

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ
УЧРЕЖДЕНИЕ ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ
«РЯЗАНСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ МЕДИЦИНСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ
ИМЕНИ АКАДЕМИКА И.П. ПАВЛОВА»
МИНИСТЕРСТВА ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

На правах рукописи

Поветко Мария Ивановна

**Влияние этилметилгидроксипиридина сукцината на функциональную
активность транспортера BCRP в экспериментах *in vitro* и *in vivo***

3.3.6. Фармакология, клиническая фармакология

Диссертация
на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Научный руководитель:
доктор медицинских наук, профессор
Якушева Елена Николаевна

Рязань – 2026

ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ.....	4
ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ.....	15
1.1 Характеристика белка резистентности рака молочной железы как члена суперсемейства ABC-транспортёров	15
1.2 Фармакологическое значение белка резистентности рака молочной железы	34
1.3 Выбор тест-систем для исследований белка резистентности рака молочной железы в экспериментах <i>in vitro</i> и <i>in vivo</i>	42
1.4 Выбор оптимальных субстратов и модуляторов активности белка резистентности рака молочной железы для исследований <i>in vitro</i> и <i>in vivo</i>	47
1.5 Фармакологическая характеристика сульфасалазина	50
1.6 Фармакологическая характеристика этилметилгидроксипиридина сукцината.....	53
1.7 Фармакологическая характеристика ривароксабана	57
ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ	60
2.1 Эксперименты <i>in vitro</i>	60
2.1.1. Клеточная линия и условия культивирования	60
2.1.2. Методика проведения транспортных экспериментов	61
2.2 Эксперименты <i>in vivo</i>	64
2.2.1. Животные и условия их содержания.....	66
2.2.2. Дизайн исследования	67
2.3 Методики хроматографического анализа	72
2.3.1. Условия хроматографического анализа сульфасалазина.....	72
2.3.2. Валидация методики хроматографического анализа сульфасалазина	76
2.3.3. Условия хроматографического анализа ривароксабана	79
2.4 Статистическая обработка данных	82

ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ.....	85
3.1 Разработка и валидация методики количественного определения сульфасалазина в транспортной среде и плазме крови методом ВЭЖХ-МС/МС	85
3.2 Влияние ЭМГПС на активность BCRP <i>in vitro</i> в сравнительном аспекте	96
3.3 Разработка <i>in vivo</i> методики анализа ингибирующей активности лекарственных веществ в отношении белка-транспортера BCRP	102
3.4. Влияние ЭМГПС на активность BCRP <i>in vivo</i>	108
3.5 Влияние ЭМГПС на фармакокинетику и фармакодинамику ривароксабана в эксперименте <i>in vivo</i>	112
ГЛАВА 4. ОБСУЖДЕНИЕ ПОЛУЧЕННЫХ РЕЗУЛЬТАТОВ	116
ЗАКЛЮЧЕНИЕ	125
ВЫВОДЫ	126
ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ.....	128
ПЕРСПЕКТИВЫ ДАЛЬНЕЙШЕЙ РАЗРАБОТКИ ТЕМЫ.....	129
СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ	130
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ	132

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность темы исследования

Молекулы различных соединений, в том числе лекарственных веществ, проникают в организм человека и животных при помощи нескольких видов транспорта. Одним из способов их переноса является активный транспорт, проходящий против градиента концентрации за счет гидролиза молекул АТФ при помощи различных транспортных систем, связанных с белками-переносчиками. Исследователи выделяют несколько групп таких белков, самой обширной из которых является суперсемейство АТФ-связывающих кассетных (ATP-binding cassette) транспортеров (ABC-транспортеров). К нему относятся более ста белков, обнаруженных у многих видов живых организмов, включая человека. Геном человека содержит 48 генов, которые кодируют ABC-транспортеры, разделенные на 7 подсемейств на основании гомологии аминокислот и доменной организации [73, 103]. Одним из представителей данного суперсемейства является белок-переносчик BCRP.

BCRP (human breast cancer resistance protein – белок резистентности рака молочной железы человека) (ABCG2, MXR; ABCP) – эффлюксный белок-транспортёр, участвующий в различных физиологических, патофизиологических и фармакологических процессах. Подобно другим белкам ABC-семейства он имеет четкую структуру, является гомодимером, содержит в составе 655 аминокислот, фосфорилирован, гликозилирован, имеет две дисульфидные связи [87, 145, 163, 253, 267]. Первоначально BCRP был обнаружен в 1998 г. в клеточной линии рака молочной железы человека, устойчивой к химиотерапии доксорубицином [47, 69, 71]. В настоящее время BCRP признан транспортером ксенобиотиков, который играет важную роль в развитии множественной лекарственной устойчивости злокачественных клеток [71, 143, 240, 270].

BCRP экспрессируется во множестве прогениторных/стволовых клеток во всех основных тканях организма. В нормальных тканях транспортер функционирует как защитный механизм, удаляющий токсины и ксенобиотики, с экспрессией в тонком и толстом кишечнике, молочных железах, почках, желчных канальцах, плацентарном и гематоэнцефалическом барьерах, облегчая выведение и ограничивая поглощение потенциально токсичных субстратных молекул. Исходя из данных о локализации белка, можно сделать вывод, что он играет важную роль в абсорбции, распределении и выведении многих лекарственных веществ [237].

Известно, что BCRP способен транспортировать цитостатики (митоксантрон, флавопиридол, метотрексат, 7-гидроксиметотрексат, диглутамат метотрексата, топотекан, иматиниб) [114, 202, 289]. Он также переносит фолат и стероиды: эстрадиол, холестерин, прогестерон, тестостерон, тамоксифен [249, 274]. Кроме этого, к субстратам BCRP относят бисантрон, ривароксабан, аликсабан, долутегравир, розувастатин [133, 147, 236], камптотецины [247], сульфасалазин [101, 112] и другие препараты из разных фармакологических групп.

Вещества, обладающие ингибирующей или индуцирующей активностью в отношении белков-транспортеров, могут опосредованно влиять на концентрацию и биодоступность лекарственных веществ. К ингибиторам BCRP относят блокаторы кальциевых каналов (никардипин, нифедипин, нимодипин) [71], противогрибковые средства (кетоконазол, микафунгин), иммунодепрессанты (циклоспорин А) [265], ингибиторы протеазы ВИЧ (ритонавир, саквинавир) [134], алкалоиды (резерпин) [159, 196], ряд флавоноидов [120, 158, 260] и многие другие.

Проводятся исследования по выявлению индуцирующего эффекта у различных соединений. Показано, что к возможным индукторам транспортера относятся холестерин, прогестерон [249], довитиниб [160], венлафаксин [156], рифамицин [95] и ряд других препаратов.

Актуальной проблемой современной фармакологии является изучение межлекарственных взаимодействий на уровне белков-транспортеров, в том числе BCRP как *in vitro*, так и *in vivo*. Анализ функциональной активности BCRP выполняется по оценке концентрации его субстрата в транспортной среде или

крови на фоне тестируемого препарата. Выбор субстрата для исследования особенно важен в экспериментах *in vivo*. Одним из наиболее подходящих соединений для оценки ингибирующей активности лекарственных веществ *in vivo*, является сульфасалазин, так как он менее токсичен для животных и не имеет выраженных системных эффектов, способных повлиять на результаты исследования в сравнении с группой цитостатиков – основных и широко применяющихся *in vitro* субстратов BCRP.

Изучение субстратной специфичности, ингибирующей или индуцирующей активности лекарственных препаратов по отношению к белку-транспортеру BCRP поможет прогнозировать и предотвращать нежелательные межлекарственные взаимодействия, а также найти способы повышения терапевтической эффективности лекарственных препаратов. Следовательно, данное направление исследований является актуальным для фармакологии, клинической фармакологии и имеет как теоретическую, так и клиническую направленность.

Этилметилгидроксипридина сукцинат (ЭМГПС) – отечественный антигипоксанта и антиоксиданта, который широко используется в клинической практике для лечения неврологических и сердечно-сосудистых заболеваний, сопровождающихся гипоксическим синдромом и активацией перекисного окисления липидов. Эффективность препарата повышается при совместном использовании со средствами патогенетической терапии заболеваний, что расширило возможности его комбинированного применения. Однако, все отечественные лекарственные препараты не изучены с точки зрения потенциальных фармакокинетических межлекарственных взаимодействий на уровне белков-транспортеров. Поэтому актуальной задачей является исследование влияния ЭМГПС на активность BCRP в экспериментах *in vitro* и *in vivo* для детализации свойств препарата и прогнозирования нежелательных межлекарственных взаимодействий.

Степень разработанности проблемы

Исследования по оценке влияния лекарственных веществ на функционирование белка-транспортера BCRP проводятся на разных линиях клеток *in vitro*, а также в экспериментах *in vivo* [92, 198, 224, 237, 285].

С 2020 года на кафедре фармакологии Рязанского государственного медицинского университета начали выполняться исследования по разработке методики тестирования лекарственных веществ на принадлежность к субстратам и ингибиторам BCRP на линии клеток Сасо-2 с использованием в качестве субстратов цитостатиков – митоксантрона и метотрексата. Были получены предварительные данные об ингибирующей активности ЭМГПС *in vitro* в концентрации 100 мкМ без ее количественной, сравнительной и клинической оценки [23, 35].

Целесообразно продолжить изучение влияния ЭМГПС на активность белка-транспортера BCRP не только *in vitro*, но и *in vivo* с использованием в качестве субстрата сульфасалазина – специфического для данного транспортера и более безопасного вещества по сравнению с цитостатиками и оценить клиническую значимость полученных результатов.

Цель исследования

Изучить влияние ЭМГПС на активность белка-транспортера BCRP в экспериментах *in vitro* и *in vivo* с целью прогнозирования фармакокинетических межлекарственных взаимодействий.

Задачи исследования

1. Разработать и валидировать методику количественного определения сульфасалазина в транспортной среде и плазме крови кроликов методом ВЭЖХ-МС/МС.

2. Изучить влияние ЭМГПС на активность BCRP *in vitro* в сравнительном аспекте.
3. Разработать *in vivo* методику анализа ингибирующей активности лекарственных веществ в отношении белка-транспортера BCRP.
4. Изучить влияние ЭМГПС на активность BCRP *in vivo*.
5. Проанализировать влияние ЭМГПС на фармакокинетику и фармакодинамику ривароксабана в эксперименте *in vivo*.

Научная новизна

1. Разработана и валидирована методика количественного определения сульфасалазина методом ВЭЖХ-МС/МС в транспортной среде и плазме крови кроликов, отличающаяся высокой чувствительностью, селективностью и специфичностью.

2. В экспериментах *in vitro* на клетках линии Caco-2 установлена ингибирующая активность ЭМГПС в отношении BCRP с IC_{50} 37,5 мкМ, которая характеризует слабый эффект в сравнении с классическим ингибитором BCRP кверцетином (IC_{50} – 0,2 мкМ); установлено, что системное ингибирование BCRP ЭМГПС не имеет клинической значимости, однако ингибирование транспортера в желудочно-кишечном тракте может приводить к фармакокинетическим межлекарственным взаимодействиям на этапе всасывания.

3. Разработана *in vivo* методика анализа ингибирующей активности тестируемых веществ в отношении BCRP с использованием в качестве тест-системы кроликов самцов породы Советская Шиншилла, а в качестве субстрата – сульфасалазина в дозе 125 мг/кг массы. Показано, что предпочтительно курсовое в течение 7 дней, а не однократное внутрижелудочное введение тест-вещества для более существенной динамики активности белка-транспортера.

4. С помощью разработанной методики в экспериментах *in vivo* не выявлено достоверного изменения фармакокинетических параметров сульфасалазина, определяющих его концентрацию в крови на фоне однократного введения ЭМГПС

и выраженную тенденцию к увеличению $C_{\max}$ при его курсовом применении, что свидетельствует о возможном ингибировании BCRP в желудочно-кишечном тракте.

5. В эксперименте *in vivo* установлено, что ЭМГПС при курсовом введении не влияет на фармакокинетику и фармакодинамику ривароксабана, что подтверждает их безопасное совместное применение.

Теоретическая и практическая значимость

В ходе исследования были получены дополнительные сведения, позволяющие прогнозировать фармакокинетические межлекарственные взаимодействия ЭМГПС на уровне белка-транспортера BCRP. Изучено влияние ЭМГПС на активность BCRP *in vitro* в широком диапазоне концентраций (0,1 мкМ – 500 мкМ), установлено его ингибирующее действие на BCRP, выполнена количественная оценка ингибирующей активности препарата с расчетом полуингибирующей концентрации в сравнении с классическим препаратом – кверцетином и установлена клиническая значимость данного факта. Для ЭМГПС показана клиническая значимость ингибирования BCRP на уровне желудочно-кишечного тракта, что может оказывать влияние на всасывание субстратов белка-транспортера, способствуя его увеличению. Это предположение было проверено в экспериментах *in vivo* с помощью разработанной методики анализа ингибирующей активности лекарственных веществ в отношении изучаемого белка-транспортера на кроликах самцах породы Советская Шиншилла. Показано, что фармакокинетика субстрата BCRP сульфасалазина не меняется при однократном введении ЭМГПС, при его курсовом применении в течение 7 дней определяется выраженная тенденция к увеличению $C_{\max}$, что характеризует возможность ингибирования BCRP в желудочно-кишечном тракте и увеличение всасывания сульфасалазина. Фармакокинетика и фармакодинамика субстрата BCRP ривароксабана значимо не меняется на фоне ЭМГПС, что демонстрирует безопасное совместное использование препаратов. Представленную методику и дизайн эксперимента

можно использовать в дальнейших доклинических и клинических исследованиях по изучению фармакокинетических межлекарственных взаимодействий на уровне BCRP.

Методология и методы исследования

Выполнение транспортных экспериментов *in vitro* проводили на трансвелл-системах с использованием клеточной линии Caco-2 (иммortalизованные клетки колоректальной аденокарциномы человека). Влияние ЭМГПС на активность BCRP изучали в сравнении с кверцетином – классическим ингибитором транспортера. В качестве субстрата BCRP использовали сульфасалазин.

Эксперименты *in vivo* выполняли на половозрелых самцах кроликов породы Советская Шиншилла. Выбор объекта исследования был сделан по оценке уровня белка-транспортера BCRP у 3-х видов лабораторных животных, который определяли в предварительном исследовании методом вестерн-блот. Эксперименты *in vivo* проводили по оригинальной разработанной методике, заключающейся в оценке ингибирующей активности тестируемых веществ по изменению фармакокинетических параметров субстрата транспортера – сульфасалазина. Дополнительно в эксперименте *in vivo* анализировали влияние ЭМГПС на фармакокинетические и фармакодинамические параметры субстрата BCRP – ривароксабана.

Концентрацию сульфасалазина в транспортной среде и плазме крови и концентрацию ривароксабана в плазме крови кроликов определяли методом ВЭЖХ-МС/МС. Значение протромбинового времени определяли при помощи автоматического коагулометра.

Полученные результаты анализировали с помощью программ офисного пакета «Microsoft Office XP» и программы GraphPad Prism 10.0 (GraphPad Software, Inc., США) надлежащими методами статистического анализа, соответствующими дизайну исследования и характеру распределения данных.

Положения, выносимые на защиту

1. Разработана и валидирована методика количественного анализа сульфасалазина методом ВЭЖХ-МС/МС в транспортной среде (аналитический диапазон 5 – 5000 нг/мл целевого вещества) и в плазме крови кроликов (аналитический диапазон 50 – 20000 нг/мл целевого вещества).

2. В эксперименте *in vitro* на клетках линии Сасо-2 доказана невысокая ингибирующая активность ЭМГПС в отношении BCRP в диапазоне концентраций 50 мкМ – 500 мкМ с IC_{50} – 37,5 мкМ в сравнении с классическим ингибитором транспортера кверцетином (IC_{50} – 0,2 мкМ). Расчет клинической значимости данного факта продемонстрировал отсутствие системного ингибирования BCRP и возможное подавление активности белка-транспортера в желудочно-кишечном тракте.

3. Разработана *in vivo* методика анализа ингибирующей активности лекарственных веществ в отношении белка-транспортера BCRP. С ее помощью показана возможность ингибирующего влияния курсового 7-дневного внутрижелудочного введения ЭМГПС на активность BCRP на уровне желудочно-кишечного тракта. Установлено, что фармакокинетика и фармакодинамика субстрата BCRP ривароксабана существенно не меняется на фоне курсового применения ЭМГПС, что подтверждает безопасность совместного использования препаратов.

Степень достоверности и апробация результатов

Достоверность полученных результатов обеспечена достаточным объемом экспериментальных данных, полученных в исследованиях *in vitro* и *in vivo*, использованием современных, валидных методов. Исследование выполнено на сертифицированном и поверенном оборудовании с последующей адекватной статистической обработкой данных, их систематизацией и анализом в соответствии

с актуальными международными и отечественными рекомендациями по изучению фармакокинетики и межлекарственных взаимодействий.

Основные положения диссертации представлены, доложены, обсуждены и опубликованы в материалах конференций: 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), X Всероссийской научной конференции «Инновационные технологии в медицине: взгляд молодого специалиста», посвященной 175-летию со дня рождения академика И.П. Павлова и 120-летию со дня получения им Нобелевской премии (Рязань, 2025), I Пленума фармакологов России, посвященного 160-летию со дня рождения академика Н.П. Кравкова «Традиции и перспективы развития российской фармакологии» (Рязань, 2025), IV конференции Московского общества медицинских генетиков «Преимственность в онкологии: от диагностики к лечению» (Рязань, 2025), XI Всероссийской с международным участием научной конференции молодых специалистов, аспирантов, ординаторов «Инновационные технологии в медицине: взгляд молодого специалиста», посвященной 75-летию университета на Рязанской земле (Рязань, 2025), IV Международной научно-практической конференции студентов и молодых ученых «Современные достижения фармацевтических наук», посвященной 60-летию фармацевтического факультета Рязанского государственного медицинского университета (Рязань, 2026).

Внедрение результатов исследования в практику

Основные результаты диссертационной работы используются в учебном процессе на кафедре фармакологии при обучении студентов и аспирантов, а также внедрены в деятельность междисциплинарного научно-образовательного лабораторного центра ФГБОУ ВО РязГМУ Минздрава России.

Личный вклад автора

Автор самостоятельно подготовил обзор литературы по теме диссертационной работы; выполнил транспортные эксперименты *in vitro*, эксперименты на животных *in vivo*; участвовал в разработке и валидации методик количественного анализа и выполнении ВЭЖХ-МС/МС анализа, статистической обработке и трактовке результатов; подготовил публикации по материалам исследования. В целом личный вклад автора в исследование превышает 80%.

Сведения о публикациях по теме диссертации

По материалам диссертационного исследования опубликовано 13 печатных работ, полно отражающих основные положения диссертации, в том числе 5 статей в рецензируемых научных журналах, рекомендованных ВАК при Минобрнауки России, из которых 3 статьи в журналах, входящих в международные цитатно-аналитические базы данных Scopus и Web of Science; 2 статьи в иных изданиях и 6 тезисов докладов в материалах всероссийских и международных конференций.

Структура и объем диссертации

Диссертационная работа изложена на 170 страницах и включает в себя следующие разделы: введение, обзор литературы, материалы и методы исследования, результаты исследования, обсуждение полученных результатов, заключение, выводы, практические рекомендации, перспективы дальнейшей разработки темы, список сокращений, список литературы. Диссертация иллюстрирована 26 рисунками и 23 таблицами. Список литературы представлен 299 источниками, из них 44 отечественных и 255 зарубежных авторов.

Благодарности

Автор выражает глубокую признательность д.м.н., профессору Якушевой Е.Н., д.м.н., доценту Щулькину А.В., д.б.н., доценту Черных И.В., д.м.н., доценту Абаленихиной Ю.В., к.б.н., доценту Мыльникову П.Ю. и к.б.н., ст.преп. Горбуновой Ю.С. за всестороннюю помощь на всех этапах исследования, при подготовке и публикации печатных работ.

ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1 Характеристика белка резистентности рака молочной железы как члена суперсемейства ABC-транспортёров

Молекулы различных соединений, в том числе лекарственных веществ, проникают и выводятся из организма человека и животных при помощи нескольких видов транспорта. Одним из механизмов их переноса является активный транспорт, происходящий против градиента концентрации при помощи различных транспортных систем – белков-переносчиков. Исследователи выделяют транспортеры, способствующие переносу соединений в клетки (инфлюксные) и из внутриклеточного во внеклеточное пространство или биологические жидкости (эффлюксные).

Самой обширной группой эффлюксных транспортеров является суперсемейство АТФ-связывающих кассетных транспортеров (*англ: ATP-binding cassette transporters*) (ABC-транспортеры). К нему относятся более трехсот белков, обнаруженных у многих живых организмов, включая человека [290].

Большинство представителей ABC-семейства являются интегральными мембранными белками с трансмембранными участками и цитоплазматическими АТФ-связывающими доменами [73, 135].

Данное суперсемейство выполняет несколько функций в организме, основной из которых является выведение эндогенных и экзогенных веществ, включая ксенобиотические соединения, во внеклеточное пространство. Следовательно, основной функцией данных белков можно считать защитную. Для осуществления транспорта все представители ABC-транспортеров используют энергию, выделяющуюся при гидролизе молекулы АТФ [280].

Геном человека содержит 48 генов, которые кодируют ABC-суперсемейство, среди которого дополнительно выделяют 7 подсемейств (ABCA–ABCG) на основании гомологии аминокислот и доменной организации (Таблица 1) [60, 102].

Таблица 1 – Перечень генов суперсемейства ABC-транспортеров у человека (Цит. по: Dean M., 2001 [103]; с дополнениями: [31, 49, 50, 59, 75, 102, 190, 205, 213, 284, 293, 296])

Обозначение гена	Другие варианты наименований	Основная локализация	Функция
ABCA1	ABC1	Многие ткани организма	Эффлюкс холестерина
ABCA2	ABC2	Многие ткани организма	Лекарственная устойчивость
ABCA3	ABC3, ABCC	Многие ткани организма	Множественная лекарственная устойчивость
ABCA4	ABCR	Стержневые фоторецепторы	Эффлюкс N-ретинилидиен-фосфатидилэтаноламина
ABCA5		Мышцы, сердце, яички	Эффлюкс холестерина, транспорт липидов
ABCA6		Многие ткани организма	Множественная лекарственная устойчивость
ABCA7		Селезёнка, тимус, костный мозг	Эффлюкс холестерина
ABCA8		Многие ткани организма	Транспорт некоторых липофильных препаратов
ABCA9		Многие ткани организма	Может играть роль в дифференцировке моноцитов и гомеостазе липидов макрофагов
ABCA10		Кишечник, мышцы, сердце	Может играть роль в гомеостазе липидов макрофагов
ABCA12		Кератиноциты зернистого слоя	Транспорт липидов и ферментов в клетках эпидермиса
ABCA13		Низкий уровень во всех тканях	Транспорт холестерина
ABCB1	PGY1, MDR1, P-gp	Многие ткани организма	Защита от ксенобиотиков, лекарственная устойчивость
ABCB2	TAP1	Многие ткани организма	Транспорт пептидов
ABCB3	TAP2	Многие ткани организма	Транспорт пептидов
ABCB4	PGY3	Печень	Транспорт фосфатидилхолина

ABCB5		Многие ткани организма	Меланогенез
ABCB6	MTABC3	Митохондрии	Транспорт железа
ABCB7	ABC7	Митохондрии	Транспорт кластеров Fe/S
ABCB8	MABC1	Митохондрии	Внутриклеточная транспортировка пептидов через мембраны митохондрий
ABCB9		Многие ткани организма	Транслокация пептидов из цитозоля в просвет лизосом
ABCB10	MTABC2	Митохондрии	Эффлюкс пептидов, образующихся в результате протеолиза белков внутренней мембраны
ABCB11	SP-GP	Печень	Транспорт солей желчных кислот
ABCC1	MRP1	Многие ткани организма	Защита от ксенобиотиков, лекарственная устойчивость
ABCC2	MRP2	Многие ткани организма	Транспорт органических анионов
ABCC3	MRP3	Многие ткани организма	Лекарственная устойчивость
ABCC4	MRP4	Многие ткани организма	Транспорт нуклеозидов
ABCC5	MRP5	Многие ткани организма	Транспорт нуклеозидов
ABCC6	MRP6	Многие ткани организма	Органический анионный транспорт, лекарственная устойчивость
ABCC7	CFTR	Экзокринные железы	Хлоридный ионный канал
ABCC8	SUR	Поджелудочная железа	Рецептор сульфонилмочевины
ABCC9	SUR2	Сердце, мышцы	Рецептор сульфонилмочевины; Множественная лекарственная устойчивость
ABCC10	MRP7	Низкий уровень во всех тканях	Множественная лекарственная устойчивость

ABCC11		Низкий уровень во всех тканях	Лекарственная устойчивость при раке молочной железы
ABCC12		Низкий уровень во всех тканях	Множественная лекарственная устойчивость
ABCD1	ALD	Пероксисомы	Транспорт очень длинноцепочечных жирных кислот (VLCFA)
ABCD2	ALDL1, ALDR	Пероксисомы	Транспорт очень длинноцепочечных жирных кислот (VLCFA)
ABCD3	PXMP1, PMP70	Пероксисомы	Транспорт жирных кислот и/или жирных ацилкоферментов в пероксисому
ABCD4	PMP69, P70R	Лизосомы	Транспорт витамина В ₁₂ из лизосом в цитозоль
ABCE1	OABP, RNS41	Многие ткани организма	Белок, связывающий олигоаденилат
ABCF1	ABC50	Многие ткани организма	Регуляция цитокинов, множественная лекарственная устойчивость
ABCF2		Многие ткани организма	Подавление опухолей в метастатических участках и в эндокринном пути при раке молочной железы/лекарственной резистентности
ABCF3		Многие ткани организма	Функция не ясна, возможно участие в противовирусном эффекте в отношении флавивирусов
ABCG1	ABC8, WHITE	Многие ткани организма	Транспорт холестерина
ABCG2	ABCP, MXR, BCRP	Многие ткани организма	Защита от ксенобиотиков, лекарственная устойчивость

ABCG4	WHITE2	Печень, макрофаги, глаза, мозг, селезенка	Транспорт холестерина
ABCG5	WHITE3	Многие ткани организма	Транспорт стеролов
ABCG8		Печень, кишечник, яички	Транспорт стеролов

В подсемействе G у человека выделяют лишь 5 представителей: ABCG1, ABCG2, ABCG4, ABCG5, ABCG8 [34].

В качестве ключевых белков-транспортеров, участвующих в фармакокинетике лекарственных препаратов в организме человека, международными агентствами были признаны гликопротеин Р (Р-gr; ABCB1), белок множественной лекарственной устойчивости 1 (MRP1; ABCC1), белок резистентности рака молочной железы человека (BCRP; ABCG2) [245, 255].

BCRP (*human breast cancer resistance protein* – белок резистентности рака молочной железы человека) (ABCG2, MXR; ABCP) – эффлюксный АТФ-зависимый белок-транспортёр, участвующий в различных физиологических и фармакологических процессах организма [53, 141]. Впервые данный белок был обнаружен в 1998 году в клетках рака молочной железы MCF-7/AdrVp, сформировавших лекарственную устойчивость к противоопухолевой терапии доксорубицином [47].

Несмотря на то, что BCRP был открыт позднее, чем другие эффлюксные транспортеры суперсемейства ABC, проводимые исследования подтверждают значимость этого белка для фармакокинетики и биодоступности ряда лекарственных препаратов, являющихся его субстратами, а также его значительное влияние на межлекарственные взаимодействия [119, 179].

Структура белка

BCRP является мембранным белком-полутранспортером, состоящим из 655 аминокислотных остатков, массой 72 кДа. Его структура представляет собой один

нуклеотидсвязывающий домен (*англ.: nucleotide binding domain, NBD*) (остатки ~1–396)) и один трансмембранный домен (*англ.: transmembrane domain, TMD*) (остатки ~397–655), состоящий из 6 трансмембранных сегментов (*англ.: transmembrane, TM*)) или α -спиралей. Оба домена объединены в одну полипептидную цепь. Важнейшим интерфейсом между TMD и NBD является фенилаланин (*англ.: phenylalanine, Phe*¹⁴²), взаимодействующий соединительной спиралью с аминокислотами, а также лизин (*англ.: lysine, Lys*³⁸²) и аргинин (*англ.: arginine, Arg*³⁸³) [1, 53, 87, 163, 253, 267].

Как и другие представители подсемейства G, BCRP имеет особенность, отличающую его от других ABC-транспортеров. А именно в структуре данного белка есть характерное N-концевое положение для NBD по отношению к TMD-домену [251].

Минимальной функциональной единицей белка BCRP, в которой он находится в плазматической мембране клеток, является гомодимер с молекулярной массой ~144 кДа, связанный с дисульфидными остатками цистеина (*англ.: cysteine, Cys*⁶⁰³). Однако основной олигомерной формой белка является гомотетрамер с возможностью олигомеризации более высокого порядка вплоть до гомодекамеров, содержащих 12 субъединиц [87]. Значительное влияние на локализацию белка в мембране и его транспортную активность оказывает внутримолекулярная дисульфидная связь Cys⁵⁹² – Cys⁶⁰⁸, так как она отвечает за его стабильность и правильное сворачивание.

Изучение топологических моделей BCRP показало, что его трансмембранные спирали и внеклеточные петли, в сравнении с ABCB1 (гликопротеин P; P-gp) более короткие. За исключением EL3, петли между TM5 и TM6. Эта особенность приводит к уменьшению расстояния между NBD и мембраной, делая BCRP похожим на более компактные бактериальные ABC-импортёры [177, 299].

Кроме того, в данном участке находится единственный известный сайт N-гликозилирования в положении 596 (аспарагин, *англ.: asparagine, Asn*⁵⁹⁶), 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 дистальных отделов ТМ. Также известно о ковалентно связанных протомерах в гомодимере через цистеины в положении 603 [105, 144]. Перечисленные особенности являются основными отличительными характеристиками BCRP [221].

При помощи криоэлектронной микроскопии (крио-ЭМ) было показано, что белок-транспортер BCRP в организме человека в норме дополнительно может быть симметрично соединен с двумя антигенсвязывающими фрагментами 5D3 (*англ.*: 5D3-Fab). Оба фрагмента являются внеклеточными структурами белка (Рисунок 1).

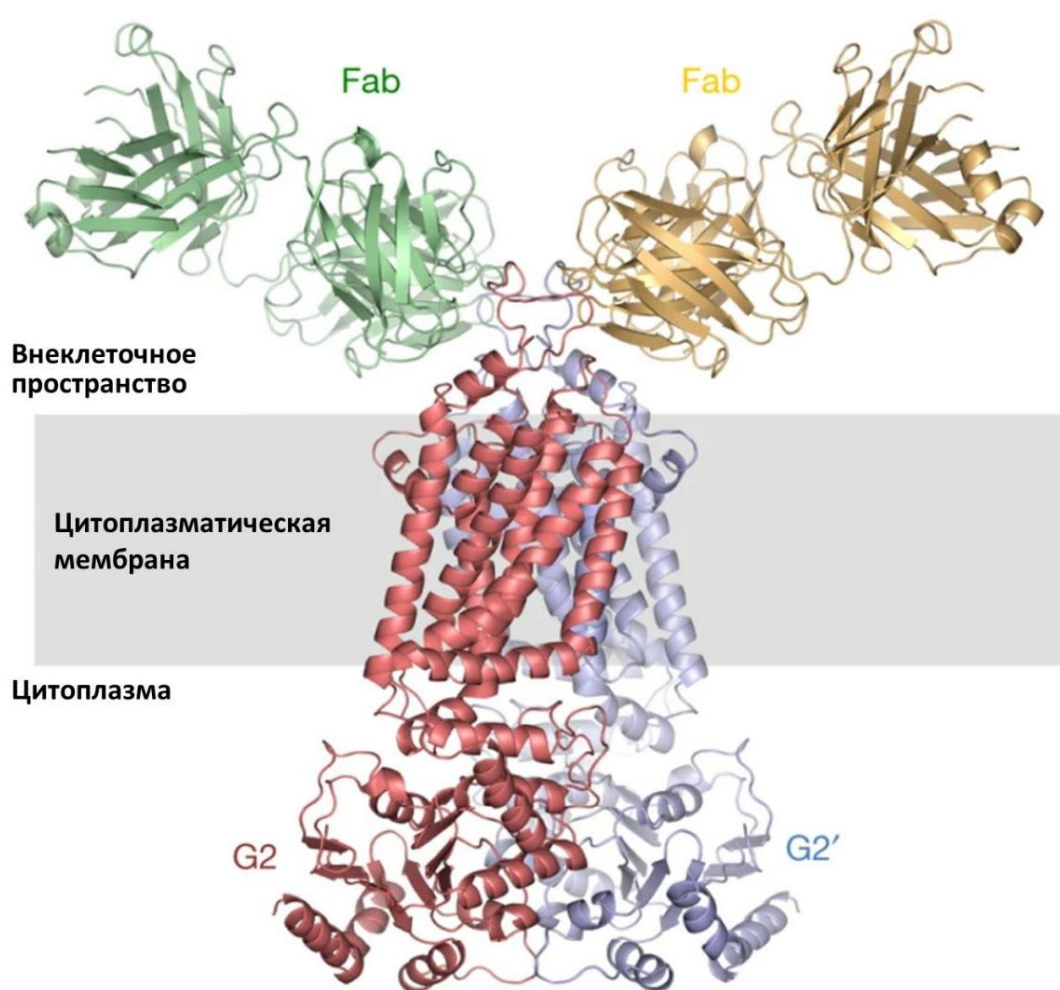


Рисунок 1— Структура человеческого белка-транспортера BCRP дикого типа в комплексе с двумя антигенсвязывающими фрагментами 5D3 (5D3-Fab), полученная методом криоэлектронной микроскопии (крио-ЭМ). Ленточная диаграмма. (Цит. по: Manolaridis I., 2018; Jackson S.M., 2018) [97, 250]

Примечание – Обозначенные белковые субъединицы G2' относятся ко второму мономеру ABCG2

Каждый 5D3-Fab взаимодействует с внеклеточными петлями обоих мономеров ABCG2. Большинство контактов образуется с помощью самой длинной петли белка EL3. Данные фрагменты способны снижать транспортную активность ABCG2 [253].

Транспортный механизм

Механизм переноса субстратов и действия модуляторов активности белка тесно связаны с особенностями его структуры и остаются активно изучаемым направлением в настоящее время. Большинство исследователей сходятся во мнениях о ключевом влиянии конформационных изменений TMDS в ABCG2, зависящих от активности АТФ-фазы, а также АТФ-зависимого образования и разделения «сэндвич-димера» NBD.

При отсутствии АТФ белок принимает конформацию, обращенную внутрь (IF, состояние I, Рисунок 2), с трансмембранной полостью, открытой к цитозольной стороне клеточной мембраны, и четырьмя центральными трансмембранными спиралями (TM2, TM5, TM2', TM5'), образующими большой гидрофобный щелевидный карман с основным участком связывания для субстратов (полость 1).

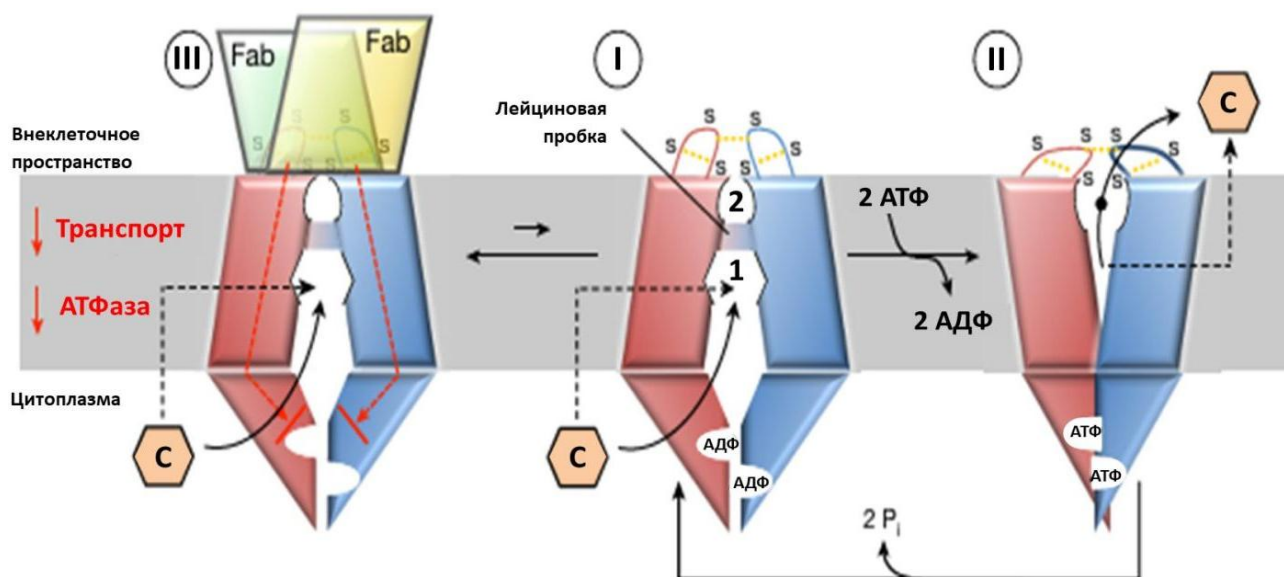


Рисунок 2 – Механизм транспорта BCRP и влияние 5D3-Fab на транспортную активность белка (Цит. по: Manolaridis I., 2018; Jackson S.M., 2018) [97, 250]

Примечание – Мономеры BCRP окрашены красным и синим цветом, цистеины, образующие дисульфидные связи (желтые пунктирные линии), обозначены буквой «s»

Данный участок обладает преимущественно липофильными свойствами. Указанные TM2 и TM5' также являются образующими сегментами для полости 2, занимающей значительную часть билипидной мембраны до остатков лейцина (англ.: *leucine*, Leu⁵⁵⁴ и Leu^{554'}). Остатки лейцина служат для образования лейциновой пробки, разделяющей полость 1 и 2.

Транспорт субстрата (оранжевый шестиугольник, обозначенный буквой «С»), стимулируемый образованием молекул АТФ и их гидролизом, происходит между состояниями I и II. Состояние II по-другому называют состоянием, обращенным наружу (OF, Рисунок 2). Субстрат попадает в полость 1 из цитоплазмы или из внутреннего слоя мембраны, но не может проникнуть в полость 2 из-за лейциновой пробки. Подобное связывание способствует стимуляции активности АТФазы. Далее происходит связывание молекул АТФ с NBD. Закрытие его интерфейса способствует конформационному изменению: состояние I переходит в направленное наружу состояние II. Субстрат при этом выталкивается в меньшую по размерам и менее гидрофобную полость 2, позволяя высвободить вещество во внеклеточное пространство, где далее может произойти его сольватация. Вместе с соединением выделяются и продукты гидролиза – АДФ и неорганический фосфат (Pi) [176]. Высвобождение неорганического фосфата сопровождается обратимым переходом BCRP из состояния II в состояние I. В состоянии III два фрагмента 5D3-Fab (закрашены зеленым и желтым цветами и обозначены как Fab) связываются с внешней стороны ABCG2, «фиксируя» структурные мономеры белка и препятствуя образованию конформации, обращенной наружу (состояние II), которая необходима для активного транспорта соединений белком. Это приводит к ингибированию транспортной функции и активности АТФ-азы (указано красными стрелками слева). Ингибирование транспорта происходит путем фиксации мономеров ABCG2 друг относительно друга, тогда как ингибирование гидролиза АТФ носит аллостерический характер (показано пунктирными красными стрелками) [253].

Связывание веществ, обладающих ингибирующей активностью, с полостью 2 также может приводить к снижению транспортной функции BCRP за счет снижения активности АТФазы [71].

Локализация и функции

Локализация BCRP была обнаружена во многих тканях и органах человеческого организма [1]. Этот транспортер физиологически экспрессируется в различных тканевых структурах, образующих гистогематические барьеры: плацентарной синцитиотрофобластной плазматической мембране (Рисунок 3, А) [45], эндотелиальных клетках капилляров головного мозга, в эпителиальных клетках слизистой оболочки толстого и тонкого кишечника (Рисунок 3, D и C соответственно) [256], интерстициальных клетках яичек [47], эпителии конъюнктивы и пигментном эпителии сетчатки [68]. Для гематотестикулярного барьера функциональная значимость белка сомнительна, так как отмечается низкий уровень его экспрессии в этой ткани [174].

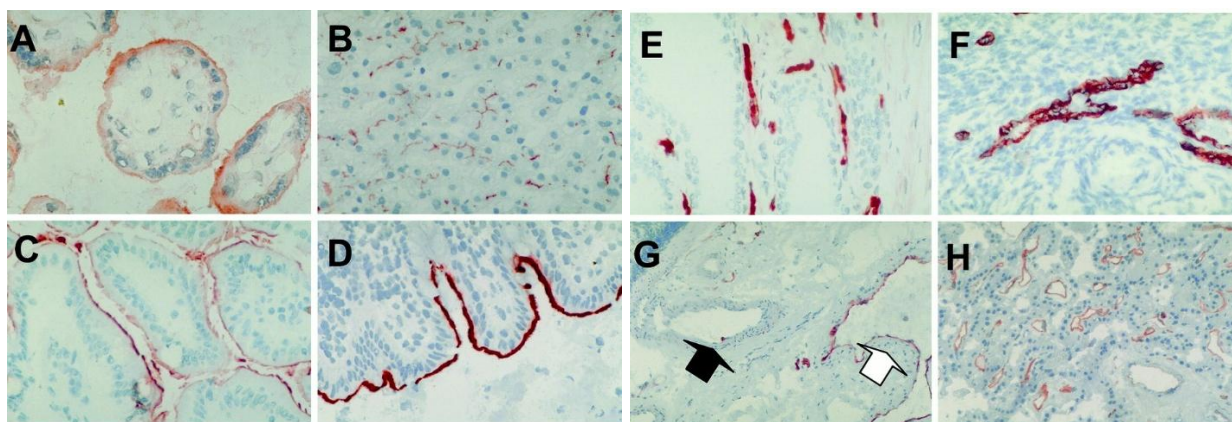


Рисунок 3 – BCRP-окрашивание криосекций человеческой ткани с использованием моноклональных антител VXP-21 (D и H) или VXP-34 (A–C, E–G): А – плацента (×100); В – печень (×100); С – тонкий кишечник (×100); D – толстый кишечник (×100); Е – простата (×100); F – яичник (×100); G – вена (белая стрелка) и артерия (чёрная стрелка) в подслизистой оболочке желудка (×33); H – сосудистое сплетение (×100) (Цит. по: Maliepaard M., 2001) [256]

Кроме того, BCRP был обнаружен в желчной каналикулярной мембране гепатоцитов (Рисунок 3, В) и желчных канальцах [244] Также имеются данные о расположении транспортера в просветной мембране эпителиальных клеток желчного пузыря [57, 257] и эндотелии кровеносных сосудов печени человека [80].

Отсюда можно сделать вывод о важном вкладе белка-транспортера BCRP в процессы метаболизма и элиминации через канальцевую или синусоидальную мембрану гепатоцитов в желчь или системный кровоток, соответственно [210].

Иммуногистохимические исследования подтвердили наличие BCRP в сальных железах, переходном эпителии мочевого пузыря, кортикальных канальцах почек, сетчатом слое надпочечников, эпителии предстательной железы (Рисунок 3, E), островковых и ацинарных клетках поджелудочной железы, в различных прогениторных и стволовых клетках, включая плюрипотентные стволовые клетки [175, 244, 272].

Обнаружен некоторый уровень экспрессии BCRP/ABCG2 в альвеолярных пневмоцитах легких. Роль белка в этой ткани недостаточно изучена [193].

Высокие уровни экспрессии BCRP наблюдаются в эндоцервикальных клетках матки, плоском эпителии шейки матки и яичниках (Рисунок 3, F) [256, 262].

Выявлено расположение белка-транспортера в молочных [244] и в лактирующих молочных железах, где он способствует ограничению проникновения ксенобиотиков в грудное молоко [46, 91, 269, 270].

В меньших количествах транскрипты BCRP были обнаружены в сердце, скелетных мышцах, селезенке, тимусе и лейкоцитах периферической крови [47].

Единичные локусы встречаются при окрашивании эндотелиальных сосудистых клеток в подслизистой оболочке желудка и сосудистом сплетении головного мозга (Рисунок 3, G и H) [256].

BCRP участвует в гомеостазе порфирина, опосредуя экспорт протопорфирина IX (PPIX) как из митохондрий в цитозоль, так и из цитозоля во внеклеточное пространство. Также вероятно дополнительной функцией белка является регуляция и поддержание нормального гомеостаза гема и фолата, необходимых для выживания клеток в условиях гипоксии [185]. Данную гипотезу подтверждает выявленная значительная экспрессия BCRP/ABCG2 в различных стволовых клетках, сохраняющих способность к развитию даже в условиях низкого содержания кислорода. Считается, что гиперэкспрессия данного белка

способствует снижению уровня внутриклеточного гема, накопление которого происходит в условиях гипоксии и имеет токсический эффект [279].

Обобщая информацию, можно отметить, что ключевой физиологической функцией этого транспортера является абсорбция, распределение и выведение эндо- и ксенобиотиков, особенно через тканевые барьеры, выполняющие защитную роль от потенциально токсичных субстратных молекул. Следовательно, защита от естественных и ксенобиотических токсинов является одной из основных нормальных биологических функций BCRP, подобно P-gp [174]. Локализация же в прогениторных и стволовых клетках свидетельствует о дополнительной защите от генотоксичных мутагенов и неблагоприятных условий, в частности гипоксии. Также он регулирует клеточный гомеостаз физиологически важных эндогенных соединений, таких как гем, порфирины, рибофлавин и эстрогены [132, 169, 194, 209].

Однако BCRP встречается не только в нормальных клетках организма. Например, различные опухолевые клетки используют его гиперэкспрессию как механизм формирования резистентности с целью выведения во внеклеточное пространство химиотерапевтических агентов и защиты злокачественных новообразований от гипоксии подобно стволовым клеткам [196]. Так, открытие данного белка впервые произошло в подлиннии клеток карциномы молочной железы человека MCF-7, отобранных по резистентности к антрациклину и доксорубину в присутствии верапамила - ингибитора P-gp [69, 91]. Позднее транскрипты белка-транспортера были обнаружены и в других опухолевых культурах организма человека.

Субстраты и модуляторы активности

Из-за особенностей липофильных свойств основного участка связывания, субстратной активностью в отношении большинства представителей подсемейства G обладают преимущественно липиды. Однако BCRP как белок-транспортер отличается от них более широкой субстратной специфичностью и универсальностью [191].

Многочисленные исследования показали, что BCRP способен переносить различные по размерам полярные гидрофобные молекулы, гидрофильные органические анионы и катионы, имеющие гидрофобные участки, конъюгаты лекарственных препаратов II фазы биотрансформации (конъюгированные с сульфатом, глюкуронатом и глутатионом, поскольку сульфатированные конъюгаты обладают лучшим сродством к BCRP) [56, 139, 186].

Несмотря на разные молекулярные массы субстратных соединений белка, в их химической структуре можно выделить следующие общие черты: длина углеродной цепи варьирует от 7 до 20 атомов; молекула способна принимать плоскую конформацию; все они содержат ароматическое кольцо и функциональные группы, в состав которых могут входить атомы азота, кислорода, а в некоторых случаях атомы металлов [104].

Транспорт посредством BCRP может служить основным механизмом переноса противоопухолевых нуклеозидных препаратов, являясь одним из основных белков, формирующих множественную лекарственную устойчивость опухолевых клеток. При этом исследователями отмечается довольно высокий аффинитет многих лекарственных средств этой группы к BCRP [114, 206].

Перечень основных субстратов белка среди лекарственных препаратов представлен в Таблице 2.

Таблица 2 – Перечень основных доказанных субстратов белка-транспортера BCRP (Цит. по: Mao Q., Unadkat J.D., 2015; Polgar O., 2008 [179, 218]; с дополнениями: [1, 56, 96, 157, 286])

Наименование группы лекарственных препаратов	Представители
Антиагреганты	Дипиридамо́л
Антибиотики и противомикробные препараты	Ципрофлоксацин Офлоксацин Норфлоксацин Энрофлоксацин Эритромицин Диритромицин Рифампицин Нитрофурантоин Сульфасалазин [157]

Антигельминтные препараты	Альбендазола сульфоксид Оксфендазол
Антикоагулянты	Апиксабан [56] Ривароксабан [56]
Блокаторы H_2 -гистаминовых рецепторов	Циметидин
Витаминные препараты	Фолиевая кислота Рибофлавин
Гипотензивные препараты	Празозин [1] Нитрендипин
Ингибиторы ГМГ-КоА-редуктазы	Розувастатин [96] Питавастатин Церивастатин
Ингибиторы $H^+ - K^+ - ATP$ -азы	Пантопразол
НПВС	Диклофенак [286]
Противовирусные препараты	Зидовудин (AZT) Ламивудин Абакавир Ацикловир [1]
Противоопухолевые препараты	Митоксантрон Даунорубин Доксорубин Эпирубин Бисантрон Флавопиридол Этопозид Тенипозид Топотекан Иринотекан Метотрексат, метотрексат ди- и триглутамат Азидопин
Сахароснижающие препараты	Глибурид [1]

Среди субстратов с наибольшим сродством к белку выделяют такие соединения как митоксантрон, метотрексат, топотекан, сульфасалазин, розувастатин и др. [72, 112, 137, 188]. Соответственно, перечисленные лекарственные препараты могут выступать в качестве потенциальных молекул для изучения особенностей функционирования BCRP в качестве переносчика.

Установлено также, что BCRP, играя защитную роль, удаляет различные пищевые канцерогены (2-амино-1-метил-6-фенилимидазо(4,5-b)-пиридин, афлатоксин В1 и т.д.) [81, 107, 138].

BCRP в качестве переносчика транспортирует эндогенные соединения, метаболиты и конъюгаты: порфирины [271], эндогенные фолаты (моно-, ди- и триглутаматы фолиевой кислоты) [203], ураты [142, 228], стероидные гормоны и их метаболиты [116, 165], конъюгаты глюкуронида, глутатиона и сульфата [83, 107, 148, 238].

Это подтверждает то, что BCRP является не только защитным белком, ограничивающим внутриклеточный транспорт ксенобиотиков и метаболитов II фазы биотрансформации, но и принимает участие в физиологических процессах и поддержании гомеостаза за счет переноса эндогенных соединений.

Перечень веществ способных влиять на функциональную активность белка достаточно широк и продолжает пополняться новыми соединениями (Таблица 3). К мощным ингибиторам BCRP, согласно имеющимся данным, обычно относятся соединения с высокой липофильностью и молекулярной массой, а также большим количеством связей, вокруг которых возможно свободное вращение атомов, малых циклов, ароматических колец, акцепторов водородных связей [204]. Наиболее часто встречающейся частью в химической структуре ингибиторов при этом является азотсодержащее гетероциклическое кольцо, размер боковой цепи которого может влиять на эффективность снижения активности белка. В связи с чем одной из обширных химических групп, способной ингибировать BCRP, являются производные пиридина и дигидропиридина [71].

С точки зрения фармакотерапевтической классификации, высокой ингибирующей активностью обладают такие классы соединений, как ингибиторы тирозинкиназы, некоторые препараты для лечения заболеваний сердечно-сосудистой системы (в частности, пиридиновой и дигидропиридиновой структуры), противовирусные, противогрибковые и противоопухолевые средства [204, 223].

Таблица 3 – Перечень доказанных ингибиторов белка-транспортера BCRP (Цит. по: Mao Q., Unadkat J.D., (2015), Polgar O., 2008 [179, 218]; с дополнениями: [1, 52, 95, 141, 201, 204, 281, 291])

Наименование лекарственных препаратов	группы	Представители
Антибиотики		Тедизолид [95] Новобиоцин [291]
Антиагреганты		Дипиридамола Тикагрелор [281]
Антигельминтные препараты		Оксфендазол
Антикоагулянты		Дабигатрана этексилат [204]
Гипотензивные препараты		Нигулдипин Никардипин [1] Нитрендипин [1] Нимодипин [1] Нифедипин Резерпин [1] Лозартан [1] Кандесартан [1] Телмисартан [1]
Препараты глюкокортикостероидов		Беклометазон Метилпреднизолон Дексаметазон Триамцинолон Мометазон Циклесонид
Иммунодепрессанты		Такролимус Сиролимус Циклоспорин А
Ингибиторы $H^+ - K^+ - ATP$ -азы		Пантопразол Омепразол Рабепразол [1] Лансопразол [1]
НПВС		Мелоксикам [52]
Препараты для лечения муковисцидоза		Ивакафтор [204]

Противовирусные препараты	Ритонавир Нелфинавир Лопинавир Делавирудин Эфавиренз Саквинавир Атазанавир Паритапревир [1] Дазабувир [1] Абакавир [1] Ампренавир [1] Делавирдин [1] Фавиренц [1] Боцепревир [1] Телапревир [1]
Противогрибковые препараты	Кетоконазол [1] Итраконазол Флуконазол [1] Изавуконазол [1] Позаконазол [1] Мегацетоконазол Амфотерицин Б [1] Каспофунгин [1] Микофунгин [1]
Противомалярийные препараты [1]	Артемизин Атоваквон Хлорохин Дигидроартемизин Люмефантрин Мефлохин Прогуанил Хинин
Противомикробные препараты	Новобиоцин Рифампицин Фузидиевая кислота

Противоопухолевые препараты	Вемурафениб [204] Бексаротин [204] Торемифен Иматиниб [1] Гефитиниб [1] Лапатиниб [1] Фостаматиниб [1] Авапритиниб [1] Алектиниб [1] Дазатиниб [1] Понатиниб [1] Сорафениб [1] Тивозаниб [1] Нилотиниб Эверолимус [204]
Противорвотные препараты	Апрепитант [201]
Противотуберкулезные препараты	Рифапентин [204]
Сердечные гликозиды	Дигоксин
Стимулятор тромбопоэза	Элтромбопаг [141]
Эстрогены, агонисты эстрогенов, антагонисты эстрогенов	17- β -эстрадиол Диэтилстильбэстрол Тамоксифен

Высокую ингибирующую активность демонстрируют флавоноиды – группа биологически активных веществ лекарственных растений. При этом среди наиболее активных ингибиторов BCRP выделяют кверцетин, гесперидин, акацетин, кампферол и др. [55]. Также для этой группы соединений характерна селективность в отношении ингибирования BCRP, так как они не оказывают влияния на гликопротеин Р [223].

Кроме того, некоторые пищевые агенты способны снижать активность транспортного белка, так, например, при совместном употреблении продуктов, содержащих куркумин, и лекарственных препаратов-субстратов BCRP, отмечается статистически значимое снижение эффлюкса последних [98].

Некоторые исследования, показали ингибирующее действие ряда вспомогательных веществ, что может негативно сказываться на фармакокинетике при их введении в состав препаратов, являющихся субстратами белка-

транспортера. К таким веществам относят, например, эмульгатор BL-9EX, поверхностно-активные вещества Brij 97, Pluronic F68 и Tween 20, солюбилизаторы макроглицерола рицинолеат, лаурилсульфат натрия, Labrasol и др. [187].

Наибольшее количество вспомогательных веществ, обладающих ингибирующей активностью, исследователи обнаруживают в группе красителей (FD&C Red 40, FD&C Yellow 6 и т.д.) и поверхностно-активных веществ [161].

Механизмы ингибирования данного белка остаются плохо изученными. Вероятно, для перечисленных соединений может быть характерно конкурентное, аллостерическое ингибирование, либо взаимодействие с мембранными фосфолипидами, снижающее проницаемость мембраны для ионов, а, следовательно, и активность белка.

Перспективными классами соединений для возможного синтеза новых молекул-ингибиторов BCRP современные исследователи признают ауроны, халконы и хромоны [55].

Поиск индукторов активно ведется в настоящее время, тем не менее их перечень крайне мал. К этой группе соединений относят теллапревир, риоцигуат, венлафаксин [265], довитиниб [160], оксотреморин, фенобарбитал, цетилпиридиний хлорид, промазин, бенцетимид, ифенпродил, этопозид, перфеназин [118], рифамицины [95].

Также есть сведения об индуцирующей активности антиретровирусных препаратов, например, для биктегравира, механизм стимуляции связан с повышением экспрессии гена ABCG2 [155]. Схожим механизмом обладает препарат из этой же фармакотерапевтической группы – эфавиренз. Для него исследователи отмечают как субстратную специфичность, так и индуцирующую активность [108].

Выявлен ряд эндогенных соединений, способных индуцировать работу белка, к ним относятся холестерин, прогестерон и др. [249]. Механизм стимулирующего действия физиологических субстратов BCRP, включая холестерин, желчные кислоты, половые гормоны и их производные, связан с тем, что они значительно стимулируют его АТФ-азную активность [249] и участвуют в

регуляции этой активности в присутствии других субстратов. Например, АТФ-азная активность BCRP, стимулируемая субстратом, увеличивается с повышением уровня холестерина в мембранных везикулах, полученных из клеток насекомых. В свою очередь, истощение холестерина приводило к снижению АТФ-азной активности транспортера [104].

Существуют данные, свидетельствующие об опосредованном влиянии на активность BCRP в клетках печени через систему цитохромов – СYP ферментов или оксидаз смешанной функции. При повышении активности некоторых изоферментов данной группы существует вероятность индуцирования белков-транспортеров, включая BCRP [118].

Анализируя обширные списки субстратов и модуляторов активности белка-транспортера BCRP, можно сделать вывод о его значительном влиянии на фармакокинетические параметры лекарственных средств и нормальные функции организма аналогично другому клинически значимому транспортеру – гликопротеину Р.

1.2 Фармакологическое значение белка резистентности рака молочной железы

Влияние количества BCRP на эффективность лечения некоторых заболеваний

Лекарственная резистентность является существенной проблемой современной фармакотерапии онкологических заболеваний, так как это одна из основных причин неэффективного лечения, которая может приводить к метастазированию и рецидиву заболеваний [199, 230].

BCRP, как и многие другие белки-транспортеры суперсемейства ABC, используется опухолевыми клетками как один из механизмов формирования множественной лекарственной устойчивости (МЛУ; *англ: multi-drug resistant, MDR*). Например, доказано, что BCRP играет значительную роль в развитии резистентности при лейкемии [58, 139]. Транскрипты белка-транспортера были

обнаружены и в других опухолевых клетках организма человека, часто гиперэкспрессия BCRP наблюдается в аденокарциномах пищеварительного тракта, эндометрия и легких, а также при меланоме [126]. Считается, что значительную роль BCRP играет в формировании устойчивости к лечению при остром миелоидном и лимфоидном лейкозе [218].

Было показано, что высокая экспрессия данного белка-транспортера обеспечивает устойчивость к митоксантрону и различным аналогам камптотецина, включая топотекан и иринотекан (CPT-11), за счет эффлюкса перечисленных субстратных соединений из опухолевых клеток [82].

Анализ перечня субстратных молекул BCRP позволяет убедиться в обширности группы противоопухолевых средств, относящихся к этой категории. Отсюда можно сделать вывод о необходимости поиска и изучения возможных ингибиторов BCRP, которые позволят снизить транспорт терапевтических агентов из опухолевых клеток и преодолеть явление фармакорезистентности.

Имеются сведения о влиянии повышения экспрессии BCRP на развитие устойчивости к терапии у ВИЧ-1-инфицированных больных. В проведенном исследовании было показано, что избыточная экспрессия BCRP может быть вовлечена в прогрессирование инфекции ВИЧ-1 и может способствовать лекарственной устойчивости к антиретровирусной терапии. Соответственно, эти данные необходимо учитывать при назначении лечения для ВИЧ-1-инфицированных [122].

Обратная картина наблюдается при лечении инфицированных вирусом гепатита С. Так, имеются сведения о снижении экспрессии некоторых белков-транспортеров гепатоцитами у инфицированных вирусом гепатита С, в частности, наблюдается уменьшение количества BCRP [287]. Данный факт исследователи частично связывают с изменением цитокинового статуса, вызванным вирусом гепатита С. Подобное уменьшение количества белка-транспортера может влиять на фармакокинетику лекарственных средств, а также эффективность противовирусной терапии, используемой в лечении гепатита С. Например, выполнены исследования у пациентов с данным диагнозом, подтверждающие

увеличение площади под фармакокинетической кривой для неспецифических субстратных препаратов – велпатасвир, глекапревир и др. Приведенные изменения могут способствовать развитию относительной передозировки или увеличению частоты проявления побочных эффектов лекарственных средств, являющихся субстратами транспортера [220].

Влияние экспрессии белка-транспортера BCRP на терапию аутоиммунных заболеваний также значительно. Например, при язвенном колите и инсулинозависимом сахарном диабете отмечают снижение количества белка [208, 294].

А при ревматоидном артрите наоборот характерно увеличение экспрессии BCRP. Следовательно, это может влиять на фармакокинетические параметры лекарственных субстратов BCRP, приводя к нежелательным побочным реакциям и изменениям эффективности лечения [232, 233, 297].

Важно отметить вклад уровня экспрессии BCRP и в изменение проницаемости гистогематических барьеров при некоторых патологических состояниях. Описано повышение экспрессии белка-транспортера при боковом амиотрофическом склерозе, что может сказываться на проницаемости гематоспинно-мозгового барьера [246].

Вероятно, повышение уровня белков-транспортеров в различных тканевых барьерах играет важную роль в защите повреждённой ткани от естественных молекул. Поэтому любые попытки снизить экспрессию транспортеров с целью уменьшения эффлюкса лекарственных препаратов, специфичных для терапии спинальных заболеваний, могут иметь неожиданные негативные последствия, препятствуя внутренней защите, обеспечиваемой транспортерами.

В лечении же рефрактерной эпилепсии были обнаружены противоречивые результаты, которые, возможно объясняются как спорное влияние уровня BCRP на фармакотерапию данного заболевания [264].

Таким образом, в лечении ряда заболеваний крайне важно учитывать изменения в количестве белка-транспортера BCRP, так как это может обеспечить

более эффективное и рациональное применение лекарственных средств и, в определенной степени, снизить проявление побочных реакций.

Межлекарственные взаимодействия на уровне белка-транспортера BCRP, имеющие клиническую значимость

На эффективность и безопасность фармакотерапии кроме уровня самого белка в тканях могут влиять и лекарственные взаимодействия между субстратами и модуляторами активности транспортеров. Подобные межлекарственные взаимодействия (англ: *drug–drug interaction*, DDI) способны изменять концентрацию в плазме и биодоступность лекарственного средства, а значит влиять на безопасность и эффективность используемой терапии [90].

Межлекарственные взаимодействия признаны мировым сообществом одной из важных причин сообщений о побочных эффектах и отзыва лекарственных средств с рынка по соображениям безопасности [200]. Следовательно, их изучение и прогнозирование необходимо для безопасного применения лекарственных средств [78].

Нормативные рекомендации регуляторных органов, включая Европейское медицинское агентство (EMA), Агентство по фармацевтическим препаратам и медицинским устройствам (PMDA, Япония) и Управление по контролю за продуктами питания и лекарствами США (FDA), рекомендуют проводить соответствующую оценку впервые регистрируемых препаратов *in vitro* и / или *in vivo* на предмет потенциального ингибирования некоторых транспортеров лекарственных средств, включая BCRP [117, 150, 242].

Вероятность подобных взаимодействий уровне белка-транспортера BCRP повышается при использовании нескольких препаратов в терапии одного заболевания. Так, наиболее характерна комбинированная терапия и даже полипрагмазия, в терапии онкологических заболеваний. Есть сведения о применении противорвотных препаратов, являющихся ингибиторами BCRP (апрепитант – противорвотное средство, используемое для профилактики тошноты и рвоты, вызванных химиотерапией), совместно с субстратными химиотерапевтическими средствами. Среди них можно выделить такие препараты

как митоксантрон, иринотекан, топотекан [179]. Было установлено, что в подобной комбинации противорвотный агент, в данном случае – апрепитант, может повышать чувствительность опухолевых клеток к химиотерапевтическим препаратам путем ингибирования BCRP. Однако у данного положительного эффекта есть существенный недостаток: ингибитор может нарушать функцию печеночного BCRP и вмешиваться в выведение с желчью или энтерогепатический цикл препаратов-субстратов BCRP. Подобный эффект был доказан в исследовании взаимодействия иринотекана с апрепитантом [201].

Для схожего противорвотного средства ролапитанта также была продемонстрирована высокая ингибирующая активность при совместном приеме с сульфасалазином: происходило увеличение площади под кривой концентрация-время, но не сообщалось о существенном учащении проявления побочных эффектов. Тем не менее это может спровоцировать относительную передозировку, повысив риск токсичности препарата, что следует контролировать [113].

При лечении сердечно-сосудистых заболеваний также часто применяются сразу несколько лекарственных препаратов. В частности, с целью профилактики развития тромбозов, эмболии и снижения риска инсульта, используется комбинация антикоагулянтов и гиполипидемических средств. Наиболее часто применяемой группой среди гиполипидемических препаратов являются статины, для которых характерна субстратная специфичность в отношении BCRP. При этом среди антикоагулянтов выявлены его ингибиторы – дабигатрана этексилат (но не дабигатран). Согласно имеющимся статистическим моделям подобное взаимодействие дабигатрана этексилата и розувастатина, может почти вдвое повышать AUC последнего, подвергая пациентов потенциально повышенному риску миотоксичности. Однако метаболизм дабигатрана этексилата в кишечнике [275] может снижать его концентрацию в энтероцитах и, следовательно, его способность ингибировать BCRP.

Схожее действие характерно для ингибитора BCRP – антиагреганта тикагрелора. В недавнем клиническом исследовании была доказана его способность повышать концентрацию розувастатина в плазме крови у больных,

получающих подобную терапию после перенесенного инфаркта миокарда. Причем с ростом концентрации розувастатина отмечалось и повышение уровня креатинина ($p=0,039$), что может оказывать токсическое воздействие на организм [281]. Также есть сведения об увеличении концентрации розувастатина вдвое при одновременном приеме со стимулятором тромбоза элтромбопагом (ингибитор BCRP) [141].

При лечении подагры может возникать взаимодействие статинов, в частности розувастатина, с фебуксостатом, ингибитором ксантиноксидазы. Так, в проведенных клинических исследованиях было отмечено увеличение концентрации розувастатина за счет снижения активности BCRP фебуксостатом в тонком кишечнике [124].

Кроме того, среди ингибиторов белка-транспортера, которые с высокой вероятностью могут использоваться совместно со статинами, можно выделить мелоксикам, препарат из группы нестероидных противовоспалительных средств [52]. Данная комбинация применяется в терапии остеоартроза с метаболическим синдромом. Причем мелоксикам, в отличие от дабигатрана этексилата, который метаболизируется в энтероцитах до дабигатрана, способен к ингибированию BCRP в том числе в кишечнике. Следовательно, указанный НПВС способен увеличивать всасывание статинов [204].

Вероятным может быть подобное взаимодействие и для мелоксикама с сульфасалазином, что способно приводить к увеличению всасывания последнего. Оба препарата используются в лечении ревматоидного артрита, а сульфасалазин относится к группе болезнь-модифицирующих антиревматических препаратов (БМАРП) [136]. Однако в настоящий момент в литературе отсутствуют сведения о клинической значимости данной комбинации.

Проводят исследования по изучению взаимодействия некоторых антибиотиков с сульфасалазином. Например, в эксперименте *in vivo* было показано, что антибиотик класса аминкумаринов (новобиоцин) эффективно ингибирует BCRP, повышая площадь под фармакокинетической кривой в плазме крови, а также пиковую концентрацию сульфасалазина после перорального введения [291].

Сообщается об аналогичном возможном взаимодействии еще одного антибиотика, тедизолида, с рядом субстратных веществ: матиниб, лапатиниб, метотрексат, питавастантин, розувастатин, сульфасалазин и топотекан, что приводит к увеличению их концентрации в крови [95].

Высокая востребованность лекарственных средств на основе лекарственного растительного сырья среди населения Российской Федерации также может приводить к риску нежелательных побочных эффектов при одновременном приеме с субстратами белка-транспортера. Это обусловлено тем, что большинство выпускаемых фитопрепаратов являются суммарными и могут содержать вещества, обладающие ингибиторной или субстратной активностью по отношению к BCRP. С ростом популярности растительных добавок увеличилось использование фитопрепаратов в сочетании с классическими лекарственными средствами [89].

Согласно имеющимся данным подобные взаимодействия выявлены у сульфасалазина и препаратов Гинкго билоба: экстракт Гинкго билоба способен опосредованно увеличивать $C_{\max}$ и AUC для сульфасалазина. Подобный эффект предположительно связан с подавляющим действием препарата на экспрессию белка и модуляцией активности микробиоты кишечника, дополнительно снижающей количество BCRP [121, 129].

Потенциально могут ингибировать BCRP биологически активные добавки и пища, содержащие кверцетин и куркумин. Приведенные соединения в целом используются исследователями в качестве высокоэффективных ингибиторов в сочетании с различными субстратами, например, с сульфасалазином [99, 198, 224, 283].

Кроме того, есть данные о влиянии экстракта черного имбиря, содержащего 5,7-диметоксифлавонол (DMF), на терапевтическую эффективность субстратов BCRP и P-gp. Было установлено, что данный экстракт может увеличивать всасывание субстратных молекул белка, а значит является его ингибитором [76].

Выявлено значительное повышение AUC сульфасалазина при совместном пероральном приеме с капсаицином, который вызывает снижение экспрессии гена и количества белка BCRP в печени и кишечнике крыс [109]. Видимо, подобное

взаимодействие может наблюдаться и у людей, принимающих сульфасалазин совместно с БАД, содержащими капсаицин.

Исследователи отмечают клиническую значимость некоторых однонуклеотидных полиморфных вариаций BCRP и их влияние на фармакокинетику лекарственных средств, а также вклад в развитие межлекарственных взаимодействий [252]. Так при варианте Q141K со сниженной экспрессией белка наблюдается повышенный риск проявления диспепсических расстройств при взаимодействии гефитиниба с рядом других препаратов: сульфасалазин, иринотекан, топотекан, розувастатин и т.д. [100]. Учащение проявления побочных реакций при приеме субстратных молекул в данном случае можно связать с ингибирующим действием гефитиниба на малые количества белка, наблюдающиеся в указанном варианте мутации.

Описаны клинические сведения о влиянии полиморфной формы гена Q141K на эффективность терапии у пациентов, принимавших аллопуринол [128], и повышении риска миопатии при лечении розувастатином [273]. Несмотря на то, что аллопуринол не является субстратом BCRP, данный белок способен транспортировать активный метаболит соединения – оксипуринол. Исследователи отмечают, что концентрация именно этого вещества увеличивается в плазме крови у пациентов с полиморфной формой гена Q141K [164]. Именно эта полиморфная форма признана исследователями наиболее важной и часто встречающейся [54, 197].

Высокая частота встречаемости наблюдается и для полиморфного варианта гена V12M, который также может влиять на концентрации субстратных молекул и вызывать межлекарственные взаимодействия [179].

В целом, согласно современным подходам, наиболее точную оценку фармакокинетических межлекарственных взаимодействий на уровне белков-транспортеров можно дать только при дополнительном учете индивидуальных особенностей конкретных пациентов (возраст, генетические особенности, в частности полиморфизм генов, кодирующих белки-транспортеры, сопутствующие заболевания, хронический прием ингибиторов BCRP, P-gp и др.) [207, 229], что

требует продолжения активных доклинических и клинических исследований в данном направлении.

1.3 Выбор тест-систем для исследований белка резистентности рака молочной железы в экспериментах *in vitro* и *in vivo*

Тест-системы in vitro

Мировые регуляторные агентства рекомендуют проводить изучение активности белка-транспортера BCRP с использованием ряда клеточных линий, при этом подбор тест-систем во многом будет определяться целью исследования [117, 151]. Например, если требуется определить влияние количества и активности белка на биодоступность лекарственного препарата и возможность его прохождения через гистогематические барьеры, используются клеточные линии, представляющие собой изолированные клетки конкретных барьеров.

Для оценки функциональной активности переносчика в гематоэнцефалическом барьере используются клетки эндотелиальной капиллярной линии человеческого мозга (hCMEC/D3) [85]. Данная клеточная линия применяется чаще подобных и представляет собой хорошо дифференцированную линию эндотелиальных клеток мозга человека, в которой была доказана экспрессия P-gp, MRP1 и BCRP, а также подтверждена их функциональная активность [77].

Анализ работы белка-транспортера в гепатоцитах можно провести на клеточных линиях HepG2 [131] и HepaRG [152]. Данные культуры клеток сохраняют многие ферментные системы, транспортеры и ядерные рецепторы, что делает их схожей с первичной клеточной линией печени человека. Однако двумерные модели гепатоцитов в основном используются в оценке метаболизма лекарственных средств и их влияния на уровень экспрессии транспортеров ABC-семейства, поскольку ферментные системы могут влиять на активность транспортеров и количество субстрата [131].

Также в экспериментах применяют опухолевые клетки молочной железы человека MCF7 (MCF7/MR – подлиния, устойчивая к митоксантрону и

гиперэкспрессирующая BCRP; MCF7/AdVp3000, гиперэкспрессирующий вариант R482T BCRP) [146]. Исследования с их использованием ограничиваются особенностями клеточного гомеостаза опухолевых культур, так как при культивировании данная линия не способна к дифференцировке в нормальные клетки.

В работе могут применяться и трансфицированные клеточные линии: клетки почек HEK293 в различных модификациях (BCRP-HEK293 стабильно трансфицированные лентивирусом ABCG2 [71], HEK293/Neo – HEK293, трансфицируемые pcDNA3 [146] и др.).

Также схожие эксперименты могут проводиться на клетках линии почек собак Madin-Darby II, селективно экспрессирующих BCRP (SB MDCKII/BCRP) [67].

Для проведения анализа методом мембранных везикул используют клеточные линии насекомых Sf9, инфицированные бакуловирусом с ABCG2 (BCRP-Sf9), насыщенные экзогенным холестерином и также инфицированные бакуловирусом с геном ABCG2 (BCRP-Sf9-HAM) для осуществления различных исследований активности BCRP [157].

Применение трансфицированных клеточных линий имеет ряд недостатков, в частности наличие ложноположительных результатов, связанных с высокой проницаемостью некоторых соединений, ограниченность в выборе субстратов, в ряде случаев они должны обладать способностью к флуоресценции, а также дороговизна таких клеточных культур [67, 71].

Наиболее часто используемой тест-системой являются клетки колоректальной аденокарциномы кишечника человека Caco-2, которая при культивировании в течение 3-х недель трансформируется в полярные клетки, схожие по строению и функциональным характеристикам с клетками кишечника [298]. Данная клеточная линия позволяет осуществлять количественную оценку межлекарственных взаимодействий, опосредованных BCRP, на уровне кишечника, что особенно актуально для лекарственных средств, применяемых перорально [92]. Отличительной особенностью клеток Caco-2 является низкий уровень экспрессии

ферментных систем, а значит клеточную линию можно использовать в оценке переноса исходных молекул субстратных веществ [239]. Значительным преимуществом данной клеточной линии является возможность оценки межлекарственных взаимодействий, а также скрининга новых модуляторов активности BCRP [85, 184].

Для количественного анализа активности BCRP возможно использование 3D-сфероидов различных культур клеток [65]. Такие модели наиболее приближены к условиям *in vivo*, однако ведение 3D-системы отличается сложностью ее культивирования, высокой стоимостью получения и поддержания жизнеспособности, а также трудностями в воспроизводимости результатов. К тому же длительное ведение таких культур во многом зависит от свойств каркаса для создания 3D-модели [33]. По этой причине двумерные модели в настоящее время остаются более востребованным, рекомендованным регуляторными органами и широко применяющимся видом тест-систем.

Тест-системы in vivo

Результаты, полученные в экспериментах *in vitro*, не дают полного представления о функционировании белка-транспортера на уровне целостного организма, т.к. требуют масштабного исследования с применением всех тканей, участвующих в фармакокинетике субстратов BCRP: различных отделов кишечника, печени, почек. Проведение экспериментов *ex vivo* на изолированных органокомплексах является методически сложным, инвазивным и дорогостоящим [153]. По этой причине следующим этапом фармакокинетических исследований обычно является проведение экспериментов на лабораторных животных. Подбор тест-систем в данном случае затруднен необходимостью поиска у разных видов животных геномов гомологичных человеческому, сопоставимой экспрессии белков-транспортеров, работы ферментных систем, а также физиологических особенностей.

В научной литературе при описании исследований чаще всего можно встретить использование различных грызунов. Распространено применение мышей дикого типа WT, а также мышей с нокаутированными генами: Mdr1a/Mdr1b ^{-/-} –

без экспрессии P-gr, так как данный транспортер может мешать изучению BCRP из-за сходного перечня субстратов и модуляторов активности; Abcg2^{-/-} – без экспрессии BCRP, используемые в качестве контрольной группы и т.д. Несмотря на частое применение этого вида животных, описан ряд недостатков, связанных с видовыми различиями экспрессии данного транспортера. Было показано, что у мышей в сравнении с человеком наблюдается повышенное количество мРНК Abcg2 в почках, а в плацентарном барьере наоборот выявляются меньшие значения [276]. Соответственно результаты, характеризующие почечную экскрецию с участием BCRP, а также транспорт веществ через плацентарный барьер, могут быть некорректными. Затруднено получение репрезентативных данных и в случае проведения длительных фармакокинетических исследований, предполагающих забор крови. Как правило, в таких экспериментах требуется одно животное на временную точку, а значит не представляется возможным оценить активность белка в одном конкретном организме. Этот факт может повышать разброс данных при обработке результатов.

Использование лабораторных крыс является не менее распространенным. В экспериментах используют крыс линии Sprague-Dawley и стока Wistar [162]. Как и для всех грызунов, для крыс существуют различия в уровне белка-транспортера BCRP в сравнении с человеком. Отмечают высокие значения мРНК Abcg2 в кишечнике, а также в почках для самцов и незначительные различия в экспрессии в тестикулах [282]. А значит это также может отразиться на итоговых результатах исследований. К тому же при использовании крыс многократный забор крови возможен лишь в небольшом объеме, которого может быть недостаточно для проведения количественного анализа исследуемых веществ, особенно при УФ-детектировании. А сама процедура предполагает сложную инвазивную манипуляцию, требующую определенных мануальных навыков. Даже при условии правильного выполнения взятия крови существует риск гемолиза, загрязнения образцов, высокая травматичность для животного и, как следствие, возможное изменение состава крови из-за стресса [3, 10].

Среди лабораторных животных, не относящихся к грызунам, в исследованиях используют собак породы бигль и обезьян. Собаки и обезьяны являются дорогостоящими объектами исследования. Кроме того, для обезьян также отмечают различия в уровне BCRP в гепатоцитах в сравнении с человеком [70], а для собак есть данные о различии в экспрессии белка в ЦНС [222]. Приводятся сведения о возможном использовании птиц, например, для индюков BUT9 была доказана экспрессия BCRP в желудочно-кишечном тракте, печени, почках, легких, мозге, надпочечниках, яичниках, яйцеводах и яичках [123].

В зарубежной литературе практически нет данных об использовании лабораторных кроликов в проведении фармакокинетических экспериментов. Встречается лишь упоминание об использовании изолированных органов и систем, полученных от этих животных [154].

Кролики являются представителями отряда зайцеобразных (*лат. Lagomorpha*) и имеют меньшее количество различий с человеком в локализации и количестве белков-транспортёров по сравнению с грызунами (*лат. Rodentia*), несмотря на их общую принадлежность к группе грызунообразных (*лат. Glires*) [66, 125, 268]. В отличие от собак и обезьян кролики не требуют сложных и дорогостоящих условий содержания [17], имеют схожий с человеческим геном [248], а также физиологические особенности на уровне желудочно-кишечного тракта, например, распределение микрофлоры [62]. При этом кролики хорошо переносят введение требуемых количеств препаратов и многократный забор крови в достаточных объемах при проведении длительного эксперимента. Процедуру взятия крови для кролика можно осуществить безболезненно через крупную и легко определяемую визуально ушную вену. Это позволяет использовать одного кролика на все временные точки при выполнении фармакокинетического исследования подобно экспериментам, которые проводят в клинической практике на одном пациенте.

Кролики породы Советская Шиншилла уже успешно использовались для изучения функционирования гликопротеина Р, который, как и BCRP, является ключевым представителем ABC-транспортёров [18, 19, 21]. Таким образом,

лабораторные животные могут использоваться в качестве тест-систем для изучения функционирования BCRP на уровне целостного организма, а выбор вида животного определяется целями, задачами и условиями эксперимента.

1.4 Выбор оптимальных субстратов и модуляторов активности белка резистентности рака молочной железы для исследований *in vitro* и *in vivo*

Для изучения функциональной активности конкретного белка требуется тщательный подбор высокоселективных субстратов и ингибиторов, так как при использовании не модифицированных клеточных линий и лабораторных животных на транспорт ряда соединений могут оказывать влияние сразу несколько переносчиков. Подобное явление наблюдается из-за неспецифичности веществ-субстратов и ингибиторов для ряда белков-транспортёров. Проведение исследований трансмембранного транспорта на уровне *in vitro* предполагает необходимость использования не просто селективных соединений, но и обладающих достаточной растворимостью и проницаемостью. А для исследований *in vivo* и клинических испытаний во многом выбор субстратов и ингибиторов ограничивает требование низкой токсичности в отношении живых организмов и отсутствие системного влияния возможных побочных эффектов на фармакокинетические параметры исследуемых веществ за счет снижения кровотока, гастро-, гепато и нефротоксичности и других явлений.

При анализе литературных данных можно отметить частое применение противоопухолевых препаратов (митоксантрон, метотрексат, топотекан и т.д.) в качестве субстратных молекул в исследованиях *in vitro*. Однако использование таких средств в экспериментах на лабораторных животных и людях значительно ограничивает профиль безопасности указанных лекарственных препаратов, в частности их цитотоксичность [78].

Рекомендованы для изучения белка и ингибиторы ГМК-КоА-редуктазы (статины), а именно розувастатин. Он обладает наибольшим сродством к BCRP среди всех остальных статинов, высокой липофильностью и относительной

безопасностью для организма животных и человека. Однако это вещество не является селективным субстратом для белка, поскольку может переноситься другими эффлюксными транспортерами (MRP2, гликопротеин Р) и инфлюксными переносчиками из семейства полипептидного транспортера органических анионов OATP (OATP1B1, OATP1B3) [295].

Некоторые исследователи отдают предпочтение рибофлаvinу как субстрату-кандидату [183, 194]. Тем не менее он не обладает селективностью в отношении BCRP, так как его основным переносчиком является инфлюксный транспортер – RFVT3 [127]. А при интерпретации результатов будет необходимо учитывать дополнительное влияние поступающего с пищей и эндогенного рибофлавина.

В научной литературе достаточно часто упоминается применение сульфасалазина, который является доказанным селективным субстратом для белка-транспортера BCRP [112, 198]. Среди других лекарственных субстратов он обладает наибольшим сродством к данному белку, а также для него не характерна выраженная цитотоксичность, что позволяет использовать этот препарат в исследованиях *in vivo* на животных и людях. Приведенные свойства делают сульфасалазин подходящим кандидатом для выбора в качестве субстрата BCRP при проведении экспериментальных и клинических исследований [78].

Перечень ингибирующих агентов, применяющихся в подобных исследованиях более велик. Но для выбора таких соединений также существует ряд ограничивающих параметров, которые совпадают с таковыми для выбора субстратов, а дополнительным аргументом является выраженная ингибирующая активность. Она напрямую зависит от полумаксимальной ингибирующей концентрации соединения (IC_{50}), чем ниже ее величина, тем сильнее проявляется эффект подавления. Однако даже при условии требуемых значений этого параметра не исключено отсутствие системного ингибирования при применении вещества. Например, при исследовании ингибитора BCRP элакридара было обнаружено, что он не способен к системному ингибированию белка, а также не обладает селективностью, так как является ингибитором и для гликопротеина Р [231]. Подобное совпадение перечня ингибиторов для этих двух белков-

транспортёров (перекрёстное ингибирование) характерно для многих соединений, как и в случае с молекулами субстратов.

Ингибиторы протонной помпы, а именно пантопразол [115] и рабепразол [61] не отличаются высокой степенью ингибирующей активности, несмотря на их относительную безопасность. Обратная ситуация наблюдается для ингибиторов тирозинкиназы (эрлотиниб, gefitinib, лапатиниб, nilotinib и сунитиниб), являющихся противоопухолевыми препаратами – для них характерна высокая активность, но относительно низкая безопасность [178]. Существенным их недостатком может быть также высокая стоимость.

Имеются сведения о возможном применении блокаторов медленных кальциевых каналов (никардипин, нитрендипин и нимодипин) и антиагреганта дипиридамола в качестве ингибиторов белка, но их активность аналогична ингибиторам протонной помпы, а дипиридамола обладает дополнительной субстратной специфичностью в отношении BCRP [71].

В настоящее время наиболее селективными, безопасными и мощными ингибиторами BCRP считаются некоторые пищевые агенты, используемые в качестве биологически активных добавок, например, куркумин [93] и ряд флавоноидов [120, 158, 260]. Причём среди флавоноидов наибольшую активность в исследованиях демонстрирует кверцетин [22, 74]. При сравнении полумаксимальной ингибирующей концентрации куркумина ($IC_{50} = 1,6$) [78] и кверцетина ($IC_{50} = 0,6$) [224] можно отметить большую активность последнего. Дополнительным преимуществом кверцетина является его высокая селективность в отношении BCRP [223].

Однако при анализе литературных источников обращает на себя внимание противоречивая информация об использовании этого соединения у лабораторных животных. В некоторых исследованиях отмечено, что низкие дозы кверцетина не оказывают какого-либо воздействия на AUC назначаемого с ним совместно субстрата белка [198]. Следовательно, необходимо учесть имеющиеся данные при подборе дозировок соединений на этапе планирования исследований. К тому же есть сведения об успешном повышении биодоступности сульфасалазина при

сочетании с кверцетином в коаморфных системах, что дополнительно подтверждает перспективность использования данного ингибитора в исследованиях на животных [259]. Таким образом, кверцетин может быть использован в качестве ингибитора при исследовании функциональной активности BCRP в экспериментах *in vitro* и *in vivo*.

1.5 Фармакологическая характеристика сульфасалазина

Сульфасалазин является комбинированным синтетическим противомикробным средством, обладающим противовоспалительной активностью. Молекула этого вещества впервые была получена доктором Наной Сварц (Nana Svartz), в Каролинском институте в Стокгольме, в сотрудничестве со шведской фармацевтической компанией Pharmacia в 1941 году (Рисунок 4) [195].

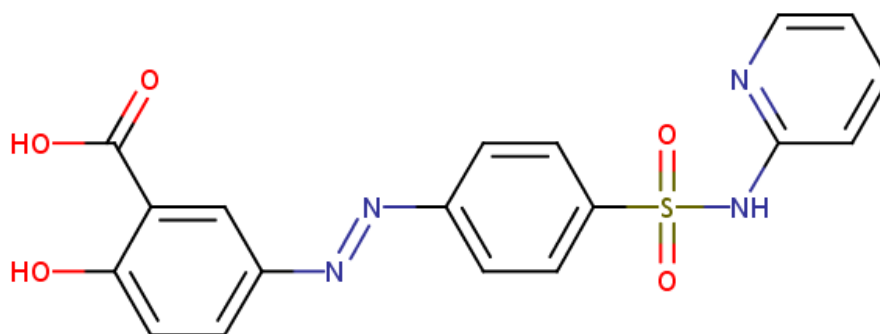


Рисунок 4 – Структурная химическая формула сульфасалазина

Основным показанием к назначению для этого препарата является лечение таких заболеваний, как болезнь Крона, неспецифический язвенный колит (НЯК) и ревматоидный артрит [211, 226]. В литературе приводятся данные о клинической эффективности сульфасалазина в лечении спондилоартропатии [258], некоторых видов злокачественных опухолей (глиом) [48, 172].

Пероральный прием таблеток сульфасалазина характеризуется его низкой абсорбцией в кишечнике в количестве около 10-30% [168]. Пленочная оболочка таблеток при этом не оказывает существенного влияния на биодоступность [226].

Однако именно низкий уровень всасывания обеспечивает терапевтическое действие препарата в просвете толстой кишки. После достижения этого сегмента кишечника молекула сульфасалазина подвергается расщеплению азоредуктазами, выделяемыми местной микрофлорой, с образованием сульфапиридина и 5-аминосалициловой кислоты (5-АСК, месалазин) [212]. Далее эти вещества подвергаются всасыванию, но в разных количествах. Сульфапиридина абсорбируется более 90%, а для 5-АСК наблюдается лишь 20-30% всасывания, что позволяет оказывать противовоспалительное действие в просвете кишечника [266].

Аналогичным образом происходит метаболизм и системно абсорбированного сульфасалазина в печени с образованием сульфапиридина и 5-АСК [168].

Изначально исследователи объясняли низкую биодоступность сульфасалазина его низкой растворимостью и параметрами проницаемости, но при дальнейшем изучении было показано, что для сульфасалазина характерна высокая проницаемость ($\log P$ ($C\log P$) = 3,88) [189]. Позднее плохую абсорбцию соединения связали с активностью транспортных систем кишечника. Действительно, было доказано, что высокоэкспрессирующийся на протяжении всего кишечника BCRP, уровень которого при этом не изменяется, играет важную роль в транспорте сульфасалазина, препятствуя его всасыванию [79, 167]. При ингибировании данного белка и/или снижении его количества (при разных вариантах полиморфизма *ABCG2*) наблюдается повышение всасывания сульфасалазина, которое можно наблюдать в том числе по снижению концентрации сульфапиридина в плазме крови и нарушению его противомикробной активности [79, 88, 214, 254]. Другие эффлюксные транспортеры имеют меньшее сродство или не имеют его вовсе по отношению к данному веществу [79, 88, 101].

Абсорбированный сульфасалазин проявляет противовоспалительную активность, что особенно важно в терапии язвенного колита и болезни Крона, так как в патогенезе этих заболеваний ведущую роль играют не только микроорганизмы, но и воспаление. Данный терапевтический эффект развивается за

счет ингибирования хемотаксиса и случайной миграции воспалительных клеток, таких как нейтрофилы, а также препарат снижает выработку супероксида и протеолитических ферментов [180].

Сульфапиридиновая часть обеспечивает противомикробное действие препарата в отношении широкого ряда микроорганизмов семейства *Enterobacteriaceae* и ряда других. Механизм обусловлен ингибированием бактериального фермента дигидроптероатсинтетазы, необходимой для синтеза фолиевой кислоты [130]. Отмечается вклад этой части молекулы совместно с самим сульфасалазином в снижение ангиогенеза за счет уменьшения хемотаксиса и пролиферации эндотелиальных клеток, что может играть важную роль в лечении ревматоидного артрита [288].

5-АСК выступает в качестве противовоспалительного компонента, который способен к ингибированию высвобождения цитокинов IL-1, 2, 6, 12, простагландин Е2-синтазы, а также к снижению продукции транскрипционного фактора Nf-kB и уменьшению экспрессии молекул адгезии [195].

Активные метаболиты сульфасалазина метаболизируются в печени: сульфапиридин биотрансформируется в основном путем гидроксилирования с образованием неактивных метаболитов. 5-АСК – подвергается конъюгации путем ацетилирования под действием N-ацетилтрансферазы-1 в клетках печени и цитозоле клеток слизистой оболочки кишечника [217].

Выведение активных метаболитов может происходить с калом (5% для сульфапиридина и 67% для 5-АСК), а некоторая часть выводится с желчью. Основная часть сульфапиридина и его метаболитов, ацетилированные метаболитные формы 5-АСК выводятся с мочой [168].

Благодаря длительному существованию на рынке для сульфасалазина тщательно изучены побочные эффекты. Известно, что препарат может оказывать влияние на различные органы и системы: нервную (головная боль, головокружения, шум в ушах и др.); мочевыводящую (нарушения функции почек); пищеварительную (тошнота, рвота, диарея); дыхательную (различные поражения легочной ткани), репродуктивную; систему кроветворения. Кроме того,

сульфасалазин может вызывать аллергические реакции. Хотя исследователи сообщают о высокой частоте проявлений некоторых побочных эффектов у пациентов (от 10 до 45%), хорошая осведомленность об этих эффектах позволяет своевременно принять соответствующие профилактические меры [263].

Таким образом, сульфасалазин широко используется не только в терапии ряда заболеваний, но и помогает в изучении функциональной активности белка-транспортера BCRP благодаря своей уникальной фармакокинетике [86]. Однако, принадлежность сульфасалазина к субстратам белка-транспортера требует дальнейшего изучения возможных межлекарственных взаимодействий препарата с потенциальными ингибиторами данного клинически значимого транспортного белка.

1.6 Фармакологическая характеристика этилметилгидроксипиридина сукцината

Этилметилгидроксипиридина сукцинат (ЭМГПС) (Рисунок 5) был синтезирован в начале 1980-х годов в ГУ НИИ Фармакологии РАМН Л.Д. Смирновым и В.И. Кузьминым. Фармакологические эффекты соединения были выявлены под руководством академика РАМН А.В. Вальдмана. Коллективом исследователей (Т.А. Воронина, С.Б. Середенин, А.В. Еременко, Л.Д. Лукьянова, Л.Н. Неробкова, Т.Л. Гарибова и др.) проведено изучение механизма действия, выполнены доклинические исследования по токсикологии (Б.И. Любимов) и фармакокинетике (А.К. Сариев, В.П. Жердев), выполнены первые клинические испытания (Г.Г. Незнамов, Е.С. Телешова, С.А. Сюняков и др.) и осуществлено внедрение препарата в медицинскую практику.

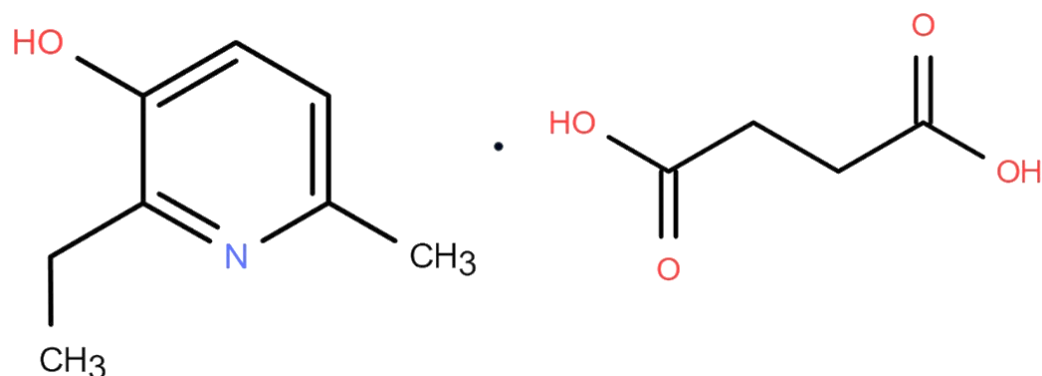


Рисунок 5 – Структурная химическая формула ЭМПС

В настоящее время лекарственное средство выпускается в нескольких лекарственных формах – таблетки, покрытые пленочной оболочкой, в дозировках 125 и 250 мг, а также раствор для внутривенного и внутримышечного введения.

При пероральном приеме ЭМПС быстро всасывается в желудочно-кишечном тракте, для достижения максимальной концентрации, в среднем, требуется около получаса. После с высокой скоростью происходит распределение препарата в тканях организма, включая головной мозг, благодаря его способности проникать через ГЭБ [40]. ЭМПС подвергается биотрансформации в печени с образованием 5 метаболитов: фосфат-3-оксипиридин (обнаружен только у животных), 2-метил-6-метил-3-оксипиридин, 6-метил-3-оксипиридин и два глюкуроноконъюгата (с 2-этил-6-метил-3-оксипиридином и с фосфатом 2-этил-6-метил-3-оксипиридина) [39]. Аналогично быстрому всасыванию, происходит и быстрое выведение препарата, так как примерно через 5 часов его концентрация не детектируется в организме [42]. Выведение преимущественно осуществляется через почки – в течение первых 4 часов с мочой выводится основная часть препарата в виде глюкуроноконъюгатов.

ЭМПС обладает мультимодальным действием и широким спектром фармакологических эффектов, которые хорошо изучены [11].

ЭМПС положительно влияет на процессы свободно-радикального окисления и клеточный гомеостаз. Основной компонент молекулы, 3-гидроксипиридин, проявляет выраженную антиоксидантную активность, которая реализуется через ингибирование радикально-цепных реакций перекисного

окисления липидов биологических мембран, обеспечивает прямое связывание первичных и гидроксильных радикалов, а также реакцию с супероксид-анионом и другими активными формами кислорода с последующим их инактивированием [6].

Препарат усиливает активность ключевых ферментов антиоксидантной системы, в частности супероксиддисмутазы и глутатионпероксидазы [13]. Получены данные об ингибировании свободных радикалов на стадии синтеза простагландинов, катализируемые циклооксигеназой и липоксигеназой, а также о повышении соотношения простоциклин/тромбоксан A_2 и торможении образования лейкотриенов [9].

Кроме того, ЭМГПС способствует снижению активности индуцибельной NO-синтазы, и уменьшает повышенный при патологических состояниях уровень оксида азота в клетках мозга, что определяет его способность ограничивать оксидативный и нитрозативный стресс и нейротоксическое повреждение клеток при гипоксии и ишемии [7].

Выявлено, что ЭМГПС стимулирует экспрессию редокс-чувствительного транскрипционного фактора Nrf2, ответственного за активацию генов антиоксидантной защиты, что укрепляет устойчивость клеток к окислительному стрессу и способствует сохранению целостности мембранных структур [41].

Помимо антиоксидантных эффектов, сукцинат как часть молекулы участвует в метаболических процессах, поддерживая функциональную активность сукцинатоксидазы цикла Кребса в условиях недостатка кислорода и активируя специфические рецепторы GPR91 [39], что обеспечивает прямое антигипоксическое действие посредством улучшения энергетического статуса клетки и повышения её метаболической резистентности. Подобный механизм дополнительно способствует стабилизации мембран клеток [25].

Сообщается о модулирующем влиянии ЭМГПС на активность мембраносвязанных ферментов и рецепторных комплексов мембран мозга, в частности, бензодиазепиновый, ГАМК, ацетилхолиновый, усиливая их способность к связыванию [6].

Обобщая, можно отметить, что для препарата характерно антиоксидантное, антигипоксическое, мембраностабилизирующее, и церебропротективное действие [7].

Несмотря на выраженную активность и обширный перечень эффектов, исследования подтверждают благоприятный профиль переносимости и безопасности препарата. Все описанные побочные действия (ангионевротический отек, крапивница, головная боль, сонливость, диспепсические расстройства и др.) для лекарственного средства отличаются очень редкой частотой проявления [26].

Все указанные свойства в совокупности позволяют использовать ЭМГПС в лечении широкого ряда неврологических заболеваний, сопровождающихся ишемией, гипоксией и развитием окислительного стресса (последствия острых нарушений мозгового кровообращения, черепно-мозговые травмы, энцефалопатии различного генеза и т.д.). Многие исследователи отмечают при этом эффективность лекарственного средства за счет его нейропротекторных свойств и способности к улучшению когнитивных функций [11, 36].

Существуют исследования, доказывающие наличие анксиолитического эффекта, что позволяет применять препарат в комплексной терапии тревожных расстройств, невротических и неврозоподобных состояний [6].

Также ЭМГПС демонстрирует эффективность в лечении сердечно-сосудистых заболеваний, например, ишемической болезни сердца, хронической сердечной недостаточности, атеросклерозе, в профилактике и лечении острого инфаркта миокарда и т.д. [37, 43].

Подобное широкое использование лекарственного средства обуславливает вероятность его участия в развитии межлекарственных взаимодействий [8]. С целью прогнозирования и профилактики развития фармакокинетических межлекарственных взаимодействий, повышения эффективности и безопасности фармакотерапии ЭМГПС целесообразно изучить принадлежность данного препарата к возможным субстратам и модуляторам активности ряда важнейших белков-транспортёров.

Так, для ЭМГПС были изучены субстратные свойства и ингибирующая активность в отношении гликопротеина Р (ABCB1) и OATP1B1/B3. Исследования показали, что препарат не является субстратом для указанных белков, а как ингибитор проявляет клиническую значимость только для гликопротеина Р в желудочно-кишечном тракте [5, 18].

В отношении BCRP было установлено, что ЭМГПС не является субстратом данного транспортера, но может проявлять ингибирующую активность в концентрации 100 мкМ и нарушать транспорт митоксантрона через монослой клеток Сасо-2 [16, 35]. Однако требуется изучить его возможную модулирующую активность во всем диапазоне концентраций для расчета количественной характеристики его активности в отношении BCRP и уточнения уровня его влияния – системный или воздействие на желудочно-кишечный тракт.

1.7 Фармакологическая характеристика ривароксабана

Ривароксабан – производное оксазолидона, антикоагулянт прямого действия, который был одобрен для клинического применения в 2008 г. Является пероральным прямым специфическим ингибитором фактора свертывания крови Ха. Особенности химической структуры (Рисунок 6) обеспечивают эффективное связывание с фактором Ха, которое является обратимым [243].

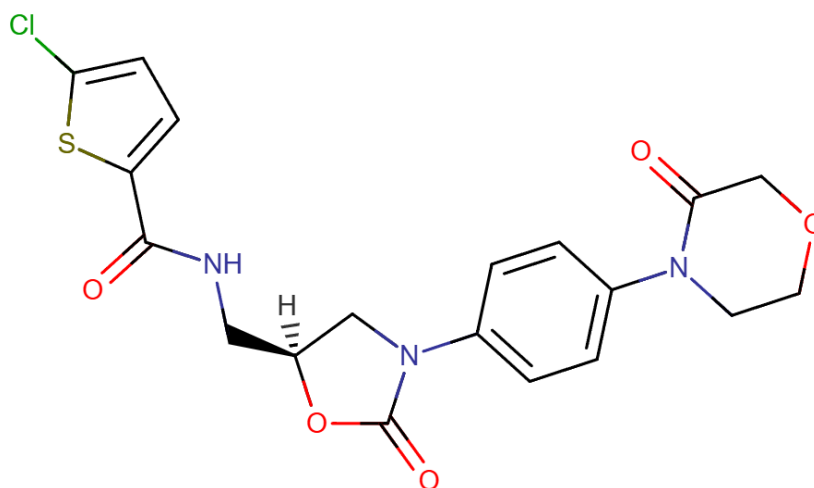


Рисунок 6 – Структурная химическая формула ривароксабана

Препарат характеризуется высокой биодоступностью при приеме внутрь (от 80 и до практически 100%), быстрым наступлением эффекта и предсказуемой дозозависимой фармакокинетикой без необходимости рутинного мониторинга коагуляции [170]. Он всасывается, достигая максимальной плазменной концентрации через 2–4 часа, не депонируется в организме при многократном приеме и отличается достаточной широтой терапевтического действия [241].

Для проявления антикоагулянтной активности ривароксабану не требуется связывание с антитромбином III в сравнении с косвенными ингибиторами фактора Ха (такими как фондапаринукс натрия и др.). Дополнительно препарат способен снижать выработку тромбина, тем самым увеличивая проницаемость и деградацию всего тромба, но не может ингибировать активность его уже сформировавшихся молекул [110].

Метаболизм ривароксабана происходит в печени под действием нескольких ферментов системы цитохрома P450 (CYP 3A4/5; CYP2J2), а также ферментов независимых от системы цитохрома. Большая часть биотрансформации препарата приходится на окисление морфолиновой группы и гидролиз амидных групп. Ривароксабан выводится как в виде метаболитов (в большей степени), так и в неизменном виде почками с мочой, для некоторой части метаболитов характерен гепатобилиарный путь экскреции [182]. Период полувыведения у лиц молодого возраста составляет 5–9 часов [241], для пожилых характерен диапазон 11–13 часов [106].

Важно отметить вклад белков-транспортёров в процессы переноса ривароксабана в организме. Было доказано, что в его активной почечной экскреции участвуют белок резистентности рака молочной железы (BCRP) и гликопротеин Р (Р-gr), влияние последнего при этом незначительно [149]. Соответственно, одновременный прием высокоактивных ингибиторов BCRP с ривароксабаном может повышать концентрацию последнего, а, следовательно, и риск кровотечений или проявления иных нежелательных побочных реакций [192].

Ривароксабан разрешен к применению с целью профилактики венозной тромбоэмболии после плановых операций по замене суставов (тазобедренного или

коленного), инсульта и системной эмболии у пациентов с неклапанной фибрилляцией предсердий, для лечения и профилактики тромбоза глубоких вен и лёгочной эмболии [64, 235]. Данный антикоагулянт широко используется в комбинированной терапии. Препарат применяется в сочетании с антитромбоцитарными средствами для профилактики атеротромботических состояний у взрослых с острыми коронарными синдромами и повышенными уровнями сердечных биомаркеров. Ривароксабан можно комбинировать с рядом иных препаратов, используемых в лечении сердечно-сосудистых заболеваний (антиаритмические, гипотензивные, гиполипидемические, антиоксидантные препараты и др.) [2, 8, 14, 94, 171].

Таким образом, ривароксабан широко используется в терапии сердечно-сосудистых заболеваний, хирургии и ортопедии, причем чаще всего в сочетании с различными лекарственными средствами патогенетической терапии, которые при этом могут оказаться ингибиторами белка-транспортера BCRP. Являясь субстратом BCRP, ривароксабан может иметь нежелательные межлекарственные взаимодействия с ингибиторами данного транспортера с выраженными клиническими последствиями, что требует тщательного изучения, профилактики и контроля.

ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

2.1 Эксперименты *in vitro*

2.1.1. Клеточная линия и условия культивирования

В экспериментах использовали клеточную линию Caco-2 (иммортиализованные клетки колоректальной аденокарциномы человека). Клеточная линия закуплена в ФГБУН «Институт цитологии» РАН (Санкт-Петербург), и была получена из ATCC (American Type Culture Collection, США).

Клетки культивировали при 37°C в условиях CO₂-инкубатора с 5% уровнем CO₂. В качестве питательной среды использовали Дульбекко модифицированную среду Игла (DMEM), с высоким содержанием глюкозы (4500 мг/л), содержащую L-глутамин (4 mM) (ООО «ПанЭко», Россия), 15% эмбриональной бычьей сыворотки («Sigma-Aldrich», Германия), 100 ЕД/мл и 100 мкг/мл пенициллина и стрептомицина (ООО «ПанЭко», Россия) соответственно. Эксперименты выполнялись в лаборатории клеточных технологий (подразделение МНОЛЦ ФГБОУ ВО РязГМУ Минздрава России).

При достижении монослоя на фласке (конфлюентность 90%) клетки высаживали на полупроницаемое мембранное дно внутренней (апикальной, Рисунок 7, а) камеры трансвелл-системы (Рисунок 7, б) (12 mm Transwell® with 0,4 µm Pore Polycarbonate Membrane Insert, Sterile, Corning Incorporated, США), окруженной внешней (базальной/базолатеральной) камерой. Подобная система является классической моделью для изучения транспорта соединений, так как апикальная камера имитирует просвет кишечника, а базолатеральная камера – кровь/мезентериальную лимфу желудочно-кишечного тракта [292].

Клетки культивировали в течение 21 суток в тех же условиях для образования монослоя и спонтанной дифференцировки в энтероцитоподобные клетки кишечника человека [35], смену питательной среды выполняли каждые 24 часа.

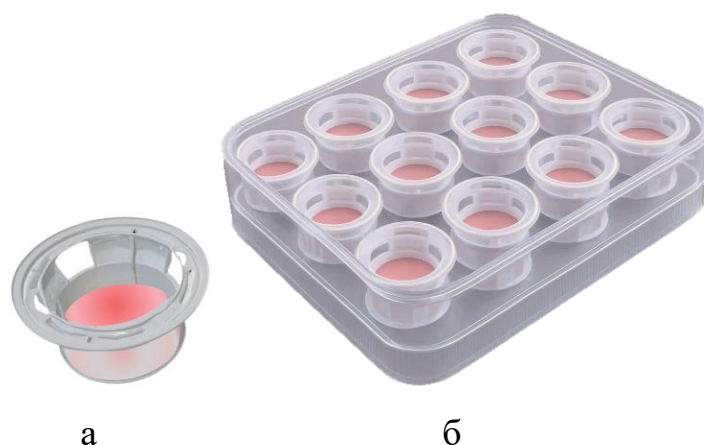


Рисунок 7 – Внешний вид апикальной камеры (а) и планшета для культивирования клеток (трансвелл-система) (б), наполненных питательной средой

Примечание – рисунки выполнены с помощью искусственного интеллекта Freepik AI (Freepik Company S.L., Испания)

Образование плотного монослоя клеток в трансвелл-системах оценивали по измерению трансэпителиального сопротивления (TEER) с помощью вольтметра Millicell® ERS-2 (Millipore, США). Транспортные эксперименты выполняли при значении TEER выше $500 \text{ мОм} \cdot \text{см}^2$.

2.1.2. Методика проведения транспортных экспериментов

Для проведения транспортных экспериментов питательную среду в камерах заменяли на транспортную среду с температурой 37°C , состоящую из раствора Хэнкса (ООО «ПанЭко», Россия) с добавлением 25мМ раствора HEPES (Gipco, Англия) и 1% раствора ДМСО (ООО «ПанЭко», Россия).

Активность BCRP оценивали по проникновению его субстрата сульфасалазина («Sigma-Aldrich», США) в концентрации 10 мкМ из апикальной камеры в базальную (*a-b* транспорт за счет пассивной диффузии против работы транспортера) и в обратном направлении (*b-a* транспорт за счет пассивной диффузии и работы транспортера).

Для оценки проницаемости сульфасалазина через монослой клеток из апикальной в базолатеральную камеру (*a-b* транспорт) и в обратном направлении

(*b-a* транспорт) рассчитывали коэффициент кажущейся проницаемости P_{app} по формуле (1):

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

где P_{app} – коэффициент кажущейся проницаемости;

dQ/dt – изменение концентрации субстрата в камере-реципиенте за время инкубации;

A – площадь полупроницаемой мембраны в апикальной камере трансвелл-системы;

C_0 – начальная концентрация субстрата в камере-доноре.

Дополнительно проводили расчет по формуле (2) эффлюксного коэффициента (ER) – отношения $P_{app} \text{ } b-a / P_{app} \text{ } a-b$, характеризующего участие белков-транспортеров, в частности BCRP, в переносе соединений.

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

Отношение коэффициентов (эффлюксный коэффициент), превышающее «2», свидетельствует об активном переносе соединения с участием белка-транспортера, а значение до 2 показывает отсутствие подобного транспорта.

Влияние ЭМГПС (ЭМГПС, «Мексидол», ООО НПК «Фармасофт», Россия) на активность BCRP оценивали при его добавлении в обе камеры трансвелл-системы вне зависимости от направления транспорта сульфасалазина в концентрациях 0,1 мкМ; 1 мкМ; 10 мкМ; 50 мкМ; 100 мкМ; 250 мкМ; 500 мкМ с 30 мин преинкубацией.

В качестве препарата сравнения использовали кверцетин – классический ингибитор BCRP («Sigma-Aldrich», США) в эквивалентных концентрациях.

Транспортные эксперименты выполняли в два этапа по три повтора, схема эксперимента представлена ниже (Рисунок 8).

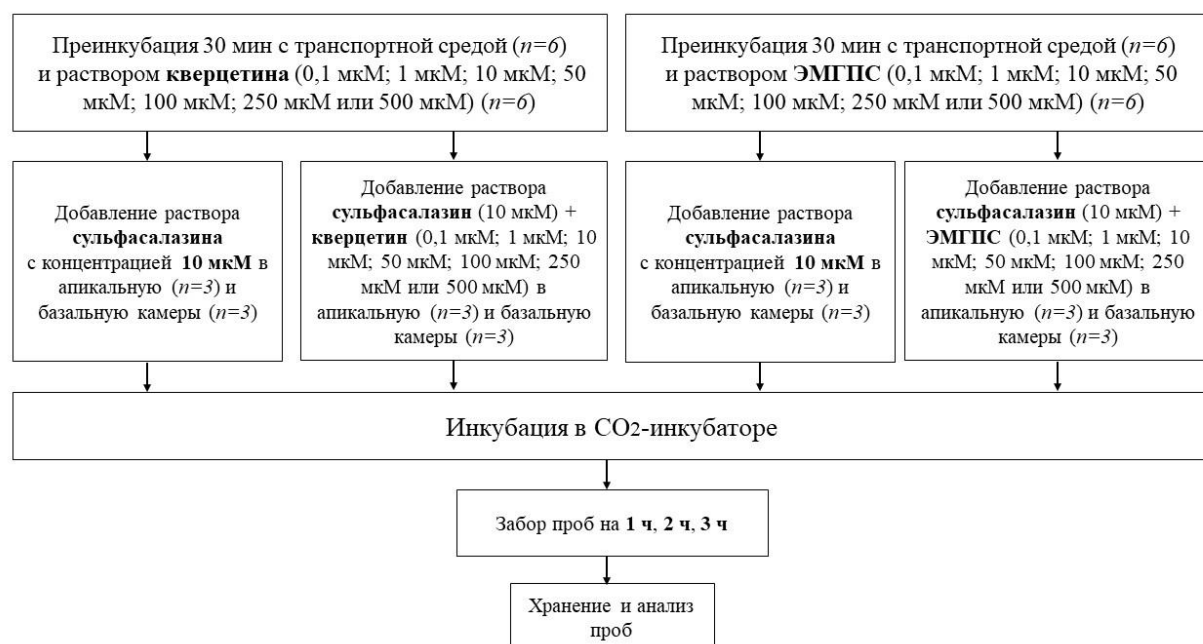


Рисунок 8 – Общая схема проведения транспортных экспериментов *in vitro*

На первом этапе добавление сульфасалазина производили в апикальную камеру (*a-b* транспорт, Рисунок 9), которая служила камерой-донором. Забор проб в объеме 100 мкл осуществляли на 1, 2, 3 час эксперимента из камеры-реципиента – противоположная (базальная/базолатеральная) камера, заполненная транспортной средой без добавления субстрата.

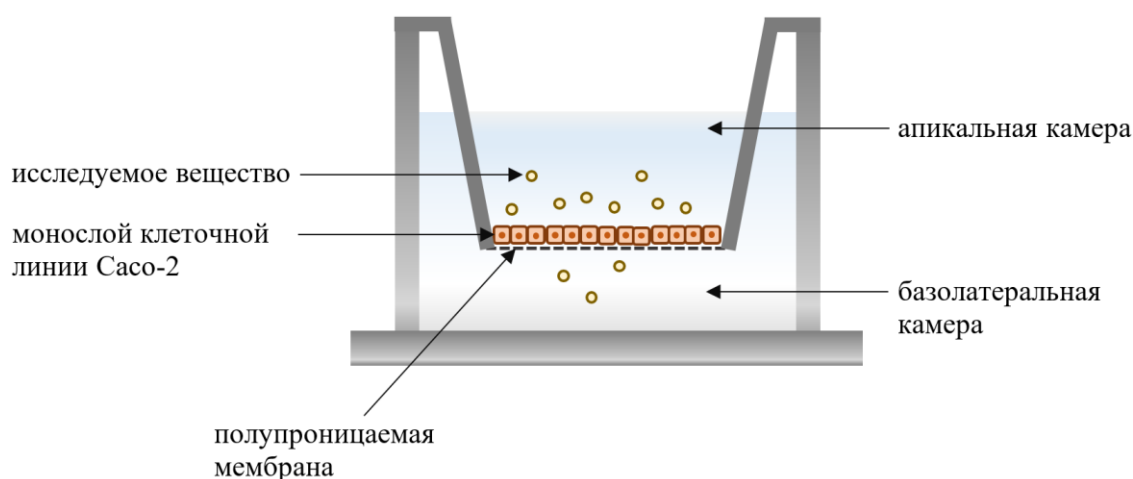


Рисунок 9 – Схема *a-b* транспорта исследуемого вещества, внесенного в апикальную камеру, через полупроницаемую мембрану

Во время второго этапа добавляли сульфасалазин в базальную камеру (камера-донор), а забор проб проводили из апикальной (камера-реципиент) через временные промежутки аналогичные первому этапу (*b-a* транспорт).

Полученные пробы помещали в микроцентрифужные пробирки типа «Эппендорф», замораживали в морозильной камере при -80°C и хранили до проведения хроматографического анализа.

Для кверцетина и ЭМГПС рассчитывали значение концентрации полумаксимального ингибирования (IC_{50}) с помощью нелинейной регрессии на основе трехпараметрической логистической функции. Кроме того, была оценена клиническая значимость системного ингибирования ЭМГПС (соотношение $C_{\text{max}} / \text{IC}_{50}$) и ингибирования в желудочно-кишечном тракте (соотношение доза ЭМГПС / 250 мг / IC_{50}) [150, 181].

Утилизация использованного клеточного материала осуществлялась в соответствии с СОП, предусмотренными в лаборатории клеточных технологий.

2.2 Эксперименты *in vivo*

В качестве предполагаемой тест-системы для исследований *in vivo* использовали самцов кроликов породы Советская Шиншилла, крыс самцов стока Wistar и мышей самцов стока ICR ($n=3$ для каждого вида). В предварительном исследовании оценивали относительное количество BCRP (методом вестерн-блот) в тканях тощей кишки, печени и почек указанных видов лабораторных животных для сравнительного анализа уровня транспортера и выбора наиболее адекватной тест-системы для последующего исследования функциональной активности BCRP. Выбор вида животных был сделан по наибольшему количеству белка-транспортера, зафиксированному в тканях. Выбор тканей обусловлен данными научной литературы и их ключевым участием в процессах фармакокинетики.

Забор тканей и анализ количества BCRP методом вестерн-блот

Животных вводили в состояние наркоза внутримышечным введением золетила в дозе 30 мг/кг массы, забирали необходимые для анализа органы. Образцы тканей измельчали и гомогенизировали в NP40 Cell Lysis Buffer Thermo («Thermo Fisher Scientific», США) с добавлением смеси ингибиторов протеиназ

(«Sigma-Aldrich», Германия) с помощью гомогенизатора Поттера (16–20 ударов) в соотношении масса ткани (мг): объем буфера (мл) 1:1, а затем инкубировали в течение 3 ч при 4°C и постоянном перемешивании. Полученный гомогенат центрифугировали при 22440 *g* в течение 10 мин («AvantiJXN-3», «Beckman Coulter», США). Супернатант использовали для анализа. 30 мкг белков (количество белка анализировали методом Брэдфорда) подвергали электрофорезу с использованием TGX Stain-Free FastCast Acrylamide Kit («Bio-Rad») в буферной системе Laemmli («Bio-Rad»). Перед загрузкой образцы обрабатывали в соответствии с протоколом Bio-Rad, их смешивали с буфером для образцов Laemmli («Bio-Rad»), содержащем 2,5% 2-меркаптоэтанола («Bio-Rad») в соотношении 1:3, инкубировали 5 мин при температуре 70°C. Электрофорез проводили при 100 В в течение 90 мин. После окончания электрофореза образцы переносили полусухим методом на нитроцеллюлозную мембрану с размером пор 0,2 мкм при помощи прибора Transblot (Bio-Rad, США). Затем мембраны на 1 час помещали в раствор казеина (Bio-Rad, США) с добавлением Tween-20 («Sigma», Германия). Для определения относительного количества BCRP методом вестерн-блот использовали первичные кроличьи поликлональные антитела (AF5177 ABCG2 Antibody, Affinity, Китай) в разведении 1:200 и инкубацией в течение 2 ч при 37°C. Визуализацию первичных антител осуществляли с использованием вторичных козлиных антител (Goat anti-Rabbit IgG (H+L) Cross-Adsorbed Secondary Antibody, HRP, "Invitrogen", США) в разведении 1:4000 и инкубацией в течение 1 ч при комнатной температуре.

Молекулярная масса белков была подтверждена путем сравнения с маркерами молекулярной массы (Precision plus protein standards Dual Color, «Bio-Rad», США). Интенсивность полученных полос (бэндов) анализировали денситометрически с помощью программного обеспечения ImageLab («Bio-Rad», США). Количество BCRP оценивали относительно содержания белка домашнего хозяйства GAPDH (первичные GAPDH Loading Control Monoclonal Antibody (GA1R), DyLight 68, «Invitrogen», США, разведение 1:1000, вторичные антитела –

вторичные кроличьи антитела к первичным антителам GAPDH – Rabbit-anti-Mouse IgG (H+L) Secondary Antibody, HRP, «Invitrogen», США, разведение 1:4000).

2.2.1. Животные и условия их содержания

В дальнейшем исследовании использовали 20 половозрелых самцов кроликов породы Советская Шиншилла, массой 3000 г – 4000 г. Животные, полученные из питомника «ООО КролИнфо» (Московская область, Орехово-Зуевский район, деревня Новая), прошли карантинный режим вивария ФГБОУ ВО РязГМУ Минздрава России в течение двух недель и имели все необходимые ветеринарные свидетельства.

В ходе исследования животных содержали в условиях вивария ФГБОУ ВО РязГМУ Минздрава России, с системой «чистого» и «грязного» коридоров и автоматической сменой дневного и ночного периода. В помещении поддерживались температура 22–24°C, относительная влажность воздуха 55–65%, при как минимум 12-кратной смене воздушного объёма в час, и естественное освещение.

Для каждого животного была предусмотрена индивидуальная клетка с подстилкой из опилок деревьев лиственных пород. Кормление осуществляли *ad libitum* в первой половине дня при свободном доступе к воде, рацион соответствовал ГОСТ 34566-2019. Накануне забора крови животных лишали пищи при свободном доступе к воде. Работу с животными выполняли в соответствии с правилами надлежащей лабораторной практики [28].

Выполняемые эксперименты были одобрены комиссией по контролю за содержанием и использованием лабораторных животных ФГБОУ ВО РязГМУ Минздрава России (протокол №11 от 29.01.2018 г., протокол №108 от 09.09.2025 г.).

Животных использовали в последовательном эксперименте, многократно, между экспериментами выдерживали «отмывочный» период – 7 суток для выведения исследуемых лекарственных препаратов из организма и восстановления потерянного объема крови после ее забора для фармакокинетического исследования [27]. Подобный подход позволяет исключить влияние индивидуальных особенностей организма животных на значения параметров в разных сериях экспериментов. При завершении эксперимента эвтаназию осуществляли в соответствии с СОП вивария ФГБОУ ВО РязГМУ им.акад. И.П. Павлова Минздрава России передозировкой средств для наркоза (внутримышечным введением золетила в дозе 30 мг/кг массы и ксилазина в дозе 20 мг/кг массы с помощью стерильного одноразового шприца объемом 2 мл).

2.2.2. Дизайн исследования

Животные были рандомизированы на 3 группы по 6-7 особей, согласно Руководству по проведению доклинических исследований лекарственных средств под редакцией А.Н. Миронова и др. от 2012 года [30]. Дозы исследуемых соединений выбирались, исходя из литературных данных.

Первую группу животных ($n=6$) в последовательном эксперименте использовали для изучения влияния кверцетина на фармакокинетику сульфасалазина. Достоверное увеличение содержания субстрата BCRP сульфасалазина в организме кроликов и замедление его выведения на фоне кверцетина показывает ингибирование изучаемого белка-транспортера.

В первой серии – оценивали исходные фармакокинетических параметры субстрата BCRP сульфасалазина. Животным однократно внутрижелудочно через зонд вводили суспензию сульфасалазина, приготовленную из лекарственного препарата (таблетки «Сульфасалазин», 500 мг, ООО «Озон», Россия), в дозировке 125 мг/кг в объеме 4 мл [227]. За полчаса до этого животным вводили воду очищенную в объеме, аналогичном объему суспензии изучаемого препарата (имитация предварительного введения ингибитора). После введения

сульфасалазина проводили забор крови у животных в 12-и временных точках для построения фармакокинетической кривой и расчета основных фармакокинетических параметров.

Вторая серия – изучение влияния однократного введения кверцетина на фармакокинетику сульфасалазина. После «отмывочного» периода животным однократно внутрижелудочно вводили классический ингибитор белка-транспортера (кверцетин). Использовали суспензию кверцетина (таблетки биологически активной добавки (БАД) «Дигидрокверцетин», 100 мг, «Эвалар», Россия) в дозировке 100 мг/кг [198, 225]. Через полчаса животным вводили суспензию сульфасалазина – 125 мг/кг. После применения сульфасалазина проводили забор крови у животных в 12-и временных точках для оценки его фармакокинетических параметров.

Третья серия – изучение влияния курсового введения кверцетина на фармакокинетику сульфасалазина. После «отмывочного» периода животным выполняли курсовое введение классического ингибитора белка-транспортера (кверцетина). Использовали суспензию кверцетина («Дигидрокверцетин», 25 мг, «Эвалар», Россия) в дозе 25 мг/кг массы [198, 225] внутрижелудочно один раз в день в течение 7 дней. На 7-е сутки через полчаса после применения последней дозы кверцетина животным вводили суспензию сульфасалазина – 125 мг/кг, после чего проводили забор крови в 12-и временных точках для оценки его фармакокинетических параметров.

Вторую группу животных ($n=7$) использовали в последовательном эксперименте для изучения влияния ЭМГПС на фармакокинетику сульфасалазина. Достоверное увеличение фармакокинетических параметров субстрата BCRP сульфасалазина, характеризующих его концентрацию в крови, на фоне тестируемого препарата показывает ингибирование изучаемого белка-транспортера.

В первой серии – оценивали исходные фармакокинетических параметры субстрата BCRP сульфасалазина. Животным однократно внутрижелудочно через зонд вводили суспензию сульфасалазина, приготовленную из лекарственного

препарата (таблетки «Сульфасалазин», 500 мг, ООО «Озон», Россия), в дозировке 125 мг/кг в объеме 4 мл [227]. За полчаса до этого животным вводили воду очищенную, в объеме, аналогичном объему суспензии изучаемого препарата (имитация предварительного введения ингибитора). После введения сульфасалазина проводили забор крови у животных в 12-и временных точках для построения фармакокинетической кривой и расчета основных фармакокинетических параметров.

Вторая серия – изучение влияния однократного введения ЭМГПС на фармакокинетику сульфасалазина. После «отмывочного» периода животным однократно внутрижелудочно вводили ЭМГПС – предполагаемый ингибитор белка-транспортера. Использовали суспензию ЭМГПС (таблетки «Мексидол», дозировка 250 мг) в дозе 50 мг/кг массы [18], через полчаса выполняли введение суспензии сульфасалазина – 125 мг/кг и проводили забор крови у животных в 12-и временных точках для оценки его фармакокинетических параметров.

Третья серия – изучение влияния курсового введения ЭМГПС на фармакокинетику сульфасалазина. После «отмывочного» периода животным внутрижелудочно вводили суспензию ЭМГПС в дозе 50 мг/кг массы 1 раз в день в течение 7 дней. На 7-е сутки через полчаса после введения последней дозы ЭМГПС вводили суспензию сульфасалазина – 125 мг/кг внутрижелудочно, затем проводили забор крови у животных в 12-и временных точках для оценки его фармакокинетических параметров.

Третью группу кроликов ($n=7$) использовали для изучения влияния ЭМГПС на фармакокинетику и фармакодинамику ривароксабана.

Первая серия – изучение исходных фармакокинетических параметров субстрата BCRP – ривароксабана. Животным однократно внутрижелудочно вводили суспензию ривароксабана приготовленную из лекарственного препарата (таблетки «Ксарелто», 10 мг, производитель «Bayer AG», Германия), в дозировке 3 мг/кг массы [111, 219]. За полчаса до этого животным вводили объем воды очищенной, соответствующий объему суспензии препарата. После введения

ривароксабана забирали кровь у животных в 10-и временных точках для оценки его фармакокинетических параметров.

Вторая серия – изучение влияния курсового введения предполагаемого ингибитора BCRP – ЭМГПС на фармакокинетику ривароксабана. Животным в течение 7 суток внутрижелудочно вводили суспензию ЭМГПС в дозе 50 мг/кг один раз в день. На 7-е сутки через полчаса после введения последней дозы ЭМГПС внутрижелудочно вводили суспензию ривароксабана в дозе 3 мг/кг массы. После введения ривароксабана забирали кровь у животных в 10-и временных точках для оценки его фармакокинетических параметров.

Общая схема дизайна эксперимента представлена ниже (Рисунок 10).

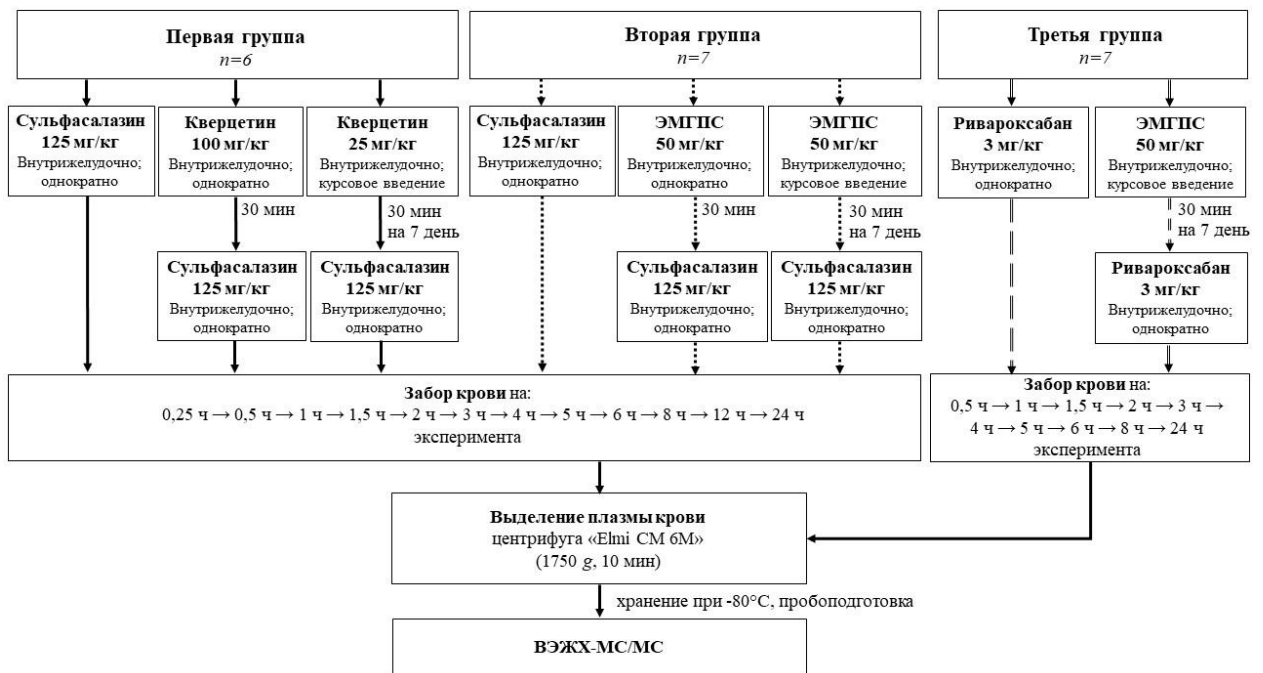


Рисунок 10 – Общая схема проведения экспериментов *in vivo*

Суспензии всех указанных препаратов изготавливались непосредственно перед каждым введением отдельному животному для увеличения седиментационной и агрегативной устойчивости, а также повышения точности дозирования. Для изготовления лекарственный препарат (или БАД) измельчали в ступке до порошкообразного состояния при помощи пестика, после осуществляли введение допустимого объема воды очищенной на 1 кг массы животного и

тщательно диспергировали до получения суспензии. Дополнительное добавление стабилизаторов для указанных препаратов не требовалось.

После введения препаратов в каждой серии осуществляли забор крови путем надреза одноразовым скальпелем (скарификатором) краевой вены уха животного, кровь собирали в гепаринизированные центрифужные пробирки на 15 мл в следующие временные точки – 0,25 ч., 0,5 ч., 1 ч., 1,5 ч., 2 ч., 3 ч., 4 ч., 5 ч., 6 ч., 8 ч., 12 ч., 24 ч. для серий оценки фармакокинетики сульфасалазина. Для серий исследования фармакокинетики ривароксабана были выбраны следующие временные точки – 0,5 ч., 1 ч., 1,5 ч., 2 ч., 3 ч., 4 ч., 5 ч., 6 ч., 8 ч., 24 ч.

Объем забираемой крови во всех экспериментах не превышал 1–1,2 мл за одну временную точку и 12–14,4 мл в течение всего эксперимента.

Затем центрифугированием (центрифуга «Elmi CM 6M», 1750 g, 10 мин) получали плазму крови, которую переносили в пробирки типа «Эппендорф» объемом 1,5 мл. Полученная плазма хранилась в морозильной камере («SCANDIFROST VT60», Китай) при -80°C до проведения хроматографического анализа.

С использованием модельнонезависимого метода рассчитывали следующие фармакокинетические параметры сульфасалазина и ривароксабана: $C_{\max}$ – максимальная концентрация (нг/мл); AUC_{0-t} – площадь под фармакокинетической кривой концентрация-время от нуля до времени последнего забора крови (нг*ч/мл); $AUC_{0-\infty}$ – площадь под фармакокинетической кривой концентрация-время от нуля до бесконечности (нг*ч/мл), $T_{1/2}$ – период полувыведения (ч). Изучение принадлежности к модуляторам активности оценивали по изменению 90% ДИ отношения средних геометрических фармакокинетических параметров: если значение достоверно выходит за пределы 0,80-1,25 в сторону увеличения по сравнению с исходными, то тестируемое вещество – ингибитор изучаемого транспортёра, если 90% ДИ ниже данного диапазона – то индуктор.

Для оценки влияния ЭМГПС на фармакодинамику ривароксабана определяли протромбиновое время (ПТВ) для плазмы крови кроликов, так как

имеющиеся данные демонстрируют корреляцию удлинения этого показателя с концентрацией ривароксабана в плазме [63, 94, 234]. Забор крови для оценки ПТВ выполняли у интактных животных 3 группы ($n=7$) до начала эксперимента, через 4 часа после введения ривароксабана (1 серия) и ривароксабана после курсового применения ЭМГПС (2 серия). Анализ осуществляли по методу Квика с использованием коммерческого лиофилизированного тромбопластина, содержащего кальций – Thromborel® S (Siemens Healthcare Headquarters, Германия). Перед исследованием тромбопластин растворяли в дистиллированной воде и нагревали до 37°C с его последующей инкубацией на водяной бане в течение 45 минут при этой же температуре. Далее проводили исследование в автоматическом коагулометре Sysmex CA 660 (Sysmex Corporation, Япония): для активации процесса коагуляции плазму инкубировали с оптимальным количеством тромбопластина и измеряли время формирования сгустка фибрина. Значения протромбинового времени получены в секундах.

2.3 Методики хроматографического анализа

2.3.1. Условия хроматографического анализа сульфасалазина

Работа выполнена на высокоэффективном жидкостном хроматографе «Ultimate 3000» («ThermoFisher», США) и масс-спектрометре TSQ Fortis («ThermoFisher», США). Управление совмещённой системой ВЭЖХ-МС/МС и обработку данных проводили при помощи программного обеспечения «Thermo Scientific Xcalibur (ver. 4.2.47)».

Для выполнения хроматографического анализа использовали следующие реактивы: вода ВЭЖХ-МС («Panreac», Испания), кислота муравьиная 98% для аналитики («Panreac», Испания), метанол для HPLC («Merck», Германия).

Использовали колонку Luna Omega 3μm Polar C18 50x2.1, 3μm и предколонку аналогичного типа – C18 3μm. Температура разделения составила

35°C, скорость потока – 0,3 мл/мин. Применяли градиентный режим элюирования по следующей программе (Таблица 4).

Таблица 4 – Соотношение компонентов подвижной фазы в зависимости от времени, прошедшего с начала хроматографического анализа

Время (мин)	Растворитель А: водный раствор муравьиной кислоты 0,1%, %	Растворитель С: метанол, %
0,0	60	40
0,3	15	85
4,0	1	99
6,0	60	40
8,0	60	40

Ионизацию молекул проводили в режиме негативной ионизации, метод ионизации – Н-ESI (высокотемпературный электроспрей) при атмосферном давлении. Напряжение ионизации – 2500 В.

Метод детектирования – tandemная масс-спектрометрия. Режим детектирования: вспомогательный газ – азот, оболочечный газ (Sheath gas) – 50 отн.ед. (Arb), усиливающий газ (Aux gas) – 10 отн.ед. (Arb), продувочный газ (Sweep gas) – 1 отн.ед. (Arb). Температура ион-транспортирующего капилляра – 300°, температура испарителя – 350°C.

В качестве фрагментирующего газа использовали аргон с потоком 2 mTorr (мТорр), фрагментация в источнике составила 10В.

Таблица 5 – Масс-переходы соединений

	Прекурсор, m/z	Продукт, m/z	Энергия столкновения, В	Напряжение линз, В
Сульфасалазин	397,1	197,1*	24	57
		289,1	24	57
Валсартан	434,2	179,1*	27	104
		350,2	26	104
Примечание – * – переходы, используемые для количественного анализа				

Условия детектирования приведены в Таблице 5. Валсартан использовался как внутренний стандарт.

Объём вводимой пробы – 10 мкл, время анализа – 8 мин. Время пика сульфасалазина в данных условиях составило 3,2 мин. Время пика валсартана – 3,5 мин.

Для разработки и валидации методики количественного определения использовали субстанции сульфасалазина и валсартана («Sigma Aldrich», Германия).

Структурная формула сульфасалазина (аналит) и продуктов его фрагментации представлена на Рисунке 11.

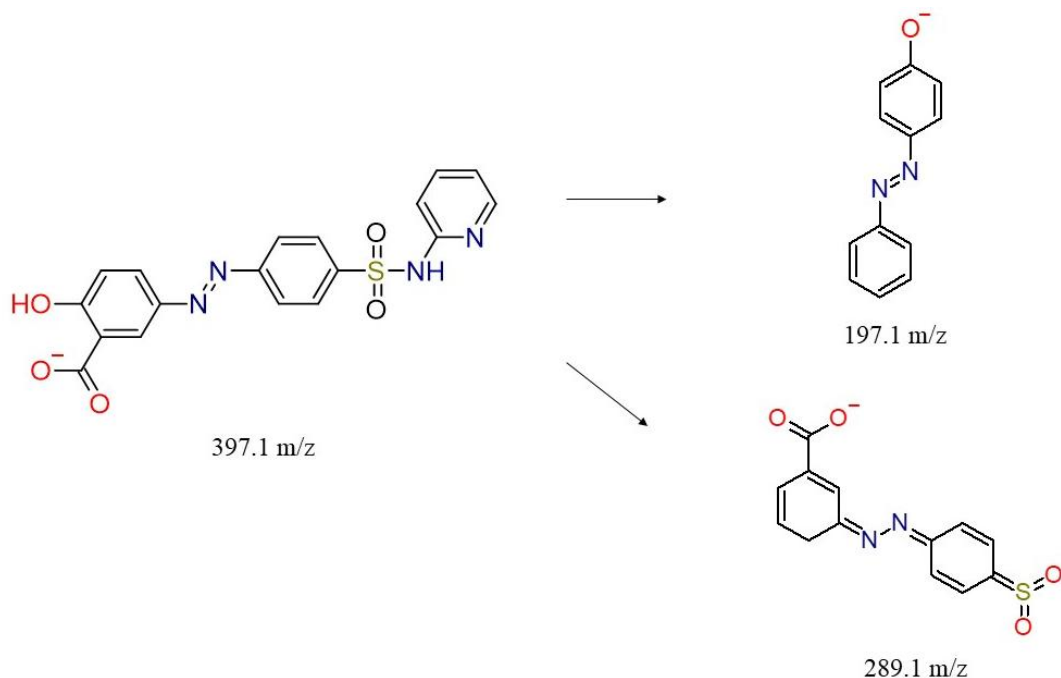


Рисунок 11 – Структурная формула сульфасалазина и основных продуктов его фрагментации

Валсартан (Рисунок 12) использовался в концентрации 100 нг/мл.

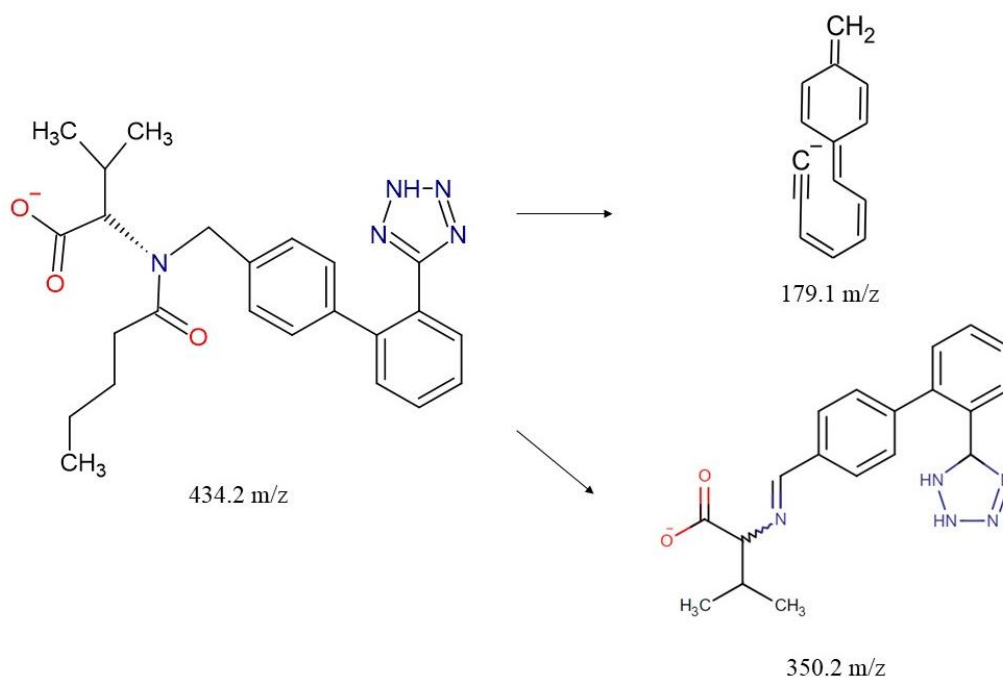


Рисунок 12 – Структурная формула валсартана и основных продуктов его фрагментации

В качестве матриц использовали транспортную среду после инкубирования с клетками линии Сасо-2 в течение 3 часов и плазму крови интактных самцов кроликов породы Советская Шиншилла. Образцы матриц замораживали и хранили при -80°C до анализа.

Приготовление сток-раствора (матричного раствора) и калибровочных растворов

Матричный раствор представлял собой раствор сульфасалазина в метаноле в соотношении 1:10 с концентрацией 0,1 мг/мл (100000 нг/мл). Для проведения валидации получали калибровочные стандарты путем разведения матричного раствора транспортной средой для серии проб, полученных в экспериментах *in vitro*. Для проб, полученных в ходе экспериментов *in vivo*, использовали разбавление матричного раствора интактной плазмой крови кроликов. Диапазон концентраций сульфасалазина выбирали исходя из концентраций, ожидаемых в экспериментах на клетках линии Сасо-2 и на животных. Концентрации целевых соединений в анализируемых пробах определяли методом абсолютной калибровки.

Для определения сульфасалазина в транспортной среде был выбран следующий диапазон концентраций для калибровочных стандартов: 5000 нг/мл,

4000 нг/мл, 2500 нг/мл, 1000 нг/мл, 500 нг/мл, 100 нг/мл, 50 нг/мл, 15 нг/мл, 10 нг/мл, 5 нг/мл. В плазме крови кроликов для определения сульфасалазина использовали калибровочные стандарты в концентрациях: 20000 нг/мл, 16000 нг/мл, 10000 нг/мл, 5000 нг/мл, 1000 нг/мл, 500 нг/мл, 250 нг/мл, 150 нг/мл, 100 нг/мл, 50 нг/мл.

Пробоподготовка

Извлечение сульфасалазина из транспортной среды осуществляли смесью метанола с валсартаном (100 нг/мл). Аналогичную смесь использовали для осаждения белков в плазме крови и извлечения из нее сульфасалазина. Для этого смешивали 200 мкл объекта (транспортная среда/плазма крови) с 600 мкл метанола с валсартаном. Далее перемешивали при помощи встряхивателя Vortex (Heidolph, Германия) 5 минут, центрифугировали при +4°C 10 минут, 21000 g, центрифуга – Avanti JXN-3 Beckman Coulter («Beckman Coulter», США).

После проведения пробоподготовки полученные супернатанты переносили в вials объемом 1 мл и помещали в автосамплер. Объём инъекции при этом составлял 10 мкл.

2.3.2. Валидация методики хроматографического анализа сульфасалазина

Биоаналитический метод был валидирован по следующим параметрам: селективность, предел количественного определения, линейность, правильность, прецизионность, эффект переноса, стабильность, матричный эффект и эффект извлечения [29].

Для оценки селективности проводили анализ холостой пробы культуральной среды и интактной плазмы крови без добавления стандарта сульфасалазина. Также был проведен анализ образцов транспортной среды и интактной плазмы крови кроликов с добавлением сульфасалазина в концентрации, являющейся нижним пределом количественного определения для указанных сред. В случае отсутствия пиков со временем удерживания сульфасалазина и валсартана на хроматограммах

образцов холостой транспортной среды и интактной плазмы, методику считали селективной.

Нижний предел количественного определения (НПКО) устанавливали путем оценки отношения сигнала к шуму, значение которого не должно быть ниже 10, а также правильности и прецизионности определения, которые не должны превышать 20 %.

Для построения *калибровочных кривых* выполняли анализ образцов холостых матриц транспортной среды и плазмы крови кроликов с добавлением калибровочных растворов. По полученным значениям строили по 3 калибровочных графика в координатах: отношение площади пика сульфасалазина к площади пика валсартана от концентрации сульфасалазина. Также в ходе анализа получили уравнения линейной регрессии для каждой из биологических сред. Для подтверждения линейности методики коэффициенты корреляции должны составлять не менее 0,99, а отклонения концентраций калибровочных образцов от номинальных значений в транспортной среде и плазме крови не должны превышать 15% для всех значений и 20% для НПКО.

Правильность и прецизионность оценивали путем проведения анализа в рамках 3 последовательностей (циклов), брали по 5 образцов для каждого уровня концентраций аналитов для культуральной среды и для плазмы крови. Для расчета правильности и прецизионности на уровне между циклами использовали данные ($n=15$ для каждой концентрации), полученные в течение 1-й, 2-й и 3-й последовательностей. Полученные величины относительного стандартного отклонения (прецизионность) и относительной погрешности (правильность) считаются нормой при значениях не более 20% на уровне НПКО, не более 15% – для остальных точек.

Влияние (эффект) переноса оценивали при последовательном анализе проб с максимальной концентрацией сульфасалазина из аналитического диапазона методики в транспортной среде и в плазме крови и последующем анализе холостых матриц. При этом на хроматограммах холостых матриц должны отсутствовать пики, соответствующие по времени удерживания пикам сульфасалазина.

Матричный эффект изучали путем анализа проб холостой матрицы от шести различных кроликов после экстракции с добавлением рабочих растворов аналитов для получения нижнего и верхнего контролей качества и раствор внутреннего стандарта. Также готовили растворы сульфасалазина и валсартана с теми же концентрациями на воде. Матричный эффект рассчитывали, как отношение площади пиков в присутствии матрицы к площади пиков в отсутствие матрицы для каждого контроля качества и внутреннего стандарта. Также рассчитывали нормализованный эффект матрицы по внутреннему стандарту (как частное от деления эффекта матрицы анализируемого вещества на эффект матрицы внутреннего стандарта). Относительное стандартное отклонение эффекта матрицы сульфасалазина, валсартана и нормализованного матричного эффекта не должно превышать 15%. Матричный эффект в транспортной среде не оценивали так как она имеет одинаковый состав, а в эксперименте обычно используется один клон клеток.

Степень извлечения сульфасалазина из плазмы крови кроликов оценивали по соотношению площадей пиков нижнего и верхнего контролей качества сульфасалазина и валсартана к площади пиков контролей качества и внутреннего стандарта, приготовленных на плазме после экстракции. Относительное стандартное отклонение степени извлечения сульфасалазина и валсартана не должно превышать 15%.

Также оценивалась *стабильность* сульфасалазина и валсартана в составе рабочих растворов, стабильность аналита в матрицах при хранении при -80°C в течение 30 дней, при трехкратном цикле заморозки-разморозки, а также стабильность после пробоподготовки и хранения в автосамплере при $+6^{\circ}\text{C}$ в течение 24 ч. Для анализа каждого вида стабильности использовали нижний и верхний контроли качества (QC) в трех повторениях. Стабильность рабочих растворов оценивали путём их хроматографического анализа после разведения в матрице до концентраций нижнего и верхнего контролей качества. Рассчитывали отклонение полученных концентраций после хранения образцов от их исходных

значений. Изменения концентраций аналита при тестировании всех видов стабильности не должны превышать 15%.

2.3.3. Условия хроматографического анализа ривароксабана

Количественное определение ривароксабана проводили с использованием ранее разработанной и валидированной методики с аналитическим диапазоном 10 – 10000 нг/мл. Хроматографическое разделение и детектирование проводили на высокоэффективном жидкостном хроматографе Nexera Series (Shimadzu, Япония) и тандемном масс-спектрометрическом детекторе AB Sciex Triple Quad 3500 (AB Sciex, Сингапур). Обработку первичных данных проводили при помощи программного обеспечения Analyst Software (ver. 1.7.3), (США). Методика была валидирована по следующим параметрам: селективность, нижний предел количественного определения, правильность, прецизионность, матричный эффект, эффект извлечения, эффект разбавления, эффект переноса, стабильность.

Использовали колонку Luna Omega 3μm Polar C18 50x2,1, 3μm и предколонку аналогичного типа – C18 3μm. Температура термостата колонок составила 40°C, скорость потока – 0,5 мл/мин. Применяли градиентный режим элюирования по следующей программе (Таблица 6).

Таблица 6 – Соотношение компонентов подвижной фазы в зависимости от времени, прошедшего с начала хроматографического анализа

Время (мин)	Растворитель А: 10мМ водный раствор формиата аммония, %	Растворитель Б: метанол, %
0,00	73	27
1,00	40	60
2,50	10	90
4,00	5	95
6,00	5	95
6,01	73	27

Ионизацию молекул проводили в режиме положительной ионизации, метод ионизации – H-ESI (высокотемпературный электроспрей) при атмосферном давлении. Напряжение ионизации – 5500 В.

Метод детектирования – тандемная масс-спектрометрия. Режим детектирования: вспомогательный газ 1 (Ion Source Gas 1) – 50 psi, Вспомогательный газ 2 (Ion Source Gas 2) – 50 psi, экранирующий газ (Curtain gas) – 35 psi, фрагментирующий газ (Collision gas) – 5 psi. Температура испарителя – 550°C, напряжение на игле (IonSpray Voltage) – 5500 В.

Условия детектирования приведены в Таблице 7. Входной и выходной потенциал для двух продуктов ривароксабана и хлорпромазина (использовали как внутренний стандарт) составил 10 В.

Таблица 7 – Масс-переходы соединений

	Прекурсор, m/z	Продукт, m/z	Энергия столкновения, В	Потенциал декластеризации, В
Ривароксабан	436,1	144,9*	33	57
		231,1	29	57
Хлорпромазин	319,1	58,0	20	120
		86,1*	20	120
Примечание – * – переходы, используемые для количественного анализа				

Объём вводимой пробы – 12 мкл, время анализа – 6,01 мин. Время пика ривароксабана в данных условиях составило – 5,31 мин, хлорпромазина – 4,79 мин.

Структурная формула ривароксабана (аналит) и продуктов его фрагментации представлена на Рисунке 13.

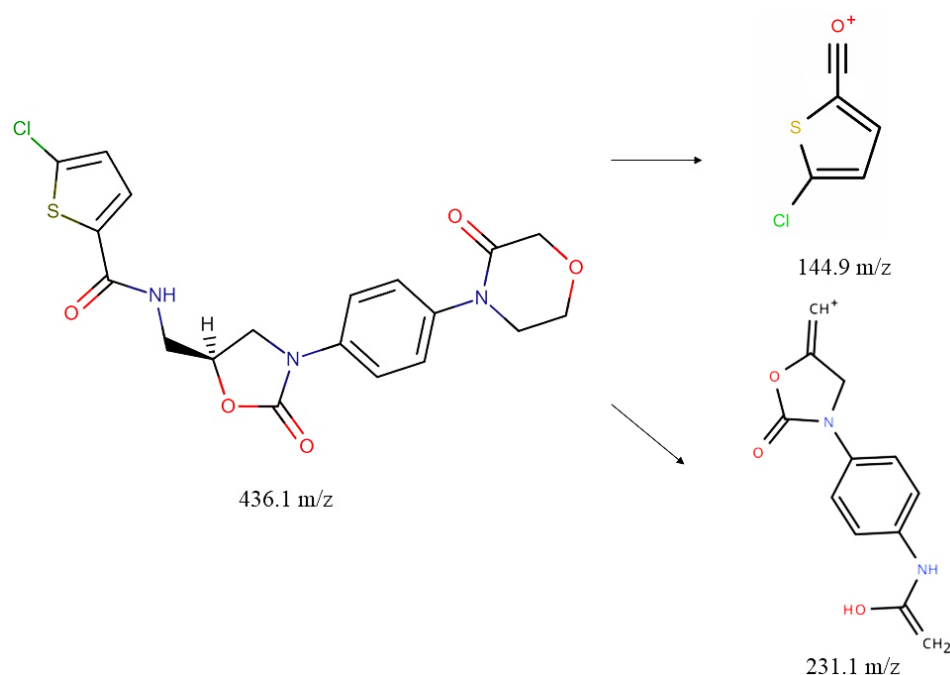


Рисунок 13 – Структурная формула ривароксабана и основных продуктов его фрагментации

Хлорпромазин применялся в концентрации 10 нг/мл (Рисунок 14).

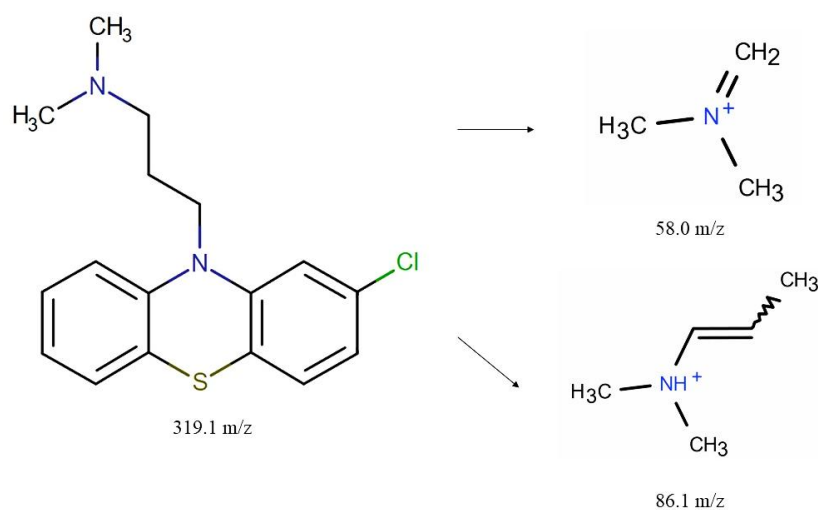


Рисунок 14 – Структурная формула хлорпромазина и основных продуктов его фрагментации

Пробоподготовка

200 мкл анализируемой плазмы крови кроликов смешивали с 800 мкл метанола, содержащего 10 нг/мл хлорпромазина в качестве внутреннего стандарта. После встряхивания полученной смеси на встряхивателе Vortex (Heidolph, Германия) при 3000 об/мин в течение 5 секунд пробирки со смесью перемещали на

шейкер для встряхивания при 500 об/мин в течение 10 минут. Затем образцы центрифугировали (центрифуга Avanti JXN-3 Beckman Coulter («Beckman Coulter», США) при 10000 g в течение 10 минут при 4°C. Надосадочную жидкость в объеме 700 мкл переносили в вials для дальнейшего ввода 12 мкл раствора в аналитическую систему.

Приготовление сток-раствора (матричного раствора) и калибровочных растворов

Изначально готовили маточный раствор: к точной навеске стандарта ривароксабана 4 мг добавляли 40 мл метанола для получения метанольного раствора ривароксабана с концентрацией 100 мкг/мл. Из него далее получали разведения со следующими концентрациями: 10000 нг/мл; 5000 нг/мл; 3000 нг/мл; 1000 нг/мл; 500 нг/мл; 300 нг/мл; 100 нг/мл; 50 нг/мл; 30 нг/мл; 10 нг/мл.

Приготовление калибровочных растворов перед началом аналитического цикла проводили по следующему алгоритму: к 180 мкл образца интактной плазмы крови добавляли 20 мкл раствора концентрата. Полученную смесь встряхивали на встряхивателе Vortex (Heidolph, Германия) при 3000 об/мин в течение 5 секунд. К смеси добавляли 800 мкл метанола, содержащего 10 нг/мл хлорпромазина. Дальнейшая пробоподготовка была аналогична стандартным пробам.

Приготовление раствора метанола, содержащего внутренний стандарт

Точную навеску 4,46 мг стандартного образца хлорпромазина растворяли в 4 мл метанола для получения стандартного раствора внутреннего стандарта хлорпромазина с концентрацией 1 мг/мл. К 1000 мл метанола для пробоподготовки добавляли 10 мкл полученного раствора хлорпромазина для получения метанольного раствора хлорпромазина с концентрацией 10 нг/мл, используемого для пробоподготовки.

2.4 Статистическая обработка данных

Полученные результаты обрабатывали с помощью программ офисного пакета «Microsoft Office XP» и программы GraphPad Prism версии 10.0 (GraphPad

Software, Inc., США). Характер распределения полученных данных оценивали по критерию Шапиро-Уилка. При нормальном распределении данных для оценки статистической значимости различий использовали дисперсионный анализ для связанных и несвязанных выборок при сравнении более чем 2 групп (ANOVA), попарные сравнения выполняли с помощью критерия Тьюки, или t-критерий Стьюдента для сравнения двух групп. При распределении данных отличным от нормального использовали критерий Крускала–Уоллиса. Попарные сравнения осуществляли по критерию Данна. Статистически значимыми считали различия при $p < 0,05$.

Данные представлены как среднее арифметическое (M) $\pm$ стандартное отклонение (SD) при нормальном распределении данных или медианы, нижнего и верхнего квартилей при распределении отличным от нормального.

На основании полученных результатов о концентрации сульфасалазина и ривароксабана в плазме крови кроликов после их внутривенного введения строили фармакокинетические кривые. Модельнонезависимым методом рассчитывали следующие фармакокинетические параметры сульфасалазина и ривароксабана [15, 20, 32]:

$C_{\max}$ – максимальная концентрация (нг/мл);

$T_{\max}$ – время достижения максимальной концентрации (ч);

AUC_{0-t} – площадь под фармакокинетической кривой концентрация-время от нуля до времени последнего забора крови (нг*ч/мл), которую рассчитывали методом трапеций по формуле (3):

$$\frac{1}{2} \sum_{i=1}^n [(c_i + c_{i-1}) \times (t_i - t_{i-1})]; \quad (3)$$

где c – концентрация вещества в плазме крови, t – время забора образца плазмы;

K_{el} – константа элиминации, которую рассчитывали как тангенс угла наклона линейной части полулогарифмического графика концентрация-время к оси абсцисс.

$AUC_{0-\infty}$ – площадь под фармакокинетической кривой концентрация-время от нуля до бесконечности ($нг*ч/мл$), которую рассчитывали по формуле (4):

$$AUC_{0-\infty} = AUC_{0-t} + C_t/K_{el} \quad (4)$$

где C_t – концентрация веществ в плазме крови кроликов в последней временной точке;

$T_{1/2}$ – период полувыведения (ч), который рассчитывали как $0,693/K_{el}$.

Статистическую значимость различий между фармакокинетическими параметрами веществ (за исключением T_{max}) оценивали исходя из представления о лог-нормальном распределении данных. Сравнение изучаемых фармакокинетических параметров проводили с помощью дисперсионного анализа (ANOVA) после их логарифмирования. Различия с исходными показателями внутри групп и межгрупповые сравнения выполняли по критерию множественного сравнения Тьюки. Полученные результаты (фармакокинетические параметры) представлены в таблицах в виде среднего геометрического и его 90% доверительного интервала. Различия считали статистически значимыми при $p < 0,05$.

Дополнительно рассчитывали двухсторонний 90% доверительный интервал (ДИ) отношения средних геометрических фармакокинетических параметров сульфасалазина и ривароксабана на фоне введения ЭМГПС/кверцетина к параметрам животных после введения тестируемых веществ (сульфасалазина и ривароксабана). Согласно U.S. Food and Drug Administration, Center for Drug Evaluation and Research (CDER, 2012, 2017) и Руководству по экспертизе лекарственных средств, том I, значимыми считаются различия между фармакокинетическими параметрами, если двухсторонний 90% ДИ их отношения находится за пределами диапазона 0,8-1,25 (80-125%), поскольку только изменение фармакокинетических параметров более чем на 25% может привести к изменению фармакодинамики препаратов.

Статистическую значимость различий между значениями T_{max} анализировали непараметрическими критериями.

ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

3.1 Разработка и валидация методики количественного определения сульфасалазина в транспортной среде и плазме крови методом ВЭЖХ-МС/МС

Для проведения количественного анализа полученных проб, на первом этапе исследования была разработана и валидирована методика количественного определения субстрата белка-транспортера BCRP сульфасалазина в биологических матрицах: транспортной среде и плазме крови кроликов породы Советская Шиншилла.

Поскольку концентрации исследуемых веществ в транспортных экспериментах обычно имеют низкие значения, для получения достоверных результатов использовали количественный метод определения ВЭЖХ-МС/МС. Для плазмы крови применяли аналогичную методику, так как анализировали одно и то же вещество – сульфасалазин.

Режим хроматографической методики, условия анализа и детектирования были описаны ранее в главе «Материалы и методы».

Изначально детектирование проводили как в положительном, так и в отрицательном режимах. Однако был выбран негативный режим ионизации, так как при его использовании отмечали более низкий уровень шума, что позволило получить более высокое значение отношения сигнал/шум при более низких концентрациях сульфасалазина.

При изучении масс-спектра дочерних ионов сульфасалазина, как наиболее интенсивные, были выбраны ионы 197,1 m/z и 289,1 m/z (Рисунок 15). Ион 197,1 m/z использовался для количественного анализа.

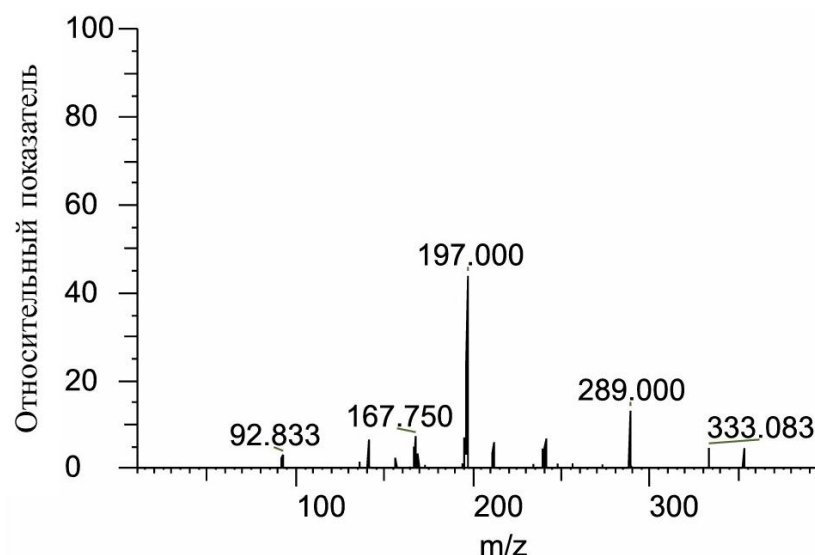


Рисунок 15 – Масс-спектр дочерних ионов сульфасалазина в отрицательном режиме ионизации (ион-предшественник 397,1 m/z)

Параметры детектирования оптимизировали после выбора ионов: как фрагментирующий газ использовали аргон с потоком 2 mTorr (mTorr), фрагментация в источнике составила 10 В, диапазон энергий столкновения от 0 до 55 В (Рисунок 16).

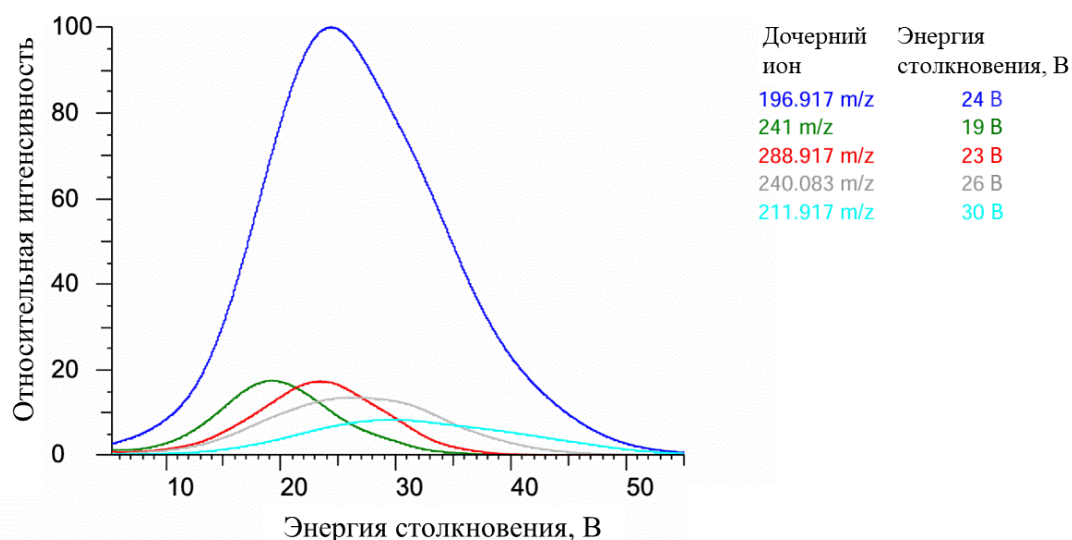


Рисунок 16 – Кривая зависимости интенсивности дочерних ионов сульфасалазина от энергии столкновения

Валидировали биоаналитическую методику на основе Решения от 3 ноября 2016 года №85 «Об утверждении Правил проведения исследований биоэквивалентности лекарственных препаратов в рамках Евразийского

экономического союза» по следующим параметрам: селективность, нижний предел количественного определения, градуировочная кривая (линейность), правильность (внутри и между циклами), прецизионность (внутри и между циклами), влияние (эффект) переноса, матричный эффект, степень извлечения и стабильность.

Селективность. Осуществляли анализ холостой пробы транспортной среды и интактной плазмы крови без добавления стандарта сульфасалазина. Также был проведен анализ образцов транспортной среды с добавлением сульфасалазина в концентрации 5 нг/мл (Рисунок 17), и интактной плазмы крови кроликов с добавлением сульфасалазина в концентрации 50 нг/мл (Рисунок 18). На хроматограммах образцов холостой транспортной среды и интактной плазмы крови кроликов отсутствовали пики со временем удерживания, соответствующим времени удерживания сульфасалазина и валсартана, который использовали как внутренний стандарт.

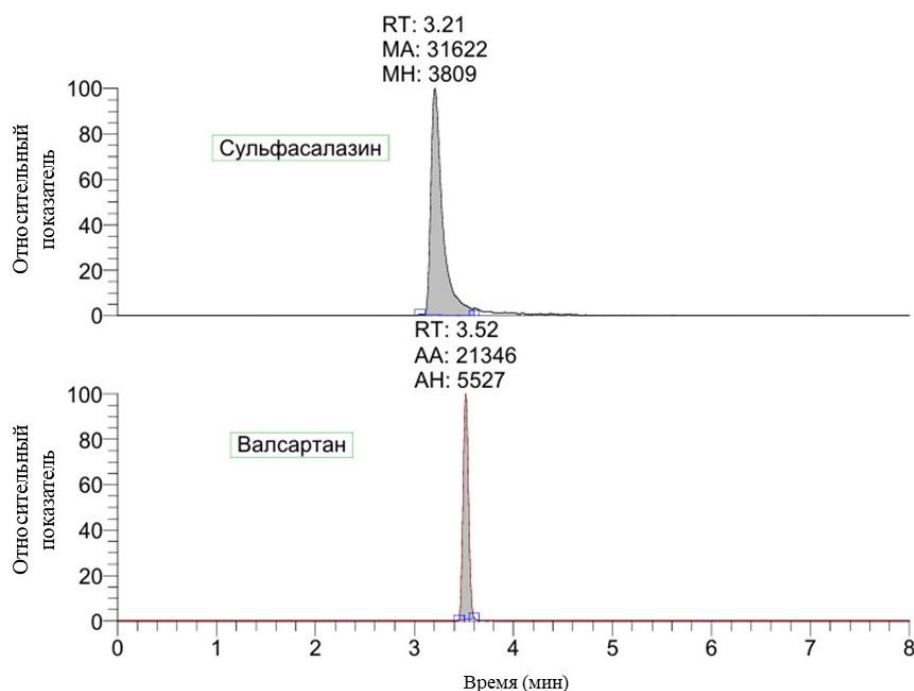


Рисунок 17 – Хроматограмма «холостой» транспортной среды с добавлением сульфасалазина до конечной концентрации 5 нг/мл и внутреннего стандарта валсартана в концентрации 100 нг/мл

Примечание – RT – retention time, время удерживания; AA – automatic area, площадь пика; AH – automatic height, высота пика; MA – manual area, площадь пика; MH – manual height, высота пика

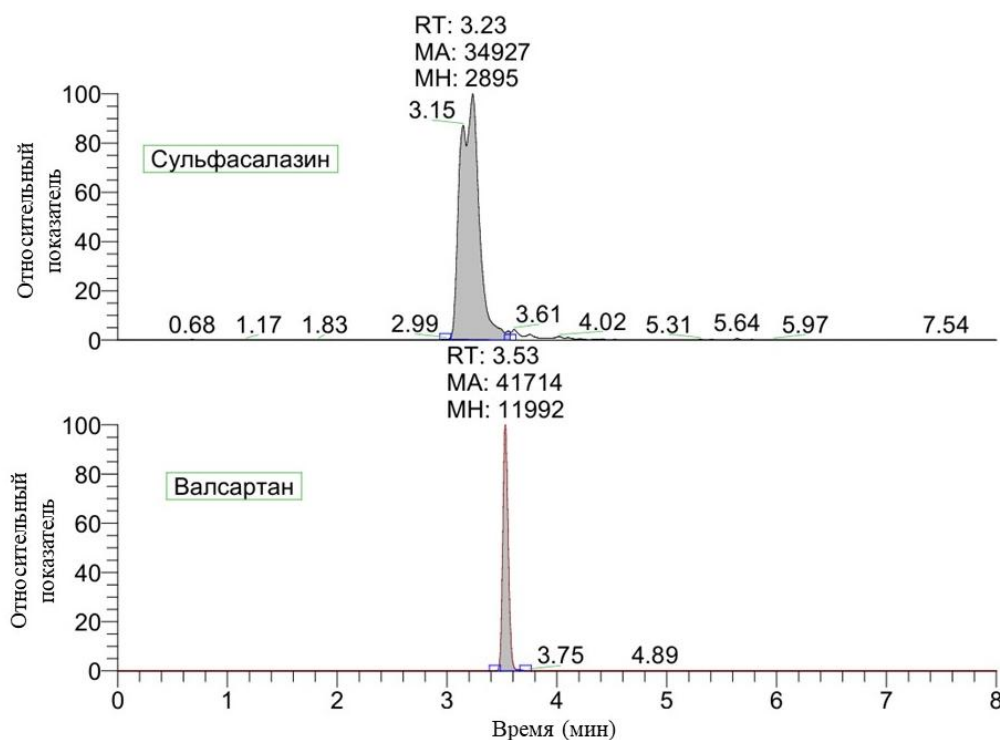


Рисунок 18 – Хроматограмма «холостой» плазмы крови кроликов с добавлением сульфасалазина до конечной концентрации 50 нг/мл и внутреннего стандарта валсартана в концентрации 100 нг/мл

Примечание – RT – retention time, время удерживания; MA – manual area, площадь пика; MH – manual height, высота пика

Нижний предел количественного определения (НПКО) сульфасалазина составил 5 нг/мл в транспортной среде и 50 нг/мл в плазме крови. При этом отношение сигнала к шуму было не ниже 10, а точность и прецизионность определения не превышали 20%.

Градуировочная кривая (линейность). Выполняли анализ образцов холостых матриц с добавлением стандарта сульфасалазина до получения концентраций в транспортной среде 5000 нг/мл, 4000 нг/мл, 2500 нг/мл, 1000 нг/мл, 500 нг/мл, 100 нг/мл, 50 нг/мл, 15 нг/мл, 10 нг/мл, 5 нг/мл; в плазме крови кроликов 20000 нг/мл, 16000 нг/мл, 10000 нг/мл, 5000 нг/мл, 1000 нг/мл, 500 нг/мл, 250 нг/мл, 150 нг/мл, 100 нг/мл, 50 нг/мл. По полученным значениям были построены по 3 калибровочных графика в координатах отношение площади пика сульфасалазина к площади пика валсартана от концентрации сульфасалазина в транспортной среде и в плазме крови кроликов.

В ходе анализа были получены следующие уравнения линейной регрессии для транспортной среды: $Y = 1,37683 + 0,0230471 \cdot X$, $R^2 = 0,9944$ W: 1/X (1 цикл); $Y = 1,20165 + 0,0263666 \cdot X$, $R^2 = 0,9973$, W: 1/X (2 цикл); $Y = 1,32374 + 0,0269235 \cdot X$, $R^2 = 0,9990$, W: 1/X (3 цикл). Для плазмы крови кроликов: $Y = 0,508827 + 0,00602456 \cdot X$, $R^2 = 0,9950$, W: 1/X (1 цикл) (Рисунок 19); $Y = 0,504218 + 0,00626648 \cdot X$, $R^2 = 0,9950$, W: 1/X (2 цикл); $Y = 0,468945 + 0,00617386 \cdot X$, $R^2 = 0,9934$, W: 1/X (3 цикл).

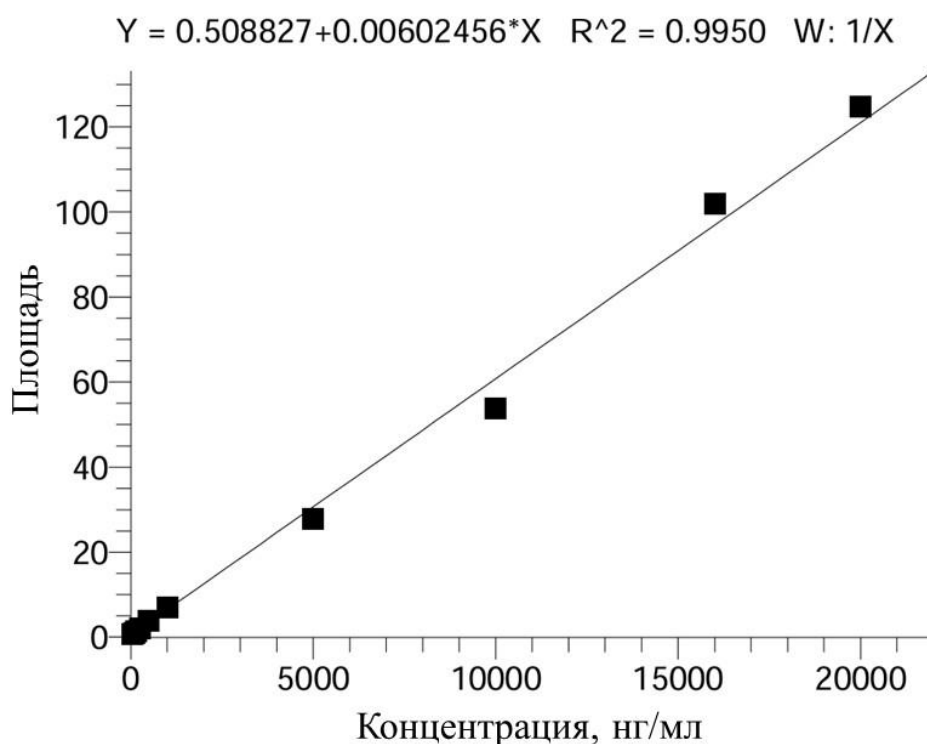


Рисунок 19 – Образец калибровочного графика зависимости «концентрация сульфасалазина – площадь пика» для плазмы крови кроликов

Рассчитанные коэффициенты корреляции соответствовали принятой норме (не менее 0,99). Отклонения концентраций калибровочных образцов, рассчитанные по уравнению линейной зависимости, от номинальных значений в транспортной среде и плазме крови не превышали 15% для всех значений и 20% для НПКО, что также соответствует норме (Таблицы 8 и 9).

Таблица 8 – Отклонения концентраций сульфасалазина в калибровочных образцах транспортной среды от их номинальных значений

Концентрация номинальная, нг/мл	Серия 1		Серия 2		Серия 3	
	Концентрация рассчитанная, нг/мл	Точность, %	Концентрация рассчитанная, нг/мл	Точность, %	Концентрация рассчитанная, нг/мл	Точность, %
5,00	4,19	16,15	4,85	2,95	4,68	6,31
10,00	8,84	11,62	8,60	14,04	9,27	7,34
15,00	14,57	2,873	15,84	5,61	15,29	1,94
50,00	56,84	13,68	54,91	9,82	56,90	13,79
100,00	114,30	14,30	110,52	10,52	110,08	10,08
500,00	490,60	1,88	494,16	1,17	467,01	6,60
1000,00	983,47	1,65	943,82	5,62	942,40	5,76
2500,00	2761,87	10,48	2379,21	4,83	2432,12	2,72
4000,00	4164,15	4,10	3858,32	3,54	4013,34	0,33
5000,00	4581,18	8,38	5309,77	6,20	5128,92	2,58

Таблица 9 – Отклонения концентраций сульфасалазина в калибровочных образцах интактной плазмы крови кроликов от их номинальных значений

Концентрация номинальная, нг/мл	График 1		График 2		График 3	
	Концентрация рассчитанная, нг/мл	Точность, %	Концентрация рассчитанная, нг/мл	Точность, %	Концентрация рассчитанная, нг/мл	Точность, %
50,00	47,76	4,47	50,19	0,38	52,85	5,70
100,00	86,56	13,44	89,02	10,98	86,87	13,13
150,00	164,36	9,57	164,49	9,66	168,73	12,49
250,00	249,42	0,23	233,49	6,60	231,40	7,44
500,00	564,10	12,82	556,44	11,29	568,23	13,65
1000,00	1078,86	7,89	1089,85	8,99	1014,04	1,40
5000,00	4553,15	8,94	4525,28	9,49	4531,18	9,38
10000,0	8848,0	11,52	8852,0	11,48	8662,0	13,38
16000,0	16828,3	5,18	16637,4	3,98	17127,7	7,05
20000,0	20629,4	3,15	20851,8	4,26	20607,0	3,04

Правильность и прецизионность. Правильность аналитической методики выражает близость полученных с помощью нее значений к номинальным концентрациям аналитов и представляется в виде процента от номинальных значений. Под прецизионностью методики понимают степень близости результатов между отдельными повторными измерениями, и выражают в виде относительного стандартного отклонения (коэффициента вариации).

Анализ проводили в рамках 3 последовательностей (циклов), брали по 5 образцов для каждого уровня концентраций аналитов для транспортной среды (5, 15, 2500 и 4000 нг/мл) и для плазмы крови (50, 150, 10000 и 16000 нг/мл).

Для расчета правильности и прецизионности на уровне между циклами использовали данные ($n=15$ для каждой концентрации), полученные в течение 1-й, 2-й и 3-й последовательностей.

Полученные величины относительного стандартного отклонения (прецизионность) и относительной погрешности (правильность) соответствовали нормам (не более 20% на уровне НПКО, не более 15% – для остальных точек) (Таблица 10).

Таблица 10 – Внутри- и межцикловая правильность и прецизионность методики количественного определения сульфасалазина в транспортной среде и плазме крови

Препарат	QC, нг/мл	Внутрицикловая правильность (ϵ), %, n=5	Внутрицикловая прецизионность (RSD), %, n=5	Межцикловая правильность (ϵ), %, n=15	Межцикловая прецизионность (RSD), %, n=15
Транспортная среда	5	5,21	5,58	6,61	2,72
	15	2,33	3,26	4,64	3,82
	2500	11,68	0,86	5,56	7,02
	4000	5,12	3,29	6,36	7,29
Плазма крови	50	4,50	5,22	5,74	7,40
	150	10,19	1,54	11,99	1,69
	10 000	10,99	1,05	11,35	0,41
	16 000	3,41	1,10	3,96	4,55
Примечание – QC – контроль качества					

Влияние (эффект) переноса. При последовательном анализе проб с концентрацией сульфасалазина 5000 нг/мл в транспортной среде и 20 000 нг/мл в плазме крови и последующем анализе холостых матриц на хроматограммах холостых матриц отсутствовали пики, соответствующие по времени удерживания пикам сульфасалазина.

Матричный эффект. В холостую матрицу от шести различных кроликов после экстракции были добавлены рабочие растворы анализов для получения нижнего и верхнего контролей качества (150 и 16000 нг/мл) и раствор внутреннего стандарта. Также готовили растворы сульфасалазина и валсартана с такими же концентрациями на воде. Матричный эффект рассчитывали как отношение площади пиков в присутствии матрицы к площади пиков в отсутствие матрицы для каждого контроля качества и внутреннего стандарта. Также рассчитывали нормализованный эффект матрицы по внутреннему стандарту (как частное от деления эффекта матрицы анализируемого вещества на эффект матрицы внутреннего стандарта). Относительное стандартное отклонение эффекта матрицы сульфасалазина, валсартана и нормализованного матричного эффекта не превышало 15% (Таблица 11). Матричный эффект в транспортной среде не оценивали так как она имеет одинаковый состав, а в эксперименте обычно используется один клон клеток.

Степень извлечения сульфасалазина из плазмы крови кроликов оценивали по соотношению площадей пиков нижнего и верхнего контролей качества сульфасалазина и валсартана к площади пиков контролей качества и внутреннего стандарта, приготовленных на плазме крови после экстракции. Относительное стандартное отклонение степени извлечения сульфасалазина и валсартана не превышало 15% (Таблица 11).

Таблица 11 – Матричный эффект и степень извлечения сульфасалазина и валсартана в плазме крови кроликов

	Концентрация, нг/мл	Матричный эффект, %	Степень извлечения, %
Сульфасалазин	150	110,49±1,18	90,61±1,02
	16000	103,76±1,28	97,29±1,12
Валсартан	100	90,67±0,95	98,38±2,43

Стабильность. Оценивалась стабильность сульфасалазина и валсартана в составе рабочих растворов, стабильность аналита в матрицах при хранении при -80°C в течение 30 дней, при трехкратном цикле заморозки-разморозки, а также стабильность после пробоподготовки и хранения в автосамплере при +6°C в течение 24 ч. Для анализа каждого вида стабильности использовали нижний и верхний контроли качества (QC) в трех повторениях. Стабильность рабочих растворов (растворы аналитов в метаноле, которые использовались для приготовления калибровочных растворов) оценивали путём их хроматографического анализа после разведения в матрице до концентраций нижнего и верхнего контролей качества. Рассчитывали отклонение полученных концентраций после хранения образцов от их исходных значений. Изменения концентраций аналита при тестировании всех видов стабильности не превышали 15%.

Апробацию разработанных аналитических методик выполнили на кролике самце породы «Советская Шиншилла» массой 3800 г, после однократного внутрижелудочного введения ему сульфасалазина в дозе 500 мг и при оценке транспорта сульфасалазина через монослой клеток линии Сасо-2 по методике, приведенной в литературных источниках. Полученные значения в плазме крови кролика (диапазон концентраций сульфасалазина 219,8 – 12680,9 нг/мл) и концентрации в транспортной среде в камере реципиенте трансвелл-системы (диапазон концентраций 51,9 – 4820,9 нг/мл) укладываются в аналитический диапазон разработанных методик, что подтверждает их пригодность для оценки активности белка-транспортера BCRP.

3.2 Влияние ЭМГПС на активность BCRP *in vitro* в сравнительном аспекте

Эксперименты по тестированию влияния ЭМГПС на активность BCRP *in vitro* выполняли на клетках линии Сасо-2 в специальных трансвелл-системах. Сравнительную оценку действия ЭМГПС на BCRP проводили с классическим ингибитором белка-транспортера – кверцетином.

На первом этапе эксперимента оценивали транспорт субстрата BCRP – сульфасалазина через монослой клеток Сасо-2 в концентрации 10 мкМ для расчета исходных показателей проницаемости (серия контроль). На клетках Сасо-2 коэффициент кажущейся проницаемости сульфасалазина $P_{app\ b-a}$ составил $11,8 \cdot 10^{-6} \pm 3,3 \cdot 10^{-6}$ см/сек, $P_{app\ a-b} - 0,346 \cdot 10^{-6} \pm 0,181 \cdot 10^{-6}$ см/сек, а их отношение $37,36 \pm 10,13$. Отношение $P_{app\ b-a} / P_{app\ a-b}$ более, чем в 10 раз превышает значение «2», что свидетельствует об асимметрии транспорта вещества, который реализуется за счет эффлюксного эффекта изучаемого белка-транспортера BCRP (Таблица 12).

На следующем этапе исследования оценивали влияние кверцетина, классического ингибитора BCRP, на транспорт сульфасалазина через монослой клеток линии Сасо-2.

Кверцетин в концентрациях 1, 10, 50, 100, 250 и 500 мкМ вызывал снижение коэффициента кажущейся проницаемости сульфасалазина $P_{app\ b-a}$ на 70,5% ($p < 0,001$), 62,2% ($p < 0,01$), 60,8% ($p < 0,01$), 88,2% ($p < 0,0001$), 92,5% ($p < 0,0001$) и 68,7% ($p < 0,001$) соответственно (Таблица 12).

Таблица 12 – Влияние кверцетина в различных концентрациях на транспорт сульфасалазина через монослой клеток линии Сасо-2 ($M \pm SD$, см/сек)

<i>Сульфасалазин (контроль)</i>			
Концентрация сульфасалазина	Рapp b-a	Рapp a-b	Рapp b-a/Рapp a-b
10 мкМ	$11,8 \cdot 10^{-6} \pm 3,3 \cdot 10^{-6}$	$0,346 \cdot 10^{-6} \pm 0,181 \cdot 10^{-6}$	$37,36 \pm 10,13$
<i>Сульфасалазин 10 мкМ + кверцетин в различных концентрациях</i>			
Концентрация кверцетина	Рapp b-a	Рapp a-b	Рapp b-a/Рapp a-b
0,1 мкМ	$8,71 \cdot 10^{-6} \pm 0,22 \cdot 10^{-6}$	$0,344 \cdot 10^{-6} \pm 0,070 \cdot 10^{-6}$	$26,11 \pm 5,76^*$
1 мкМ	$3,48 \cdot 10^{-6} \pm 0,44 \cdot 10^{-6}***$	$0,473 \cdot 10^{-6} \pm 0,179 \cdot 10^{-6}$	$8,11 \pm 3,19*****$
10 мкМ	$4,46 \cdot 10^{-6} \pm 1,58 \cdot 10^{-6}**$	$0,932 \cdot 10^{-6} \pm 0,168 \cdot 10^{-6}$	$4,69 \pm 0,83*****$
50 мкМ	$4,62 \cdot 10^{-6} \pm 3,08 \cdot 10^{-6}**$	$1,08 \cdot 10^{-6} \pm 0,68 \cdot 10^{-6}$	$4,06 \pm 1,80*****$
100 мкМ	$1,39 \cdot 10^{-6} \pm 0,098 \cdot 10^{-6}*****$	$0,491 \cdot 10^{-6} \pm 0,074 \cdot 10^{-6}$	$2,87 \pm 0,43*****$
250 мкМ	$0,888 \cdot 10^{-6} \pm 0,517 \cdot 10^{-6}*****$	$0,342 \cdot 10^{-6} \pm 0,041 \cdot 10^{-6}$	$2,64 \pm 1,50*****$
500 мкМ	$3,69 \cdot 10^{-6} \pm 2,28 \cdot 10^{-6}***$	$1,73 \cdot 10^{-6} \pm 1,13 \cdot 10^{-6}^*$	$2,18 \pm 0,11*****$
Примечание – *p < 0,05, **p < 0,01, ***p < 0,001, ****p < 0,0001 – достоверные различия с показателями контроля			

В концентрации 500 мкМ кверцетин вызывал повышение коэффициента кажущейся проницаемости сульфасалазина $P_{app} a-b$ на 400,0% ($p < 0,05$) (Таблица 12). Во всех применяемых концентрациях от 0,1 до 500 мкМ классический ингибитор BCRP снижал отношение $P_{app} b-a/P_{app} a-b$: в концентрации 0,1 мкМ на 30,1% ($p < 0,05$), 1 мкМ – на 78,3% ($p < 0,0001$), 10 мкМ – на 87,4% ($p < 0,0001$), 50 мкМ – на 89,1% ($p < 0,0001$), 100 мкМ – на 92,3% ($p < 0,0001$), 250 мкМ – на 92,9% ($p < 0,0001$), 500 мкМ – на 94,2% ($p < 0,0001$) (Таблица 12).

Полученные результаты подтверждают ингибирующую активность кверцетина в отношении BCRP *in vitro* и доказывают адекватность выбранной тест-системы для оценки влияния ЭМГПС на активность изучаемого белка-транспортера.

Для сравнительного анализа количественно оценивали выраженность ингибирующей активности кверцетина, для чего рассчитали IC_{50} по отношению $P_{app} b-a/P_{app} a-b$. Полученное значение IC_{50} составило 0,2 мкМ, что соотносится с литературными данными и свидетельствует о высокой активности выбранного для сравнения ингибитора (Рисунок 20).

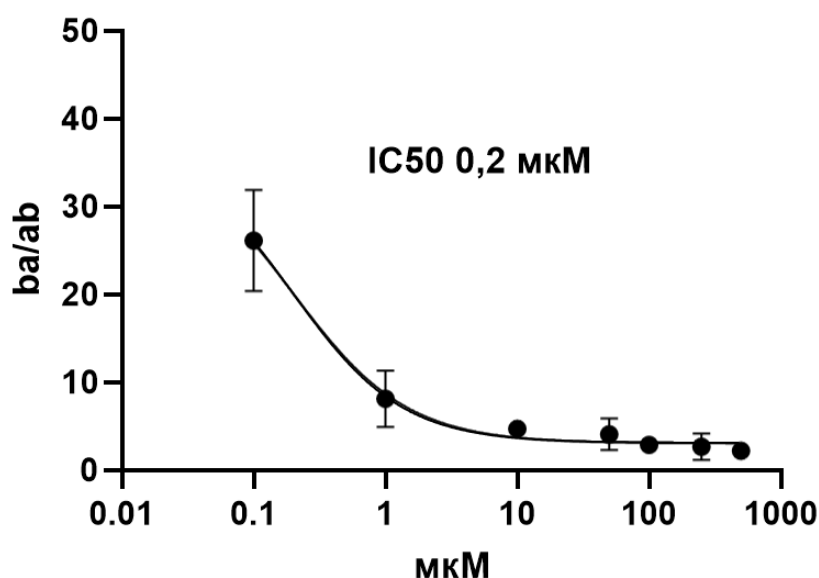


Рисунок 20 – Концентрация полумаксимального ингибирования кверцетина

На следующем этапе исследования изучали влияние ЭМГПС на активность BCRP *in vitro*, которую оценивали по изменению транспорта сульфасалазина через монослой клеток линии Caco-2 в присутствии ЭМГПС. Полученные результаты представлены в Таблице 13.

ЭМГПС во всех протестированных концентрациях не влиял на коэффициент кажущейся проницаемости сульфасалазина $P_{app} \text{ } b-a$ и повышал коэффициент кажущейся проницаемости $P_{app} \text{ } a-b$ только в концентрации 500 мкМ в 9,88 раза ($p < 0,05$).

При этом ЭМГПС снижал отношение $P_{app} \text{ } b-a / P_{app} \text{ } a-b$ в более высоких концентрациях – 50 мкМ на 64,6% ($p = 0,05$), 100 мкМ – на 81,1% ($p < 0,05$), 250 мкМ – на 92,1% ($p < 0,01$), 500 мкМ – на 93,9% ($p < 0,01$). Полученные результаты свидетельствуют о том, что ЭМГПС ингибирует активность BCRP.

IC_{50} для ЭМГПС рассчитанная по отношению $P_{app} \text{ } b-a / P_{app} \text{ } a-b$ составила 37,5 мкМ (Рисунок 21), что на несколько порядков ниже, чем для кверцетина и свидетельствует о невысокой ингибирующей активности тестируемого препарата в отношении BCRP.

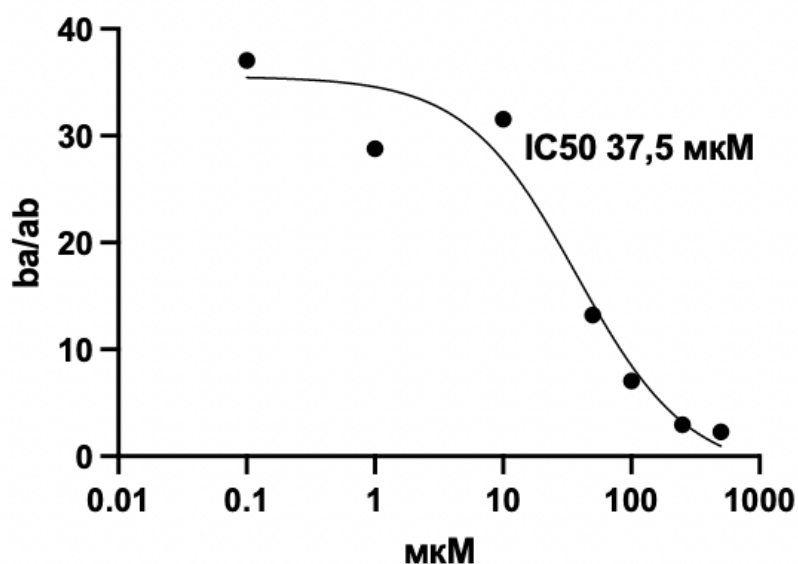


Рисунок 21 – Концентрация полумаксимального ингибирования ЭМГПС

Таблица 13 – Влияние ЭМГПС в различных концентрациях на транспорт сульфасалазина через монослой клеток линии Сасо-2 ($M \pm SD$, см/сек)

<i>Сульфасалазин (контроль)</i>			
Концентрация сульфасалазина	Рapp b-a	Рapp a-b	Рapp b-a/Рapp a-b
10 мкМ	$11,8 \cdot 10^{-6} \pm 3,3 \cdot 10^{-6}$	$0,346 \cdot 10^{-6} \pm 0,181 \cdot 10^{-6}$	$37,36 \pm 10,13$
<i>Сульфасалазин 10 мкМ + ЭМГПС в различных концентрациях</i>			
Концентрация ЭМГПС	Рapp b-a	Рapp a-b	Рapp b-a/Рapp a-b
0,1 мкМ	$15,7 \cdot 10^{-6} \pm 0,19 \cdot 10^{-6}$	$0,487 \cdot 10^{-6} \pm 0,210 \cdot 10^{-6}$	$37,04 \pm 17,07$
1 мкМ	$12,3 \cdot 10^{-6} \pm 0,42 \cdot 10^{-6}$	$0,440 \cdot 10^{-6} \pm 0,093 \cdot 10^{-6}$	$28,77 \pm 6,21$
10 мкМ	$7,70 \cdot 10^{-6} \pm 0,71 \cdot 10^{-6}$	$0,331 \cdot 10^{-6} \pm 0,245 \cdot 10^{-6}$	$31,54 \pm 17,61$
50 мкМ	$7,29 \cdot 10^{-6} \pm 8,07 \cdot 10^{-6}$	$0,454 \cdot 10^{-6} \pm 0,288 \cdot 10^{-7}$	$13,21 \pm 7,04^*$
100 мкМ	$5,36 \cdot 10^{-6} \pm 0,71 \cdot 10^{-6}$	$1,73 \cdot 10^{-6} \pm 1,89 \cdot 10^{-6}$	$7,06 \pm 5,99^*$
250 мкМ	$3,57 \cdot 10^{-6} \pm 0,19 \cdot 10^{-6}$	$2,10 \cdot 10^{-6} \pm 1,64 \cdot 10^{-6}$	$2,94 \pm 2,70^{**}$
500 мкМ	$5,65 \cdot 10^{-6} \pm 6,82 \cdot 10^{-6}$	$3,42 \cdot 10^{-6} \pm 1,36 \cdot 10^{-6}^*$	$2,27 \pm 2,90^{**}$
Примечание – *p < 0,05, **p < 0,01, ***p < 0,001, ****p < 0,0001 – достоверные различия с показателями контроля			

Для изучения клинической значимости ингибирующей способности ЭМГПС применялся подход, одобренный Управлением по санитарному надзору за качеством пищевых продуктов и лекарственных препаратов США (FDA, 2020) и Международным консорциумом переносчиков (International Transporter Consortium (ITC), 2010) [150, 181].

Рассчитывалось отношение $C_{\max}$ ЭМГПС / IC_{50} (прогнозирует системное ингибирование BCRP в печени, почках, гистогематических барьерах) и отношение доза ЭМГПС / 250 мл / IC_{50} (прогнозирует ингибирование BCRP в кишечнике). Если полученные значения больше или равно 0,1 и 10 соответственно, то ингибирование BCRP ЭМГПС является клинически значимым.

Согласно проведенным ранее исследованиям $C_{\max}$ для ЭМГПС составляет 0,39 мкМ [39]. Расчет показывает, что соотношение $C_{\max}$ / IC_{50} для ЭМГПС составляет 0,01, соответственно системное ингибирование BCRP ЭМГПС не является клинически значимым.

Максимальная разовая доза ЭМГПС составляет 250 мг, соответственно отношение доза ЭМГПС / 250 мл / IC_{50} составляет $1 \text{ мг/мл} / 37,5 \text{ мкМ} = 3922 \text{ мкМ} / 37,5 \text{ мкМ} = 104,6$. Полученное значение больше 10, что свидетельствует о том, что ингибирование BCRP под действием ЭМГПС в желудочно-кишечном тракте может иметь клиническое значение.

Соответственно, сравнение результатов, полученных в эксперименте *in vitro* при использовании классического ингибитора кверцетина и исследуемого соединения ЭМГПС, свидетельствует о низкой ингибирующей активности последнего. Тем не менее возможное ингибирования белка-транспортера в желудочно-кишечном тракте может приводить к фармакокинетическим межлекарственным взаимодействиям на этапе всасывания. Поэтому полученные результаты в исследованиях *in vitro* требуют проверки и сопоставления в условиях *in vivo*.

3.3 Разработка *in vivo* методики анализа ингибирующей активности лекарственных веществ в отношении белка-транспортера BCRP

Проверка ингибирующей активности лекарственных веществ в отношении BCRP *in vivo* осуществляется по изменению фармакокинетики субстрата изучаемого белка-транспортера на фоне однократного и курсового введения тестируемого вещества.

Первоначально для выполнения данных исследований осуществляли выбор подходящей тест-системы. Для этого методом вестерн-блот оценивали относительное количество BCRP в печени, почках и тощей кишке кроликов породы Советская Шиншилла, крыс Wistar и мышей стока ICR.

В ходе исследования было установлено, что максимальный уровень белка отмечался в органах кроликов (Рисунок 22), поэтому именно эти животные были выбраны в качестве тест-системы.

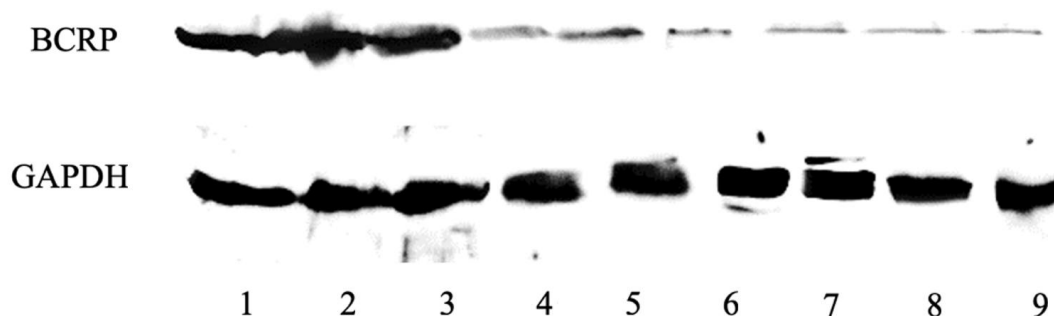


Рисунок 22 – Результаты вестерн-блот анализа относительного количества BCRP в органах животных

Примечание – 1 – кролик печень, 2 – кролик почка, 3 – кролик кишка, 4 – крыса печень, 5 – крыса почка, 6 – крыса кишка, 7 – мышь печень, 8 – мышь почка, 9 – мышь кишка

На следующем этапе было оценено влияние классического ингибитора BCRP кверцетина на фармакокинетику субстрата транспортера – сульфасалазина. Данный эксперимент позволяет разработать методику *in vivo* анализа ингибирующей активности тестируемых лекарственных веществ с использованием специфического субстрата и классического ингибитора изучаемого белка-транспортера.

Для этого первоначально у животных оценивали исходные параметры фармакокинетики сульфасалазина, который вводили внутрижелудочно в дозе 125 мг/кг массы и через определенные временные точки забирали кровь из ушной вены. В полученной плазме крови определяли концентрацию сульфасалазина.

Из представленных результатов видно, что у интактных кроликов сульфасалазин медленно всасывается и достигает максимальной концентрации ($C_{\max}$) к 5 часам, при этом он также медленно выводится и сохраняется в системном кровотоке до 24 часов (Таблица 14, Рисунок 23). Показатели демонстрируют его медленное всасывание при пероральном приеме и медленное выведение, описанное в литературе.

Далее после периода «отмывки» и восстановления длительностью 7 дней тем же кроликам внутрижелудочно вводили кверцетин в дозе 100 мг/кг массы, а затем через 30 мин вводили сульфасалазин и оценивали его концентрацию в аналогичных временных точках.

После периода восстановления кроликам начинали курсовое введение кверцетина в дозе 25 мг/кг в течение 7 дней, затем через 30 мин внутрижелудочно вводили сульфасалазин и повторно анализировали его фармакокинетику.

Однократное внутрижелудочное введение кверцетина достоверно повышало значение $C_{\max}$ сульфасалазина в 1,62 раза (90% ДИ отношения средних геометрических 1,12 – 2,34; $p=0,0418^*$) по сравнению с исходными показателями, остальные изучаемые фармакокинетические параметры (AUC_{0-t} ; $AUC_{0-\infty}$ и $T_{1/2}$) достоверно не изменялись ($p>0,05$).

Полученные данные демонстрируют увеличение максимальной концентрации сульфасалазина в крови на 62% и свидетельствуют о повышении скорости всасывания сульфасалазина после однократного введения кверцетина, в результате ингибирования белка-транспортера BCRP (Таблица 15).

Таблица 14 – Концентрация сульфасалазина (мкг/мл) в плазме крови кроликов после внутрижелудочного введения в дозе 125 мг/кг массы на фоне кверцетина (медиана, верхний и нижний квартили)

Серии эксперимента	Концентрация сульфасалазина / Временные точки											
	0,25 ч	0,5 ч	1 ч	1,5 ч	2 ч	3 ч	4 ч	5 ч	6 ч	8 ч	12 ч	24 ч
Контроль	0,18 (0,15; 0,28)	0,50 (0,24; 0,77)	0,75 (0,26; 1,47)	1,32 (0,51; 2,79)	1,51 (1,04; 3,25)	2,51 (1,67; 4,25)	4,23 (2,78; 4,99)	5,15 (3,87; 6,48)	3,98 (3,47; 4,87)	4,13 (2,90; 6,66)	3,83 (2,63; 5,67)	0,44 (0,34; 0,89)
Кверцетин, доза 100 мг/кг, в/ж, однократно	0,32 (0,11; 0,39)	0,42 (0,20; 1,78)	0,78 (0,26; 7,21)	1,71 (0,44; 11,14)	2,26 (0,71; 14,42)	5,59 (3,08; 11,24)	7,69 (4,80; 8,55)	6,21 (4,14; 8,64)	7,25 (3,34; 8,90)	4,31 (3,13; 5,23)	3,69 (3,56; 4,00)	0,48 (0,26; 0,53)
Кверцетин, доза 25 мг/кг, в/ж, 1 р/д, 7 дней	1,52 (0,53; 2,54)	1,24 (0,62; 3,48)	1,50 (1,22; 9,19)	3,50 (2,47; 11,83)	4,50 (2,91; 16,36)	12,13 (6,12; 15,16)	12,11 (9,66; 12,88)	13,47 (12,26; 16,43)	12,15 (11,96; 14,92)	9,41 (8,99; 10,11)	11,00 (8,35; 13,10)	0,65 (0,27; 1,41)
Примечание – в/ж – внутрижелудочно, р/д – раз в день												

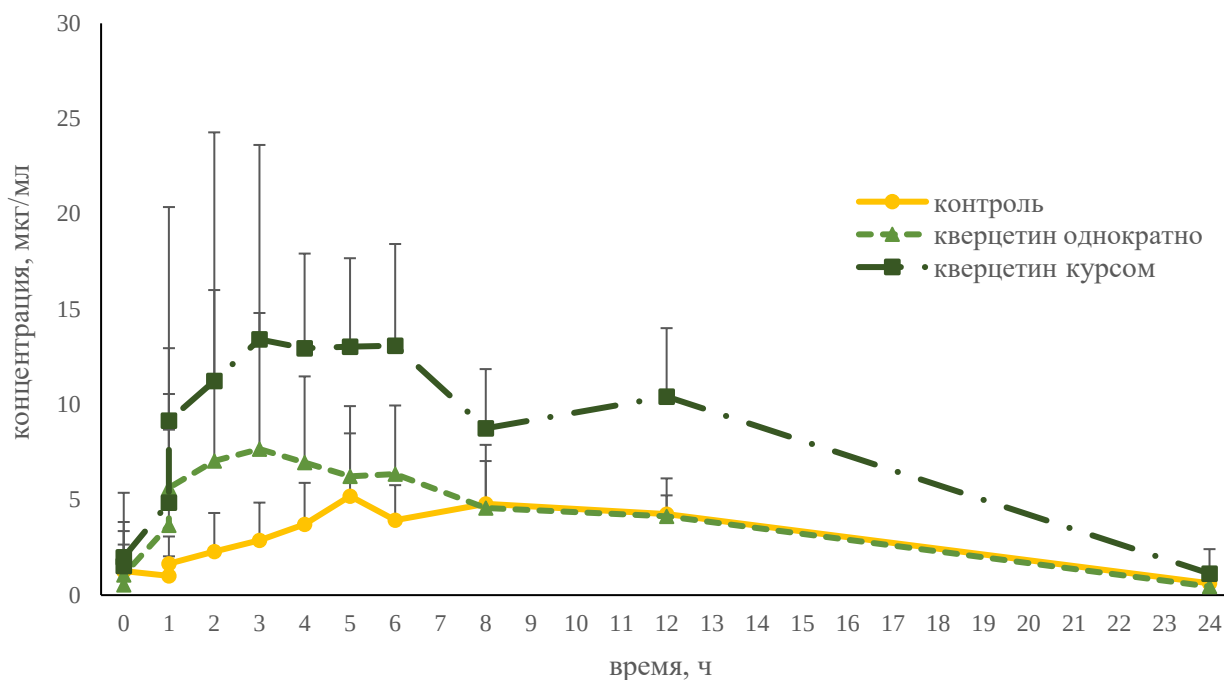


Рисунок 23 – Усредненные фармакокинетические кривые «концентрация-время» сульфасалазина (исходные/контроль), после однократного и курсового введения кверцетина

Таблица 15 – Усредненные фармакокинетические параметры сульфасалазина у кроликов до и после однократного введения кверцетина в дозе 100 мг/кг массы (Geom Mean и его 90% ДИ)

Параметры фармакокинетики	Исходные значения (контроль)	Значения после однократного введения кверцетина	90% ДИ отношения средних геометрических
$C_{\max}$, нг/мл	6210,64 (2675,04;10190,76)	10056,84 (3728,69; 19292,47)	1,12 – 2,34; $p=0,0418^*$
AUC_{0-t} , нг*ч/мл	67464,71 (33360,54;106560,79)	85856,74 (42928,82; 130291,55)	0,997 – 1,62; $p=0,1038$
$AUC_{0-\infty}$, нг*ч/мл	80459,95 (45852,07;171624,87)	88638,97 (43095,51; 133729,29)	0,71 – 1,70; $p=0,8168$
$T_{1/2}$, ч	6,35 (2,78; 38,33)	4,1 (2,0; 5,43)	0,23 – 1,84; $p=0,5334$
Примечание – $*p < 0,05$ – достоверные различия с показателями контроля			

После курсового внутрижелудочного введения кверцетина в течение 7 дней $C_{\max}$ сульфасалазина увеличилась в 3,1 раза (90% ДИ отношения средних геометрических 1,97 – 4,90; $p=0,0032^{**}$), AUC_{0-t} в 2,81 раза (90% ДИ отношения средних геометрических 1,78 – 4,45; $p=0,0048^{**}$) и $AUC_{0-\infty}$ в 2,49 раза (90% ДИ отношения средних геометрических 1,42 – 4,38; $p=0,0192^*$) по сравнению с исходными фармакокинетическими параметрами (Таблица 16).

Приведенные результаты показывают значительное увеличение концентрации сульфасалазина в крови, ускорении скорости и степени его всасывания после курсового введения кверцетина, что убедительно подтверждает ингибирование BCRP.

$T_{1/2}$, характеризующий выведение сульфасалазина, ни после однократного, ни после курсового введения кверцетина не изменялся.

Таблица 16 – Усредненные фармакокинетические параметры сульфасалазина у кроликов до и после курсового введения кверцетина в дозе 25 мг/кг массы (Geom Mean и его 90% ДИ)

Параметры фармакокинетики	Исходные значения (контроль)	Значения после курсового введения кверцетина	90% ДИ отношения средних геометрических
$C_{\max}$, нг/мл	6210,64 (2675,04;10190,76)	19287,24 (14312,4; 34034,29)	1,97 – 4,90; $p=0,0032^{**}$
AUC_{0-t} , нг*ч/мл	67464,71 (33360,54;106560,79)	189757,29 (144401,64; 228023,01)	1,78 – 4,45; $p=0,0048^{**}$
$AUC_{0-\infty}$, нг*ч/мл	80459,95 (45852,07;171624,87)	200373,85 (158898,94; 264936,49)	1,42 – 4,38; $p=0,0192^*$
$T_{1/2}$, ч	6,35 (2,78; 38,33)	4,34 (2,55; 8,77)	0,25 – 1,86; $p=0,5884$
Примечание – * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ – достоверные различия с показателями контроля			

$C_{\max}$ сульфасалазина при курсовом введении кверцетина в сравнении с однократным достоверно увеличивалась в 1,92 раза (90% ДИ отношения средних геометрических 1,18 – 3,13; $p=0,0386^*$), AUC_{0-t} в 2,21 раза (90% ДИ отношения средних геометрических 1,44 – 3,39; $p=0,0106^*$), $AUC_{0-\infty}$ в 2,26 раза (90% ДИ

отношения средних геометрических 1,28 – 3,99; $p=0,0127^*$). При этом $T_{1/2}$ также статистически значимо не изменялся.

Сопоставление результатов серий однократного и курсового введения ингибитора BCRP кверцетина совместно с сульфасалазином наглядно демонстрирует зависимость изменения фармакокинетических параметров, определяющих концентрацию вещества-субстрата в крови, не только от дозы, но и длительности введения классического ингибитора белка-транспортера (Таблица 17).

Таблица 17 – Сравнение усредненных фармакокинетических параметров сульфасалазина у кроликов после однократного (100 мг/кг массы) и курсового введения кверцетина (25 мг/кг массы) (Geom Mean и его 90% ДИ)

Параметры фармакокинетики	Значения после однократного введения кверцетина	Значения после курсового введения кверцетина	90% ДИ отношения средних геометрических
C_{max} , нг/мл	10056,84 (3728,69; 19292,47)	19287,24 (14312,4; 34034,29)	1,18 – 3,13; $p=0,0386^*$
AUC_{0-t} , нг*ч/мл	85856,74 (42928,82; 130291,55)	189757,29 (144401,64; 228023,01)	1,44 – 3,39; $p=0,0106^*$
$AUC_{0-\infty}$, нг*ч/мл	88638,97 (43095,51; 133729,29)	200373,85 (158898,94; 264936,49)	1,28 – 3,99; $p=0,0127^*$
$T_{1/2}$, ч	4,1 (2,0; 5,43)	4,34 (2,55; 8,77)	0,53 – 2,11; $p=0,9608$
Примечание – * $p < 0,05$ – достоверные различия между сериями однократно и курсового введения			

Более выраженные изменения концентрации субстрата белка-транспортера после курсового введения кверцетина доказывают, что при выполнении исследований предпочтительно использование не однократного, а курсового введения исследуемого вещества (рекомендуемый курс 7 дней) для более значимой динамики активности BCRP.

Таким образом, полученные данные свидетельствуют об адекватности разработанной методики тестирования лекарственных веществ на активность в

отношении BCRP *in vivo* на кроликах с использованием в качестве субстрата сульфасалазина.

3.4. Влияние ЭМГПС на активность BCRP *in vivo*

На следующем этапе исследования оценивалось влияние ЭМГПС на активность BCRP *in vivo* по разработанной методике – оценке фармакокинетики субстрата BCRP – сульфасалазина на фоне однократного и курсового введения тестируемого препарата – ЭМГПС (Рисунок 24, Таблица 18).

Для этого ЭМГПС вводили однократно внутрижелудочно в дозе 50 мг/кг и курсом в течение 7 дней в той же дозе после чего вводили сульфасалазин и анализировали его фармакокинетику.

Однократное введение ЭМГПС статистически значимо не влияло на все изучаемые параметры фармакокинетики сульфасалазина – $C_{\max}$, AUC_{0-t} , $AUC_{0-\infty}$ и $T_{1/2}$ ($p>0,05$). Полученные результаты свидетельствуют об отсутствии влияния однократного внутрижелудочного введения ЭМГПС на активность BCRP (Таблица 19).

В то же время курсовое в течение 7 дней введение ЭМГПС в дозе 50 мг/кг 1 раз в день вызывало повышение $C_{\max}$ сульфасалазина в 1,81 раза (90% ДИ 1,09 – 2,99; $p=0,0577$) и AUC_{0-t} в 1,52 раз (90% ДИ 1,00 – 2,30; $p=0,0994$) (Таблица 20).

Полученные результаты свидетельствуют об отсутствии значимого ингибирования белка-транспортера BCRP на уровне *in vivo* как для однократного, так и курсового введения ЭМГПС. Однако, обращает на себя внимание отчетливая тенденция ($p=0,0577$) к увеличению $C_{\max}$ сульфасалазина после курсового использования ЭМГПС в течение 7 дней.

При сравнении фармакокинетических параметров сульфасалазина после однократного и курсового введения ЭМГПС было установлено, что AUC_{0-t} и $AUC_{0-\infty}$ после курсового введения превышали значения после однократного введения в 1,75 раза (90% ДИ 1,28 – 2,38; $p=0,0095$) и 1,73 раза (90% ДИ 1,25 – 2,38; $p=0,0121$) соответственно, а $C_{\max}$ и $T_{1/2}$ достоверно не различались (Таблица 21).

Таблица 18 – Концентрация сульфасалазина (мкг/мл) в плазме крови кроликов после его внутрижелудочного введения в дозе 125 мг/кг массы на фоне ЭМГПС (медиана, верхний и нижний квартили)

Группы эксперимента	Временные точки											
	0,25 ч	0,5 ч	1 ч	1,5 ч	2 ч	3 ч	4 ч	5 ч	6 ч	8 ч	12 ч	24 ч
Контроль	0,29 (0,23; 0,70)	1,23 (0,52; 2,93)	1,64 (1,02; 3,86)	3,68 (1,51; 8,05)	5,56 (2,94; 9,00)	7,21 (4,20; 8,77)	6,78 (4,96; 8,47)	7,32 (6,47 8,84)	5,92 (5,52; 8,69)	6,15 (3,27; 8,08)	2,86 (2,19; 5,83)	0,55 (0,37; 0,66)
ЭМГПС, доза 50 мг/кг, в/ж, однократно	1,04 (0,25; 2,56)	1,41 (0,62; 2,71)	3,31 (1,42; 6,62)	7,38 (2,96; 9,16)	8,76 (5,49; 11,14)	10,06 (5,38; 12,93)	6,69 (6,54; 7,86)	5,15 (4,11; 6,27)	4,67 (3,90; 5,30)	2,11 (1,83; 6,46)	1,40 (1,19; 2,72)	0,30 (0,26; 0,44)
ЭМГПС, доза 50 мг/кг, в/ж, 1 р/д, 7 дней	1,12 (0,60; 2,95)	1,83 (0,73; 4,17)	4,66 (2,27; 10,47)	9,45 (4,33; 13,13)	12,62 (5,86; 16,78)	13,69 (6,40; 20,48*)	8,29 (7,50; 14,50)	8,60 (8,07; 10,95)	9,93 (8,84; 12,32)	6,12 (3,32; 7,13)	5,65 (3,71; 6,00)	0,39 (0,29; 0,92)
Примечание – в/ж – внутрижелудочно, р/д – раз в день; * – образцы разводились и анализировались повторно												

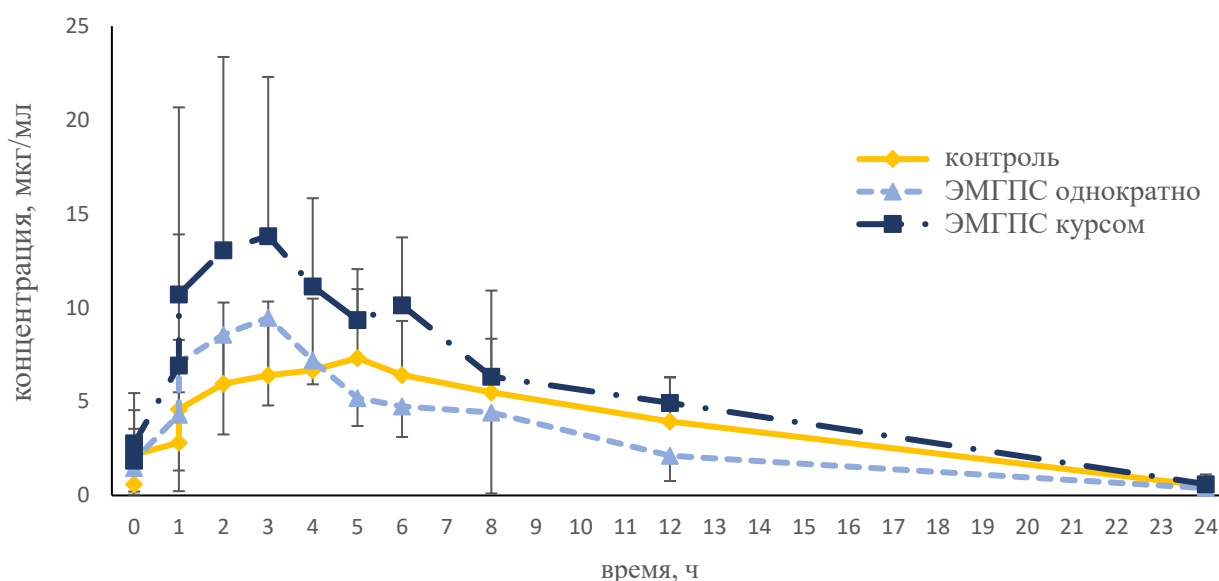


Рисунок 24 – Усредненные фармакокинетические кривые «концентрация-время» сульфасалазина (исходные/контроль), после однократного и курсового введения ЭМГПС

Таблица 19 – Усредненные фармакокинетические параметры сульфасалазина у кроликов до и после однократного введения ЭМГПС в дозе 50 мг/кг массы (Geom Mean и его 90% ДИ)

Параметры фармакокинетики	Исходные значения (контроль)	Значения после однократного введения ЭМГПС	90% ДИ отношения средних геометрических
$C_{\max}$, нг/мл	8217,41 (2326,36; 12680,87)	11661,06 (6689,44; 17207,05)	0,80 – 2,52; $p=0,3302$
AUC_{0-t} , нг*ч/мл	83137,23 (30437,78; 130032,88)	72134,87 (38997,60; 99168,22)	0,53 – 1,43; $p=0,7413$
$AUC_{0-\infty}$, нг*ч/мл	87886,42 (35042,48; 130252,25)	75000,09 (40636,00; 108259,30)	0,54 – 1,36; $p=0,6607$
$T_{1/2}$, ч	4,54 (2,47; 6,77)	4,84 (2,94; 6,86)	0,67 – 1,69; $p=0,9295$

Таблица 20 – Усредненные фармакокинетические параметры сульфасалазина у кроликов до и после курсового введения ЭМГПС в дозе 50 мг/кг массы (Geom Mean и его 90% ДИ)

Параметры фармакокинетики	Исходные значения (контроль)	Значения после курсового введения ЭМГПС	90% ДИ отношения средних геометрических
$C_{\max}$, нг/мл	8217,41 (2326,36; 12680,87)	14852,69 (9002,72; 31882,01)	1,09 – 2,99; $p=0,0577$
AUC_{0-t} , нг*ч/мл	83137,23 (30437,78; 130032,88)	126019,62 (81955,94; 192979,32)	1,00 – 2,30; $p=0,0994$
$AUC_{0-\infty}$, нг*ч/мл	87886,42 (35042,48; 130252,25)	129538,40 (84148,08; 202793,28)	0,996 – 2,18; $p=0,1034$
$T_{1/2}$, ч	4,54 (2,47; 6,77)	4,02 (1,93; 5,49)	0,52 – 1,50; $p=0,8166$

Таблица 21 – Сравнение усредненных фармакокинетических параметров сульфасалазина у кроликов после однократного (100 мг/кг массы) и курсового введения ЭМГПС в дозе 50 мг/кг массы (Geom Mean и его 90% ДИ)

Параметры фармакокинетики	Значения после однократного введения ЭМГПС	Значения после курсового введения ЭМГПС	90% ДИ отношения средних геометрических
$C_{\max}$, нг/мл	11661,06 (6689,44; 17207,05)	14852,69 (9002,72; 31882,01)	0,94 – 1,73; $p=0,1982$
AUC_{0-t} , нг*ч/мл	72134,87 (38997,60; 99168,22)	126019,62 (81955,94; 192979,32)	1,28 – 2,38; $p=0,0095^{**}$
$AUC_{0-\infty}$, нг*ч/мл	75000,09 (40636,00; 108259,30)	129538,40 (84148,08; 202793,28)	1,25 – 2,38; $p=0,0121^{*}$
$T_{1/2}$, ч	4,84 (2,94; 6,86)	4,02 (1,93; 5,49)	0,55 – 1,25; $p=0,5306$
Примечание – * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$ – достоверные различия между сериями однократно и курсового введения			

Подобная динамика может свидетельствовать о более значимом воздействии ЭМГПС на активность BCRP при курсовом введении, то есть для изменения активности белка-транспортера под действием тестируемого вещества требуется время, что, в свою очередь может указать на снижении активности BCRP не за счет прямого ингибирования молекулы транспортера, а, вероятно, за счет снижения количества BCRP.

Полученные результаты позволяют предполагать, что клинически значимое влияние на активность BCRP может иметь только курсовое введение ЭМГПС.

3.5 Влияние ЭМГПС на фармакокинетику и фармакодинамику ривароксабана в эксперименте *in vivo*

Для оценки практической значимости полученных результатов о возможном ингибировании активности BCRP на фоне курсового введения ЭМГПС были выполнены эксперименты с субстратом транспортера – ривароксабаном, фармакокинетика которого зависит не только от активности BCRP, но также от функционирования другого транспортера – Р-гликопротеина и ферментов метаболизма, в частности изоферментов цитохрома P450.

Оценка фармакокинетики ривароксабана важна для прогнозирования развития межлекарственных взаимодействий с его участием и повышения безопасности проводимой антикоагулянтной терапии.

Так как ЭМГПС оказал влияние на фармакокинетику сульфасалазина только при курсовом введении, для оценки влияния препарата на фармакокинетику ривароксабана использовалось только его курсовое введение в течение 7 дней (Рисунок 25, Таблица 22).

Влияние ЭМГПС на фармакокинетику ривароксабана оценивали по изменению основных фармакокинетических параметров антикоагулянта (C_{max} , AUC_{0-t} , $AUC_{0-\infty}$, $T_{1/2}$) после курсового введения ЭМГПС по сравнению с исходными показателями (контроль). Полученные результаты представлены в Таблице 23.

Таблица 22 – Концентрация ривароксабана (нг/мл) в плазме крови кроликов после его внутривенного введения в дозе 3 мг/кг массы на фоне ЭМГПС (медиана, верхний и нижний квартили)

Группы эксперимента	Временные точки									
	0,5 ч	1 ч	1,5 ч	2 ч	3 ч	4 ч	5 ч	6 ч	8 ч	24 ч
Контроль	9,28	12,85	16,90	22,37	28,58	54,86	45,30	40,54	35,01	23,32
	(8,21;	(10,75;	(14,40;	(19,39;	(22,13;	(35,78;	(31,40;	(34,67;	(22,50;	(19,44;
	10,90)	14,22)	23,75)	23,99)	35,14)	65,67)	95,88)	77,07)	60,58)	26,28)
ЭМГПС, доза 50 мг/кг, в/ж, 3 р/д, 7 дней	16,48	23,75	41,10	38,82	54,66	46,49	53,12	38,88	46,60	23,29
	(13,67;	(16,49;	(17,43;	(19,06;	(35,46;	(29,17;	(24,35;	(32,65;	(31,64;	(16,88;
	20,93)	31,94)	56,23)	57,97)	61,79)	64,81)	59,26)	62,72)	82,15)	28,98)
Примечание – в/ж – внутривенно, р/д – раз в день										

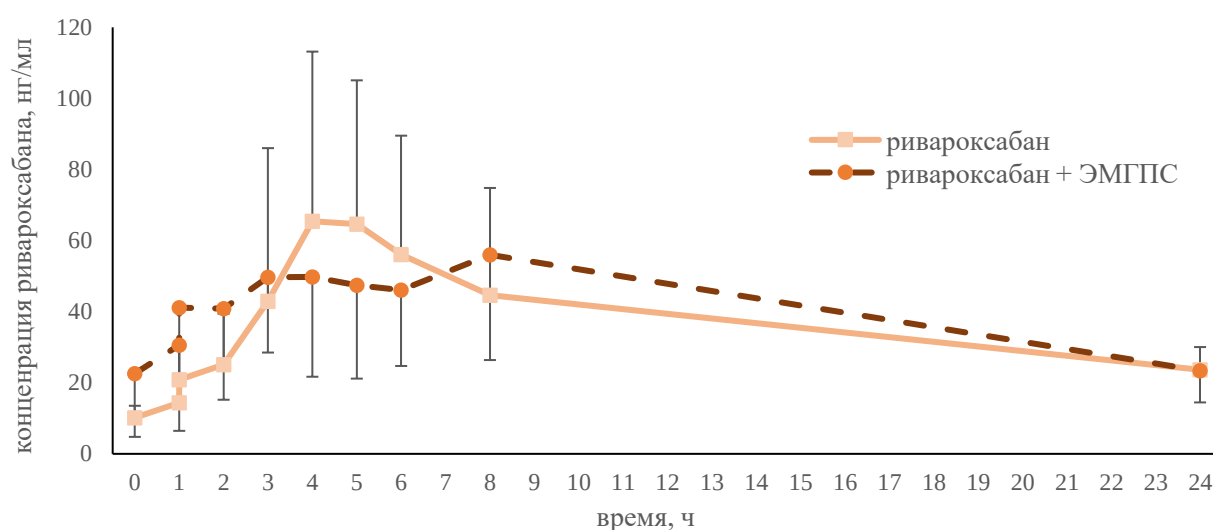


Рисунок 25 – Усредненные фармакокинетические кривые «концентрация-время» ривароксабана (исходные/контроль) после курсового введения ЭМГПС

Таблица 23 – Сравнение усредненных фармакокинетических параметров ривароксабана у кроликов после курсового введения ЭМГПС (50 мг/кг массы) (Geom Mean и его 90% ДИ)

Параметры фармакокинетики	Исходные значения (контроль)	Значения после курсового введения ЭМГПС	90% ДИ отношения средних геометрических
$C_{\max}$, нг/мл	68,23 (36,98; 168,342)	71,14 (35,57; 96,79)	0,68 – 1,59; $p=0,8538$
AUC_{0-t} , нг*ч/мл	803,74 (427,24; 1393,88)	928,90 (553,89; 1448,71)	0,84 – 1,59; $p=0,4139$
$AUC_{0-\infty}$, нг*ч/мл	1667,59 (953,94; 2560,68)	1466,06 (743,03; 2285,31)	0,57 – 1,36; $p=0,5892$
$T_{1/2}$, ч	20,83 (8,65; 48,67)	13,41 (7,30; 47,94)	0,31 – 1,32; $p=0,2766$

Из полученных данных видно, что основные фармакокинетические параметры ривароксабана ($C_{\max}$, AUC_{0-t} , $AUC_{0-\infty}$, $T_{1/2}$) достоверно не изменялись ($p>0,05$) после внутрижелудочного введения ЭМГПС в дозе 50 мг/кг в течение 7 дней.

При оценке протромбинового времени были получены следующие результаты. Однократное внутрижелудочное введение ривароксабана приводило к увеличению протромбинового времени на 45,2% ($p=0,049$), так же, как и введение

ривароксабана, после курсового введения ЭМГПС увеличивало данный показатель на 67,2% ($p=0,004$) по сравнению с исходными показателями. При этом достоверных различий между значением протромбинового времени после введения ривароксабана и после введения ривароксабана на фоне ЭМГПС получено не было ($p>0,05$) (рис. 26).

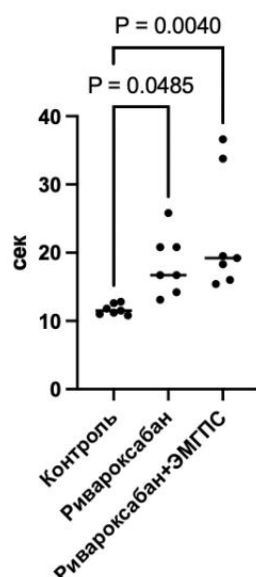


Рисунок 26 – Влияние ривароксабана и ривароксабана после курсового введения ЭМГПС на величину протромбинового времени (медиана и индивидуальные значения, сек)

Таким образом, результаты эксперимента свидетельствует о том, что ЭМГПС при курсовом введении не оказывает влияния на фармакокинетику и фармакодинамику ривароксабана, что подтверждает их возможное безопасное совместное применение.

ГЛАВА 4. ОБСУЖДЕНИЕ ПОЛУЧЕННЫХ РЕЗУЛЬТАТОВ

Значительную роль в фармакокинетике играют транспортные системы организма, способные регулировать количество эндо- и экзогенных веществ в крови, а также в различных тканях и органах. Помимо этого, на уровне белков-переносчиков могут происходить межлекарственные взаимодействия. Наибольшее влияние на транспорт и взаимодействие лекарственных веществ оказывает суперсемейство АТФ-связывающих кассетных транспортеров (ABC-транспортеров), к которому относят, например, гликопротеин Р (P-gp), BCRP, белок множественной лекарственной устойчивости (MRP), имеющие наиболее широкую субстратную специфичность [73, 290].

BCRP – белок резистентности рака молочной железы (ABCG2, MXR; ABCP) – АТФ-зависимый эффлюксный белок-транспортёр, физиологически экспрессирующийся в эндотелиальных клетках различных гистогематических барьеров (ГЭБ, плацентарный и др.), эпителиальных клетках кишечника и почечных канальцев, в молочных железах, желчных канальцах и в различных прогениторных и стволовых клетках [244]. В перечисленных тканях BCRP участвует в ключевых физиологических и фармакокинетических процессах (абсорбция, распределение и выведение эндо- и ксенобиотиков, являющихся субстратами данного белка-переносчика).

BCRP способен удалять из клетки препараты разных фармакологических групп [1, 173, 179]. Известны и изучены ингибиторы белка-транспортёра: кверцетин, резерпин, нимодипин, омепразол и др. [1, 179]. Установлены индукторы BCRP, к которым относят, холестерин, телапревир, довитиниб, оксотреморин и др. [118, 249, 265].

Совместное назначение субстратов BCRP и модуляторов его активности может приводить к снижению эффективности терапии, развитию нежелательных лекарственных реакций, а в некоторых случаях провоцировать относительную передозировку лекарственных средств [90, 229].

Учитывая вышеизложенное, для повышения эффективности и безопасности проводимой терапии, прогнозирования развития межлекарственных взаимодействий ведущие мировые регуляторные органы (ICH, FDA, EMA) рекомендуют тестировать лекарственные вещества на принадлежность к субстратам и ингибиторам BCRP, а также других клинически значимых транспортеров (P-gr, OATP1B1, OATP1B3, OAT1, OAT3, OCT2 и др.) [140, 150].

Этилметилгидроксипиридина сукцинат (ЭМГПС) – оригинальный российский препарат, применяющийся для лечения заболеваний центральной нервной и сердечно-сосудистой систем, сопровождающихся ишемическими нарушениями и развитием окислительного стресса [26, 38]. Использование препарата в комплексной терапии широкого спектра заболеваний обуславливает необходимость проверки его участия в развитии межлекарственных взаимодействий [8]. С целью их прогнозирования, повышения эффективности и безопасности фармакотерапии целесообразно изучение принадлежности ЭМГПС к субстратам и модуляторам активности ряда важнейших белков-транспортеров, включая BCRP.

Так, для ЭМГПС были изучены субстратные свойства и ингибирующая активность в отношении гликопротеина Р (ABCB1) и OATP1B1/B3. Исследования показали, что препарат не является субстратом для данных белков, а как ингибитор проявляет клиническую значимость только для гликопротеина Р в желудочно-кишечном тракте [5, 12, 44].

Оценку влияния ЭМГПС на активность BCRP в настоящем исследовании проводили по изучению фармакокинетики его субстрата – сульфасалазина. Для этого на данном этапе решалась первая задача исследования – была разработана и валидирована методика количественного определения сульфасалазина методом ВЭЖХ-МС/МС в транспортной среде и плазме крови кроликов. Выбор сульфасалазина в качестве субстрата обусловлен специфичностью по отношению к BCRP, отсутствием выраженных системных и побочных эффектов на организм животного, поскольку в дальнейших задачах работы планировалось его использование в экспериментах как *in vitro*, так и *in vivo* [78, 112]. Кроме того, для

данного препарата отмечают эффективный транспорт в клеточной линии Сасо-2, являющейся тест-системой *in vitro* в нашем исследовании [56]. Валидацию методики осуществляли по следующим параметрам: селективность, предел количественного определения, линейность, правильность, прецизионность, эффект переноса, стабильность, матричный эффект и эффект извлечения. Подтверждённый аналитический диапазон методики (5 – 5000 нг/мл для культуральной среды и 50 – 20000 нг/мл для плазмы крови кроликов) позволяет использовать ее для оценки количества сульфасалазина в различных биологических объектах (транспортная среда и плазма крови кроликов) при изучении действия тестируемых веществ на активность белка-транспортера BCRP [24].

Следующей задачей исследования явилось изучение влияния ЭМГПС на активность BCRP *in vitro* в сравнительном аспекте. Ранее было установлено, что ЭМГПС не является субстратом данного транспортера и показана его ингибирующая активность в концентрации 100 мкМ [16, 35]. Нашей задачей стало установление диапазона ингибирующих концентраций ЭМГПС, расчет IC_{50} , количественной характеристики и клинической значимости его активности в отношении BCRP, сравнение полученных данных с серией оценки классического ингибитора транспортера – кверцетина.

В эксперименте *in vitro* на клетках линии Сасо-2 изучено влияние ЭМГПС на активность BCRP в широком диапазоне концентраций (0,1 мкМ – 500 мкМ). Оценку функциональной активности BCRP выполняли по анализу транспорта его субстрата – сульфасалазина в трансвел-системах в присутствии ЭМГПС и кверцетина.

Установлено ингибирующее действие ЭМГПС на BCRP диапазоне концентраций 50 мкМ – 500 мкМ, рассчитанная IC_{50} препарата составила 37,5 мкМ. Подтверждено ингибирующее действие кверцетина во всем диапазоне изученных концентраций с IC_{50} 0,2 мкМ. Таким образом, ингибирующая активность ЭМГПС в отношении BCRP значительно уступает по силе действия классическому препарату – кверцетину [22].

Сравнение полученных результатов с данными научной литературы подтверждает слабый ингибирующий эффект ЭМГПС на активность BCRP. Так для специфического ингибитора BCRP лапатиниба IC_{50} , установленная на клетках MDCKII-BCRP по транспорту субстрата циметидина, составила 0,025 мкМ [278]. IC_{50} ингибитора транспортера циклоспорина, рассчитанная по транспорту субстрата PhIP на том же типе клеток, равняется 11,1 мкМ [277]. Значение IC_{50} для селективного ингибитора Ko143, изученное в исследовании на клеточной линии Caco-2 по транспорту 3Н-эстрон-3-сульфата, составляет 0,23 мкМ [261]. Проведение везикулярного анализа (везикулы получали из трансфицированных клеток Sf9), где как положительный контроль использовали сульфасалазин, показало активность сильных ингибиторов BCRP: вемурафениб ($IC_{50} = 1,2$ мкМ), дабигатрана этексилат ($IC_{50} = 1,8$ мкМ) и эверолимус ($IC_{50} = 2,2$ мкМ) [204]. Однако, следует подчеркнуть, что препараты могут иметь разное сродство и силу действия на один и тот же транспортер в разных клеточных линиях [166].

При оценке клинической значимости ингибирующего действия ЭМГПС было установлено отсутствие системного ингибирования BCRP: C_{max} / IC_{50} составляет 0,01 ($<0,1$). Однако изучаемый препарат способен подавлять активность BCRP в желудочно-кишечном тракте и принимать участие в межлекарственных взаимодействиях на этапе всасывания (отношение доза ЭМГПС / 250 мл / $IC_{50} = 1$ мг/мл / 37,5 мкМ = 3922 мкМ / 37,5 мкМ = 104,6, что >10). Соответственно, ЭМГПС может повышать всасывание, концентрацию и, следовательно, активность субстратов белка-транспортера (например, сульфасалазина, метотрексата, митоксантрона, топотекана, ривароксабана и др.) [56, 179] при совместном пероральном применении.

Для подтверждения полученных результатов были проведены эксперименты *in vivo*. В Российской Федерации подобные исследования ранее не проводились, а описанные в зарубежной научной литературе методики предполагают использование большого количества лабораторных животных, либо имеют иные цели работы [198, 224]. Поэтому на следующем этапе исследования решалась

задача разработки *in vivo* методики анализа ингибирующей активности лекарственных веществ в отношении белка-транспортера BCRP.

Для данной методики в качестве тест-системы выбрали самцов кроликов породы Советская Шиншилла, доказав в предварительном исследовании методом вестерн-блот высокое количество белка-транспортера BCRP в различных органах животных в сравнении с самцами лабораторных крыс Wistar и мышей ICR.

Сульфасалазин, выбранный в качестве субстрата для *in vivo* методики оценки принадлежности тестируемых веществ к модуляторам активности BCRP, обладает высоким аффинитетом к данному белку-транспортеру [79]. Указанный препарат считается селективным субстратом BCRP, т.к. в его трансмембранном переносе не участвуют другие ABC-транспортеры – гликопротеин Р и MRP2, которые также локализованы в кишечнике [79, 215, 216]. При этом в отличие от ряда иных высокоселективных субстратов (митоксантрон, метотрексат) для него не характерны выраженные цитотоксические свойства и высокая частота проявления системных побочных эффектов, которые способны оказать влияние на активность транспортера [78]. Перечисленные характеристики делают его оптимальным кандидатом-субстратом в опытах *in vivo*.

Кверцетин – селективный ингибитор BCRP, обладающий низкой себестоимостью и малым количеством побочных эффектов, в отличие от иных ингибиторов, рекомендуемых для исследований (лапатиниб, гефитиниб) [224]. В сравнении с куркумином, другим пищевым биологически активным продуктом, данное вещество имеет более высокую ингибирующую активность: IC_{50} куркумина = 1,6 мкМ; IC_{50} кверцетина = 0,6 мкМ [78, 224].

Таким образом, вещества, выбранные для разработки и экспериментального обоснования методики, являются оптимальными, селективными и безопасными при однократном и курсовом использовании у лабораторных животных. При анализе литературных данных подобное сочетание субстрата и ингибитора в экспериментах показало возможность его использования у крыс и собак породы бигль при однократном введении [198, 224].

Полученные в настоящем исследовании результаты выявили наличие у кверцетина ингибирующей способности в отношении белка-транспортера BCRP в экспериментах *in vivo* у кроликов при однократном и курсовом применении, что дополняет имеющиеся данные для других видов животных и согласуется с ними [198, 224]. Подобная ингибирующая активность в целом отмечается для ряда флавоноидов (гесперидин; акацетин; кампферол и т.д.), что можно связать со схожими свойствами и структурой у данной группы соединений [55, 260].

Значимое снижение активности белка-транспортера наблюдалось как при однократном (100 мг/кг), так и при курсовом введении кверцетина в дозировке 25 мг/кг, но было достоверно более выражено для большего количества фармакокинетических параметров при курсовом применении в течение 7 дней по сравнению с серией однократного использования ингибитора. C_{max} сульфасалазина при курсовом введении кверцетина в сравнении с однократным достоверно увеличивалась в 1,92 раза ($p=0,0386$), AUC_{0-t} в 2,21 раза ($p=0,0106$), $AUC_{0-\infty}$ в 2,26 раза ($p=0,0127$).

При этом обращает на себя внимание достоверное изменение параметров C_{max} , AUC_{0-t} , $AUC_{0-\infty}$, которые характеризуют концентрацию сульфасалазина в крови, скорость и степень всасывания вещества, в то время как $T_{1/2}$, показывающий выведение препарата, не изменился ($p>0,05$), что согласуется с данными других исследований [224].

Далее решалась задача изучения влияния ЭМГПС на активность BCRP *in vivo* по разработанной методике анализа ингибирующей активности лекарственных веществ. При введении животным ЭМГПС внутривенно в дозе 50 мг/кг массы достоверных изменений фармакокинетических параметров сульфасалазина не зафиксировано, что свидетельствует об отсутствии ингибирования BCRP *in vivo* как при однократном, так и курсовом применении препарата. Однако, обращает на себя внимание отчетливая тенденция к увеличению C_{max} сульфасалазина после курсового использования ЭМГПС в течение 7 дней ($p<0,0577$). Следовательно, полученные результаты позволяют предполагать, что влияние курсового введения

препарата, снижающее активность BCRP, может иметь клиническое значение на этапе всасывания для субстратов транспортера.

Полученные результаты подтверждают и дополняют имеющиеся сведения об ингибирующей способности в отношении BCRP соединений дигидропиридинового ряда, к которым относится и ЭМГПС. Предполагаемый механизм ингибирования для азотсодержащих гетероциклов не был изучен, вероятно для них характерно аллостерическое, либо конкурентное ингибирование [71]. Так как ЭМГПС не является субстратом белка-транспортера, более вероятен аллостерический механизм ингибирования, связанный со снижением активности АТФ-азы. В ранее проведенных исследованиях было установлено, что ЭМГПС достоверно не влияет на количество белка-транспортера в клетках Caco-2 при инкубировании в течение 24 часов, т.е. процесс ингибирования не сопровождается изменением синтеза белка в указанные сроки [35]. Однако, в экспериментах *in vivo* при однократном и курсовом введении препарата влияние ЭМГПС на количество BCRP нуждается в проверке. Поэтому дальнейшее изучение механизма ингибирования белка-транспортера ЭМГПС требует комплексного подхода и анализа. Полученные результаты при этом смогут дополнить сведения о механизмах ингибирования BCRP для соединений дигидропиридинового ряда.

Поскольку ингибирование BCRP при курсовом введении ЭМГПС в желудочно-кишечном тракте показало значимость на уровне отчетливой тенденции, была поставлена задача изучить влияние ЭМГПС на фармакокинетику и фармакодинамику ривароксабана в эксперименте *in vivo*. Ривароксабан был выбран как субстрат BCRP [51, 149], антикоагулянт, имеющий важное практическое значение, широко использующийся в клинической практике и потенциально опасный при передозировке из-за риска возникновения кровотечений [64, 84, 235]. Анализ подобной комбинации важен в практическом отношении для повышения безопасности антикоагулянтной терапии, так как данные препараты зачастую назначаются совместно, например, при лечении ряда сердечно-сосудистых заболеваний [8]. В частности, ЭМГПС включен в клинические рекомендации для лечения ишемического инсульта и транзиторной

ишемической атаки. При эмболическом генезе инсульта в его лечении применяют прямые оральные антикоагулянты. Пациенты пожилого и старческого возраста часто страдают сопутствующими заболеваниями сердечно-сосудистой системы, в т.ч. фибрилляцией предсердий, поэтому им в целях профилактики тромботических осложнений назначаются препараты новых оральных антикоагулянтов. Таким образом, совместное назначение ЭМГПС и ривароксабана показано в ряде клинических случаев и не имеет противопоказаний и ограничений для совместного использования согласно инструкциям по применению препаратов.

Результаты, полученные в ходе эксперимента *in vivo*, показали отсутствие влияния ЭМГПС на фармакокинетические параметры и фармакодинамику ривароксабана, что характеризует низкую вероятность ингибирования BCRP, способную существенно увеличить всасывание ривароксабана. Дополнительно отсутствие увеличения концентрации ривароксабана может объяснить влияние ЭМГПС на его метаболизм, так как изучаемый антигипоксант является индуктором цитохрома P-450 изоформы 3A4 [4, 39]. Изоформа CYP3A4 метаболизирует 18% от общего количества ривароксабана (против 14% под действием CYP2J2 и 14% некатализируемого системой цитохромов гидролиза амидных связей). Остальные 36% выводятся почками в неизменном виде, причем активная секреция с помощью P-gr и BCRP является основным механизмом (только 6% ривароксабана фильтруется в клубочках) [149, 234]. Таким образом, модуляция активности белков транспортеров (P-gr и BCRP) и изоферментов цитохрома P450 может привести к изменению плазменной концентрации ривароксабана и развитию побочных эффектов (при повышении концентрации), или неэффективности терапии и тромбозам (при ее снижении) [63]. Например, есть данные о том, что следующие препараты умеренно влияют на AUC ривароксабана, но не в клинически значимой степени: эритромицин (умеренный ингибитор CYP3A4/P-gr; увеличение AUC на 34% [95% ДИ 23%, 46%]), кларитромицин (сильный ингибитор CYP3A4/умеренный ингибитор P-gr; увеличение на 54% [95% ДИ 44%, 64%]) и флуконазол (умеренный ингибитор CYP3A4, возможный ингибитор BCRP увеличение на 42% [95% ДИ 29%, 56%]). Значительное увеличение AUC

ривароксабана было продемонстрировано при применении сильных ингибиторов CYP3A4, P-gp/BCRP (и потенциальных ингибиторов CYP2J2) кетоконазола (увеличение на 158% [95% ДИ 136%, 182%] при дозе 400 мг один раз в сутки) и ритонавира (увеличение на 153% [95% ДИ 134%, 174%]) [192].

Полученные результаты позволяют предположить высокую вероятность безопасного совместного применения ЭМГПС и ривароксабана, что, однако, не исключает целесообразность проведения клинических испытаний.

Таким образом, в экспериментах *in vitro* на клетках линии Caco-2 установлена ингибирующая активность ЭМГПС в отношении BCRP в концентрациях 50 – 500 мкМ с IC_{50} – 37,5 мкМ, что характеризует слабый эффект в сравнении с классическим ингибитором BCRP кверцетином (IC_{50} – 0,2 мкМ), выявлена клиническая значимость ингибирования BCRP в желудочно-кишечном тракте при отсутствии системного ингибирования транспортера. Разработана *in vivo* методика анализа ингибирующей активности тестируемых веществ в отношении BCRP, с помощью которой установлено, что на фоне курсового применения ЭМГПС наблюдается отчетливая тенденция увеличения C_{max} сульфасалазина, которая показывает вероятность ингибирования BCRP на уровне желудочно-кишечного тракта и отсутствие изменений фармакокинетики и фармакодинамики субстрата BCRP – ривароксабана.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В ходе настоящего исследования изучено влияние этилметилгидроксипиридина сукцината на функциональную активность белка-транспортера BCRP в экспериментах *in vitro* и *in vivo*. Для чего была разработана и валидирована методика количественного определения сульфасалазина, субстрата белка-транспортера BCRP, методом ВЭЖХ-МС/МС в транспортной среде и в плазме крови кроликов.

В экспериментах *in vitro* на клетках линии Caco-2 установлена ингибирующая активность ЭМГПС в отношении BCRP в концентрациях 50, 100, 250 и 500 мкМ. IC_{50} препарата составила 37,5 мкМ, что характеризует слабый эффект, в сравнении с классическим ингибитором белка-транспортера – кверцетином. Для ЭМГПС показано отсутствие системного ингибирования и клиническая значимость ингибирования BCRP в желудочно-кишечном тракте.

Для проведения экспериментов *in vivo* была разработана методика оценки ингибирующей активности тестируемых веществ в отношении BCRP по анализу фармакокинетики субстрата транспортера – сульфасалазина, с использованием в качестве тест-системы кроликов самцов породы Советская Шиншилла. В эксперименте *in vivo* не выявлено достоверного изменения C_{max} , AUC_{0-t} , $AUC_{0-\infty}$ сульфасалазина на фоне однократного внутрижелудочного введения ЭМГПС и обнаружена выраженная тенденция увеличения C_{max} после курсового применения препарата, что свидетельствует о вероятности ингибирования BCRP в желудочно-кишечном тракте.

Учитывая полученные результаты, был выполнен анализ фармакокинетического межлекарственного взаимодействия ЭМГПС и ривароксабана, также являющегося субстратом BCRP. В эксперименте *in vivo* установлено, что ЭМГПС при курсовом введении не влияет на фармакокинетические параметры и фармакодинамику ривароксабана, что позволяет предположить безопасность их совместного применения, но не исключает целесообразность проведения клинических испытаний.

ВЫВОДЫ

1. Разработана и валидирована по требуемым критериям высокочувствительная методика количественного определения сульфасалазина методом ВЭЖХ-МС/МС с подтвержденным аналитическим диапазоном концентраций 5 – 5000 нг/мл в транспортной среде и 50 – 20000 нг/мл в плазме крови кроликов.

2. В экспериментах *in vitro* на клетках линии Caco-2 установлена ингибирующая активность этилметилгидроксипиридина сукцината в отношении BCRP в концентрациях 50, 100, 250 и 500 мкМ, IC_{50} препарата составила 37,5 мкМ, что характеризует слабый эффект в сравнении с классическим ингибитором BCRP кверцетином (IC_{50} – 0,2 мкМ). Соотношение C_{max} / IC_{50} для этилметилгидроксипиридина сукцината составляет 0,01 ($<0,1$), что показывает отсутствие системного ингибирования BCRP. Отношение доза этилметилгидроксипиридина сукцината / 250 мг / IC_{50} составляет 104,6 (>10), что характеризует клиническую значимость ингибирования BCRP в желудочно-кишечном тракте.

3. Разработана *in vivo* методика анализа ингибирующей активности тестируемых веществ в отношении BCRP с использованием в качестве тест-системы кроликов самцов породы Советская Шиншилла, в качестве субстрата – сульфасалазина в дозе 125 мг/кг массы, причем предпочтительно курсовое (7 дней), а не однократное внутрижелудочное введение изучаемого вещества для более значимой динамики активности белка-транспортера, оцениваемой по фармакокинетике его субстрата.

4. В экспериментах *in vivo* не выявлено достоверного изменения C_{max} , AUC_{0-t} , $AUC_{0-\infty}$ сульфасалазина на фоне однократного (50 мг/кг) введения этилметилгидроксипиридина сукцината и обнаружена отчетливо выраженная тенденция увеличения C_{max} после курсового (50 мг/кг 1 раз в день в течение 7 дней) применения препарата ($p=0,0577$), последнее свидетельствует о вероятности ингибирования BCRP в желудочно-кишечном тракте.

5. В эксперименте *in vivo* установлено, что этилметилгидроксипиридина сукцинат при курсовом введении (50 мг/кг 1 раз в день в течение 7 дней) не влияет на фармакокинетические параметры и фармакодинамику субстрата BCRP – ривароксабана (3 мг/кг однократно).

ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

1. Разработанная методика количественного определения сульфасалазина методом ВЭЖХ-МС/МС может быть использована при выполнении транспортных экспериментов *in vitro* и фармакокинетических исследований с указанным субстратом.

2. Разработанная методика определения принадлежности тестируемых веществ к ингибиторам BCRP *in vivo* рекомендуется для последующего использования в экспериментах.

3. Данные об ингибирующей активности этилметилгидроксипиридина сукцината в отношении BCRP, полученные *in vitro* и установленное клиническое значение факта ингибирования белка-транспортера на уровне желудочно-кишечного тракта, позволяют рекомендовать применение данного препарата с осторожностью с субстратами BCRP, а именно разделение приемов с интервалом между ними более часа.

4. Данные об отсутствии значимых изменений фармакокинетики и фармакодинамики ривароксабана на фоне курсового применения этилметилгидроксипиридина сукцината в экспериментах *in vivo* позволяют считать их совместное использование безопасным, но не исключают целесообразности выполнения аналогичного по цели клинического исследования.

ПЕРСПЕКТИВЫ ДАЛЬНЕЙШЕЙ РАЗРАБОТКИ ТЕМЫ

Перспективы дальнейших исследований связаны с целесообразностью подтверждения данных, полученных для этилметилгидроксипиридина сукцината в экспериментах *in vitro* и *in vivo* данными клинических исследований. Необходимо изучение фармакокинетики других субстратов BCRP с низким терапевтическим индексом и выраженными побочными эффектами на фоне этилметилгидроксипиридина сукцината с контролем эффективности и безопасности терапии.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

5-АСК – 5-аминосалициловая кислота

АТФ – аденозинтрифосфат

АДФ – аденозиндифосфат

БАДы – биологически активные добавки к пище

БМАРП – болезнь-модифицирующие антиревматические препараты

ВИЧ-1 – вирус иммунодефицита человека 1-го типа

ВЭЖХ – высокоэффективная жидкостная хроматография

ГАМК – гамма-аминомасляная кислота

ДМСО – диметилсульфоксид

МС/МС – тандемная масс-спектрометрия

НПКО – нижний предел количественного определения

НЯК – неспецифический язвенный колит

ЭМГПС – этилметилгидроксипиридина сукцинат

АВС – АТФ-связывающие кассетные транспортеры (англ.: ATP-binding cassette)

AUC – площадь под фармакокинетической кривой (англ.: area under the curve)

BCRP – белок резистентности рака молочной железы человека (англ: human breast cancer resistance protein)

Caco-2 – клетки аденокарциномы ободочной кишки человека (англ.: cancer coli, colon cancer)

C_{max} – максимальная концентрация (англ.: maximum concentration)

CYP – цитохром P450-зависимая монооксигеназа (англ. cytochrome P450)

DDI – межлекарственные взаимодействия (англ: drug–drug interaction)

DMF – 5,7-диметоксифлавоны (англ: 5,7-Dimethoxyflavone)

GAPDH – глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназа (англ.: glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase)

НЕК293 – эмбриональные клетки почек человека (англ.: human embryonic kidney 293)

HepG2 – клеточная линия гепатоцеллюлярной карциномы человека (англ: human liver cancer cell line 2)

H-ESI – высокотемпературный электроспрей (англ. heated electrospray ionization source)

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

K_{el} – константа элиминации (англ: elimination rate constant)

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)

MDR – множественная лекарственная устойчивость (англ: multi-drug resistant)

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

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

NBD – нуклеотидсвязывающий домен (англ.: nucleotide binding domain)

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

P_{app} – коэффициент кажущейся проницаемости (англ. apparent permeability)

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

RFVT3 – переносчик рибофлавина (англ: riboflavin transporter-3)

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

T_{1/2} – период полувыведения (англ: apparent elimination half-life)

T_{max} – время достижения максимальной концентрации (англ: time to maximum concentration)

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

TMD – трансмембранный домен (англ.: transmembrane domain)

TM – трансмембранные сегменты (англ.: transmembrane)

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Белок резистентности рака молочной железы: структура, локализация, функции, значение для рациональной фармакотерапии / Н.М. Попова, А.В. Щулькин, Ю.С. Транова [и др.]. – Текст: непосредственный // Российский медико-биологический вестник имени академика И.П. Павлова. – 2024. – Т. 32, № 2. – С. 305–314.
2. Бельдиев, С.Н. Взаимодействие ривароксабана с амиодароном, верапамилом и дилтиаземом у пациентов с фибрилляцией предсердий: *terra incognita* / С.Н. Бельдиев. – Текст: непосредственный // Рациональная фармакотерапия в кардиологии. – 2016. – Т. 12, № 1. – С. 101–105.
3. Валентюкевич, А.Л. Способ взятия крови из яремной вены / А.Л. Валентюкевич, Н.А. Тарасов, К.Д. Лапчук. – Текст: непосредственный // Сборник материалов конференции студентов и молодых ученых, посвященной 90-летию со дня рождения профессора Борец Валентины Максимовны, 20–21 апреля 2017 г., Гродно / Министерство здравоохранения Республики Беларусь, УО «Гродненский государственный медицинский университет»; ответственный редактор В.А. Снежицкий. – Гродно: ГрГМУ, 2017. – С. 90. – 1 электрон. опт. диск.
4. Влияние мексидола на соотношение 6-бета-гидрокортизол/свободный кортизол. Возможная индукция СYP 3A4 / П.А. Баранов, С.А. Апполонова, Г.М. Родченков, [и др.]. – Текст: непосредственный // Экспериментальная и клиническая фармакология. – 2010. – Т. 73, № 11. – С. 39–40.
5. Влияние оригинальных отечественных нейротропных препаратов на полипептиды, транспортирующие органические анионы OATP1B1 и OATP1B3 / П.Д. Ерохина, Ю.В. Абаленихина, П.Ю. Мыльников [и др.]. – Текст: непосредственный // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. – 2023. – Т. 176, № 8. – С. 198–203. – DOI: 10.47056/0365-9615-2023-176-8-198-203.
6. Воронина, Т.А. Антиоксидант мексидол. Основные эффекты и механизм действия / Т.А. Воронина. – Текст: непосредственный // Психофармакология и биологическая наркология. – 2001. – Т. 1. – С. 2–12.

7. Воронина, Т.А. Мексидол: спектр фармакологических эффектов / Т.А. Воронина. – Текст: непосредственный // Журнал неврологии и психиатрии им. С.С. Корсакова. – 2012. – Т. 112, № 12. – С. 86–90.
8. Воронина, Т.А. Комбинированное применение мексидола с известными лекарственными средствами / Т.А. Воронина, Е.А. Иванова. – Текст: непосредственный // Журнал неврологии и психиатрии им. С.С. Корсакова. – 2019. – Т. 119, № 4. – С. 115–124. – DOI: 10.17116/jnevro2019119041115.
9. Дюмаев, К.М. Антиоксиданты в профилактике и терапии патологий ЦНС / К.М. Дюмаев, Т.А. Воронина, Л.Д. Смирнов. – Текст: непосредственный. – [М.: б. и.], 1995.
10. Иванова, Д.Ю. Сравнительный анализ методов взятия проб крови у экспериментальных крыс / Д.Ю. Иванова. – Текст: непосредственный // Научное сообщество студентов XXI столетия. Естественные науки: сборник статей по материалам XLII международной студенческой научно-практической конференции. – [б. м.: б. и.], [б. г.]. – № 41.
11. Известные и новые представления о механизме действия и спектре эффектов Мексидола / Т.А. Воронина, С.А. Литвинова, Н.А. Гладышева [и др.]. – Текст: непосредственный // Журнал неврологии и психиатрии им. С.С. Корсакова. – 2025. – Т. 125, № 5. – С. 22–33.
12. Изучение влияния эстрадиола на активность гликопротеина-P *in vitro* / П.Д. Ерохина, Ю.В. Абаленихина, А.В. Шулькин [и др.]. – Текст: непосредственный // Наука молодых (Eruditio Juvenium). – 2020. – Т. 8, № 3. – С. 329–336. – DOI: 10.23888/HMJ202083329-336.
13. Исследование антиокислительной активности новых аналогов этилметилгидроксипиридина сукцината и производных гидроксипиридидобензимидазола / Ю.В. Кузнецов, И.А. Матюшин, Л.Д. Смирнов [и др.]. – Текст: непосредственный // Вестник новых медицинских технологий. – 2006. – Т. XIII, № 3. – С. 9–10.

14. Казаков, А.С. Ривароксабан – риск развития нежелательных реакций взаимодействия / А.С. Казаков, А.В. Астахова, В.К. Лепехин. – Текст: непосредственный // Российский медицинский журнал. – 2014. – № 2. – С. 31–36.
15. Каркищенко, Н.Н. Фармакокинетика / Н.Н. Каркищенко, В.В. Хоронько, С.А. Сергеева [и др.]; под редакцией Г.И. Должич. – Текст: непосредственный. – Ростов-на-Дону: Феникс, 2001. – 381 с. – ISBN 5-222-01504-1.
16. Клетки линии Сасо-2 как модель для изучения абсорбции лекарственных веществ / А.В. Щулькин, Ю.С. Транова, Ю.В. Абаленихина [и др.]. – Текст: непосредственный // Экспериментальная и клиническая гастроэнтерология. – 2022. – № 10 (206). – С. 63–69. – DOI: 10.31146/1682-8658-ecg-206-10-63-69.
17. Макарова, М.Н. Использование кроликов в доклинических исследованиях / М.Н. Макарова, В.Г. Макаров. – Текст: электронный // Лабораторные животные для научных исследований. – 2023. – № 3. – URL: <https://cyberleninka.ru/article/n/ispolzovanie-krolikov-v-doklinicheskikh-issledovaniyah>.
18. Методика определения принадлежности лекарственных средств к числу субстратов гликопротеина-Р / Е.Н. Якушева, И.В. Черных, А.В. Щулькин [и др.]. – Текст: электронный // Российский медико-биологический вестник имени академика И.П. Павлова. – 2015. – № 3. – URL: <https://cyberleninka.ru/article/n/metodika-opredeleniya-prinadlezhnosti-lekarstvennyh-sredstv-k-chislu-substratov-glikoproteina-p>.
19. Механизм влияния тестостерона на белок-транспортер Р-гликопротеин / А.А. Слепнев, А. В. Щулькин, Ю. В. Абаленихина [и др.]. – Текст: непосредственный // Российский физиологический журнал им. И.М. Сеченова. – 2022. – Т. 108, № 9. – С. 1188–1199. – DOI: 10.31857/S0869813922090059.
20. Мирошниченко, И.И. Рациональное дозирование и мониторинг лекарственных средств: практическое руководство / И.И. Мирошниченко. – Текст: непосредственный. – Москва: Медицинское информационное агентство, 2011. – 410, [1] с.: ил., табл. – ISBN 978-5-9986-0042-5.

21. Можно ли оценивать принадлежность лекарственных веществ к субстратам гликопротеина-Р на самках кроликов породы Шиншилла / М.В. Гацанога, И.В. Черных, А.В. Щулькин [и др.]. – Текст: электронный // Наука молодых – Eruditio Juvenium. – 2016. – № 3. – URL: <https://cyberleninka.ru/article/n/mozhno-li-otsenivat-prinadlezhnost-lekarstvennyh-veschestv-k-substratam-glikoproteina-p-na-samkah-krolikov-porody-shinshilla>.

22. Оценка влияния этилметилгидроксипиридина сукцината на активность белка-транспортёра BCRP *in vitro* / М.И. Поветко, П.Ю. Мыльников, А.В. Щулькин [и др.]. – Текст: непосредственный // Фармакокинетика и фармакодинамика. – 2025. – № 3. – С. 57–64.

23. Разработка и валидация методики количественного определения метотрексата в транспортной среде методом ВЭЖХ-МС/МС / П.Ю. Мыльников, Ю. Транова, А.В. Щулькин [и др.]. – Текст: непосредственный // Фармакокинетика и фармакодинамика. – 2021. – № 1. – С. 45–51.

24. Разработка и валидация методики количественного определения сульфасалазина в плазме крови кроликов и среде культивирования клеток методом ВЭЖХ-МС/МС / М.И. Поветко, П.Ю. Мыльников, Ю. Транова [и др.]. – Текст: непосредственный // Химико-фармацевтический журнал. – 2025. – Т. 59, № 3. – С. 45–49. – DOI: 10.30906/0023-1134-2025-59-3-45-49.

25. Рандомизированное двойное слепое плацебо-контролируемое исследование эффективности и безопасности мексидола в комплексной терапии ишемического инсульта в остром периоде / В.И. Скворцова, Л.В. Стаховская, Я.Р. Нарциссов [и др.]. – Текст: непосредственный // Журнал неврологии и психиатрии им. С.С. Корсакова. Часть 2. – 2006. – Т. 106, № 12 (вып. 2). – С. 47–54.

26. Результаты международного многоцентрового рандомизированного двойного слепого плацебо-контролируемого исследования оценки эффективности и безопасности последовательной терапии пациентов с хронической ишемией мозга препаратами Мексидол и Мексидол ФОРТЕ 250 / А.И. Федин, В.В. Захаров, М.М. Танашян [и др.]. – Текст: непосредственный // Журнал неврологии и психиатрии им. С.С. Корсакова. – 2021. – Т. 121, № 11. – С. 7–16.

27. Рекомендация Коллегии Евразийской экономической комиссии от 14.11.2023 №33 «О Руководстве по работе с лабораторными (экспериментальными) животными при проведении доклинических (неклинических) исследований». – URL: <https://docs.eaeunion.org/documents/415/7752/> (дата обращения 13.10.2024) – Текст: электронный.

28. Решение Совета Евразийской экономической комиссии от 03.11.2016 № 81 «Об утверждении Правил надлежащей лабораторной практики Евразийского экономического союза в сфере обращения лекарственных средств». – URL: <https://docs.eaeunion.org/documents/306/2588/> (дата обращения 13.10.2024) – Текст: электронный.

29. Решение Совета Евразийской экономической комиссии от 03.11.2016 № 85 (ред. от 12.04.2024) «Об утверждении Правил проведения исследований биоэквивалентности лекарственных препаратов в рамках Евразийского экономического союза». – URL: <https://docs.eaeunion.org/documents/306/2592/> (дата обращения 26.05.2025) – Текст: электронный.

30. Миронов, А.Н. Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств. Часть первая. / А.Н. Миронов, Н.Т. Бунятян, А.Н. Васильев [и др.]. – М.: Гриф и К, 2012. – 944 с. – ISBN 978-5-8125-1466-3 – Текст: непосредственный.

31. Связь полиморфизма генов ABCB9 и COL22A1 с предрасположенностью человека к тяжелым формам клещевого энцефалита / А.В. Бархаш, В.А. Степанов, И.О. Маринкин [и др.]. – Текст: непосредственный // Генетика. –2019. –Т. 55, № 3. –С. 337–347. –DOI: 10.1134/S0016675819030032.

32. Сергиенко, В.И. Прикладная фармакокинетика: основные положения и клиническое применение / В.И. Сергиенко, Р. Джеллифф, И.Б. Бондарева; Российская академия медицинских наук. – Текст: непосредственный. – Москва: Изд-во Рос. акад. мед. наук, 2003. – 208 с. – ISBN 5790100317.

33. Системы 3D-культивирования клеток: современное состояние / И.А. Иващенко, В.В. Василевский, О.С. Федотова [и др.]. – Текст: непосредственный //

Биотехнология. – 2024. – Т. 40, № 2. – С. 23–35. – DOI: 10.56304/S0234275824020066.

34. Смирнов, Л.П. АТФ-связывающие транспортные белки семейства ABC (ATP-binding cassette transporters, abc). Номенклатура, структура, молекулярное разнообразие, функция, участие в функционировании системы биотрансформации ксенобиотиков / Л.П. Смирнов. – Текст: непосредственный // Труды Карельского научного центра Российской академии наук. – 2020. – № 3. – С. 5–19.

35. Транова, Ю. Разработка методики тестирования лекарственных веществ на принадлежность к субстратам, ингибиторам и индукторам белка транспортера BCRP *in vitro*; специальность 3.3.6 «Фармакология, клиническая фармакология»: диссертация на соискание ученой степени кандидата биологических наук / Транова Юлия. – Рязань, 2023. – Текст: непосредственный.

36. Чуканова, Е.И. Старение мозга: молекулярные мишени геропротекции и стратегии профилактики / Е.И. Чуканова, А.С. Чуканова. – Текст: непосредственный // Журнал неврологии и психиатрии им. С.С. Корсакова. – 2025. – Т. 125, № 11. – С. 132–139.

37. Шефтелович, Т.К. Мексидол в комплексной терапии кардиологических заболеваний / Т.К. Шефтелович, А.М. Окунь, А.А. Аппакова. – Текст: непосредственный // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. – 2012. – № S1. – С. 160–166.

38. Шишкова, В.Н. Вопросы практического применения метаболитических и антиоксидантных препаратов в амбулаторной практике / В.Н. Шишкова, В.А. Шишков. – Текст: непосредственный // Лечебное дело. – 2025. – № 2. – С. 12–18.

39. Щулькин, А.В. Мексидол: современные аспекты фармакокинетики и фармакодинамики / А.В. Щулькин. – Текст: непосредственный // Фарматека. – 2016. – Т. 4, № 16. – С. 65–71.

40. Щулькин, А.В. Распределение мексидола в структурах головного мозга, его клеточных элементах и субклеточных фракциях / А.В. Щулькин, Е.Н. Якушева, И.В. Черных. – Текст: непосредственный // Журнал неврологии и психиатрии. – 2014. – Т. 114, № 8. – С. 70–73.

41. Щулькин, А.В. Современные представления об антигипоксическом и антиоксидантном эффектах мексидола / А.В. Щулькин. – Текст: непосредственный // Журнал неврологии и психиатрии им. С.С. Корсакова. Часть 2. – 2018. – Т. 118, № 12 (вып. 2). – С. 87–93.
42. Щулькин, А.В. Сравнение фармакокинетических параметров препарата мексидол с препаратом этилметилгидроксипиридина сукцинат / А.В. Щулькин, Е.Н. Якушева, И.В. Черных. – Текст: непосредственный // Журнал неврологии и психиатрии. – 2014. – Т. 114, № 11–2. – С. 40–43.
43. Эффекты Мексидола у пациентов с ХИМ и ХСН II–III функционального класса / А.В. Щулькин, Э.Р. Казахмедов, С.А. Галочкин [и др.]. – Текст: непосредственный // Кардиология и сердечно-сосудистая хирургия. – 2020. – Т. 13, № 5. – С. 427–434. – DOI: 10.17116/kardio202013051427.
44. Якушева, Е.Н. Оценка принадлежности мексидола к субстратам, ингибиторам или индукторам гликопротеина-Р / Е.Н. Якушева, А.В. Щулькин, И.В. Черных. – Текст: непосредственный // Экспериментальная и клиническая фармакология. – 2015. – Т. 78, № 5. – С. 19–23. – DOI: 10.30906/0869-2092-2015-78-5-19-23
45. 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 Research. – 1998. – Vol. 58, № 23. – P. 5337–5339.
46. A literature review of drug transport mechanisms during lactation / C. Gong, L.N. Bertagnolli, D.W. Boulton [et al.]. – Text: visual // CPT: Pharmacometrics & Systems Pharmacology. – 2024. – Vol. 13, № 11. – P. 1870–1880.
47. A multidrug resistance transporter from human MCF-7 breast cancer cells / L.A. Doyle, W. Yang, L.V. Abruzzo [et al.]. – Text: visual // Proceedings of the National Academy of Sciences. – 1998. – Vol. 95, № 26. – P. 15665–15670.
48. A phase Ib/II randomized, open-label drug repurposing trial of glutamate signaling inhibitors in combination with chemoradiotherapy in patients with newly

diagnosed glioblastoma: the GLUGLIO trial protocol / M. Mastall, P. Roth, A. Bink [et al.]. – Text: visual // BMC Cancer. – 2024. – Vol. 24. – P. 82.

49. ABCA13 dysfunction associated with psychiatric disorders causes impaired cholesterol trafficking / M. Nakato, N. Shiranaga, M. Tomioka [et al.]. – Text: visual // Journal of Biological Chemistry. – 2021. – Vol. 296. – DOI: 10.1074/jbc.RA120.015997.

50. ABCC8 and ABCC9: ABC transporters that regulate K⁺ channels / J. Bryan, A. Muñoz, X. Zhang [et al.]. – Text: visual // Pflügers Archiv – European Journal of Physiology. – 2007. – Vol. 453. – P. 703–718. – DOI: 10.1007/s00424-006-0116-z.

51. ABCG2 polymorphism and rivaroxaban pharmacokinetics in healthy individuals after a single dose / A.F. Santos, Q. A. S. Francisco, J. B. Nunes [et al.]. – Text: visual // Brazilian Journal of Medical and Biological Research. – 2024. – Vol. 57. – P. e13257.

52. Abcg2 transporter affects plasma, milk and tissue levels of meloxicam / A.M. Garcia-Lino, E. Blanco-Paniagua, E.N. Astorga-Simon [et al.]. – Text: visual // Biochemical Pharmacology. – 2020. – Vol. 175. – Article 113924. – DOI: 10.1016/j.bcp.2020.113924.

53. ABCG2 transporter: From structure to function – Current insights and open questions / L. Álvarez-Fernández, A. Millán-García, G. Merino [et al.]. – Text: visual // International Journal of Molecular Sciences. – 2025. – Vol. 26, № 13. – P. 6119.

54. ABCG2, the breast cancer resistance protein (BCRP) / R.W. Robey, S. Lusvardi, C. H. Chau [et al.]. – Text: visual // Drug Transporters: Molecular Characterization and Role in Drug Disposition. – 2022. – P. 235–256.

55. ABCG2/BCRP: specific and nonspecific modulators / D. Peña-Solórzano, S.A. Stark, B. König [et al.]. – Text: visual // Medicinal Research Reviews. – 2017. – Vol. 37, № 5. – P. 987–1050. – DOI: 10.1002/med.21428.

56. ABCG2/BCRP: variants, transporter interaction profile of substrates and inhibitors / Z. Safar, E. Kis, F. Erdo [et al.]. – Text: visual // Expert Opinion on Drug Metabolism & Toxicology. – 2019. – Vol. 15, № 4. – P. 313–328. – DOI: 10.1080/17425255.2019.1591373.

57. ABCG2: a perspective / R.W. Robey, K. K. To, O. Polgar [et al.]. – Text: visual // *Advanced Drug Delivery Reviews*. – 2009. – Vol. 61, № 1. – P. 3–13. – DOI: 10.1016/j.addr.2008.11.003.
58. ABCG2: determining its relevance in clinical drug resistance / R.W. Robey, O. Polgar, J. Deeken [et al.]. – Text: visual // *Cancer and Metastasis Reviews*. – 2007. – Vol. 26, № 1. – P. 39–57. – DOI: 10.1007/s10555-007-9042-6.
59. Akiyama, M. The roles of ABCA12 in keratinocyte differentiation and lipid barrier formation in the epidermis / M. Akiyama. – Text: visual // *Dermato-endocrinology*. – 2011. – Vol. 3, № 2. – P. 107–112. – DOI: 10.4161/derm.3.2.15136.
60. Alam, A. Structure and mechanism of human ABC transporters / A. Alam, K.P. Locher. – Text: visual // *Annual Review of Biophysics*. – 2023. – Vol. 52, № 1. – P. 275–300.
61. An open-label, non-comparative, non-interventional, multi-center, post-authorization safety study on the administration of rabeprazole to adults with gastro-esophageal reflux disease / I. Zouboulis-Vafiadis, E. Paraskevas, D. Tzourmakliotis [et al.]. – Text: visual // *Annals of Gastroenterology*. – 2014. – Vol. 27. – P. 133–138.
62. Animal models in toxicology / edited by S.C. Gad. – 2nd ed. – Text: visual. – Boca Raton: CRC Press, 2007. – 933 p.
63. Antoniou, S. Rivaroxaban for the treatment and prevention of thromboembolic disease / S. Antoniou. – Text: visual // *Journal of Pharmacy and Pharmacology*. – 2015. – Vol. 67, № 8. – P. 1119–1132. – DOI: 10.1111/jphp.12387.
64. Application of rivaroxaban in patients with non-valvular atrial fibrillation and end-stage kidney disease: a systematic review and meta-analysis / Z. Yang, J. Wang, Y. Yuan [et al.]. – Text: visual // *Frontiers in Cardiovascular Medicine*. – 2023. – Vol. 10. – P. 1021959.
65. Architecture of chimeric spheroids controls drug transport / S. Curran, M.M. Vantangoli, K. Boekelheide [et al.]. – Text: visual // *Cancer Microenvironment*. – 2015. – Vol. 8. – P. 101–109. – DOI: 10.1007/s12307-015-0171-0.

66. Are mice, rats, and rabbits good models for physiological, pharmacological and toxicological studies in humans? / I. Sabolić, D. Breljak, M. Ljubojević [et al.]. – Text: visual // *Periodicum Biologorum*. – 2011. – Vol. 113, № 1. – P. 7–16.
67. Assessment of drug transporter function using fluorescent cell imaging / K.M. Bircsak, C.J. Gibson, R.W. Robey [et al.]. – Text: visual // *Current Protocols in Toxicology*. – 2013. – Vol. 57, № 1. – DOI: 10.1002/0471140856.tx2306s57.
68. ATP-binding cassette transporter G2 mediates the efflux of phototoxins on the luminal membrane of retinal capillary endothelial cells / T. Asashima, S. Hori, S. Ohtsuki [et al.]. – Text: visual // *Pharmaceutical Research*. – 2006. – Vol. 23. – P. 1235–1242.
69. Atypical multidrug resistance: breast cancer resistance protein messenger RNA expression in mitoxantrone-selected cell lines / D.D. Ross, W. Yang, L. V. Abruzzo [et al.]. – Text: visual // *Journal of the National Cancer Institute*. – 1999. – Vol. 91, № 5. – P. 429–433.
70. Bailey, J. Monkey-based research on human disease: the implications of genetic differences / J. Bailey. – Text: visual // *Alternatives to Laboratory Animals*. – 2014. – Vol. 42, № 5. – P. 287–317.
71. BCRP transports dipyridamole and is inhibited by calcium channel blockers / Y. Zhang, A. Gupta, H. Wang [et al.]. – Text: visual // *Pharmaceutical Research*. – 2005. – Vol. 22, № 12. – P. 2023–2034. – DOI: 10.1007/s11095-005-8384-4.
72. BCRP/MXR/ABCP expression in topotecan-resistant human breast carcinoma cells / C.H. Yang, E. Schneider, M. L. Kuo [et al.]. – Text: visual // *Biochemical Pharmacology*. – 2000. – Vol. 60, № 6. – P. 831–837. – DOI: 10.1016/j.xphs.2018.10.043.
73. Beyond the boundary: the emerging roles of ATP-binding cassette transporters in multidrug resistance (MDR) and therapeutic targeting in cancer / D. Sun, L. Bo, C. Jiang [et al.]. – Text: visual // *Drug Resistance Updates*. – 2025. – P. 101310.
74. Bioavailability of quercetin: problems and promises / X. Cai, Z. Fang, J. Dou [et al.]. – Text: visual // *Current Medicinal Chemistry*. – 2013. – Vol. 20, № 20. – P. 2572–2582. – DOI: 10.2174/09298673113209990120.

75. Biochemical characterization of the mouse ABCF3 protein, a partner of the flavivirus-resistance protein OAS1B / E. Peterson, E. Shippee, M.A. Brinton [et al.]. – Text: visual // Journal of Biological Chemistry. – 2019. – Vol. 294, № 41. – P. 14937–14952. – DOI: 10.1074/jbc.RA119.008477.

76. Black ginger extract and its active compound, 5,7-dimethoxyflavone, increase intestinal drug absorption via efflux drug transporter inhibitions / R. Boonnop, P. Meetam, L. Siangjong [et al.]. – Text: visual // Drug Metabolism and Pharmacokinetics. – 2023. – Vol. 50. – P. 100500. – DOI: 10.1016/j.dmpk.2023.100500.

77. Blood-brain barrier-specific properties of a human adult brain endothelial cell line / B.B. Weksler, E.A. Subileau, N. Perrière [et al.]. – Text: visual // The FASEB Journal. – 2005. – Vol. 19. – P. 1872–1874. – DOI: 10.1096/fj.04-3458fje.

78. 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 Metabolism and Disposition. – 2015. – Vol. 43. – P. 490–509.

79. Breast cancer resistance protein (BCRP/ABCG2) is a major determinant of sulfasalazine absorption and elimination in the mouse / H. Zaher, A.A. Khan, J. Palandra [et al.]. – Text: visual // Molecular Pharmaceutics. – 2006. – Vol. 3. – P. 55–61.

80. Breast cancer resistance protein (BCRP/ABCG2) is expressed by progenitor cells/reactive ductules and hepatocytes and its expression pattern is influenced by disease etiology and species type: possible functional consequences / S. VanderBorgh, L. Libbrecht, A. Katoonizadeh [et al.]. – Text: visual // Journal of Histochemistry and Cytochemistry. – 2006. – Vol. 54. – P. 1051–1059.

81. 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, № 1. – P. 123–130. – DOI: 10.1093/carcin/bgi176.

82. Breast cancer resistance protein directly confers SN-38 resistance of lung cancer cells / S. Kawabata, M. Oka, K. Shiozawa [et al.]. – Text: visual // Biochemical

and Biophysical Research Communications. – 2001. – Vol. 280, № 5. – P. 1216–1223. – DOI: 10.1006/bbrc.2001.4267.

83. Breast cancer resistance protein exports sulfated estrogens but not free estrogens / Y. Imai, S. Asada, S. Tsukahara [et al.]. – Text: visual // Molecular Pharmacology. – 2003. – Vol. 64, № 3. – P. 610–618.

84. Bubna, A.K. Rivaroxaban / A.K. Bubna. – Text: visual // Therapeutics in Dermatology – Essentials for Clinical Practice: Systemic Therapy. – Vol. 2. – Singapore: Springer Nature Singapore, 2026. – P. 345–364.

85. Cellular models and in vitro assays for the screening of modulators of P-gp, MRP1 and BCRP / M. Gameiro, R. Silva, C. Rocha-Pereira [et al.]. – Text: visual // Molecules. – 2017. – Vol. 22. – P. 600. – DOI: 10.3390/molecules22040600.

86. Characterization of EpiIntestinal Duodenum Microtissue as an in vitro model for studying intestinal drug permeability, transport, and metabolism / J. Cheong, J. Jorski, C. Chhin [et al.]. – Text: visual // Pharmaceutical Research. – 2026. – DOI: 10.1007/s11095-025-04008-w.

87. Characterization of oligomeric human half-ABC transporter ATP-binding cassette G2 / J. Xu, Y. Liu, Y. Yang [et al.]. – Text: visual // Journal of Biological Chemistry. – 2004. – Vol. 279, № 19. – P. 19781–19789.

88. Characterization of SAGE Mdr1a (P-gp), Bcrp, and Mrp2 knockout rats using loperamide, paclitaxel, sulfasalazine, and carboxydichlorofluorescein pharmacokinetics / M.J. Zamek-Gliszczynski, D. W. Bedwell, J. Q. Bao [et al.]. – Text: visual // Drug Metabolism and Disposition. – 2012. – Vol. 40, № 9. – P. 1825–1833. – DOI: 10.1124/dmd.112.046508.

89. Choi, M.K. Pharmacokinetic drug–drug interactions and herb–drug interactions / M.K. Choi, I.S. Song. – Text: visual // Pharmaceutics. – 2021. – Vol. 13, № 5. – P. 610.

90. Choi, Y.H. Interpretation of drug interaction using systemic and local tissue exposure changes / Y.H. Choi. – Text: visual // Pharmaceutics. – 2020. – Vol. 12, № 5. – P. 417. – DOI: 10.3390/pharmaceutics12050417.

91. Choudhuri, S. Structure, function, expression, genomic organization, and single nucleotide polymorphisms of human ABCB1 (MDR1), ABCC (MRP), and ABCG2 (BCRP) efflux transporters / S. Choudhuri, C.D. Klaassen. – Text: visual // *International Journal of Toxicology*. – 2006. – Vol. 25, № 4. – P. 231–259. – DOI: 10.1080/10915810600746023.
92. Clinical analysis and in vitro correlation of BCRP-mediated drug–drug interaction in the gastrointestinal tract / L.M.B. Perera, K. Okazaki, Y. Woo [et al.]. – Text: visual // *Biological and Pharmaceutical Bulletin*. – 2024. – Vol. 47, № 4. – P. 750–757.
93. Clinical assessment of breast cancer resistance protein (BCRP)-mediated drug–drug interactions of sepiapterin with curcumin and rosuvastatin in healthy volunteers / L. Gao, D. Kaushik, K. Ingalls [et al.]. – Text: visual // *Drugs in R&D*. – 2024. – Vol. 24. – P. 477–487. – DOI: 10.1007/s40268-024-00488-0.
94. Clinical pharmacokinetic and pharmacodynamic profile of rivaroxaban / W. Mueck, J. Stampfuss, D. Kubitza [et al.]. – Text: visual // *Clinical Pharmacokinetics*. – 2014. – Vol. 53. – P. 1–16. – DOI: 10.1007/s40262-013-0100-7.
95. Clinically important pharmacokinetic drug-drug interactions with antibacterial agents / A. T. Rodríguez, A. F. I Barceló, M. B. González [et al.]. – Text: visual // *Revista Española de Quimioterapia*. – 2024. – Vol. 37, № 4. – P. 299–322. – DOI: 10.37201/req/037.2024.
96. Comparative hepatic and intestinal efflux transport of statins / F. Deng, S.-K. Tuomi, M. Neuvonen [et al.]. – Text: visual // *Drug Metabolism and Disposition*. – 2021. – Vol. 49, № 9. – P. 750–759. – DOI: 10.1124/dmd.121.000430.
97. Cryo-EM structures of a human ABCG2 mutant trapped in ATP-bound and substrate-bound states / I. Manolaridis, S.M. Jackson, N.M.I. Taylor [et al.]. – Text: visual // *Nature*. – 2018. – Vol. 563, № 7731. – P. 426–430. – DOI: 10.1038/s41586-018-0680-3.
98. Curcumin inhibits the activity of ABCG2/BCRP1, a multidrug resistance-linked ABC drug transporter in mice / S. Shukla, H. Zaher, A. Hartz [et al.]. – Text: visual

// Pharmaceutical Research. – 2009. – Vol. 26, № 2. – P. 480–487. – DOI: 10.1007/s11095-008-9735-8.

99. Curcumin, a natural cancer chemopreventive agent, increases oral absorption of sulfasalazine by blocking Bcrp1/abcg2 transporter in the mouse / S. Shukla, H. Zaher, J. Ware [et al.]. – Text: visual // Cancer Research. – 2008. – Vol. 68, № 9_Supplement. – P. 3245.

100. Cusatis, G. Pharmacogenomic importance of ABCG2 / G. Cusatis, A. Sparreboom. – Text: visual // Pharmacogenomics. – 2008. – Vol. 9, № 8. – P. 1005–1009. – DOI: 10.2217/14622416.9.8.1005.

101. 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. – Text: visual // American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology. – 2009. – Vol. 297, № 2. – P. G371–G377.

102. Dean, M. The genetics of ATP-binding cassette transporters / M. Dean. – Text: visual // Methods in Enzymology. – Academic Press, 2005. – Vol. 400. – P. 409–429. – DOI: 10.1016/S0076-6879(05)00024-8.

103. Dean, M. The human ATP-binding cassette (ABC) transporter superfamily / M. Dean, Y. Hamon, G. Chimini. – Text: visual // Journal of Lipid Research. – 2001. – Vol. 42, № 7. – P. 1007–1017.

104. Determinants of the activity and substrate recognition of breast cancer resistance protein (ABCG2) / M.J. Szafraniec, M. Szczygieł, K. Urbanska [et al.]. – Text: visual // Drug Metabolism Reviews. – 2014. – Vol. 46, № 4. – P. 459–474. – DOI: 10.3109/03602532.2014.942037.

105. Diop, N.K. N-Linked glycosylation of the human ABC transporter ABCG2 on asparagine 596 is not essential for expression, transport activity, or trafficking to the plasma membrane / N.K. Diop, C.A. Hrycyna. – Text: visual // Biochemistry. – 2005. – Vol. 44, № 14. – P. 5420–5429. – DOI: 10.1021/bi0479858.

106. Dose-escalation study of the pharmacokinetics and pharmacodynamics of rivaroxaban in healthy elderly subjects / D. Kubitza, M. Becka, A. Roth [et al.]. – Text:

visual // Current Medical Research and Opinion. – 2008. – Vol. 24, № 10. – P. 2757–2765. – DOI: 10.1185/03007990802361499.

107. Ebert, B. Identification of BCRP as transporter of benzo[a]pyrene conjugates metabolically formed in Caco-2 cells and its induction by Ah-receptor agonists / B. Ebert, A. Seidel, A. Lampen. – Text: visual // Carcinogenesis. – 2005. – Vol. 26, № 10. – P. 1754–1763. – DOI: 10.1093/carcin/bgi139.

108. Efavirenz is a substrate and in turn modulates the expression of the efflux transporter ABCG2/BCRP in the gastrointestinal tract of the rat / R.N. Peroni, S.S. Di Gennaro, C. Hocht [et al.]. – Text: visual // Biochemical Pharmacology. – 2011. – Vol. 82. – P. 1227–1233.

109. Effect of capsaicin on breast cancer resistance protein (BCRP/Abcg2) and pharmacokinetics of probe substrates in rats / F. Chen, L. Wang, X. Zhai [et al.]. – Text: visual // Xenobiotica. – 2022. – Vol. 52, № 2. – P. 209–217. – DOI: 10.1080/00498254.2021.2025281.

110. Effect of rivaroxaban, an oral direct factor Xa inhibitor, on whole blood clot permeation and thrombolysis: critical role of red blood cells / R. Varin, S. Mirshahi, P. Mirshahi [et al.]. – Text: visual // Blood. – 2009. – Vol. 114, № 22. – P. 1064. – DOI: 10.1182/blood.V114.22.1064.1064.

111. Effects of direct oral anticoagulants dabigatran and rivaroxaban on the blood coagulation function in rabbits / L. Yin, Y. Qi, Z. Ge [et al.]. – Text: visual // Open Life Sciences. – 2022. – Vol. 17, № 1. – P. 1–9. – DOI: 10.1515/biol-2022-0002.

112. Effects of GLPG3970 on sulfasalazine and methotrexate pharmacokinetics in healthy adults: two open-label, phase I, drug–drug interaction studies / M. van der Plas, J. Dao, V. Zabela [et al.]. – Text: visual // Clinical Pharmacology & Therapeutics. – 2025. – Vol. 117. – P. 427–435. – DOI: 10.1002/cpt.3438.

113. Effects of rolapitant administered intravenously or orally on the pharmacokinetics of digoxin (P-glycoprotein substrate) and sulfasalazine (breast cancer resistance protein substrate) in healthy volunteers / X. Wang, Z.-Y. Zhang, S. Arora [et al.]. – Text: visual // The Journal of Clinical Pharmacology. – 2018. – Vol. 58. – P. 202–211. – DOI: 10.1002/jcph.1005.

114. Effects of ticagrelor on the absorption and metabolism of imatinib in rats / T. Guo, N. Fan, M. Liu [et al.]. – Text: visual // International Journal of Pharmacology. – 2026. – Vol. 22, № 1.

115. Efficacy, safety, and tolerability of pantoprazole magnesium in the treatment of reflux symptoms in patients with gastroesophageal reflux disease (GERD): a prospective, multicenter, post-marketing observational study / J.M. Remes-Troche, S. Sobrino-Cossío, J.C. Soto-Pérez [et al.]. – Text: visual // Clinical Drug Investigation. – 2014. – Vol. 34. – P. 83–93.

116. Efflux transport of estrogen glucuronides by human MRP2, MRP3, MRP4 and BCRP / E. Järvinen, F. Deng, H. Kidron [et al.]. – Text: visual // Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology. – 2018. – Vol. 178. – P. 99–107. – DOI: 10.1016/j.jsbmb.2017.11.007.

117. European medicines agency (EMA), Guideline on the Investigation of Drug Interactions – 2012. – Text: electronic. URL: http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Scientific_guideline/2012/07/WC500129606.pdf (date accessed: 20.12.2025)

118. Evaluation of 309 molecules as inducers of CYP3A4, CYP2B6, CYP1A2, OATP1B1, OCT1, MDR1, MRP2, MRP3 and BCRP in cryopreserved human hepatocytes in sandwich culture / L. Badolo, B. Jensen, C. Säll [et al.]. – Text: visual // Xenobiotica. – 2014. – Vol. 45, № 2. – P. 177–187. – DOI: 10.3109/00498254.2014.955831.

119. Evaluation of BCRP-related DDIs between methotrexate and cyclosporin A using physiologically based pharmacokinetic modelling / S. Schaller, I. Michon, V. Baier [et al.]. – Text: visual // Drugs in R&D. – 2025. – Vol. 25, № 1. – P. 1–17.

120. Evaluation of inhibitory effects of flavonoids on breast cancer resistance protein (BCRP): from library screening to biological evaluation to structure-activity relationship / X. Fan, J. Bai, S. Zhao [et al.]. – Text: visual // Toxicology in Vitro. – 2019. – Vol. 61. – P. 104642.

121. Evidence of the interactions between immunosuppressive drugs used in autoimmune rheumatic diseases and Chinese herbal medicine: a scoping review / T.H.

Woon, M. J. H. Tan, Y. H. Kwan [et al.]. – Text: visual // *Complementary Therapies in Medicine*. – 2024. – Vol. 80. – P. 103017. – DOI: 10.1016/j.ctim.2024.103017.

122. Expression of breast cancer resistance protein in peripheral T cell subsets from HIV-1-infected patients with antiretroviral therapy / J. Zhang, Z. Deng, Y. Wang [et al.]. – Text: visual // *Molecular Medicine Reports*. – 2014. – Vol. 10. – P. 939–946. – DOI: 10.3892/mmr.2014.2282.

123. Expression of MDR1, MRP2 and BCRP mRNA in tissues of turkeys / A.M. Haritova, J. Schrickx, L. D. Lashev [et al.]. – Text: visual // *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics*. – 2008. – Vol. 31, № 4. – P. 378–385. – DOI: 10.1111/j.1365-2885.2008.00968.x.

124. Febuxostat, but not allopurinol, markedly raises the plasma concentrations of the breast cancer resistance protein substrate rosuvastatin / M. Lehtisalo, J.E. Keskitalo, A. Tornio [et al.]. – Text: visual // *Clinical and Translational Science*. – 2020. – Vol. 13, № 6. – P. 1236–1243. – DOI: 10.1111/cts.12809.

125. Fostowicz-Frelik, Ł. Mandibular characteristics of early Glires (Mammalia) reveal mixed rodent and lagomorph morphotypes / Ł. Fostowicz-Frelik, P.G. Cox, Q. Li. – Text: visual // *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*. – 2023. – Vol. 378, № 1880. – P. 20220087. – DOI: 10.1098/rstb.2022.0087.

126. Frequent expression of the multi-drug resistance-associated protein BCRP/MXR/ABCP/ABCG2 in human tumours detected by the BXP-21 monoclonal antibody in paraffin-embedded material / J.E. Diestra, G.L. Scheffer, I. Català, [et al.]. – Text: visual // *The Journal of Pathology*. – 2002. – Vol. 198, № 2. – P. 213–219.

127. Functional involvement of RFVT3/SLC52A3 in intestinal riboflavin absorption / H. Yoshimatsu, A. Yonezawa, Y. Yao [et al.]. – Text: visual // *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology*. – 2014. – Vol. 306, № 2. – P. G102–G110. – DOI: 10.1152/ajpgi.00349.2013.

128. Genome-wide association study identifies ABCG2 (BCRP) as an allopurinol transporter and a determinant of drug response / C.C. Wen, S. W. Yee, X. Liang [et al.]. – Text: visual // *Clinical Pharmacology & Therapeutics*. – 2015. – Vol. 97. – P. 518–525.

129. Ginkgo biloba leaf extract suppresses intestinal human breast cancer resistance protein expression in mice: correlation with gut microbiota / J.K. Kim, M.S. Choi, J.Y. Kim [et al.]. – Text: visual // Biomedicine & Pharmacotherapy. – 2021. – Vol. 140. – P. 111712. – DOI: 10.1016/j.biopha.2021.111712.
130. Goldman, P. Sulfasalazine / P. Goldman, M.A. Peppercorn. – Text: visual // New England Journal of Medicine. – 1975. – Vol. 293, № 1. – P. 20–23. – DOI: 10.1056/nejm197507032930105.
131. Guguen-Guillouzo, C. General review on in vitro hepatocyte models and their applications / C. Guguen-Guillouzo, A. Guillouzo. – Text: visual // Hepatocytes: Methods and Protocols. – 2010. – P. 1–40.
132. Heme metabolism in nonerythroid cells / L.S. Dunaway, S.A. Loeb, S. Petrillo [et al.]. – Text: visual // Journal of Biological Chemistry. – 2024. – Vol. 300, № 4.
133. High plasma concentrations of dolutegravir in patients with ABCG2 genetic variants / K. Tsuchiya, T. Hayashida, A. Hamada [et al.]. – Text: visual // Pharmacogenetics and Genomics. – 2017. – Vol. 27, № 11. – P. 416–419.
134. HIV protease inhibitors are inhibitors but not substrates of the human breast cancer resistance protein (BCRP/ABCG2) / A. Gupta, Y. I. Zhang, J. D. Unadkat [et al.]. – Text: visual // The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics. – 2004. – Vol. 310, № 1. – P. 334–341.
135. Hollenstein, K. Structure and mechanism of ABC transporter proteins / K. Hollenstein, R.J.P. Dawson, K.P. Locher. – Text: visual // Current Opinion in Structural Biology. – 2007. – Vol. 17, № 4. – P. 412–418. – DOI: 10.1016/j.sbi.2007.07.003.
136. Hromadkova, L. Important drug interactions in patients with rheumatic disorders: interactions of glucocorticoids, immunosuppressants and antimalarial drugs / L. Hromadkova, T. Soukup, J. Vlcek. – Text: visual // Drugs of Today. – 2012. – Vol. 48, № 8. – P. 545.
137. Huang, L. ATP-dependent transport of rosuvastatin in membrane vesicles expressing breast cancer resistant protein / L. Huang, Y. Wang, S.W. Grimm. – Text: visual // Drug Metabolism and Disposition. – 2006. – Vol. 34, № 5. – P. 738–742.

138. Human breast cancer resistance protein: interactions with steroid drugs, hormones, the dietary carcinogen 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo(4,5-b)pyridine, and transport of cimetidine / P. Pavsek, G. Merino, E. Wagenaar [et al.]. – Text: visual // *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*. – 2005. – Vol. 312, № 1. – P. 144–152. – DOI: 10.1124/jpet.104.073916.

139. Human multidrug resistance ABCB and ABCG transporters: participation in a chemoinnity defense system / B. Sarkadi, L. Homolya, G. Szakacs [et al.]. – Text: visual // *Physiological Reviews*. – 2006. – Vol. 86, № 4. – P. 1179–1236. – DOI: 10.1152/physrev.00037.2005.

140. ICH M12 drug interaction studies: summary of the efforts to achieve global convergence / K. Reynolds, X. Yang, S.A. Peters [et al.]. – Text: visual // *Clinical Pharmacology & Therapeutics*. – 2025. – Vol. 118, № 1. – P. 33–44. – DOI: 10.1002/cpt.3625.

141. Identification and clinical evaluation of potential biomarkers for breast cancer resistance protein (BCRP/ABCG2) / A.M. Riselli, S.W. Yee, J. Yang, [et al.]. – Text: visual // *Clinical Pharmacology & Therapeutics*. – 2025. – Vol. 118, № 1. – P. 177–189.

142. Identification of a urate transporter, ABCG2, with a common functional polymorphism causing gout / O.M. Woodward, A. Kottgen, J. Coresh [et al.]. – Text: visual // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. – 2009. – Vol. 106, № 25. – P. 10338–10342. – DOI: 10.1073/pnas.0901249106.

143. Identification of an N-methylpyrazole derivative as a selective inhibitor of breast cancer resistance protein (BCRP/ABCG2) / A.B.F. Siridó, A. H. G. de Oliveira, J. Poletto [et al.]. – Text: visual // *Archives of Biochemistry and Biophysics*. – 2026. – P. 110761.

144. Identification of intra- and intermolecular disulfide bridges in the multidrug resistance transporter ABCG2 / U. Henriksen, J.U. Fog, T. Litman [et al.]. – Text: visual // *Journal of Biological Chemistry*. – 2005. – Vol. 280, № 44. – P. 36926–36934. – DOI: 10.1074/jbc.M502937200.

145. Identifying potent ABCG2 inhibitors from the COCONUT database of natural compounds to overcome drug resistance in breast cancer: a comprehensive in silico study targeting ATP-binding cassette (ABC) transporter G2 / P. Mandal, K. Barik, A. Kumar [et al.]. – Text: visual // *In Silico Pharmacology*. – 2026. – Vol. 14, № 1. – P. 15.

146. Imatinib mesylate (STI571) is a substrate for the breast cancer resistance protein (BCRP)/ABCG2 drug pump / H. Burger, H. van Tol, A.W.M. Boersma [et al.]. – Text: visual // *Blood*. – 2004. – Vol. 104, № 9. – P. 2940–2942. – DOI: 10.1182/blood-2004-04-1398.

147. Impact of ABCB1, ABCG2, and CYP3A5 polymorphisms on plasma trough concentrations of apixaban in Japanese patients with atrial fibrillation / S. Ueshima, D. Hira, R. Fujii [et al.]. – Text: visual // *Pharmacogenetics and Genomics*. – 2017. – Vol. 27, № 9. – P. 329–336.

148. Impaired renal excretion of 6-hydroxy-5,7-dimethyl-2-methylamino-4-(3-pyridylmethyl)benzothiazole (E3040) sulfate in breast cancer resistance protein (BCRP1/ABCG2) knockout mice / N. Mizuno, M. Suzuki, H. Kusuhara [et al.]. – Text: visual // *Drug Metabolism and Disposition*. – 2004. – Vol. 32, № 9. – P. 898–901.

149. In vitro and in vivo P-glycoprotein transport characteristics of rivaroxaban / M.J. Gnoth, U. Buete Horn, U. Muenster [et al.]. – Text: visual // *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*. – 2011. – Vol. 338, № 1. – P. 372–380. – DOI: 10.1124/jpet.111.180240.

150. In vitro drug interaction studies – cytochrome P450 enzyme- and transporter-mediated drug interactions: guidance for industry / US Food and Drug Administration (FDA), Center for Drug Evaluation and Research (CDER). – Text: electronic. – 2020. – URL: <https://www.fda.gov/media/134582/download> (date accessed: 15.11.2025).

151. In vitro metabolism and transporter-mediated drug-drug interaction studies guidance for industry / U.S. Department of Health and Human Services, Food and Drug Administration, Center for Drug Evaluation and Research. – Text: electronic. – 2017.

152. *In vitro* models for liver toxicity testing / V.Y. Soldatow, E. L. LeCluyse, L. G. Griffith [et al.]. – Text: visual // *Toxicology Research*. – 2013. – Vol. 2, № 1. – P. 23–39.

153. *In vivo* and *ex vivo* regulation of breast cancer resistant protein (BCRP) by peroxisome proliferator-activated receptor alpha (Ppar α) at the blood–brain barrier / M.T. Hoque, A. Shah, V. More [et al.]. – Text: visual // *Journal of Neurochemistry*. – 2015. – Vol. 135, № 6. – P. 1113–1122.

154. Increased delivery of chemotherapy to the vitreous by inhibition of the blood-retinal barrier / G. Pascual-Pasto, N.G. Olaciregui, J.A.W. Opezzo [et al.]. – Text: visual // *Journal of Controlled Release*. – 2017. – Vol. 264. – P. 34–44. – DOI: 10.1016/j.jconrel.2017.08.018.

155. Induction effect of antiretroviral bictegravir on the expression of Abcb1, Abcg2 and Abcc1 genes associated with P-gp, BCRP and MRP1 transporters present in rat peripheral blood mononuclear cells / T. Jadav, N. Rajput, H. Kumar [et al.]. – Text: visual // *Expert Opinion on Drug Metabolism & Toxicology*. – 2024. – Vol. 20, № 6. – P. 529–539. – DOI: 10.1080/17425255.2024.2352462.

156. Induction of drug efflux protein expression by venlafaxine but not desvenlafaxine / C.J. Bachmeier, D. Beaulieu-Abdelahad, N.J. Ganey [et al.]. – Text: visual // *Biopharmaceutics & Drug Disposition*. – 2011. – Vol. 32, № 4. – P. 233–244.

157. Inhibition of ABCG2/BCRP-mediated transport – correlation analysis of various expression systems and probe substrates / Z. Sáfár, G. Kecskeméti, J. Molnár [et al.]. – Text: visual // *European Journal of Pharmaceutical Sciences*. – 2021. – Vol. 156. – Article 105593. – DOI: 10.1016/j.ejps.2020.105593.

158. Inhibition of breast cancer resistance protein by flavonols: *in vitro*, *in vivo*, and *in silico* implications of the interactions / K.R. Lee, M.J. Kang, M.J. Kim [et al.]. – Text: visual // *Scientific Reports*. – 2025. – Vol. 15, № 1. – P. 28558.

159. Inhibitory effects of alkaloids on BCRP implicated in reversing multidrug resistance: a case example of enhancing temozolomide cytotoxicity / X. Duan, J. Wu, J. Hu [et al.]. – Text: visual // *Chemical Research in Toxicology*. – 2025. – Vol. 38, № 9. – P. 1595–1610.

160. Interaction potential of the multitargeted receptor tyrosine kinase inhibitor dovitinib with drug transporters and drug metabolising enzymes assessed in vitro / J. Weiss, D. Theile, Z. Dvorak [et al.]. – Text: visual // *Pharmaceutics*. – 2014. – Vol. 6, № 4. – P. 632–650.

161. Interactions of oral molecular excipients with breast cancer resistance protein, BCRP / L. Zou, J. Pottel, N. Khuri [et al.]. – Text: visual // *Molecular Pharmaceutics*. – 2020. – Vol. 17, № 3. – P. 748–756.

162. Interspecies variability in expression of hepatobiliary transporters across human, dog, monkey, and rat as determined by quantitative proteomics / L. Wang, B. Prasad, L. Salphati [et al.]. – Text: visual // *Drug Metabolism and Disposition*. – 2015. – Vol. 43, № 3. – P. 367–374. – DOI: 10.1124/dmd.114.061580.

163. Intramolecular disulfide bond is a critical check point determining degradative fates of ATP-binding cassette (ABC) transporter ABCG2 protein / K. Wakabayashi, H. Nakagawa, A. Tamura [et al.]. – Text: visual // *Journal of Biological Chemistry*. – 2007. – Vol. 282, № 38. – P. 27841–27846.

164. Investigation of the transport of xanthine dehydrogenase inhibitors by the urate transporter ABCG2 / M. Nakamura, K. Fujita, Y. Toyoda [et al.]. – Text: visual // *Drug Metabolism and Pharmacokinetics*. – 2018. – Vol. 33, № 1. – P. 77–81. – DOI: 10.1016/j.dmpk.2017.11.002.

165. Järvinen, E. Human efflux transport of testosterone, epitestosterone and other androgen glucuronides / E. Järvinen, H. Kidron, M. Finel. – Text: visual // *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*. – 2020. – Vol. 197. – Article 105518. – DOI: 10.1016/j.jsbmb.2019.105518.

166. 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 // *European Journal of Pharmaceutical Sciences*. – 2006. – Vol. 27, № 5. – P. 543–554.

167. Kinetic characterization of sulfasalazine transport by human ATP-binding cassette G2 / M. Jani, P. Szabó, E. Kis [et al.]. – Text: visual // *Biological and*

Pharmaceutical Bulletin. – 2009. – Vol. 32, № 3. – P. 497–499. – DOI: 10.1248/bpb.32.497.

168. Klotz, U. Clinical pharmacokinetics of sulphasalazine, its metabolites and other prodrugs of 5-aminosalicylic acid / U. Klotz. – Text: visual // Clinical Pharmacokinetics. – 1985. – Vol. 10. – P. 285–302.

169. Krishnamurthy, P. The role of transporters in cellular heme and porphyrin homeostasis / P. Krishnamurthy, T. Xie, J.D. Schuetz. – Text: visual // Pharmacology & Therapeutics. – 2007. – Vol. 114, № 3. – P. 345–358. – DOI: 10.1016/j.pharmthera.2007.02.001.

170. Kubitza, D. Rivaroxaban / D. Kubitza, F. Misselwitz, E. Perzborn. – Text: visual // Hämostaseologie. – 2007. – Vol. 27, № 4. – P. 282–289. – DOI: 10.1055/s-0037-1617095.

171. Laboratory assessment of rivaroxaban: a review / M.M. Samama, G. Contant, T.E. Spiro [et al.]. – Text: visual // Thrombosis Journal. – 2013. – Vol. 11. – P. 11. – DOI: 10.1186/1477-9560-11-11.

172. Laurence, A. Reciprocal interactions between glioma and tissue-resident cells fueling tumor progression / A. Laurence, L.J. Castro-Vega, G. Huberfeld. – Text: visual // Handbook of Clinical Neurology. – 2025. – Vol. 210. – P. 177–190.

173. Lemos, C. Drug transporters: recent advances concerning BCRP and tyrosine kinase inhibitors / C. Lemos, G. Jansen, G.J. Peters. – Text: visual // British Journal of Cancer. – 2008. – Vol. 98, № 5. – P. 857–862.

174. Leslie, E. M. Multidrug resistance proteins: role of P-glycoprotein, MRP1, MRP2, and BCRP (ABCG2) in tissue defense / E. M. Leslie, R. G. Deeley, S. P.C. Cole. – Text: visual // Toxicology and Applied Pharmacology. – 2005. – Vol. 204, Issue 3. – P. 216–237. – DOI: 10.1016/j.taap.2004.10.012.

175. Localization of the ABCG2 mitoxantrone resistance-associated protein in normal tissues / P.A. Fetsch, A. Abati, T. Litman [et al.]. – Text: visual // Cancer Letters. – 2006. – Vol. 235, № 1. – P. 84–92. – DOI: 10.1016/j.canlet.2005.04.024.

176. Locher, K.P. Mechanistic diversity in ATP-binding cassette (ABC) transporters / K.P. Locher. – Text: visual // *Nature Structural & Molecular Biology*. – 2016. – Vol. 23. – P. 487–493.

177. Locher, K.P. The *E. coli* BtuCD structure: a framework for ABC transporter architecture and mechanism / K.P. Locher, A.T. Lee, D.C. Rees. – Text: visual // *Science*. – 2002. – Vol. 296, № 5570. – P. 1091–1098. – DOI: 10.1126/science.1071142.

178. MacFarlane, R.J. Lapatinib for breast cancer: a review of the current literature / R.J. MacFarlane, K.A. Gelmon. – Text: visual // *Expert Opinion on Drug Safety*. – 2011. – Vol. 10. – P. 109–121.

179. Mao Q. Role of the breast cancer resistance protein (BCRP/ABCG2) in drug transport – an update / Q. Mao, J.D. Unadkat. – Text: visual // *The AAPS Journal*. – 2015. – Vol. 17, № 1. – P. 65–82. – DOI: 10.1208/s12248-014-9668-6.

180. Medegård, G. Sulphasalazine: mechanism of action in rheumatoid arthritis / G. medegård, J. Björk. – Text: visual // *British Journal of Rheumatology*. – 1995. – Vol. 34, Suppl. 2. – P. 7–15.

181. Membrane transporters in drug development / The International Transporter Consortium. – Text: visual // *Nature Reviews Drug Discovery*. – 2010. – Vol. 9. – P. 215–236. – DOI: 10.1038/nrd3028.

182. Metabolism and excretion of rivaroxaban, an oral, direct factor Xa inhibitor, in rats, dogs, and humans / C. Weinz, T. Schwarz, D. Kubitz [et al.]. – Text: visual // *Drug Metabolism and Disposition*. – 2009. – Vol. 37, № 5. – P. 1056–1064. – DOI: 10.1124/dmd.108.025569.

183. Metabolomic profiling and drug interaction characterization reveal riboflavin as a breast cancer resistance protein-specific endogenous biomarker that demonstrates prediction of transporter activity in vivo / Y. Zhang, P. A. Shipkova, B. M. Warrack [et al.]. – Text: visual // *Drug Metabolism and Disposition*. – 2023. – Vol. 51. – P. 851–861.

184. Method for testing drugs belonging to substrates and inhibitors of the transporter protein BCRP on Caco-2 cells / Y.S. Tranova, A. A. Slepnev, I. V. Chernykh

[et al.]. – Text: visual // *Doklady Biochemistry and Biophysics*. – Moscow: Pleiades Publishing, 2025. – Vol. 520, № 1. – P. 89–95.

185. Mitochondrial localization of ABC transporter ABCG2 and its function in 5-aminolevulinic acid-mediated protoporphyrin IX accumulation / H. Kobuchi, K. Moriya, T. Ogino [et al.]. – Text: visual // *PLoS One*. – 2012. – Vol. 7, № 11. – P. e50082. – DOI: 10.1371/journal.pone.0050082.

186. Mo, W. Human ABCG2: structure, function, and its role in multidrug resistance / W. Mo, J.T. Zhang. – Text: visual // *International Journal of Biochemistry and Molecular Biology*. – 2012. – Vol. 3, № 1. – P. 1–27.

187. Modulation of intestinal transport and absorption of topotecan, a BCRP substrate, by various pharmaceutical excipients and their inhibitory mechanisms of BCRP transporter / K. Sawangrat, S. Yamashita, A. Tanaka [et al.]. – Text: visual // *Journal of Pharmaceutical Sciences*. – 2019. – Vol. 108, № 3. – P. 1315–1325. – DOI: 10.1016/j.xphs.2018.10.043.

188. 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 Research*. – 1999. – Vol. 59, № 1. – P. 8–13.

189. Molecular properties of WHO essential drugs and provisional biopharmaceutical classification / N.A. Kasim, M. Whitehouse, C. Ramachandran [et al.]. – Text: visual // *Molecular Pharmaceutics*. – 2004. – Vol. 1. – P. 85–96.

190. Morita, M. Peroxisomal ABC transporters: structure, function and role in disease / M. Morita, T. Imanaka. – Text: visual // *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease*. – 2012. – Vol. 1822, № 9. – P. 1387–1396. – DOI: 10.1016/j.bbadis.2012.02.009.

191. Moving out: from sterol transport to drug resistance – the ABCG subfamily of efflux pumps / K. Moitra, L. Silverton, K. Limpert [et al.]. – Text: visual // *Drug Metabolism and Drug Interactions*. – 2011. – Vol. 26, № 3. – P. 105–111. – DOI: 10.1515/DMDI.2011.015.

192. Mueck, W. Drug interactions with rivaroxaban / W. Mueck, D. Kubitza, M. Becka. – Text: visual // *British Journal of Clinical Pharmacology*. – 2013. – Vol. 76. – P. 455–466. – DOI: 10.1111/bcp.12075.

193. Multidrug resistance related molecules in human and murine lung / G.L. Scheffer, A.C.L.M. Pijnenborg, E.F. Smit [et al.]. – Text: visual // *Journal of Clinical Pathology*. – 2002. – Vol. 55. – P. 332–339.

194. 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 // *Molecular and Cellular Biology*. – 2007. – Vol. 27, № 4. – P. 1247–1253. – DOI: 10.1128/MCB.01621-06.

195. Mushtaq, S. Sulfasalazine in dermatology: a lesser explored drug with broad therapeutic potential / S. Mushtaq, R. Sarkar. – Text: visual // *International Journal of Women's Dermatology*. – 2020. – Vol. 6, № 3. – P. 191–198. – DOI: 10.1016/j.ijwd.2020.01.009.

196. Nakanishi, T. Breast cancer resistance protein (BCRP/ABCG2): its role in multidrug resistance and regulation of its gene expression / T. Nakanishi, D.D. Ross. – Text: visual // *Chinese Journal of Cancer*. – 2012. – Vol. 31, № 2. – P. 73.

197. Natural allelic variants of breast cancer resistance protein (BCRP) and their relationship to BCRP expression in human intestine / C.P. Zamber, J.K. Lamba, K. Yasuda [et al.]. – Text: visual // *Pharmacogenetics*. – 2003. – Vol. 13, № 1. – P. 19–28. – DOI: 10.1097/00008571-200301000-00004.

198. Negligible effect of quercetin in the pharmacokinetics of sulfasalazine in rats and beagles: metabolic inactivation of the interaction potential of quercetin with BCRP / J.H. Oh, D. Kim, H. Lee [et al.]. – Text: visual // *Pharmaceutics*. – 2021. – Vol. 13, № 12. – P. 1989. – DOI: 10.3390/pharmaceutics13121989.

199. Network biology and artificial intelligence drive the understanding of the multidrug resistance phenotype in cancer / B. Bueschbell, A.B. Caniceiro, P.M.S. Suzano [et al.]. – Text: visual // *Drug Resistance Updates*. – 2022. – Vol. 60. – P. 100811. – DOI: 10.1016/j.drug.2022.100811.

200. New era in drug interaction evaluation: US Food and Drug Administration update on CYP enzymes, transporters, and the guidance process / S.-M. Huang, J.M. Strong, L. Zhang [et al.]. – Text: visual // *Journal of Clinical Pharmacology*. – 2008. – Vol. 48, № 6. – P. 662–670. – DOI: 10.1177/0091270007312153.

201. Nieva, J. J. Pharmacokinetic effect of aprepitant on irinotecan in patients with colorectal cancer / J. J. Nieva, W. Webb, G. Siuzdak. – Text: visual // *Journal of Clinical Oncology*. – 2007. – Vol. 25. – P. 19622. – DOI: 10.1200/jco.2007.25.18_suppl.19622.

202. Nigam, S.K. What do drug transporters really do? / S.K. Nigam. – Text: visual // *Nature Reviews Drug Discovery*. – 2015. – Vol. 14, № 1. – P. 29–44.

203. Noguchi, K. Human ABC transporter ABCG2/BCRP expression in chemoresistance: basic and clinical perspectives for molecular cancer therapeutics / K. Noguchi, K. Katayama, Y. Sugimoto. – Text: visual // *Pharmacogenomics and Personalized Medicine*. – 2014. – P. 53. – DOI: 10.2147/pgpm.s38295.

204. Novel inhibitors of breast cancer resistance protein (BCRP, ABCG2) among marketed drugs / F. Deng, N. Sjöstedt, M. Santo [et al.]. – Text: visual // *European Journal of Pharmaceutical Sciences*. – 2023. – Vol. 181. – P. 106362. – DOI: 10.1016/j.ejps.2022.106362.

205. Novel mechanism of cholesterol transport by ABCA5 in macrophages and its role in dyslipidemia / A.G. Ray, K.R. Choudhury, S. Chakraborty [et al.]. – Text: visual // *Journal of Molecular Biology*. – 2020. – Vol. 432, № 17. – P. 4922–4941.

206. Nucleoside-based anticancer drugs: mechanism of action and drug resistance / L. Hrubá, V. Das, M. Hajduch [et al.]. – Text: visual // *Biochemical Pharmacology*. – 2023. – Vol. 215. – P. 115741. – DOI: 10.1016/j.bcp.2023.115741.

207. Ontogeny of small intestinal drug transporters and metabolizing enzymes based on targeted quantitative proteomics / M. Kiss, R. Mbasu, J. Nicolai [et al.]. – Text: visual // *Drug Metabolism and Disposition*. – 2021. – Vol. 49. – P. 1038–1046.

208. Opposite regulation of hepatic breast cancer resistance protein in type 1 and 2 diabetes mellitus / L. He, Y. Yang, C. Guo [et al.]. – Text: visual // *European Journal*

of Pharmacology. – 2014. – Vol. 724. – P. 185–192. – DOI: 10.1016/j.ejphar.2013.12.008.

209. 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 Metabolism and Disposition. – 2007. – Vol. 35, № 1. – P. 30–35. – DOI: 10.1124/dmd.106.011411.

210. Oude Elferink, R.P.J. Understanding and controlling hepatobiliary function / R.P.J. Oude Elferink. – Text: visual // Best Practice & Research Clinical Gastroenterology. – 2002. – Vol. 16, № 6. – P. 1025–1034. – DOI: 10.1053/bega.2002.0340.

211. Peppercorn, M.A. Sulfasalazine: pharmacology, clinical use, toxicity, and related new drug development / M.A. Peppercorn. – Text: visual // Annals of Internal Medicine. – 1984. – Vol. 101, № 3. – P. 377–386. – DOI: 10.7326/0003-4819-101-3-377.

212. Peppercorn, M.A. The role of intestinal bacteria in the metabolism of salicylazosulfapyridine / M.A. Peppercorn, P. Goldman. – Text: visual // Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics. – 1972. – Vol. 181. – P. 555–562.

213. Peptide specificity and lipid activation of the lysosomal transport complex ABCB9 (TAPL) / C. Zhao, W. Haase, R. Tampé [et al.]. – Text: visual // Journal of Biological Chemistry. – 2008. – Vol. 283, № 25. – P. 17083–17091. – DOI: 10.1074/jbc.M801794200.

214. Pharmacogenetic characterization of sulfasalazine disposition based on NAT2 and ABCG2 (BCRP) gene polymorphisms in humans / Y. Yamasaki, I. Ieiri, H. Kusuhara [et al.]. – Text: visual // Clinical Pharmacology & Therapeutics. – 2008. – Vol. 84. – P. 95–103. – DOI: 10.1038/sj.clpt.6100459.

215. 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 // British Journal of Pharmacology. – 2012. – Vol. 166, № 6. – P. 1793–1803. – DOI: 10.1111/j.1476-5381.2012.01887.x.

216. Phosphorylated retinoblastoma protein is a potential predictive marker of irinotecan efficacy for colorectal cancer / A. Ikai, M. Watanabe, Y. Sowa [et al.]. – Text:

visual // International Journal of Oncology. – 2016. – Vol. 48, № 3. – P. 1297–1304. – DOI: 10.3892/ijo.2016.3332.

217. Plosker, G.L. Sulfasalazine / G.L. Plosker, K.F. Croom. – Text: visual // Drugs. – 2005. – Vol. 65. – P. 1825–1849. – DOI: 10.2165/00003495-200565130-00008.

218. Polgar, O. ABCG2: structure, function and role in drug response / O. Polgar, R.W. Robey, S.E. Bates. – Text: visual // Expert Opinion on Drug Metabolism & Toxicology. – 2008. – Vol. 4, № 1. – P. 1–15. – DOI: 10.1517/17425255.4.1.1.

219. Prevention and treatment of experimental thrombosis in rabbits with rivaroxaban (BAY 597939) – an oral, direct factor Xa inhibitor / B.J. Biemond, E. Perzborn, P.W. Friederich [et al.]. – Text: visual // Thrombosis and Haemostasis. – 2007. – Vol. 97, № 3. – P. 471–477.

220. Protein abundance of drug transporters in human hepatitis C livers / M. Drożdżik, J. Lapczuk-Romanska, C. Wenzel [et al.]. – Text: visual // International Journal of Molecular Sciences. – 2022. – Vol. 23, № 14. – P. 7947. – DOI: 10.3390/ijms23147947.

221. Purification and structural analyses of ABCG2 / C.A. McDevitt, R. Collins, I.D. Kerr [et al.]. – Text: visual // Advanced Drug Delivery Reviews. – 2009. – Vol. 61, № 1. – P. 57–65. – DOI: 10.1016/j.addr.2008.07.004.

222. Quantification of transporter and receptor proteins in dog brain capillaries and choroid plexus: relevance for the distribution in brain and CSF of selected BCRP and P-gp substrates / C. Braun, A. Sakamoto, H. Fuchs [et al.]. – Text: visual // Molecular Pharmaceutics. – 2017. – Vol. 14, № 10. – P. 3436–3447. – DOI: 10.1021/acs.molpharmaceut.7b00449.

223. Quantitative structure-activity relationship (QSAR) analysis to predict drug-drug interactions of ABC transporter ABCG2 / T. Ishikawa, H. Hirano, H. Saito [et al.]. – Text: visual // Mini Reviews in Medicinal Chemistry. – 2012. – Vol. 12, № 6. – P. 505–514.

224. Quercetin is a flavonoid breast cancer resistance protein inhibitor with an impact on the oral pharmacokinetics of sulfasalazine in rats / Y.K. Song, J. H. Yoon, J.

K. Woo [et al.]. – Text: visual // *Pharmaceutics*. – 2020. – Vol. 12, № 5. – P. 397. – DOI: 10.3390/pharmaceutics12050397.

225. Quercetin-3-O- β -D-glucoside decreases the bioavailability of cyclosporin A through regulation of drug metabolizing enzymes, transporters and nuclear receptors in rats / T. Yang, Y. Liu, X. Huang [et al.]. – Text: visual // *Molecular Medicine Reports*. – 2018. – Vol. 18, № 3. – P. 2599–2612.

226. Rains, C.P. Sulfasalazine: a review of its pharmacological properties and therapeutic efficacy in the treatment of rheumatoid arthritis / C.P. Rains, S. Noble, D. Faulds. – Text: visual // *Drugs*. – 1995. – Vol. 50. – P. 137–156.

227. Rawoof, M. Formulation and in vivo evaluation of sulfasalazine tablets for colon targeting using design of experiment / M. Rawoof, K. Rajnarayana, M. Ajitha. – Text: visual // *American Journal of PharmTech Research*. – 2019. – Vol. 9, № 2. – P. 32–44. – DOI: 10.46624/ajptr.2019.v9.i2.004.

228. Regulation of urate homeostasis by membrane transporters / T. Takada, H. Miyata, Y. Toyoda [et al.]. – Text: visual // *Gout, Urate, and Crystal Deposition Disease*. – 2024. – Vol. 2, № 2. – P. 206–219.

229. Ren, H.C. Assessing DDI risks in drug discovery and development: approaches, challenges, and trends / H.C. Ren, C. He, H. Wan. – Text: visual // *Expert Opinion on Drug Metabolism & Toxicology*. – 2026. – Vol. 22, № 1. – P. 65–82. – DOI: 10.1080/17425255.2025.2607019.

230. Re-sensitization of cancer multidrug resistance through P-gp, MRP1 and BCRP modulation: advances in terpenoids based cancer therapy / P. Pandey, A. Singh, S. Lakhanpal [et al.]. – Text: visual // *Discover Oncology*. – 2025. – Vol. 16. – P. 2008. – DOI: 10.1007/s12672-025-03593-x.

231. Reversion effects of curcumin on multidrug resistance of MNNG/HOS human osteosarcoma cells in vitro and in vivo through regulation of P-glycoprotein / M. Si, J. Zhao, X. Li [et al.]. – Text: visual // *Chinese Medical Journal (English Edition)*. – 2013. – Vol. 126. – P. 4116–4123.

232. Rheumatoid arthritis (RA) disease activity predicts function of ABCB1 (P-gp) and ABCG2 (BCRP1) drug-efflux transporters / V. Pascual-Ramos, Y. Atisha-

Fregoso, G. Lima [et al.]. – Text: visual // Gaceta Médica de México. – 2016. – Vol. 152, № 6. – P. 741–754.

233. Rheumatoid arthritis disease activity is determinant for ABCB1 and ABCG2 drug-efflux transporters function / Y. Atisha-Fregoso, G. Lima, V. Pascual-Ramos [et al.]. – Text: visual // PLoS One. – 2016. – Vol. 11, № 7. – P. e0159556. – DOI: 10.1371/journal.pone.0159556.

234. Rivaroxaban – metabolism, pharmacologic properties and drug interactions / T. Kvasnicka, I. Malikova, Z. Zenahlikova [et al.]. – Text: visual // Current Drug Metabolism. – 2017. – Vol. 18, № 7. – P. 636–642. – DOI: 10.2174/1389200218666170518165443.

235. Rivaroxaban to reduce the risk of major cardiovascular events in patients with chronic coronary artery disease or peripheral artery disease: a narrative review / T. Abdul-Rahman, P. Roy, R.E. Herrera-Calderón [et al.]. – Text: visual // Expert Opinion on Drug Safety. – 2025. – Vol. 24, № 3. – P. 261–271.

236. Role of BCRP 421C>A polymorphism on rosuvastatin pharmacokinetics in healthy Chinese males / W. Zhang, B. N. Yu, Y. J. He [et al.]. – Text: visual // Clinica Chimica Acta. – 2006. – Vol. 373, № 1-2. – P. 99–103.

237. Role of breast cancer resistance protein (BCRP/ABCG2) in cancer drug resistance / K. Natarajan, Y. Xie, M.R. Baer [et al.]. – Text: visual // Biochemical Pharmacology. – 2012. – Vol. 83, № 8. – P. 1084–1103.

238. Role of breast cancer resistance protein (Bcrp1/Abcg2) in the extrusion of glucuronide and sulfate conjugates from enterocytes to intestinal lumen / Y. Adachi, H. Suzuki, A.H. Schinkel [et al.]. – Text: visual // Molecular Pharmacology. – 2005. – Vol. 67, № 3. – P. 923–928.

239. Role of drug efflux and uptake transporters in atazanavir intestinal permeability and drug-drug interactions / O. Kis, J.A. Zastre, M.T. Hoque [et al.]. – Text: visual // Pharmaceutical Research. – 2013. – Vol. 30, № 4. – P. 1050–1064. – DOI: 10.1007/s11095-012-0942-y.

240. Ross, D.D. Function and clinical relevance of BCRP as a drug resistance protein / D.D. Ross, L.A. Doyle. – Text: visual // *Leukemia*. – 2003. – Vol. 17, № 3. – P. 661.

241. Safety, pharmacodynamics, and pharmacokinetics of BAY 59-7939 – an oral, direct Factor Xa inhibitor – after multiple dosing in healthy male subjects / D. Kubitza, M. Becka, G. Wensing [et al.]. – Text: visual // *European Journal of Clinical Pharmacology*. – 2005. – Vol. 61, № 12. – P. 873–880. – DOI: 10.1007/s00228-005-0043-5.

242. Saito, Y. Novel draft guideline for drug interaction studies in the drug development and labeling recommendations / Y. Saito, K. Maekawa, Y. Ohno. – Text: visual // *Regulatory Science of Medical Products*. – 2014. – Vol. 4. – P. 249–255.

243. Samama, M.M. The mechanism of action of rivaroxaban – an oral, direct Factor Xa inhibitor – compared with other anticoagulants / M.M. Samama. – Text: visual // *Thrombosis Research*. – 2011. – Vol. 127, № 6. – P. 497–504. – DOI: 10.1016/j.thromres.2010.09.008.

244. Sarkadi, B. The ABCG2/BCRP transporter and its variants – from structure to pathology / B. Sarkadi, L. Homolya, T. Hegedűs. – Text: visual // *FEBS Letters*. – 2020. – Vol. 594. – P. 4012–4034. – DOI: 10.1002/1873-3468.13947.

245. Schinkel, A.H. Mammalian drug efflux transporters of the ATP binding cassette (ABC) family: an overview / A. H. Schinkel, J. W. Jonker. – Text: visual // *Advanced Drug Delivery Reviews*. – 2003. – Vol. 55, Issue 1. – P. 3–29. – DOI: 10.1016/S0169-409X(02)00169-2.

246. Selective increase of two ABC drug efflux transporters at the blood–spinal cord barrier suggests induced pharmacoresistance in ALS / M.R. Jablonski, D.A. Jacob, C. Campos [et al.]. – Text: visual // *Neurobiology of Disease*. – 2012. – Vol. 47, № 2. – P. 194–200.

247. Sharom, F.J. ABC multidrug transporters: structure, function and role in chemoresistance / F.J. Sharom. – Text: visual // *Pharmacogenomics*. – 2008. – Vol. 9, № 1. – P. 105–127.

248. Soares, J. The rabbit as an animal model to study innate immunity genes: is it better than mice? / J. Soares, A. Pinheiro, P.J. Esteves. – Text: visual // *Frontiers in Immunology*. – 2022. – Vol. 13. – P. 981815.

249. Sterol transport by the human breast cancer resistance protein (ABCG2) expressed in *Lactococcus lactis* / T. Janvilisri, H. Venter, S. Shahi [et al.]. – Text: visual // *Journal of Biological Chemistry*. – 2003. – Vol. 278, № 23. – P. 20645–20651.

250. Structural basis of small-molecule inhibition of human multidrug transporter ABCG2 / S.M. Jackson, I. Manolaridis, J. Kowal [et al.]. – Text: visual // *Nature Structural & Molecular Biology*. – 2018. – Vol. 25, № 4. – P. 333–340. – DOI: 10.1038/s41594-018-0049-1.

251. Structure and function of BCRP, a broad specificity transporter of xenobiotics and endobiotics / M. Jani, C. Ambrus, R. Magnan [et al.]. – Text: visual // *Archives of Toxicology*. – 2014. – Vol. 88. – P. 1205–1248. – DOI: 10.1007/s00204-014-1224-8.

252. Structure and function of the human breast cancer resistance protein (BCRP/ABCG2) / Z. Ni, Z. Bikadi, M.F. Rosenberg [et al.]. – Text: visual // *Current Drug Metabolism*. – 2010. – Vol. 11, № 7. – P. 603–617. – DOI: 10.2174/138920010792927325.

253. Structure of the human multidrug transporter ABCG2 / N.M.I. Taylor, I. Manolaridis, S. M. Jackson [et al.]. – Text: visual // *Nature*. – 2017. – Vol. 546, № 7659. – P. 504–509.

254. Studies on the intestinal absorption characteristics of sulfasalazine a breast cancer resistance protein (BCRP) substrate / A. Tomaru, N. Morimoto, M. Morishita [et al.]. – Text: visual // *Drug Metabolism and Pharmacokinetics*. – 2013. – Vol. 28, № 1. – P. 71–74. – DOI: 10.2133/dmpk.DMPK-12-NT-024.

255. Studying the right transporter at the right time: an in vitro strategy for assessing drug-drug interaction risk during drug discovery and development / R. Elsbey, H. Atkinson, P. Butler [et al.]. – Text: visual // *Expert Opinion on Drug Metabolism & Toxicology*. – 2022. – Vol. 18, № 10. – P. 619–655.

256. 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 Research*. – 2001. – Vol. 61, № 8. – P. 3458–3464.

257. Subcellular localization of the ABCG2 transporter in normal and malignant human gallbladder epithelium / S. Aust, P. Obrist, W. Jaeger [et al.]. – Text: visual // *Laboratory Investigation*. – 2004. – Vol. 84. – P. 1024–1036.

258. Sulfasalazine in the treatment of spondylarthropathy. A randomized, multicenter, double-blind, placebo-controlled study. / M. Dougados, S. van der Linden, M. Leirisalo-Repo [et al.]. – Text: visual // *Arthritis & Rheumatism*. – 1995. – Vol. 38, № 5. – P. 618–627. – DOI: 10.1002/art.1780380507.

259. Sulfasalazine–quercetin co-amorphous systems: sustained release behaviors and enhanced pharmacokinetics / J. Deng, J. Li, Y. Peng [et al.]. – Text: visual // *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*. – 2025. – P. 114972. – DOI: 10.1016/j.ejpb.2025.114972.

260. Synergistic modulation of ABC transporter-mediated multidrug resistance by *Kalanchoe laciniata* (L.) DC. phytochemicals: integrative phytochemical profiling, network pharmacology, and molecular docking insights / A. Ruban, F. J. Raj, V. V. Sundararajan [et al.]. – Text: visual // *RSC Advances*. – 2026. – Vol. 16, № 10. – P. 8861–8874.

261. Synthesis of a new inhibitor of breast cancer resistance protein with significantly improved pharmacokinetic profiles / Y. Li, J. Woo, J. Chmielecki [et al.]. – Text: visual // *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*. – 2016. – Vol. 26, № 2. – P. 551–555.

262. Szatmári, P. Changes in expression and function of placental and intestinal P-gp and BCRP transporters during pregnancy / P. Szatmári, E. Ducza. – Text: visual // *International Journal of Molecular Sciences*. – 2023. – Vol. 24, № 17. – P. 13089.

263. Taffet, S.L. Sulfasalazine / S.L. Taffet, K.M. Das. – Text: visual // *Digestive Diseases and Sciences*. – 1983. – Vol. 28. – P. 833–842. – DOI: 10.1007/BF01296907.

264. Tang, F. Drug-resistant epilepsy: multiple hypotheses, few answers / F. Tang, A. M.S. Hartz, B. Bauer. – Text: visual // *Frontiers in Neurology*. – 2017. – Vol. 8. – DOI: 10.3389/fneur.2017.00301.

265. Targeting breast cancer resistance protein (BCRP/ABCG2): functional inhibitors and expression modulators / I.F. Zattoni, L. C. Delabio, J. de Paula Dutra [et al.]. – Text: visual // *European Journal of Medicinal Chemistry*. – 2022. – Vol. 237. – P. 114346.

266. Tett, S.E. Clinical pharmacokinetics of slow-acting antirheumatic drugs / S.E. Tett. – Text: visual // *Clinical Pharmacokinetics*. – 1993. – Vol. 25, № 5. – P. 392–407.

267. The 44-kDa Pim-1 kinase phosphorylates BCRP/ABCG2 and thereby promotes its multimerization and drug-resistant activity in human prostate cancer cells / Y. Xie, K. Xu, D. E. Linn [et al.]. – Text: visual // *Journal of Biological Chemistry*. – 2008. – Vol. 283, № 6. – P. 3349–3356.

268. The ABCG2 efflux transporter from rabbit placenta: cloning and functional characterization / S. Halwachs, C. Kneuer, K. Gohlsch [et al.]. – Text: visual // *Placenta*. – 2016. – Vol. 38. – P. 8–15. – DOI: 10.1016/j.placenta.2015.12.005.

269. The breast cancer resistance protein (BCRP/ABCG2) affects pharmacokinetics, hepatobiliary excretion, and milk secretion of the antibiotic nitrofurantoin / G. Merino, J. W. Jonker, E. Wagenaar [et al.]. – Text: visual // *Molecular Pharmacology*. – 2005. – Vol. 67, № 5. – P. 1758–1764. – DOI: 10.1124/mol.104.010439.

270. 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 // *Nature Medicine*. – 2005. – Vol. 11, № 2. – P. 127–129.

271. 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 // *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*. – 2002. – Vol. 99, № 24. – P. 15649–15654. – DOI: 10.1073/pnas.202607599.

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

273. The clinical pharmacogenetics implementation consortium guideline for SLCO1B1, ABCG2, and CYP2C9 genotypes and statin-associated musculoskeletal symptoms / R.M. Cooper-DeHoff, M. Niemi, L.B. Ramsey [et al.]. – Text: visual // *Clinical Pharmacology & Therapeutics*. – 2022. – Vol. 111. – P. 1007–1021.

274. The effect of Bcrp1 (Abcg2) on the in vivo pharmacokinetics and brain penetration of imatinib mesylate (Gleevec): implications for the use of breast cancer resistance protein and P-glycoprotein inhibitors to enable the brain penetration of imatinib in patients / P. Breedveld, D. Pluim, G. Cipriani [et al.]. – Text: visual // *Cancer Research*. – 2005. – Vol. 65, № 7. – P. 2577–2582.

275. The metabolism and disposition of the oral direct thrombin inhibitor, dabigatran, in humans / S. Blech, T. Ebner, E. Ludwig-Schwellinger [et al.]. – Text: visual // *Drug Metabolism and Disposition*. – 2008. – Vol. 36, № 2. – P. 386–399. – DOI: 10.1124/dmd.107.019083.

276. The mouse Bcrp1/Mxr/Abcp gene: amplification and overexpression in cell lines selected for resistance to topotecan, mitoxantrone, or doxorubicin / J.D. Allen, R.F. Brinkhuis, J. Wijnholds [et al.]. – Text: visual // *Cancer Research*. – 1999. – Vol. 59, № 17. – P. 4237–4241. – PMID: 10485464.

277. 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 Metabolism and Disposition*. – 2014. – Vol. 42, № 9. – P. 1466–1477.

278. 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 Metabolism and Disposition*. – 2008. – Vol. 36, № 4. – P. 695–701.

279. 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 // *Journal of Biological Chemistry*. – 2004. – Vol. 279, № 23. – P. 24218–24225. – DOI: 10.1074/jbc.M313599200.

280. Theodoulou, F. L. ABC transporter research: going strong 40 years on / F. L. Theodoulou, I. D. Kerr. – Text: visual // *Biochemical Society Transactions*. – 2015. – Vol. 43, № 5. – P. 1033–1040. – DOI: 10.1042/BST20150139.

281. Ticagrelor is associated with increased rosuvastatin blood concentrations in patients who have had a myocardial infarction / T. Dermota, B. Jug, J. Trontelj [et al.]. – Text: visual // *Clinical Pharmacokinetics*. – 2025. – Vol. 64, № 4. – P. 565–571. – DOI: 10.1007/s40262-025-01489-1.

282. Tissue distribution and hormonal regulation of the breast cancer resistance protein (Bcrp/Abcg2) in rats and mice / Y. Tanaka, A. L. Slitt, T. M. Leazer [et al.]. – Text: visual // *Biochemical and Biophysical Research Communications*. – 2004. – Vol. 326, № 1. – P. 181–187. – DOI: 10.1016/j.bbrc.2004.11.012.

283. Tokumoto, T. Effect of curcumin on sulfasalazine pharmacokinetics in healthy volunteers / T. Tokumoto. – Text: visual // *Journal of Drug Metabolism & Toxicology*. – 2016. – Vol. 7, № 2. – P. 206. – DOI: 10.4172/2157-7609.1000206.

284. Transcriptional regulation of the ABCC6 gene and the background of impaired function of missense disease-causing mutations / T. Arányi, C. Bacquet, H. de Boussac, [et al.]. – Text: visual // *Frontiers in Genetics*. – 2013. – Vol. 4. – P. 27. – DOI: 10.3389/fgene.2013.00027.

285. Transepithelial transport of caffeoylquinic acids in Caco-2 cells: structure dependence and modulation by dietary flavonoids / S. Zhao, J. Zhang, Y. Huang [et al.]. – Text: visual // *Foods*. – 2026. – Vol. 15, № 4. – P. 642.

286. Transport of diclofenac by breast cancer resistance protein (ABCG2) and stimulation of multidrug resistance protein 2 (ABCC2)-mediated drug transport by diclofenac and benzbromarone / Jurjen S. Lagas, C.M. van der Kruijsen, K. van de Wetering [et al.]. – Text: visual // *Drug Metabolism and Disposition*. – 2009. – Vol. 37, № 1. – P. 129–136.

287. Transporter expression in liver tissue from subjects with alcoholic or hepatitis C cirrhosis quantified by targeted quantitative proteomics / L. Wang, C. Collins, E. J. Kelly [et al.]. – Text: visual // *Drug Metabolism and Disposition*. – 2016. – Vol. 44, № 11. – P. 1752–1758.

288. Treatment with sulfasalazine or sulfapyridine, but not 5-aminosalicylic acid, inhibits basic fibroblast growth factor-induced endothelial cell chemotaxis / M.V. Volin, L.A. Harlow, J.M. Woods [et al.]. – Text: visual // *Arthritis & Rheumatism*. – 1999. – Vol. 42, № 9. – P. 1927–1935.

289. Tyrosine kinase inhibitor resistance in cancer: role of ABC multidrug transporters / C. Özvegy-Laczka, J. Cserepes, N.B. Elkind [et al.]. – Text: visual // *Drug Resistance Updates*. – 2005. – Vol. 8, № 1-2. – P. 15–26.

290. Understanding of human ATP binding cassette superfamily and novel multidrug resistance modulators to overcome MDR / I. S. Mohammad, W. He, L. Yin. – Text: visual // *Biomedicine & Pharmacotherapy*. – 2018. – Vol. 100. – P. 335–348. – DOI: 10.1016/j.biopha.2018.02.038.

291. Usefulness of novobiocin as a selective inhibitor of intestinal breast cancer resistance protein (Bcrp) in rats / K. Suzuki, K. Taniyama, T. Aoyama [et al.]. – Text: visual // *Xenobiotica*. – 2020. – Vol. 50, № 9. – P. 1121–1127. – DOI: 10.1080/00498254.2019.1708514.

292. Van Breemen, R.B. Caco-2 cell permeability assays to measure drug absorption / R.B. Van Breemen, Y. Li. – Text: visual // *Expert Opinion on Drug Metabolism & Toxicology*. – 2005. – Vol. 1, № 2. – P. 175–185. – DOI: 10.1517/17425255.1.2.175.

293. Vasiliou, V. Human ATP-binding cassette (ABC) transporter family / V. Vasiliou, K. Vasiliou, D.W. Nebert. – Text: visual // *Human Genomics*. – 2009. – Vol. 3. – P. 281. – DOI: 10.1186/1479-7364-3-3-281.

294. Verma, N. Profiling of ABC transporters during active ulcerative colitis and in vitro effect of inflammatory modulators / N. Verma, V. Ahuja, J. Paul. – Text: visual // *Digestive Diseases and Sciences*. – 2013. – Vol. 58. – P. 2282–2292. – DOI: 10.1007/s10620-013-2636-7.

295. Wang Q. Investigating transporter-mediated drug-drug interactions using a physiologically based pharmacokinetic model of rosuvastatin / Q. Wang, M. Zheng, T. Leil. – Text: visual // CPT: Pharmacometrics & Systems Pharmacology. – 2017. – Vol. 6, № 4. – P. 228–238. – DOI: 10.1124/dmd.108.021410.
296. Wilcox, S.M. The function of ABCF1 in immunity and mouse development: diss. – University of British Columbia, 2010.
297. Wu, Y. The effects of DMARDs on the expression and function of P-gp, MRPs, BCRP in the treatment of autoimmune diseases / Y. Wu, C. Wang, W. Wei. – Text: visual // Biomedicine & Pharmacotherapy. – 2018. – Vol. 105. – P. 870–878. – DOI: 10.1016/j.biopha.2018.06.015.
298. Xia, C.Q. Evaluation of drug-transporter interactions using in vitro and in vivo models / C.Q. Xia, M.N. Milton, L.S. Gan. – Text: visual // Current Drug Metabolism. – 2007. – Vol. 8, № 4. – P. 341–363.
299. X-ray structure of the Yersinia pestis heme transporter HmuUV / J.S. Woo, A. Zeltina, B.A. Goetz [et al.]. – Text: visual // Nature Structural & Molecular Biology. – 2012. – Vol. 19, № 12. – P. 1310–1315. – DOI: 10.1038/nsmb.24