

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

Автореферат
диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

РЯЗАНЬ – 2023

Работа выполнена в Федеральном государственном бюджетном образовательном учреждении высшего образования «Рязанский государственный медицинский университет имени академика И.П.Павлова» Министерства Здравоохранения Российской Федерации (ФГБОУ ВО РязГМУ Минздрава России)

Научный руководитель:

доктор медицинских наук, профессор

Якушева Елена Николаевна

Официальные оппоненты:

Оковитый Сергей Викторович, д.м.н., профессор, Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Санкт-Петербургский государственный химико-фармацевтический университет» Министерства здравоохранения РФ, кафедра фармакологии и клинической фармакологии, заведующий.

Воробьева Виктория Владимировна, д.м.н., Федеральное государственное бюджетное военное образовательное учреждение высшего образования «Военно-медицинская академия имени С.М.Кирова» Министерства обороны Российской Федерации, кафедра фармакологии, старший преподаватель.

Ведущая организация: Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования Первый Московский государственный медицинский университет имени И.М. Сеченова Министерства здравоохранения Российской Федерации (Сеченовский Университет)

Защита диссертации состоится « ____ » _____ 2024 года в _____ часов на заседании диссертационного совета 24.1.158.02, созданного на базе ФГБНУ «Институт экспериментальной медицины», по адресу 197022, Санкт-Петербург, Каменноостровский пр., д. 71.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Институт экспериментальной медицины» по адресу: 197376, Санкт-Петербург, ул. Академика Павлова, д. 12 и на сайте <https://iemspsb.ru/external/транова-юлия/>

Автореферат разослан « ____ » _____ 2024 года.

Ученый секретарь
диссертационного совета
кандидат медицинских наук

Мухин Валерий Николаевич

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 (Hamid AA, 2014).

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 (Sarkadi B, 2020).

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 (Doyle LA, 1998). 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 (Maliepaard M, 2001; Урываева ИВ, 2004; Mairinger S, 2022), а также в опухолевых клетках (Свирновский АИ, 2009; Шевченко АИ, 2016; Черных ЮБ, 2016; Marin JG, 2022).

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 (Jonker JW, 2002).

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, гефитиниб, нилотиниб) и ряд лекарственных средств других фармакологических групп (празозин, глибурид, циметидин, сульфасалазин, нитрофурантоин, розувастатин) (Мао Q, 2015).

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 (гефитиниб, иматиниб), ингибиторы протеазы вируса гепатита С (боцепревир), блокаторы кальциевых каналов (нимодипин, никардипин), дипиридамол, циклоспорин А, такролимус, сиролимус, резерпин, тамоксифен, некоторые флавоноиды (биохинин А и др.) (Богущ ТА, 2011, Мао Q, 2015). На данный момент веществ, являющимися индукторами BCRP, обнаружено мало; к ним относятся: теллапревир, риоцигуат, венлафаксин (Zattoni IF, 2022).

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 (Якушева ЕН, 2019). Отработаны методики тестирования лекарственных веществ на принадлежность к субстратам, индукторам и ингибиторам гликопротеина-Р *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 Caco-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 Caco-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 Caco-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 Caco-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 Caco-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 Caco-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 Caco-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 Caco-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%.

Связь задач исследования с основным планом научно-исследовательских работ университета. Диссертационная работа выполнена в соответствии с тематическим планом научно-исследовательских работ ФГБОУ ВО РязГМУ Минздрава России.

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.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

В работе использовали клеточную линию аденокарциномы ободочной кишки человека (Caco-2), которая после дифференцировки в течение 21 дня имеет морфологические и функциональные сходства с кишечными энтероцитами человека (Hilgers A.R., 1990). Клетки Caco-2 культивировали в Дульбекко модифицированной среде Игла (DMEM), содержащей глюкозу 4500 мг/л, с добавлением L-глутамин (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 и инкубировали с 5% содержанием углекислого газа при температуре 37°C.

Транспортные эксперименты проводили с использованием специальных трансвелл-систем (12 mm Transwell® with 0,4 µm Pore Polycarbonate Membrane Insert, Sterile, «Corning», США), которые состоят из двух камер: апикальной (внутренней) и базолатеральной (внешней), камеры разделены между собой полупроницаемой мембраной, на которую высеиваются клетки.

Целостность клеточного монослоя оценивали с помощью вольтметра Millicell ERS-2 («Millipore», США) по величине трансэпителиального сопротивления (TEER), которое должно быть выше 500 мОм*см² (Srinivasan. B., 2015).

Для проведения транспортных экспериментов использовали транспортную среду – раствор Хэнкса («ПанЭко», Россия) с 25 mM Хепес («Gipco», №2026999, Англия) и 1% диметилсульфоксида («ПанЭко», Россия). В апикальную камеру трансвелл-системы добавляли один из тестируемых субстратов BCRP: метотрексат, митоксантрон, кверцетин с концентрациями 1, 5, 10, 50 мкМ. Далее проводили забор проб через 1, 2 и 3 часа из базолатеральной камеры. Транспорт из апикальной камеры в базолатеральную (транспорт a-b) веществ осуществляется путем пассивной диффузии против функционирования BCRP.

На следующем этапе аналогично оценивали транспорт субстратов тех же концентраций из базолатеральной камеры в апикальную (транспорт b-a), данный транспорт реализуется не только путем пассивной диффузии, но и с помощью BCRP (Elsby R., 2008).

Транспортные эксперименты в присутствии ингибитора BCRP – резерпина с концентрацией 50 мкМ проводили аналогичным способом, предварительно инкубируя клетки с резерпином (Zhou S, 2001; Li H, 2016). Эксперименты с ингибитором проводили для метотрексата в концентрации 5 мкМ и митоксантрона в концентрации 10 мкМ.

Далее рассчитывали коэффициенты кажущейся проницаемости, характеризующие транспорт из базолатеральной камеры в апикальную (транспорт b-a) и в противоположном направлении (транспорт a-b) по формуле (Elsby R., 2008):

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

где P_{app} – коэффициент кажущейся проницаемости (apparent permeability coefficient); dQ/dt – изменение концентрации вещества в камере реципиенте за время инкубации, мкМ*с*см³; A – площадь полупроницаемой мембраны лунки в трансвелл-системе, на которой культивируются клетки, см²; C_0 – начальная концентрация субстрата в камере-доноре, мкМ.

Также рассчитывали отношение коэффициентов кажущейся проницаемости: $P_{app} \text{ b-a} / P_{app} \text{ a-b}$. Данный параметр является интегральным и оценивает общий вклад BCRP в транспорт веществ через билипидную мембрану.

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 $P_{app} \text{ b-a}$ и $P_{app} \text{ b-a}/P_{app} \text{ a-b}$, делают заключение о принадлежности тестируемого вещества к субстратам транспортера. Если на фоне добавления ингибитора эти показатели не изменяются, данный белок-транспортер не играет существенной роли в транспорте тестируемого вещества, а его перемещение осуществляется другими транспортерами, например, гликопротеином-P (Pgp) (Якушева Е.Н., 2019).

По методике, представленной выше, оценивали принадлежность этилметилгидроксипиридина сукцината к субстратам BCRP с концентрациями 10, 100 и 250 мкМ. Транспортный эксперимент для оценки влияния этилметилгидроксипиридина сукцината (50 и 100 мкМ) на активность BCRP проводили с использованием вещества-субстрата митоксантрона с концентрацией 10 мкМ.

Концентрацию метотрексата, митоксантрона и кверцетина определяли методом высокоэффективной жидкостной хроматографии с тандемным масс-спектрометрическим детектированием, а концентрацию этилметилгидроксипиридина сукцината – методом высокоэффективной жидкостной хроматографии с УФ-детектированием.

Пробоподготовка заключалась в осаждении белков транспортной среды, после инкубации с клетками, для метотрексата ее осуществляли смесью метанола и воды в соотношении 1:1, митоксантрона – метанолом, кверцетина - смесью ацетонитрила и воды в соотношении 1:1. Далее образцы тщательно перемешивали, центрифугировали в течение 10 мин при 13000g на центрифуге Avanti JXN-3 («Beckman Coulter», США).

Все биоаналитические методики валидированы в соответствии с Правилами проведения исследований биоэквивалентности лекарственных препаратов в рамках Евразийского экономического союза по следующим параметрам: селективность, предел обнаружения, нижний предел количественного определения, линейность, внутри- и межцикловая правильность и прецизионность, стабильность образцов, отсутствие переноса пробы и матричного эффекта.

Относительное количество BCRP определяли в тотальном лизате клеток Caco-2 до и после инкубации с этилметилгидроксипиридина сукцинатом в концентрациях 5, 10, 50, 100 и 500 мкМ в течение 24 часов. После инкубации клетки снимали питательной средой и измеряли их количество с помощью счетчика и анализатора жизнеспособности клеток Countess II FL Automated Cell Counter («Thermo Fisher», США). Далее клетки центрифугировали на CM-50 для пробирок Eppendorf («Eppendorf», Германия) при 1500

об/мин в течение 5 минут. 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) и выдерживали в течение 30 минут при температуре 40°C, перемешивая на встряхивателе Vortex (Heidolph, Германия) каждые 10 минут. Далее пробы центрифугировали при 13000 об/мин при температуре 4°C 10 минут и проводили анализ методом вестерн-блот. Количество транспортера пересчитывали на общее содержание белка, которое определяли по методу Брэдфорда (Comassie Plus (Bladford) Assay Kit, США) (Shchulkin A.V., 2021).

Белки супернатанта (20 мкг) подвергали электрофорезу с использованием TGX Stain-Free FastCast Acrylamide Kit («Bio-Rad», США) в буферной системе Laemmli («BioRad», США). Электрофорез проводили при 100 В в течение 90 мин. Белки переносили на нитроцеллюлозную мембрану «Trans-Blot Turbo Mini-Size nitrocellulose» («Bio-Rad», США) с применением 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).

Детекцию белка BCRP проводили с использованием первичных мышинных моноклональных антител (CD338 (ABCG2) Monoclonal Antibody (5D3) «Invitrogen», 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») инкубацией в течение 1 ч при комнатной температуре. Белки визуализировали хемилюминесценцией с помощью Chemi Doc XRS+ (“Bio-Rad”). Интенсивность полученных бэндов анализировали денситометрически с помощью программного обеспечения ImageLab (“Bio-Rad”). Содержание BCRP 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).

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. При нормальном распределении статистическую значимость различий оценивали с помощью теста ANOVA, 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 ($M \pm SD$) при нормальном распределении.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Количественный анализ метотрексата, митоксантрона и кверцетина проводили с использованием высокоэффективного жидкостного хроматографа «Ultimate 3000» («Thermo Fisher», США), оснащенного 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 А, и предколонки Selectra C18 Guard Cartridges SLC-18 GDC46-5UM.

Масс-спектрометрические параметры методики подбирали путем прямого шприцевого ввода в детектор стандартного раствора вещества в концентрации 100 нг/мл в метаноле, определяли параметры исходя из химической структуры веществ и на основании библиотечных данных базы National Institute of Standards and Technology (NIST). Для каждого вещества были определены дочерние ионы и из них выбраны наиболее интенсивные ионы двух различных масс, по которым проводилось определение подлинности вещества на хроматограмме и количественный анализ. Для каждой методики подбирали систему растворителей и профили элюирования для получения оптимальных хроматографических параметров пиков веществ. В ходе анализа были получены параметры хроматографирования и масс-спектрометрии, указанные в Таблицах 1 и 2.

Таблица 1 - Параметры хроматографирования метотрексата, митоксантрона и кверцетина

Параметр хроматографирования	Анализируемое вещество		
	Метотрексат	Митоксантрон	Кверцетин
Объем вводимой пробы, мкл	2	5	5
Скорость потока, мл/мин	0,3	0,3	0,5
Температура разделения, °С	35	35	35
Время анализа, мин	10	10	11
Подвижная фаза	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

Количественный анализ этилметилгидроксипиридина сукцината выполняли на высокоэффективном жидкостном хроматографе «Стайер» (Россия), оснащённом УФ-спектрофотометрическим детектором, ввод пробы осуществляли вручную шприцем. При анализе использовали хроматографическую колонку Beckman Coulter (США) 4,6*150 мм 5 мкм. Температура разделения – 35°С. Скорость потока – 0,8 мл/мин. Время удерживания

этилметилгидроксипиридина сукцината в данных условиях составило 5,5 мин. Детектирование проводили при длине волны 296 нм в изократическом режиме устройства. Подвижная фаза состояла из ацетонитрила и воды в объемном отношении 20:80 с добавлением уксусной кислоты до pH 3,25.

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 → 308,1 m/z 455 → 174,9 m/z	455 → 88,2 m/z 455 → 358,1 m/z	301 → 150,9 m/z 301 → 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

Валидация разработанных методик количественного анализа. *Селективность* методик проверяли, анализируя холостую пробу транспортной среды без добавления стандарта и образцы транспортной среды с добавлением стандарта. На хроматограммах образцов холостой транспортной среды не наблюдалось пиков со временем удерживания, соответствующим времени удерживания метотрексата, митоксантрона, кверцетина и этилметилгидроксипиридина сукцината (Рисунок 1).

Нижний предел количественного определения метотрексата составил 60 нМ, митоксантрона – 50 нМ, кверцетина – 5 нМ, этилметилгидроксипиридина сукцината – 400 нМ, отношение сигнала к шуму не ниже 10, точность и прецизионность определения не превышали 20%. Предел обнаружения метотрексата составил 20 нМ, митоксантрона – 10 нМ, кверцетина – 1 нМ, этилметилгидроксипиридина сукцината – 100 нМ, соотношение сигнала к шуму не менее 3.

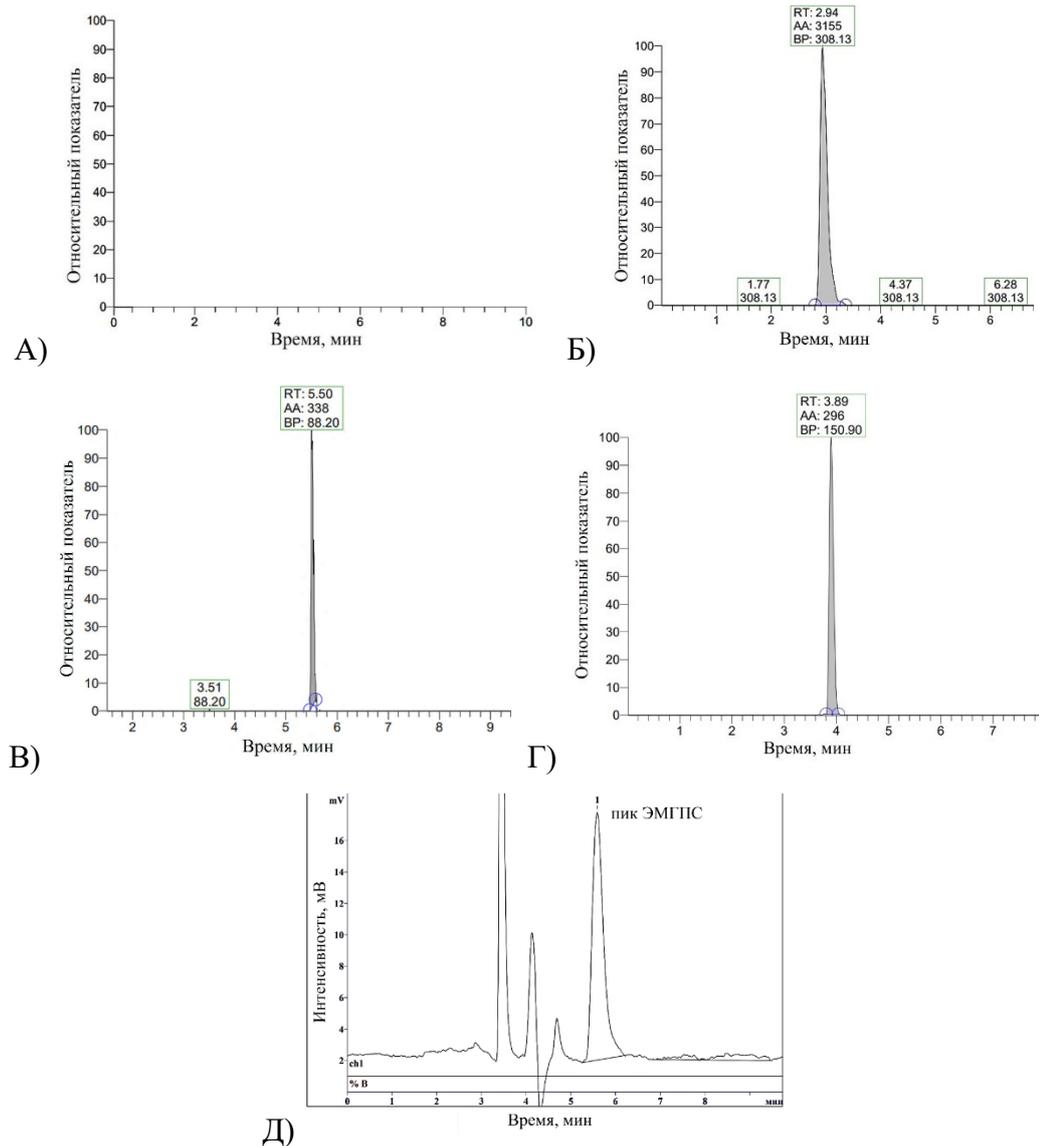


Рисунок 1 - Хроматограмма А) холостой пробы транспортной среды, Б) метотрексата в концентрации 60 нМ, В) митоксантрона в концентрации 50 нМ, Г) кверцетина в концентрации 5 нМ, Д) этилметилгидроксипиридина сукцината в концентрации 4280 нМ

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

Линейность проверяли, анализируя пробы калибровочных образцов в количестве более 5. Для метотрексата использовали калибровочные образцы с концентрациями 60, 100, 200, 600, 1000, 2000, 10 000 нМ и по результатам анализа нескольких серий калибровочных растворов были получены уравнения линейной регрессии: $y=276,898+31,4557*x$, $R^2=0,9993$; $y=92,2803+50,3247*x$, $R^2=0,9959$; $y=-98,8244+31,5429*x$, $R^2=0,9989$. Для митоксантрона готовили калибровочные растворы с концентрациями 50, 100, 200, 400, 600, 800 и 1000 нМ и получены следующие уравнения линейной регрессии: $y=-133,844+8,395*x$, $R^2=0,9972$; $y=-217,449+9,438*x$, $R^2=0,9987$; $y=-289,597+9,62134*x$, $R^2=0,9989$. Для анализа

кверцетина использовали калибровочные растворы с концентрациями 5, 10, 20, 50, 100, 200 и 500 нМ и получены следующие уравнения линейной регрессии: $y=31,0517+65,1779*x$, $R^2=0,9987$; $y=25,6809+35,643*x$, $R^2=0,9960$; $y=-77,6652+58,3289*x$, $R^2=0,9947$. Для этилметилгидроксипиридина сукцината готовили калибровочные образцы с концентрациями 400, 2140, 4280, 12860, 25720, 44780, 89560 нМ и получили 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) (Рисунок 2).

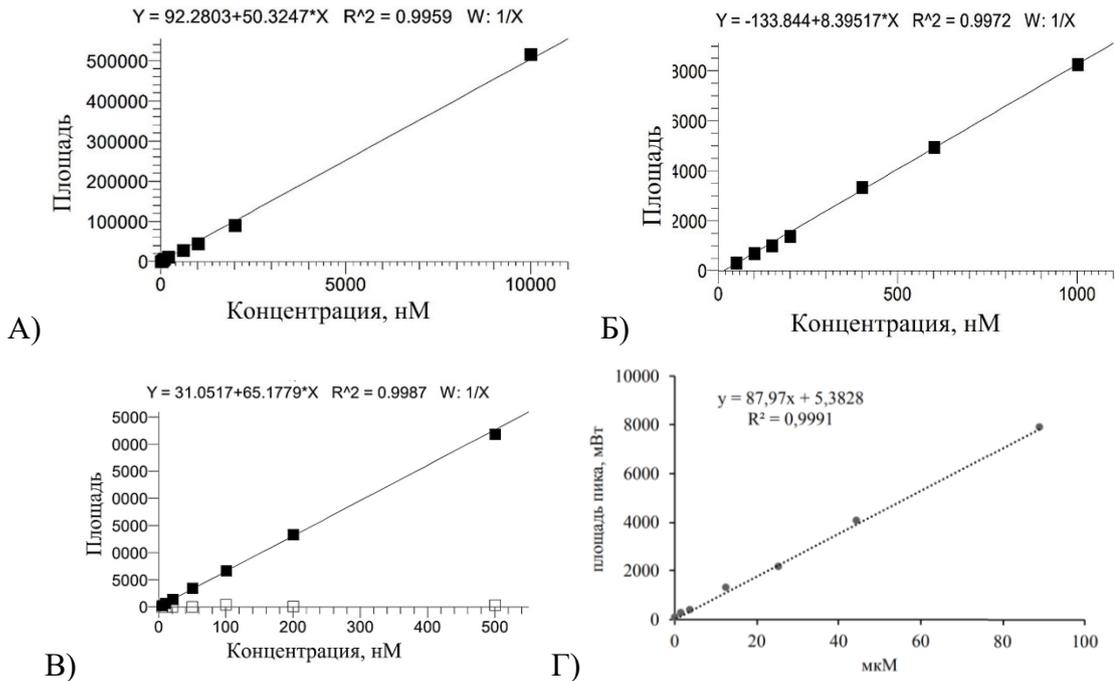


Рисунок 2 - Образцы калибровочных графиков А) метотрексата,

Б) митоксантрона, Г) кверцетина, Д) этилметилгидроксипиридина сукцината

Точность и прецизионность определяли, анализируя образцы стандартных растворов вещества в рамках трех циклов. Стандартные растворы метотрексата получены в концентрациях 60, 200, 4800 и 8000 нМ, митоксантрона – 50, 150, 400 и 800 нМ, кверцетина – 5, 20, 200 и 400 нМ, этилметилгидроксипиридина сукцината – 400, 12860, 44780 нМ. Прецизионность и точность оценивали внутри цикла, для этого анализировали по 5 образцов для каждой концентрации и между циклами. Полученные величины прецизионности и точности соответствовали принятым нормам (не более 20% для НПКО и не более 15% – для остальных точек).

Стабильность растворов веществ 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.

Перенос пробы определяли, последовательно анализируя пробы с наибольшей концентрацией вещества и образец холостой транспортной среды, на хроматограмме транспортной среды отсутствовали пики, соответствующие по времени удерживания пикам анализируемых веществ.

Матричный эффект определяли для МС/МС методик по площади пиков образца с добавлением анализируемого вещества в присутствии транспортной среды (матрицы) и чистого раствора анализируемого вещества в отсутствие матрицы. Относительное стандартное отклонение эффекта матрицы, рассчитанного для 6 образцов транспортной среды, не превышало 15%.

Аналитический диапазон методики для метотрексата составил 60-10000 нМ, для митоксантрона – 50-1000 нМ, для кверцетина – 5–500 нМ, для этилметилгидроксипиридина сукцината – 400-89560 нМ целевого вещества.

Транспорт метотрексата, митоксантрона и кверцетина изучали в концентрациях 1, 5, 10 и 50 мкМ через монослой клеток 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.

Количество метотрексата и митоксантрона возрастало с повышением концентрации вещества и с течением времени как в апикальной, так и в базолатеральной камерах, что свидетельствует о дозозависимом транспорте веществ через монослой клеток Сасо-2 (Рисунки 3 и 4).

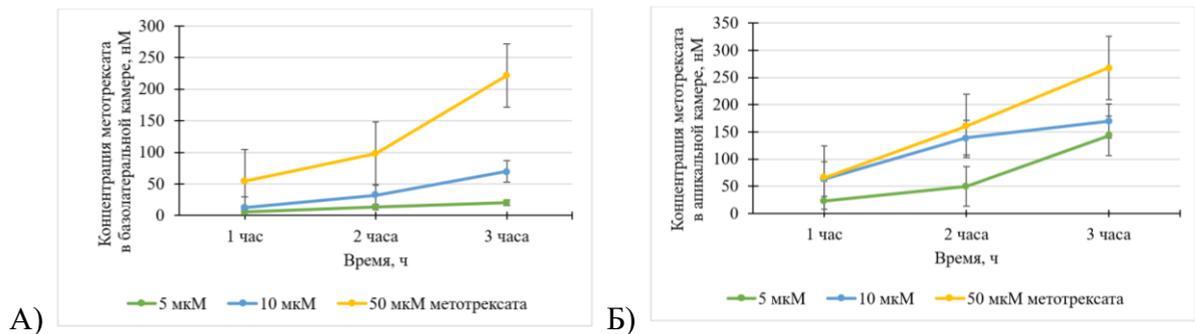


Рисунок 3 - Динамика уровня метотрексата в концентрациях 5,10 и 50 мкМ в течение 3 часов А) в базолатеральной, Б) в апикальной камере трансвелл-системы

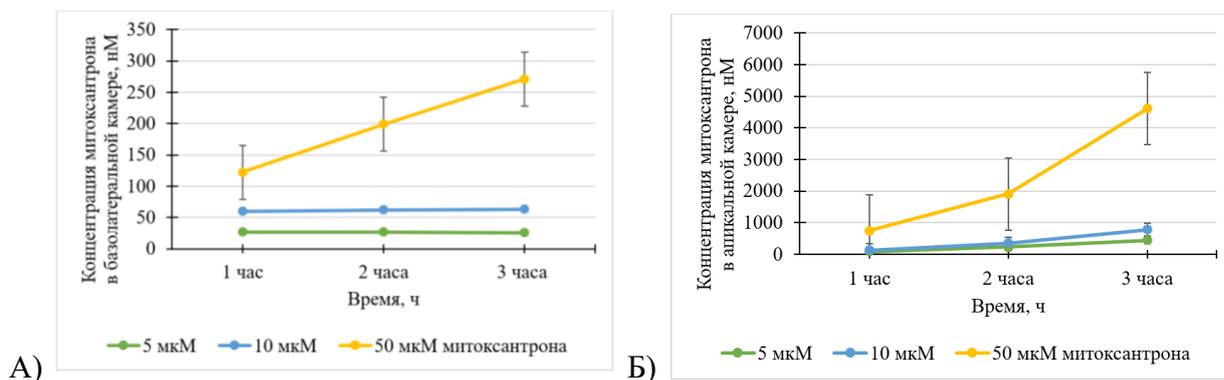


Рисунок 4 - Динамика уровня митоксантрона в концентрациях 5,10 и 50 мкМ в течение 3 часов А) в базолатеральной, Б) в апикальной камере трансвелл-системы

Рассчитанные для метотрексата коэффициенты кажущейся проницаемости и их отношение представлены в Таблице 3. Для метотрексата в концентрации 5 мкМ наблюдалась выраженная асимметрия трансцеллюлярного транспорта вещества: $P_{app\ b-a}$ составил $1,46 \pm 0,58 \cdot 10^{-6}$ см/сек, $P_{app\ a-b}$ – $0,44 \pm 0,18 \cdot 10^{-6}$ см/сек, а их отношение превышало «2» и составило 3,38, что свидетельствует об участии BCRP в транспорте вещества. При добавлении метотрексата в камеру-донор в концентрациях 10 и 50 мкМ отношение коэффициентов кажущейся проницаемости достоверно снижалось до значений ниже единицы ($p=0,00023$, $p=0,00024$ соответственно), что характеризует снижение транспорта метотрексата в направлении из клеток в апикальную камеру. Скорее всего, полученные данные являются следствием субстратного насыщения белка-транспортера BCRP.

Для митоксантрона в концентрации 5 мкМ наблюдалась выраженная асимметрия трансцеллюлярного транспорта вещества: $P_{app\ b-a}$ составил $2,23 \pm 0,090 \cdot 10^{-6}$ см/сек, $P_{app\ a-b}$ – $0,82 \pm 0,080 \cdot 10^{-6}$ см/сек, а их отношение – 2,72, т.е. превышало «2», что свидетельствует об участии BCRP в транспорте вещества. Повышение концентрации митоксантрона в транспортной среде до 10 мкМ приводило к достоверному снижению коэффициентов кажущейся проницаемости и к росту отношения коэффициентов кажущейся проницаемости до 6,18 ($p=0,00024$), что характеризует увеличение асимметрии транспорта митоксантрона. При содержании вещества 50 мкМ показатель отношения коэффициентов кажущейся проницаемости $P_{app\ b-a}/P_{app\ a-b}$ 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, повышалось субстратное насыщение BCRP.

Таблица 3 - Транспорт субстратов BCRP – метотрексата, митоксантрона и кверцетина через монослой клеток линии Сасо-2 при воздействии в течение 3 часов (M±SD)

Серия		Рapp b-a, *10-6 см/сек	Рapp a-b, *10-6 см/сек	Рapp b-a / Рapp a-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 Рapp b-a/Рapp a-b, превышающее «2», свидетельствующие об участии 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.

При добавлении кверцетина в камеру-донор вещество не детектировалось в камере-реципиенте при использовании концентраций 1, 5 и 10 мкМ. 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, недостаточная, для утверждения значимого участия 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 Сасо-2.

Далее оценивали интенсивность переноса метотрексата и митоксантрона через клеточный монослой в присутствии ингибитора BCRP – резерпина в концентрации 50 мкМ. Концентрация метотрексата и митоксантрона в обеих камерах трансвелл-системы снижалась при инкубации с резерпином в течение 3 часов (Рисунок Рисунки 5 и 6).

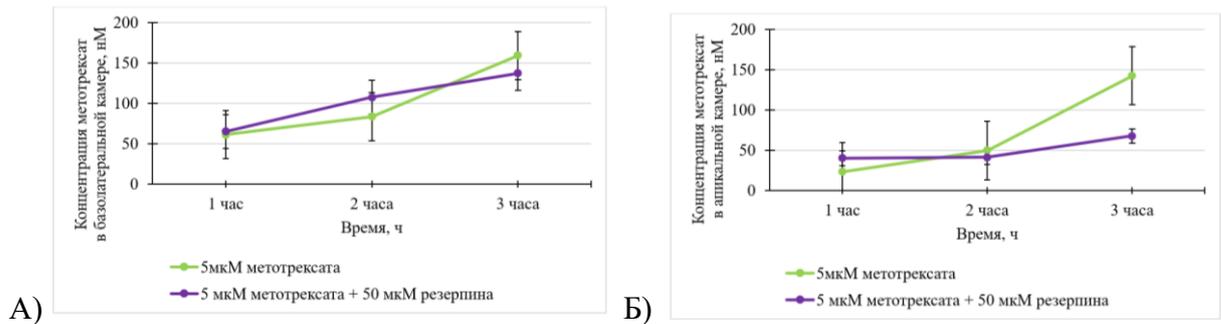


Рисунок 5 - Динамика уровня метотрексата в концентрации 5 мкМ в течение 3 часов на фоне ингибитора BCRP – резерпина в концентрации 50 мкМ и без добавления ингибитора А) в базолатеральной, Б) в апикальной камере трансвелл-системы

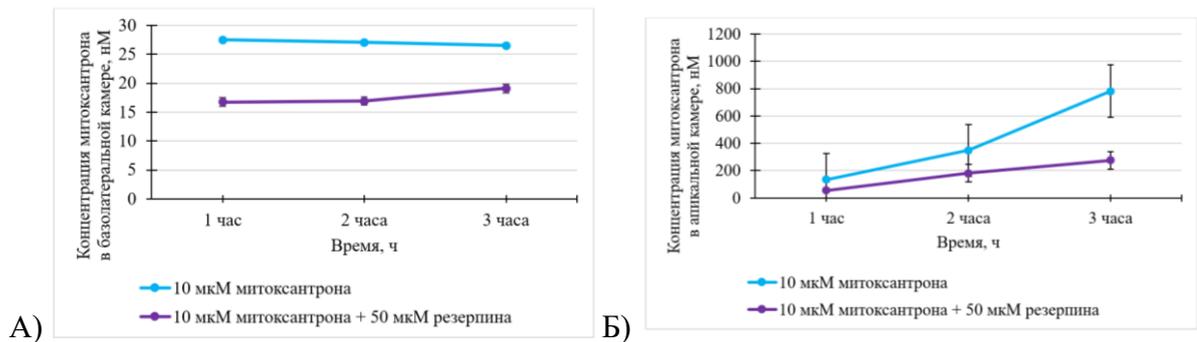


Рисунок 6 - Динамика уровня митоксантрона в концентрации 10 мкМ в течение 3 часов на фоне ингибитора BCRP – резерпина в концентрации 50 мкМ и без добавления ингибитора А) в базолатеральной, Б) в апикальной камере трансвелл-системы

В серии экспериментов без добавления ингибитора BCRP отношение $\text{Papp } b\text{-a}/\text{Papp } a\text{-b}$ метотрексата составило 3,38, а резерпин снижал $\text{Papp } b\text{-a}$ метотрексата в 2,75 раза ($p=0,053$), достоверно не изменял $\text{Papp } a\text{-b}$ ($p=0,539$). Отношение $\text{Papp } b\text{-a}/\text{Papp } a\text{-b}$ при этом снижалось в 3,31 раза ($p=0,0002$) и составило - 1,02, что свидетельствует об устранении асимметрии транспорта вещества, характерной для участия BCRP в данном процессе. В экспериментах без добавления резерпина отношение $\text{Papp } b\text{-a}/\text{Papp } a\text{-b}$ митоксантрона в концентрации 10 мкМ составило 6,18, а при добавлении резерпина $\text{Papp } b\text{-a}$ снижался в 4,03 раза ($p=0,0033$), $\text{Papp } a\text{-b}$ достоверно не изменялся и отношение $\text{Papp } b\text{-a}/\text{Papp } a\text{-b}$ уменьшалось в 3,36 раза ($p<0,0001$). Полученные результаты подтверждают возможность использования метотрексата в концентрации 5 мкМ и митоксантрона в концентрации 10 мкМ для оценки принадлежности лекарственных веществ к ингибиторам BCRP. Полученные результаты приведены в Таблице 4.

Таблица 4 - Влияние ингибитора BCRP резерпина (50 мкМ) на транспорт метотрексата (5 мкМ) и митоксантрона (10 мкМ) через монослой клеток линии Сасо-2 при воздействии в течение 3 часов ($M \pm SD$)

Серия	Рapp b-a, *10-6 см/сек	Рapp a-b, *10-6 см/сек	Рapp b-a / Рapp a-b
Метотрексат 5 мкМ	1,46±0,58	0,44±0,18	3,38±0,08
Метотрексат 5 мкМ + резерпин	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	0,39±0,057*	0,21±0,025	1,84±0,052*

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

Оценка принадлежности этилметилгидроксипиридина сукцината к субстратам BCRP проводилась по анализу его транспорта в концентрациях 10, 100 и 250 мкМ, значение коэффициентов кажущейся проницаемости и отношение этих коэффициентов представлены в Таблице 5.

Таблица 5 - 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	Рapp b-a, *10-6 см/сек	Рapp a-b, *10-6 см/сек	Рapp b-a / Рapp a-b
10 мкМ	7,56±2,98*	7,66±1,71*	0,99±0,32
100 мкМ	6,63±2,15*	7,05±2,15*	0,94±0,039
250 мкМ	16,5±4,16	22,3±1,99	0,75±0,26

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

Для указанных в Таблице 5 показателей коэффициентов кажущейся проницаемости их отношения составили менее «2» при концентрациях этилметилгидроксипиридина сукцината 10 мкМ и 100 мкМ (0,99 и 0,94 соответственно). Значения Рapp b-a и Рapp a-b этилметилгидроксипиридина сукцината при использовании концентрации 250 мкМ, были достоверно выше, чем в предшествующих сериях ($p < 0,05$). Значение Рapp b-a/Рapp a-b было менее «2» и равнялось 0,75. Полученные данные свидетельствуют об отсутствии участия белка-транспортера BCRP в переносе тестируемого вещества во всех исследованных сериях. Исходя из полученных результатов, транспортные эксперименты с применением ингибитора BCRP – резерпина не проводились.

Принадлежность этилметилгидроксипиридина сукцината к модуляторам активности BCRP оценивали с помощью транспортного эксперимента с использованием в качестве субстрата митоксантрона в концентрации 10 мкМ. Для митоксантрона в концентрации 10 мкМ наблюдалась выраженная асимметрия трансцеллюлярного транспорта вещества: отношение $P_{app} b-a/P_{app} a-b$ превышало «2» и составило $4,98 \pm 0,37$. При добавлении этилметилгидроксипиридина сукцината в концентрации 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, $P_{app} b-a/P_{app} a-b = 3,97$). 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 $P_{app} b-a/P_{app} a-b$ уменьшилось и составило $0,127 \pm 0,0066$ ($p=0,000337$) (Таблица 6).

Таблица 6 - 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 митоксантрона 10 мкМ

Таким образом, этилметилгидроксипиридина сукцинат снижал коэффициент кажущейся проницаемости $P_{app} b-a$ в 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.

Количество BCRP при воздействии этилметилгидроксипиридина сукцината в концентрациях 5, 10, 50, 100, 500 мкМ на клетки линии Caco-2 в течение 24 ч достоверно по сравнению с контролем не изменялось, $p > 0,05$ (Рисунок 7).

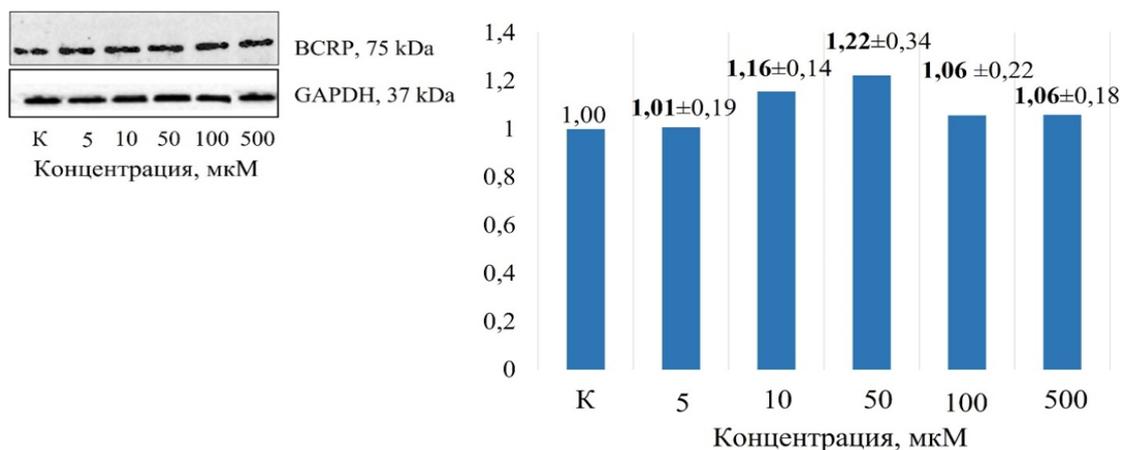


Рисунок 7 - Изменение относительного количества BCRP в клетках линии Caco-2 при воздействии этилметилгидроксипиридина сукцината в концентрациях 5, 10, 50, 100, 500 мкМ в течение 24 ч ($M \pm SD$, $n=6$ – для каждой серии экспериментов)

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

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

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.

СПИСОК ПУБЛИКАЦИЙ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

Работы, опубликованные в рецензируемых изданиях, рекомендованных ВАК РФ и/или входящих в международные базы данных Scopus и Web of Science, РИНЦ:

1. Мыльников П.Ю. Разработка и валидация методики количественного определения метотрексата в транспортной среде методом ВЭЖХ-МС/МС/ П.Ю. Мыльников, Ю. Транова, А.В. Щулькин и др. // Фармакокинетика и фармакодинамика. - 2021. - №1. - С. 45-51.
2. Транова Ю. Метод количественного определения кверцетина с помощью ВЭЖХ-МС/МС / Ю. Транова, П.Ю. Мыльников, А.В. Щулькин и др. // Наука молодых (Eruditio Juvenium). – 2022. – Т. 10. – № 3. – С. 251-258.
3. Щулькин А. В. Клетки линии Caco-2 как модель для изучения абсорбции лекарственных веществ / А.В. Щулькин, Ю.С. Транова, Ю.В. Абаленихина и др. // Экспериментальная и клиническая гастроэнтерология. – 2022. – № 206 (10). – С. 63–69.
4. Транова Ю.С. Количественный анализ митоксантрона методом ВЭЖХ-МС/МС в среде для культивирования клеток Caco-2 / Ю.С. Транова, А.В. Щулькин, И.В. Черных и др. // Ведомости Научного центра экспертизы средств медицинского применения. Регуляторные исследования и экспертиза лекарственных средств. – 2023. – Т. 13, № 1. – С. 104-111.
5. Транова Ю. Методика тестирования лекарственных средств на принадлежность к субстратам и ингибиторам белка-транспортера BCRP на клетках линии Caco-2 / Ю. Транова, А.А. Слепнев, И.В. Черных и др. // Разработка и регистрация лекарственных средств. – 2023. – Т. 12, № 2. – С. 87–94.

Публикации в материалах конференций:

1. **Транова Ю.С.** Количественное определение кверцетина в транспортной среде клеток линии Сасо-2 методом ВЭЖХ-МС/МС / **Ю. С. Транова**, А. В. Щулькин, П. Ю. Мыльников, Е. Н. Якушева // Инновационные технологии в медицине: взгляд молодого специалиста: Сборник докладов VII Всероссийской научной конференции молодых специалистов, аспирантов, ординаторов. – Рязань: РязГМУ, 2021. – С. 95-96.
2. **Транова Ю.С.** Влияние белка-транспортера BCRP на транспорт метотрексата через билипидную мембрану клеток линии Сасо-2 / **Ю. С. Транова**, А. В. Щулькин, И. В. Черных, и др. // Биохимические научные чтения памяти академика РАН Е.А. Строева: Тезисы докладов Всероссийской научно-практической конференции с международным участием. – Рязань: РязГМУ, 2022. – С. 84-85.
3. **Транова Ю.** Клетки Сасо-2 как модель для изучения активности белка устойчивости рака молочной железы / **Ю. Транова**, М. И. Поветко // Коллекции культур клеток человека и животных: современные вызовы и сетевые решения: Сборник тезисов докладов Всероссийской школы-конференции. – Санкт-Петербург: СПбПУ, 2022. – С. 111-112.
4. **Транова Ю.** Разработка методики количественного определения метотрексата методом ВЭЖХ-МС/МС в транспортной среде клеток линии Сасо-2 / **Ю. Транова**, А. В. Щулькин, П. Ю. Мыльников и др. // Естественнонаучные основы медико-биологических знаний: Материалы III Всероссийской конференции студентов и молодых ученых с международным участием. – Рязань: РязГМУ, 2021. – С. 11-13.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

ВЭЖХ – высокоэффективная жидкостная хроматография	Сасо-2 – клетки аденокарциномы ободочной кишки человека (англ.: cancer coli, colon cancer)
МС/МС – тандемная масс-спектрометрия	GAPDH – глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназа (англ.: glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase)
НПКО – нижний предел количественного определения	Papp – коэффициент кажущейся проницаемости (англ. apparent permeability)
УФ – ультрафиолетовый	TEER – трансэпителиальное сопротивление (англ.: transepithelial electrical resistance)
АВС – АТФ-связывающие кассетные транспортеры (англ.: ATP-binding cassette)	
BCRP – белок устойчивости рака молочной железы (англ.: breast cancer resistance protein)	