

Гликопротеин-P (Pgp) – это мембранный эффлюксный белок-транспортер с широким спектром эндогенных и экзогенных субстратов. Pgp локализован в гепатоцитах, энтероцитах и эпителиоцитах проксимальных почечных канальцев, эндотелиоцитах гистогематических барьеров, а также в клетках опухолей. Субстратами белка-транспортера является широкий спектр лекарственных средств, в том числе большинство цитостатиков и противоэпилептических лекарственных препаратов. Повышенная активность Pgp связана с развитием лекарственно резистентных к фармакотерапии форм опухолей и эпилепсии. Таким образом, ингибирование Pgp целесообразно для повышения эффективности лекарственного лечения указанных патологий. На данный момент ни один известный ингибитор Pgp не применяется в клинической практике из-за развития нежелательных лекарственных реакций. Следует отметить, что препараты растительного происхождения обладают меньшим спектром побочных эффектов, чем синтетические препараты, а также более экономически доступны. Поэтому целью настоящей работы является тестирование полисахаридов пижмы обыкновенной и донника лекарственного и их химических модификаций на возможность ингибирующего влияния на Pgp в экспериментах *in vitro* (на клетках линии Caco-2) и *in vivo* (на кроликах породы Шиншилла). Планируется выявить доступный отечественный ингибитор Pgp растительного происхождения, безопасный в ингибирующей дозе для повышения эффективности фармакотерапии онкологических заболеваний и фармакорезистентной эпилепсии.

Описание фундаментальной научной задачи, на решение которой направлено исследование

Гликопротеин-P (Pgp, ABCB1-белок) – АТФ-зависимый белок-транспортер, играющий ключевую роль в резистентности опухолевых клеток к проводимой химиотерапии (Schinkel A.H., 1997), а также в развитии фармакорезистентной эпилепсии. Обладая широкой субстратной специфичностью, данный белок-транспортер осуществляет эффлюкс из клеток большого спектра веществ, делая их невосприимчивыми к проводимой фармакотерапии. Таким образом, для увеличения эффективности проводимой терапии (повышения проникновения лекарственных веществ внутрь клеток) возможно использовать ингибиторы Pgp.

Первым ингибитором Pgp, который использовался в комбинированной терапии опухолей, был верапамил (Cornwell et al., 1987; Safa, 1988). Однако верапамил ингибирует кальциевые каналы L-типа в кардиомиоцитах в пикомолярных концентрациях, а Pgp – в микромолярном диапазоне, поэтому клинические исследования с его применением привели к проявлению выраженных кардиальных побочных эффектов, и дальнейшие попытки его использования с целью ингибирования транспортера были прекращены.

В последующие 30 лет было создано три поколения ингибиторов Pgp (McHugh and Callaghan, 2008; Crowley et al., 2010). Первое поколение соединений представляло собой лекарственные средства, применяемые в клинической практике, у которых была установлена способность ингибировать Pgp. Средства следующего поколения являлись химически модифицированными веществами первого поколения. Предполагалось лишить данные препараты специфической активности, сохранив при этом способность ингибировать Pgp. Однако доклинические и клинические исследования первых двух поколений выявили их низкую эффективность и проблемы с токсичностью (Gottesman et al., 2002; McHugh and Callaghan, 2008).

Третье поколение представляет собой ингибиторы, синтезированные *de novo* на основе данных о структуре известных ингибиторов Pgp. Однако их использование часто приводило к увеличению побочных эффектов проводимой фармакотерапии, поскольку Pgp играет важную роль в фармакокинетике широкого спектра веществ - его субстратов.

Поэтому необходим новый подход к ингибированию Pgp, а именно использование препаратов, которые будут селективно ингибировать белок-транспортер, снижать токсичность проводимой терапии и повышать к ней резистентность организма.

На данный момент в России не разработано ни одной отечественной оригинальной молекулы, ингибирующей Pgp. Следует отметить, что в качестве ингибитора белка-транспортера также не было предложено ни одного препарата растительного происхождения.

Актуальность исследования

Pgp экспрессируется во многих органах и тканях и участвует в защите организма от потенциально токсичных ксенобиотиков, их метаболитов и эндогенных веществ. Также данный белок-транспортер участвует в формировании некоторых патологических состояний. Экспрессия Pgp ярко выражена в опухолевых тканях (Cordon-Cardo C. et al., 1990; O'Connor R. et al., 2013), что является одной из причин развития их множественной лекарственной устойчивости (Gottesman M.M., 2002; Liu Z.H. et al., 2010). Выявлено, что белок-транспортер обеспечивает защиту опухоли не только от воздействия химиопрепаратов, но и от облучения ультрафиолетом, дефицита факторов роста и др., что невозможно объяснить только его эффлюксной функцией.

В мета-анализе 31 исследования (1200 пациентов) изучалась экспрессия Pgp в опухолевых клетках рака молочной железы и ее связь с развитием химиорезистентности. Экспрессия гена *mdr1*/Pgp была выявлена в 41% случаев.

При этом риск резистентного к лечению рака молочной железы (любыми препаратами) был в 3,21 раза (95% ДИ 2,28-4,45) выше у пациентов, у которых обнаруживалась экспрессия Pgp по сравнению с негативными пациентами, а при лечении субстратами Pgp – в 2,97 раза (2,08; 4,25) (Troock V.J. et al., 1997).

Эпилепсия – одно из наиболее распространенных хронических заболеваний центральной нервной системы. Фармакотерапия большинства больных с эпилепсией весьма эффективна, однако у трети пациентов развивается резистентность к проводимому лечению. Установлено, что функционирование Pgp в гематоэнцефалическом барьере является одной из причин данного феномена (Braakman H.M., Vaessen M.J., 2011; Cleave S.S., Panda R., Suresh P.K., 2013; Rosillo-de la Torre A. et al., 2014; Chan P.S. et al., 2014).

Вероятным механизмом развития фармакорезистентности эпилепсии является эффлюкс противоэпилептических препаратов из эпилептогенного очага (Chan P.S. et al., 2014). Так, выявлено уменьшение содержания карбамазепина и фенитоина в экстрацеллюлярной жидкости коры крыс с эпилепсией, моделируемой путем нагревания миндалины, которая восстанавливалась после ингибирования Pgp верапамилом (Ma A. et al., 2013). Также обнаружено участие Pgp в деполяризации клеточных мембран и подтверждено возрастание вероятности наличия у клеток опухолей эпилептогенной активности при его гиперэкспрессии в мембранах (Czornyj L., Lazarowski A., 2014).

Ряд исследований посвящен изучению ассоциации полиморфизмов гена *MDR1*, кодирующего Pgp, с риском развития фармакорезистентной эпилепсии. Полученные результаты обобщены в мета-анализах и систематических обзорах.

Ряд работ оценивал возможность использования ингибиторов Pgp для улучшения фармакотерапии эпилепсии. Добавление верапамила (ингибитора Pgp) в дозе 1,5 мг/кг/день в схемы лечения детей с эпилепсией, резистентной к фармакотерапии, приводило к улучшению течения заболевания (Nicita F., Spalice A., Papetti L., 2014).

Таким образом, для повышения эффективности фармакотерапии онкологических заболеваний, а также различных форм эпилепсии целесообразно комбинировать противоопухолевые средства или противоэпилептические препараты с ингибиторами Pgp, что позволит повысить проникновение лекарственных веществ в клетки-мишени.

В качестве ингибиторов белка-транспортера было предложено использовать как уже зарегистрированные лекарственные средства, так и вещества, синтез которых проводился целенаправленно с учетом информации о характеристических химических группировках уже известных ингибиторов. Однако до сих пор ни один из них не доказал свою эффективность и безопасность в серьезных клинических исследованиях.

С химической точки зрения ингибиторы Pgp представляют собой липофильные вещества, содержащие атом азота (чаще третичный) и ароматические, карбо- или гетероциклические структуры (часто алкилариловые эфиры), способные формировать как внутримолекулярные водородные связи, так и служить донором высокоэлектроотрицательных атомов для формирования водородных связей с молекулой транспортера (Seelig A., Landwojtowicz E., 2000).

В данной работе предполагается протестировать ряд растительных полисахаридов и их химические модификаций на принадлежность к ингибиторам Pgp. Выбор данных биологически активных веществ продиктован особенностями химического строения, в первую очередь, так называемых инкрустирующих полисахаридов и водорастворимых пектинов (структурных гетерополисахаридов), часто содержащих аминсахара и полипептидные цепи, а также 20–30% урсонных кислот, которые химически преобразуются в сложноэфирные группировки. Кроме того, химическая структура полисахаридов предполагает возможность введения в их молекулы дополнительных функциональных групп, таких как аминокислоты, а также сложноэфирных группировок. Работы по выделению, очистке и стандартизации указанной группы веществ разработаны и апробированы.

Среди растений-источников полисахаридов были выбраны широко представленные в средней полосе России пижма обыкновенная (*Tanacetum vulgare*, Asteraceae) и донник лекарственный (*Melilotus officinalis*, Fabaceae). Оба растения являются официальными, входят в раздел "Лекарственное растительное сырье" (Государственная фармакопея XIII издания: ФС.2.5.0031.15 "Пижмы обыкновенной цветки", ФС.2.5.0011.15 "Донника трава").

Ни в одном из выше указанных растений полисахариды не рассматриваются как основные биологически активные вещества, несмотря на их высокое содержание и потенциально высокую биологическую активность. Поэтому следует предположить, что они не приведут к возникновению нежелательных лекарственных реакций. Кроме того, принадлежность многих растительных полисахаридов к числу антиоксидантов, возможно, будет снижать токсичность химиопрепаратов.

Цель и задачи проекта

Цель исследования: оценить в опытах *in vitro* и *in vivo* способность полисахаридов пижмы обыкновенной и донника лекарственного, а также их химических модификаций ингибировать активность белка-транспортера гликопротеина-P (Pgp).

Задачи исследования:

1. Изучить в опытах *in vitro* способность полисахаридов пижмы обыкновенной и их химических модификаций ингибировать активность белка-транспортера Pgp в сравнении с известными ингибиторами.
2. Изучить в опытах *in vitro* способность полисахаридов донника лекарственного и их химических модификаций ингибировать активность белка-транспортера Pgp в сравнении с известными ингибиторами.
3. При выявлении ингибирующего действия, тестируемых соединений изучить его механизм: снижение экспрессии Pgp или непосредственное ингибирование активности Pgp.
4. Изучение *in vivo* на кроликах породы Шиншилла ингибирующей активности соединений, проявивших наибольшую активность в опытах *in vitro*.

Научная новизна исследования, заявленного в Проекте

Впервые планируется осуществить поиск эффективных и экономически доступных ингибиторов функционирования Pgp среди препаратов растительного происхождения: полисахаридов и их химических модификаций (аминопроизводные и этерифицированные по гидроксильным группам производные). Причем первоначально будет использоваться

классическая методика анализа принадлежности веществ к модуляторам активности транспортера *in vitro*, на монослое клеток, экспрессирующих Pgp (Caco-2). В случае выявления способности вещества ингибировать транспортер в дальнейшем планируется подтвердить ее в эксперименте *in vivo* на кроликах породы Шиншилла. Необходимость тестирования на организменном уровне определяется возможностью изменения функционирования Pgp под влиянием химических веществ не только за счет их непосредственного действия на белок-транспортер, но и посредством изменения метаболических процессов или гормонального статуса животных. Так, например, было выявлено, что прогестерон повышает функциональную активность белка-транспортера на уровне целостного организма, несмотря на то, что по химической структуре он является ингибитором Pgp и показал свое ингибирующее влияние в опытах *in vitro* (Якушева Е.Н. и др., 2017).

Ожидаемые результаты научного исследования и их научная и прикладная значимость.

В ходе исследования планируется подтвердить адекватность методики анализа функциональной активности Pgp *in vitro* путем применения в качестве маркерного субстрата транспортера фексофенадина, а в качестве ингибитора и индуктора транспортера – верапамила и рифампицина соответственно. В дальнейшем с применением данной методики будет обнаружен эффективный и безопасный ингибитор Pgp среди веществ растительного происхождения, затем планируется подтвердить выявленную способность вещества ингибировать белок-транспортер на кроликах – информативной и показательной *in vivo* модели.

Имеющийся у коллектива научный задел по Проекту (указываются полученные результаты, разработанные программы и методы, экспериментальное оборудование, материалы и информационные ресурсы, имеющиеся в распоряжении коллектива для реализации Проекта)

1. Разработана и апробирована методика определения функциональной активности гликопротеина-P (Pgp) на уровне целостного организма по концентрации в плазме крови его маркерного субстрата – фексофенадина на двух высокоэффективных жидкостных хроматографах «Beckman Coulter» и «Stayer» с ультрафиолетовым детектором.

2. Разработана методика экстракции и очистки растительных полисахаридов из растительного сырья, а также их стандартизация по количеству карбоксильных групп.

3. Налажена методика определения активности Pgp на линии клеток Caco-2 по скорости транспорта фексофенадина в transwell-системе.

4. Изучено влияние тиамазола, тироксина, альфузозина, финастерид, мексидола, афобазола, ноопента, тестостерона, прогестерона, эстрадиола, пероральных контрацептивов «Жанин» и «Линдинет-30», подострой гипоксической гипобарической гипоксии, окклюзии средней мозговой артерии на функционирование активность Pgp. Полученные результаты опубликованы в журналах, индексируемых РИНЦ, Scopus, Web of Science.

5. Закуплено оборудование Biorad для выполнения вестерн-блоттинга.

6. Получены патенты РФ на изобретения «Способ моделирования состояния индукции функциональной активности гликопротеина-P финастеридом в эксперименте» (№2504018), "Способ определения функциональной активности гликопротеина-P" (2 587 780), "Способ получения пектина, обладающего биологической активностью" (№2513559).

Гранты, в выполнении которых принимали участие участники проекта:

а) Грант РФФИ №14-04-97522 о_центра_а «Нейропротекторная роль гликопротеина-P, его экспрессия, функциональная активность и механизмы регуляции на фоне острой

ишемии мозга»; (2014-2015 годы); 400 тыс. рублей в год;

б) Субсидии за счет средств областного бюджета Рязанской области на выполнение работы «Функциональная активность гликопротеина-Р при дисфункции щитовидной железы»; 2012 год, 200 тыс. рублей;

в) Грант РФФИ 16-04-00320 А "Регуляция функционирования гликопротеина-Р половыми гормонами" (2016-2017 годы), 500 тыс руб. в год

г) Грант РФФИ 16-44-620292 р_а "Модулирование активности гликопротеина-Р как новый подход к фармакотерапии острого нарушения мозгового кровообращения" (2016-2017 годы), 500 тыс руб. в год

ПЕРЕЧЕНЬ ОБОРУДОВАНИЯ

Биохимический анализатор «Humalyzer 2000» (Германия, 2003); 2) Анализатор pH и газов крови (Венгрия, 2003); 3) Спектрофотометр «Shimadzu UV 150-02 (Япония, 2000); 4) pH-метр-иономер (анализатор жидкости ксперт-001) (Россия, 2002); 5) Дистиллятор Д-10 (Россия, 2002); 6) Устройство глубокой очистки воды (Россия, 2012); 7) Электронные весы Ohaus (США, 2000); 8) Электронные весы Ohaus (США, 2003); 9) Гомогенизатор D1AX 900 (Германия, 2000); 10) Центрифуга ОПи-8 (Россия, 2000); 11) Хроматограф ВЖЭХ «Стайер» (Россия, 2003); 12) Хроматограф ВЭЖХ «Beckman» (США, 2003); 13) Хроматограф ВЖЭХ «Стайер» (Россия, 2014); 14) Вакуумный испаритель Heidolph (Германия, 2003); 15) Вакуумные насосы Heidolph (Германия, 2003); 16) Встряхиватель для пробирок Вортекс (Германия, 2003); 17) Устройство для дегазации подвижной фазы (Германия, 2003); 18) Устройство для фильтрации подвижной фазы (Германия, 2003); 19) Магнитная мешалка (Германия, 2003); 20) Шейкер S-3.01 (Латвия 2003); 21) Устройства ввода пробы (шприцы Гамильтон) (Германия, 2009); 22) Устройства дозирования жидкости (дозаторы автоматические) (Германия, 2007); 23) Водяная баня (термостат водяной TW-2) (Латвия, 2001); 24) Ультранизкотемпературный медицинский морозильник Sanyo MDF-192 (Япония, 2003); 25) Центрифуга для микрокувет (Латвия, 2002); 26) Центрифуга лаб. наст. ЦЛМН-Р10-01 (Россия, 2005); 27) Центрифуга CM-50. 1000-16000 об/мин для проб. 12x0,5 (Латвия, 2008); 28) Центрифуга CM-6M – (Латвия, 2004); 29) Фотометр микропланшетный автомат (США , 2003); 30) Автоматическая постановка иммуногистохимического окрашивания с системой 2d²-кодирования Intelli PATH BioCARE (США, 2010); 31) Депарафинизация образцов PT Link, Dako (Дания, 2011); 32) Микроскоп ЛОМО «МИКМЕД-6» и «цифровая камера TC-500» (Россия); 33) Система гель-документирования ChemiDoc XRS+ (BioRad); 34) Камера для вертикального электрофореза Mini-PROTEAN Tetra Cell на 4 геля (спейсеры 1,0 мм) (BioRad); 35) Источник питания PowerPac Basic, 100-120/220-240 V (BioRad); 36) Вискозиметр Оствальда; 37) Поляриметр.