – P. 1623-1632.

155. Quantitative investigation of the role of breast cancer resistance protein (Bcrp/Abcg2) in limiting brain and testis penetration of xenobiotic compounds / J. Enokizono, H. Kusuhara, A. Ose [et al.]. – Text : visual // *Drug Metab Dispos.* – 2008. – Vol. 36, N 6. – P. 995-1002.
156. Recent advances in the search of BCRP- and dual P-gp/BCRP-based multidrug resistance modulators / S. Dei, L. Braconi, M.N. Romanelli [et al.]. – Text : visual // *Cancer Drug Resist.* – 2019. – Vol. 2, N 3. – P. 710-743.
157. Regional levels of drug transporters along the human intestinal tract: co-expression of ABC and SLC transporters and comparison with Caco-2 cells / G. Englund, F. Rorsman, A. Rönnblom [et al.]. – Text : visual // *Eur J Pharm Sci.* – 2006. – Vol. 29, N 3-4. – P. 269-277.
158. Renal glucuronidation and multidrug resistance protein 2-/ multidrug resistance protein 4-mediated efflux of mycophenolic acid: interaction with cyclosporine and tacrolimus / A.K. El-Sheikh, J.B. Koenderink, A.C. Wouterse [et al.]. – Text : visual // *Transl Res J Lab Clin Med.* – 2014. – Vol. 164, N 1. – P. 46-56.
159. Resistance to Gemcitabine in Pancreatic Ductal Adenocarcinoma: A Physiopathologic and Pharmacologic Review / T. Koltai, S.J. Reshkin, T.M. Carvalho [et al.]. – Text : visual // *Cancers (Basel).* – 2022. – Vol. 14, N 10. – P. 2486.
160. Reversal of a novel multidrug resistance mechanism in human colon carcinoma cells by fumitremorgin C / S.K. Rabindran, H. He, M. Singh [et al.]. – Text : visual // *Cancer Res.* – 1998. – Vol. 58, N 24. – P. 5850-5858.
161. Reversal of breast cancer resistance protein (BCRP/ABCG2)-mediated drug resistance by novobiocin, a coumermycin antibiotic / K. Shiozawa, M. Oka, H. Soda [et al.]. – Text : visual // *Int J Cancer.* – 2004. – Vol. 108, N 1. – P. 146-151.

162. Reversal of breast cancer resistance protein-mediated drug resistance by estrogen antagonists and agonists / Y. Sugimoto, S. Tsukahara, Y. Imai [et al.]. – Text : visual // *Mol Cancer Ther.* – 2003. – Vol. 2, N 1. – P. 105-112.

163. Rickert, V. Pharmacokinetic interaction profile of riociguat, a new soluble guanylate cyclase stimulator, in vitro / V. Rickert, W.E. Haefeli, J. Weiss. – Text : visual // *Pulm Pharmacol Ther.* – 2014. – Vol. 28, N 2. – P. 130-137.

164. Robillard, K.R. Expression of ATP-binding cassette membrane transporters in rodent and human sertoli cells: relevance to the permeability of antiretroviral therapy at the blood-testis barrier / K.R. Robillard, T. Hoque, R. Bendayan. – Text : visual // *J Pharmacol Exp Ther.* – 2012. – Vol. 340, N 1. – P. 96-108.

165. Role of breast cancer resistance protein (BCRP/ABCG2) in cancer drug resistance / K. Natarajan, Y. Xie, M.R. Baer Lee [et al.]. – Text : visual // *Biochem Pharmacol.* – 2012. – Vol. 83, N 8. – P. 1084-1103.

166. Sarkadi, B. The ABCG2/BCRP transporter and its variants - from structure to pathology / B. Sarkadi, L. Homolya, T. Hegedűs. – Text : visual // *FEBS Lett.* – 2020. – Vol. 594, N 23, - P. 4012-4034.

167. Sex-specific expression mechanism of hepatic estrogen inactivating enzyme and transporters in diabetic women / M. Fashe, M. Yi, T. Sueyoshi [et al.]. – Text : visual // *Biochem Pharmacol.* – 2021. – Vol. 190, N 114662.

168. Side population/ABCG2-positive cells represent a heterogeneous group of haemopoietic cells: implications for the use of adult stem cells in transplantation and plasticity protocols / C.S. Naylor, E. Jaworska, K. Branson Lee [et al.]. – Text : visual // *Bone Marrow Transplant.* – 2005. – Vol. 35, N 4. – P. 353-360.

169. Solitary Inhibition of the Breast Cancer Resistance Protein Efflux Transporter Results in a Clinically Significant Drug-Drug Interaction with Rosuvastatin by Causing up to a 2-Fold Increase in Statin Exposure / R. Elsby, P.

Martin, D. Surry [et al.]. – Text : visual // Drug Metab Dispos. – 2016. – Vol. 44, N 3. – P. 398-408.

170. Stacy, A.E. Molecular pharmacology of ABCG2 and its role in chemoresistance / A.E. Stacy, P.J. Jansson, D.R. Richardson. – Text : visual // Mol Pharmacol. – 2013. – Vol. 84, N 5. – P. 655-669.

171. Strategies and Mechanism in Reversing Intestinal Drug Efflux in Oral Drug Delivery / R. Lu, Y. Zhou, J Ma [et al.]. – Text : visual // Pharmaceutics. – 2022. – Vol. 14, N 6. – P. 1131.

172. Structural basis of small-molecule inhibition of human multidrug transporter ABCG2 / S.M. Jackson, I. Manolaridis, J. Kowal [et al.]. – Text : visual // Nat Struct Mol Biol. – 2018. – Vol. 25, N 4. – P. 333-340.

173. Structure and Function of the Human Breast Cancer Resistance Protein (BCRP/ABCG2) / Z. Ni, Z.F. Bikadi, M. Rosenberg [et al.]. – Text : visual // Curr Drug Metab. – 2010. – Vol. 11, N 7. – P. 603-617.

174. Structure of the human multidrug transporter ABCG2 / N.M. Taylor, I. Manolaridis, S.M. Jackson [et al.]. – Text : visual // Nature. – 2017. – Vol. 546, N 7659. – P. 504-509.

175. Studies on pharmacokinetic properties and absorption mechanism of phloretin: In vivo and in vitro / Y.Y. Zhao, Y. Fan, M. Wang [et al.]. – Text : visual // Biomed Pharmacother. – 2020. – Vol. 132, N 7110809.

176. Subcellular localization and distribution of the breast cancer resistance protein transporter in normal human tissues / M. Maliepaard, G.L. Scheffer, I.F. Faneyte [et al.]. – Text : visual // Cancer Res. – 2001. – Vol. 61, N 8. – P. 3458-3464.

177. Synthesis and ABCG2 inhibitory activity of novel fumitremorgin C analogs--specificity and structure activity correlations / O. Szolomajer-Csikós, E. Beéry, L. Kósa [et al.]. – Text : visual // Med Chem. – 2013. – Vol. 9, N 4. – P. 494-509.

178. Targeted inhibitors of P-glycoprotein increase chemotherapeutic-induced mortality of multidrug resistant tumor cells / A.K. Nanayakkara, C.A. Follit, G. Chen [et al.]. – Text : visual // *Sci Rep.* – 2018. – Vol. 8, N 1. – P. 967.

179. Targeting breast cancer resistance protein (BCRP/ABCG2): Functional inhibitors and expression modulators / I.F. Zattoni, L.C. Delabio, J.P. Dutra [et al.]. – Text : visual // *Eur J Med Chem.* – 2022. – Vol. 237. – P. 114346.

180. TEER Measurement Techniques for In Vitro Barrier Model Systems / B. Srinivasan, A.R. Kolli, M.B. Esch [et al.]. – Text : visual // *SLAS Technology.* – 2015. – Vol. 20, N 2. – P. 107-126.

181. Thalhammer T. Subcellular localization of the ABCG2 transporter in normal and malignant human gallbladder epithelium / S. Aust, P. Obrist, W. Jaeger [et al.]. – Text : visual // *Lab Investig.* – 2004. – Vol. 84, N 8. – P. 1024-1036.

182. The ABC transporter BCRP/ABCG2 is a placental survival factor, and its expression is reduced in idiopathic human fetal growth restriction / D.A. Evseenko, P. Murthi, J.W. Paxton [et al.]. – Text : visual // *FASEB J.* – 2007. – Vol. 21, N 13. – P. 3592-3605.

183. The Breast Cancer Resistance Protein (Bcrp1/Abcg2) Limits Fetal Distribution of Glyburide in the Pregnant Mouse: An Obstetric-Fetal Pharmacology Research Unit Network and University of Washington Specialized Center of Research Study / L. Zhou, S.B. Naraharisetti, H. Wang [et al.]. – Text : visual // *Mol Pharmacol.* – 2008. – Vol. 73, N 3. – P. 949-959.

184. The breast cancer resistance protein BCRP (ABCG2) concentrates drugs and carcinogenic xenotoxins into milk / J.W. Jonker, G. Merino, S. Musters [et al.]. – Text : visual // *Nat Med.* – 2005. – Vol. 11, N 2. – P. 127-129.

185. The breast cancer resistance protein protects against a major chlorophyll-derived dietary phototoxin and protoporphyria / J.W. Jonker, M. Buitelaar, E. Wagenaar [et al.]. – Text : visual // *Proc Natl Acad Sci U S A.* – 2002. – Vol. 99, N 24. – P. 15649-15654.

186. The breast cancer resistance protein transporter ABCG2 is expressed in the human kidney proximal tubule apical membrane / M. Huls, C.A. Brown, A.S. Windass [et al.]. – Text : visual // *Kidney Int.* – 2008. – Vol. 73, N 2. – P. 220-225.

187. The effect of breast cancer resistance protein and P-glycoprotein on the brain penetration of flavopiridol, imatinib mesylate (Gleevec), prazosin, and 2-methoxy-3-(4-(2-(5-methyl-2-phenyloxazol-4-yl)ethoxy)phenyl)propanoic acid (PF-407288) in mice / L. Zhou, K. Schmidt, F.R. Nelson [et al.]. – Text : visual // *Drug Metab Dispos Biol Fate Chem.* – 2009. – Vol. 37, N 5. – P. 946-955.

188. The essential role of the transporter ABCG2 in the pathophysiology of erythropoietic protoporphyria / P. Wang, M. Sachar, J. Lu [et al.]. – Text : visual // *Sci Adv.* – 2019. – Vol. 5, N 9. – P. eaaw6127.

189. The Impact of Breast Cancer Resistance Protein (BCRP/ABCG2) on Drug Transport Across Caco-2 Cell Monolayers / I. Kawahara, S. Nishikawa, A. Yamamoto [et al.]. – Text : visual // *Drug Metab Dispos.* – 2020. – Vol. 48, N 6. – P. 491-498.

190. The linker region of breast cancer resistance protein ABCG2 is critical for coupling of ATP-dependent drug transport / S. Macalou, R.W. Robey, G. Jabor Gozzi [et al.]. – Text : visual // *Cell Mol Life Sci.* – 2016. – Vol. 73, N 9. – P. 1927-1937.

191. The multidrug resistance transporter ABCG2 (breast cancer resistance protein 1) effluxes Hoechst 33342 and is overexpressed in hematopoietic stem cells / M. Kim, H. Turnquist, J. Jackson [et al.]. – Text : visual // *Clin Cancer Res.* – 2002. – Vol. 8, N 1. – P. 22-28.

192. The naphthoquinones, vitamin K3 and its structural analogue plumbagin, are substrates of the multidrug resistance linked ATP binding cassette drug transporter ABCG2 / S. Shukla, C.P. Wu, K. Nandigama [et al.]. – Text : visual // *Mol Cancer Ther.* – 2007. – Vol. 6, N 12. – P. 3279-3286.

193. The need for human breast cancer resistance protein substrate and inhibition evaluation in drug discovery and development: why, when, and how? / A. Poirier, R. Portmann, A.C. Cascais [et al.]. – Text : visual // *Drug Metab Dispos.* – 2014. – Vol. 42, N 9. – P. 1466-1477.
194. The relationship between amyloid-beta and brain capillary endothelial cells in Alzheimer's disease / Y.L. Zhang, J Wang, Z.N. Zhang [et al.]. – Text : visual // *Neural Regen Res.* – 2022. – Vol. 17, N 11. – P. 2355-2363.
195. The role of ABC transporters in drug absorption, distribution, metabolism, excretion and toxicity (ADME-Tox) / G. Szakács, A. Váradi, C. Ozvegy-Laczka [et al.]. – Text : visual // *Drug Discov Today.* – 2008. – Vol. 13, N 9-10. – P. 379-393.
196. The role of efflux and uptake transporters in [N-{3-chloro-4-[(3-fluorobenzyl)oxy]phenyl}-6-[5-({[2-(methylsulfonyl)ethyl]amino}methyl)-2-furyl]-4-quinazolinamine (GW572016, lapatinib) disposition and drug interactions / J.W. Polli, J.E. Humphreys, K.A. Harmon [et al.]. – Text : visual // *Drug Metab Dispos.* – 2008. – Vol. 36, N 4. – P. 695-701.
197. The Role of P-Glycoprotein in Decreasing Cell Membranes Permeability during Oxidative Stress / A. V. Shchulkin, Y.V. Abalenikhina, P.D. Erokhina [et al.]. – Text : visual // *Biochemistry (Moscow).* – 2021. – Vol. 86, N 2. – P. 197-206.
198. The role of the breast cancer resistance protein (ABCG2) in the distribution of sorafenib to the brain / S. Agarwal, R. Sane, J.R. Ohlfest [et al.]. – Text : visual // *J Pharmacol Exp Ther.* – 2011. – Vol. 336, N 1. – P. 223-233.
199. The role of the efflux carriers Abcg2 and Abcc2 for the hepatobiliary elimination of benzo[a]pyrene and its metabolites in mice / J. Kranz, S. Hessel, J. Aretz [et al.]. – Text : visual // *Chem Biol Interact.* – 2014. – Vol. 224. – P. 36-41.
200. The stem cell marker Bcrp/ABCG2 enhances hypoxic cell survival through interactions with heme / P. Krishnamurthy, D.D. Ross, T.

Nakanishi [et al.]. – Text : visual // *J Biol Chem.* – 2004. – Vol. 279, N 23. – P. 24218-24225.

201. Therapeutic Potential of Quercetin: New Insights and Perspectives for Human Health / B. Salehi, L. Machin, L. Monzote [et al.]. – Text : visual // *ACS Omega.* – 2020. – Vol. 5, N 20. – P. 11849-11872.

202. Towards understanding the mechanism of action of the multidrug resistance-linked half-ABC transporter ABCG2: a molecular modeling study / Y.F. Li, O. Polgar, M. Okada [et al.]. – Text : visual // *J Mol Graph Model.* – 2007. – Vol. 25, N 6. – P. 837-851.

203. Transporter Regulation in Critical Protective Barriers: Focus on Brain and Placenta / V. Taggi, M. Riera Romo, M. Piquette-Miller [et al.]. – Text : visual // *Pharmaceutics.* – 2022. – Vol. 14, N 7. – P. 1376.

204. Transporters in the Mammary Gland-Contribution to Presence of Nutrients and Drugs into Milk / A.M. García-Lino, I. Álvarez-Fernández, E. Blanco-Paniagua [et al.]. – Text : visual // *Nutrients.* – 2019. – Vol. 11, N 10. – P. 2372.

205. Triazole Bridged Flavonoid Dimers as Potent, Nontoxic, and Highly Selective Breast Cancer Resistance Protein (BCRP/ABCG2) Inhibitors / X. Zhu, I.K. Wong, K.F. Chan [et al.]. – Text : visual // *J Med Chem.* – 2019. – Vol. 62, N 18. – P. 8578-8608.

206. Validation and application of Caco-2 assays for the in vitro evaluation of development candidate drugs as substrates or inhibitors of P-glycoprotein to support regulatory submissions / R. Elsby, D.D. Surry, V.N. Smith [et al.]. – Text : visual // *Xenobiotica.* – 2008. – Vol. 38, N 7-8. – P. 1140-1164.

207. Validation of membrane vesicle-based breast cancer resistance protein and multidrug resistance protein 2 assays to assess drug transport and the potential for drug-drug interaction to support regulatory submissions / R. Elsby, V. Smith, L. Fox [et al.]. – Text : visual // *Xenobiotica.* – 2011. – Vol. 41, N 9. – P. 764-783.

208. Weiss, J. Telaprevir is a substrate and moderate inhibitor of P-glycoprotein, a strong inducer of ABCG2, but not an activator of PXR in vitro / J. Weiss, J.P. Becker, W.E. Haefeli. – Text : visual // *Int J Antimicrob Agents*. – 2014. – Vol. 43, N 2. – P. 184-188.

209. Zhang, S. Flavonoids Are Inhibitors of Breast Cancer Resistance Protein (ABCG2)-Mediated Transport / S. Zhang, X. Yang, M.E. Morris. – Text : visual // *Mol Pharmacol*. – 2004. – Vol. 65, N 5. – P. 1208–1216.