

<https://doi.org/10.33380/2305-2066-2023-12-2-87-94>
УДК 615.015 + 615.2 + 618.19



Оригинальная статья / Research article

Методика тестирования лекарственных средств на принадлежность к субстратам и ингибиторам белка-транспортера BCRP на клетках линии Caco-2

Ю. С. Транова, А. А. Слепнев, И. В. Черных✉, А. В. Шулькин, П. Ю. Мыльников, Н. М. Попова, М. И. Поветко, Е. Н. Якушева

ФГБОУ ВО «Рязанский государственный медицинский университет имени академика И. П. Павлова» Министерства здравоохранения Российской Федерации (ФГБОУ ВО РязГМУ Минздрава России), 390026, Россия, г. Рязань, ул. Высоковольная, д. 9

✉ Контактное лицо: Черных Иван Владимирович. E-mail: lvchernykh88@mail.ru

ORCID: Ю. С. Транова – <https://orcid.org/0000-0001-5068-1201>; А. А. Слепнев – <https://orcid.org/0000-0001-0696-6554>; И. В. Черных – <https://orcid.org/0000-0002-5618-7607>; А. В. Шулькин – <https://orcid.org/0000-0003-1688-0017>; П. Ю. Мыльников – <https://orcid.org/0000-0001-7829-2494>; Н. М. Попова – <https://orcid.org/0000-0002-5166-8372>; М. И. Поветко – <https://orcid.org/0000-0003-1273-520X>; Е. Н. Якушева – <https://orcid.org/0000-0001-6887-4888>.

Статья поступила: 18.03.2022

Статья принята в печать: 29.03.2023

Статья опубликована: 25.05.2023

Резюме

Введение. Белок резистентности рака молочной железы (BCRP) является эффлюксным мембранным транспортером, контролирующим фармакокинетику большого числа лекарственных средств. Его активность может изменяться на фоне приема ряда эндо- и экзогенных веществ, таким образом, делая его звеном межлекарственных взаимодействий.

Цель. Цель исследования – разработка методики тестирования лекарственных веществ на принадлежность к субстратам и ингибиторам BCRP *in vitro*.

Материалы и методы. Работа выполнена на клетках Caco-2 гиперэкспрессирующих BCRP; культивирование проводили в трансвелл-системе, состоящей из апикальной и базолатеральной камер. На дно апикальной камеры (полупроницаемая мембрана) высевали клетки. Оценивался транспорт субстратов BCRP: метотрексат, митоксантрон и кверцетин в концентрациях 1–50 мкМ в направлении из базолатеральной камеры в апикальную (Papp b-a) и в обратном направлении (Papp a-b). Отношение Papp b-a / Papp a-b более «2» характеризует участие транспортера в переносе веществ. Для подтверждения участия BCRP в транспорте тест-субстратов эксперимент проводился с добавлением в камеры ингибитора транспортера – резерпина (50 мкМ). Концентрацию субстратов определяли методом ВЭЖХ-МС/МС.

Результаты и их обсуждение. При добавлении метотрексата (1 мкМ), митоксантрона (1 мкМ) и кверцетина (1–10 мкМ) в обе камеры их содержание в камере-реципиенте не детектировалось. При концентрации метотрексата 5 мкМ отношение Papp b-a / Papp a-b составило $3,38 \pm 0,08$, что свидетельствует об участии транспортера в его переносе. При концентрации вещества (10 и 50 мкМ) Papp b-a / Papp a-b снижалось до значений ниже «2». При концентрации митоксантрона 5 мкМ Papp b-a / Papp a-b составило $2,72 \pm 0,16$. Увеличение концентрации до 10 мкМ привело к росту Papp b-a / Papp a-b до $6,18 \pm 0,08$. При содержании вещества 50 мкМ показатель снижался, но оставался выше значения 2. В концентрации кверцетина 50 мкМ Papp b-a / Papp a-b было ниже «2». Резерпин снижал Papp b-a / Papp a-b метотрексата в 3,31 раза ($p = 0,0002$), что свидетельствует об устранении асимметрии транспорта вещества. При концентрации митоксантрона 10 мкМ резерпин снижал его Papp b-a / Papp a-b в 3,36 раза ($p < 0,0001$). Результаты свидетельствуют об участии BCRP в контроле переноса обоих веществ через клеточный монослой.

Заключение. Разработана и апробирована на клетках линии Caco-2 методика тестирования лекарственных средств на принадлежность к субстратам и ингибиторам BCRP с использованием в качестве маркерных субстратов метотрексата (5 мкМ) и митоксантрона (10 мкМ), а в качестве ингибитора – резерпина (50 мкМ).

Ключевые слова: BCRP, культура клеток Caco-2, эффлюкс, субстраты, ингибиторы, метотрексат, митоксантрон, кверцетин, резерпин

Конфликт интересов. Авторы декларируют отсутствие явных и потенциальных конфликтов интересов, связанных с публикацией настоящей статьи.

Вклад авторов. Ю. Транова, И. В. Черных, Н. М. Попова, М. И. Поветко – культивирование клеток, выполнение транспортных экспериментов. А. А. Слепнев – статистическая обработка полученных результатов, написание статьи. А. В. Шулькин – выполнение хроматографических исследований. П. Ю. Мыльников – выполнение хроматографических исследований, пробоподготовка. Е. Н. Якушева – написание статьи, общее руководство работой.

Для цитирования: Транова Ю. С., Слепнев А. А., Черных И. В., Шулькин А. В., Мыльников П. Ю., Попова Н. М., Поветко М. И., Якушева Е. Н. Методика тестирования лекарственных средств на принадлежность к субстратам и ингибиторам белка-транспортера BCRP на клетках линии Caco-2. *Разработка и регистрация лекарственных средств.* 2023;12(2):87–94. <https://doi.org/10.33380/2305-2066-2023-12-2-87-94>

Method for Testing of Drugs Belonging to Substrates and Inhibitors of the Transporter Protein BCRP on Caco-2 Cells

Yulya S. Tranova, Alexander A. Slepnev, Ivan V. Chernykh✉, Aleksey V. Shchulkin, Pavel Yu. Mylnikov, Nataliya M. Popova, Mariya I. Povetko, Elena N. Yakusheva

Ryazan State Medical University named after academician I. P. Pavlov, 9, Vysokovolnaya str., Ryazan, 390026, Russia

✉ Corresponding author: Ivan V. Chernykh. E-mail: lvchernykh88@mail.ru

© Транова Ю. С., Слепнев А. А., Черных И. В., Шулькин А. В., Мыльников П. Ю., Попова Н. М., Поветко М. И., Якушева Е. Н., 2023

© Tranova Yu. S., Slepnev A. A., Chernykh I. V., Shchulkin A. V., Mylnikov P. Yu., Popova N. M., Povetko M. I., Yakusheva E. N., 2023

ORCID: Yulya S. Tranova – <https://orcid.org/0000-0001-5068-1201>; Alexander A. Slepnev – <https://orcid.org/0000-0001-0696-6554>; Ivan V. Chernykh – <https://orcid.org/0000-0002-5618-7607>; Aleksey V. Shchulkin – <https://orcid.org/0000-0003-1688-0017>; Pavel Yu. Mylnikov – <https://orcid.org/0000-0001-7829-2494>; Nataliya M. Popova – <https://orcid.org/0000-0002-5166-8372>; Mariya I. Povetko – <https://orcid.org/0000-0003-1273-520X>; Elena N. Yakusheva – <https://orcid.org/0000-0001-6887-4888>.

Received: 18.03.2022 Revised: 29.03.2023 Published: 25.05.2023

Abstract

Introduction. Breast cancer resistance protein (BCRP) is an efflux membrane transporter that controls the pharmacokinetics of a large number of drugs. Its activity may change when taking some endo- and exogenous substances, thus making it a link in drug interactions.

Aim. The aim of the study was to develop a method for testing of drugs for belonging to BCRP substrates and inhibitors *in vitro*.

Materials and methods. The work was performed on Caco-2 cells overexpressing BCRP, the cultivation was performed in a transwell-system consisting of the apical and basolateral chambers. Cells were seeded at the bottom of the apical chamber, which is a semipermeable membrane. Primarily, the transport of BCRP substrates: methotrexate, mitoxantrone and quercetin was evaluated in the concentration range of 1, 5, 10, and 50 μM in the direction from the basal chamber to the apical one (Papp b-a) and in the opposite direction (Papp a-b). The ratio Papp b-a / Papp a-b more than «2» characterizes the participation of transporter proteins in the transcellular transport of substances. To confirm the participation of BCRP in their transport the experiment was carried out with the addition of a transporter inhibitor, reserpine, to the transport medium at a concentration of 50 μM . The concentration of substrates in the chambers was analyzed by HPLC-MS/MS.

Results and their discussion. The addition of methotrexate (1 μM), mitoxantrone (1 μM), and quercetin (1–10 μM) to both the apical or basolateral chambers of the transwell-system, their content in the recipient chamber was not detected. When methotrexate concentration became 5 μM the Papp b-a / Papp a-b ratio was 3.38 ± 0.08 , which indicates the involvement of transporters in its transfer. The addition of methotrexate to the donor chamber at concentrations of 10 and 50 μM , Papp b-a / Papp a-b decreased to values below «2». At mitoxantrone concentration of 5 μM Papp b-a / Papp a-b was 2.72 ± 0.16 . An increase in the concentration to 10 μM led to an increase in Papp b-a / Papp a-b to 6.18 ± 0.08 . With a substance content of 50 μM the indicator decreased but remained above the value «2». In the quercetin concentration of 50 microns, Papp b-a / Papp was below "2". Reserpine reduced Papp b-a / Papp a-b of methotrexate by 3.31 times ($p = 0.0002$), which indicates the elimination of asymmetry in the transport of the substance. At a mitoxantrone concentration of 10 microns, reserpine reduced its Papp b-a / Papp a-b by 3.36 times ($p < 0.0001$). The results indicate the participation of BCRP in the control of the transfer of both substances through the cellular monolayer.

Conclusion. A method of testing drugs belonging to BCRP substrates and inhibitors using methotrexate (5 μM) and mitoxantrone (10 μM) as marker substrates and reserpine (50 μM) as inhibitor was developed and tested on Caco-2 cells.

Keywords: BCRP, Caco-2 cell culture, efflux, substrates, inhibitors, methotrexate, mitoxantrone, quercetin, reserpine

Conflict of interest. The authors declare that they have no obvious and potential conflicts of interest related to the publication of this article.

Contribution of the authors. Yulya S. Tranova, Ivan V. Chernykh, Nataliya M. Popova, Mariya I. Povetko – cell cultivation, transport experiments. Alexander A. Slepnev – statistical processing of the results, writing an article. Aleksey V. Shchulkin – performance of chromatographic studies. Pavel Yu. Mylnikov – performance of chromatographic studies, sample preparation. Elena N. Yakusheva – writing an article, general supervision of the work.

For citation: Tranova Yu. S., Slepnev A. A., Chernykh I. V., Shchulkin A. V., Mylnikov P. Yu., Popova N. M., Povetko M. I., Yakusheva E. N. Method for testing of drugs belonging to substrates and inhibitors of the transporter protein BCRP on Caco-2 cells. *Drug development & registration*. 2023;12(2):87–94. (In Russ.) <https://doi.org/10.33380/2305-2066-2023-12-2-87-94>

ВВЕДЕНИЕ

С целью снижения риска развития нежелательных лекарственных реакций, связанных с участием белков-транспортеров и цитохрома P450, зарубежные регулирующие организации, начиная с 1997, рекомендуют все новые лекарственные средства тестировать на принадлежность к субстратам и ингибиторам цитохромов P450¹, а с 2006 года также и к субстратам и ингибиторам транспортных белков².

¹ U.S. Department of Health and Human Services, U.S. Food and Drug Administration, Center for Drug Evaluation and Research, Center For Biologics Evaluation and Research. Guidance for Industry Drug Metabolism/Drug Interaction Studies in the Drug Development Process: Studies In Vitro. 1997. P. 10.

² U.S. Department of Health and Human Services, Food and Drug Administration, Center for Drug Evaluation and Research (CDER), Center for Biologics Evaluation and Research (CBER). Drug Interaction Studies – Study Design, Data Analysis, and Implications for Dosing and Labeling. 2006. P. 52.

Аналогичные рекомендации в России появились в 2014 году³.

Белок резистентности рака молочной железы человека (BCRP – breast cancer resistance protein, ABCG2) представляет собой эффлюксный трансмембранный белок-транспортер с массой порядка 75 кДа, относящийся к суперсемейству ABC-транспортеров [1, 2].

На данный момент показано, что BCRP экспрессируется как в опухолевых клетках, так и в плазмодиотрофобластах плаценты человека, в апикальной мембране энтероцитов, в гепатоцитах, на поверхности эндотелиальных клеток микрососудов головного мозга человека, в стволовых клетках, в яичниках, надпочечниках и легких [3]. Подобная локализация транс-

³ Методические рекомендации по изучению биотрансформации и транспортеров новых лекарственных средств: дизайн исследований, анализ данных. Руководство по экспертизе лекарственных средств. Том III. М.: Гриф и К; 2014. 343 с.

портера в органах и тканях может указывать на то, что он играет немаловажную роль в абсорбции, распределении и удалении лекарственных средств, являющихся его субстратами [4]. Учитывая функционирование BCRP в кишечнике и печени, он, аналогично гликопротеину-P (Pgp, ABCB1-белок), служит барьером для энтеральной абсорбции лекарственных средств, что ограничивает их биодоступность, а также опосредует выведение через гепатобилиарную систему [4].

На сегодня известно более 200 субстратов BCRP. К ним относят противоопухолевые средства, такие как метотрексат, митоксантрон, производные камптотецина, некоторые ингибиторы протеинкиназы, и ряд препаратов других фармакологических групп: празозин, глибурид, циметидин, сульфасалазин, нитрофурантоин, розувастатин и др. [5].

Некоторые лекарственные средства способны изменять активность BCRP. Прием препаратов, снижающих его функциональную активность (ингибиторы протеазы ВИЧ, блокаторы протонной помпы, ряд флавоноидов и др), может приводить к развитию нежелательных лекарственных взаимодействий. Прием потенциальных индукторов, напротив, может приводить к снижению эффективности фармакотерапии. На данный момент веществ, являющихся индукторами BCRP, обнаружено крайне мало [5].

Одной из методик обнаружения функциональных ингибиторов BCRP является способ, основанный на измерении накопления флуоресцентного субстрата в клетках линии почек собак Madin-Darby II, селективно экспрессирующих BCRP (SB MDCKII BCRP), на фоне инкубации с тестируемым агентом. Данный подход позволяет использовать только субстраты, способные к флуоресценции, а также дорогостоящие трансфицированные клеточные линии [6].

Оценка принадлежности биологически активных веществ к субстратам и ингибиторам BCRP может проводиться также с помощью проточной цитофлуориметрии на клетках эмбриональной почки человека (HEK) с использованием флуоресцентных субстратов [7].

В нашей работе мы планировали опробовать одобренный зарубежными рекомендациями¹ метод тестирования лекарственных веществ на принадлежность к субстратам/модуляторам активности BCRP на доступной большинству лабораторий клеточной линии Caco-2 с применением субстратов: метотрексата, митоксантрона и кверцетина. Данные вещества обладают достаточной растворимостью в большинстве растворителей и характеризуются интенсивным проникновением через клетки линии Caco-2, в отличие, например, от используемых рядом исследова-

телей феофорбида А [8] и празозина [9]. Кверцетин, кроме того, обладает низкой токсичностью и может в дальнейшем использоваться в экспериментах *in vivo* [10].

Целью исследования явилась апробация методики тестирования лекарственных веществ на принадлежность к субстратам и ингибиторам белка-транспортера BCRP *in vitro* на культуре клеток Caco-2.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

На первом этапе исследования проведена оценка количества BCRP в клетках линии Caco-2 (ЦКП «Коллекция культур клеток позвоночных», Россия). Для этого их культивировали как указано ранее [11] в течение 3 недель: за это время происходит их самопроизвольная дифференцировка в энтероцитоподобные клетки, гиперэкспрессирующие BCRP [12]. После завершения культивирования клетки снимали с лунок [11] и лизировали трехкратным циклом заморозки-разморозки. В лизате с помощью коммерческого набора для гетерогенного иммуноферментного анализа (BlueGene, КНП) оценивали количество BCRP методом абсолютной калибровки.

Для анализа принадлежности лекарственных веществ к субстратам/ингибиторам BCRP использовали специальные трансвелл-системы (12 mm Transwell® with 0,4 µm Pore Polycarbonate Membrane Insert, Sterile, Corning Incorporated, США), состоящие из апикальной и базолатеральной камер (рисунок 1). Клетки Caco-2 высевали на полупроницаемую мембрану, которая представляет дно апикальной камеры.

Транспортные эксперименты проводились на 22-е сутки после достижения плотных межклеточных контактов и формирования монослоя в трансвелл-системе.

Целостность клеточного монослоя оценивали по величине трансэпителиального сопротивления (TEER), которое определяли с помощью вольтметра Millicell® ERS-2 (Millipore, США). Транспортные эксперименты выполняли при значении TEER выше 500 мОм·см². Для этого питательную среду заменяли на транспортную среду, представляющую собой раствор Хэнкса (ООО «ПанЭко», Россия) с 25 мМ HEPES (Gipco, № 2026999, Англия) и 1 % диметилсульфоксида (ООО «ПанЭко», Россия). После этого в апикальную камеру (камера-донор) трансвелл-системы добавляли один из тестируемых субстратов BCRP [6]: метотрексат [метотрексата гидрат, субстанция-порошок, содержание метотрексата ≥98 % (HPLC), Sigma-Aldrich, Китай, серия A6770, годен до 10.02.2023], митоксантрон [митоксантрона дигидрохлорид, субстанция-порошок, содержание митоксантрона ≥97 % (HPLC), Sigma-Aldrich, Китай, серия M6545, годен до 11.03.2023], кверцетин [кверцетин, субстанция-порошок, содержание кверцетина ≥95 % (HPLC), Sigma-Aldrich, Индия, серия Q4951, годен до 23.03.2023] в концентрациях 1, 5, 10, 50 мкМ. Забор образцов транспортной среды

¹ European medicines agency. Guideline on the investigation of drug interactions. – 2012. U.S. Department of Health and Human Services, Food and Drug Administration, Center for Drug Evaluation and Research. In Vitro Metabolism and Transporter-Mediated Drug-Drug Interaction Studies Guidance for Industry. 2017.

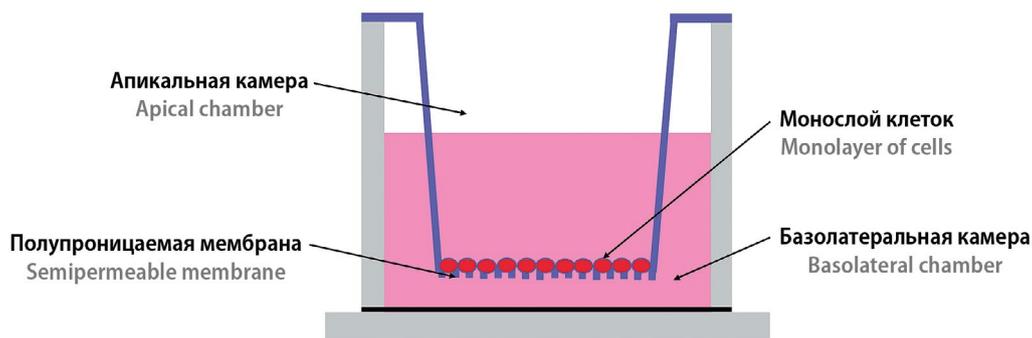


Рисунок 1. Трансвелл-система (схема)

Figure 1. Transwell-system (scheme)

для определения концентрации субстрата в базолатеральной камере (камере-реципиенте) производили через 1, 2 и 3 часа (a-b транспорт, обусловленный пассивной диффузией).

На следующем этапе оценивали транспорт субстрата BCRP из базолатеральной камеры в апикальную (b-a транспорт). Для этого забор проб осуществляли из апикальной камеры (камеры-реципиента) после добавления субстрата в базолатеральную камеру (камеру-донор) через аналогичные временные промежутки. Данный транспорт реализуется как путем пассивной диффузии, так и с помощью белков-транспортёров [13].

Для оценки интенсивности транспорта веществ через клеточных монослой рассчитывали коэффициенты кажущейся проницаемости: P_{app} b-a и P_{app} a-b, а также их отношение, которое характеризует общий вклад эффлюксных транспортеров в перенос веществ через билипидную мембрану [11].

Для подтверждения участия BCRP в трансцеллюлярном переносе данных веществ эксперименты выполняли на фоне добавления в транспортную среду ингибитора белка-транспортёра резерпина [резерпин, субстанция-порошок, содержание резерпина $\geq 99\%$ (HPLC), Sigma-Aldrich, Китай, серия 83580, годен до 09.03.2023] в концентрации 50 мкМ (за 30 мин до начала исследования и на всем его протяжении) в обе камеры вне зависимости от направления оцениваемого транспорта.

Концентрацию тестируемых веществ в камерах реципиентах анализировали с помощью ВЭЖХ-МС/МС, используя следующие реактивы: Вода ВЭЖХ-МС (№ 21F104014, VWR, Франция), кислота муравьиная 98 % для аналитики (№ 0001900259, PanReac, Испания), ацетонитрил градиентной ВЭЖХ (№ 2183665, Thermo Fisher Scientific Inc., Китай), метанол особой чистоты для градиентной ВЭЖХ (ООО ТД «ХИММЕД», Россия).

Работа выполнена на высокоэффективном жидкостном хроматографе UltiMate 3000 (Thermo Fisher Scientific, США), оснащённом градиентным насосом, дегазатором, автосемплером и tandemным масс-селективным детектором TSQ Fortis (Thermo Fisher Scien-

tific, США). Управление совмещенной системой ВЭЖХ-МС/МС и обработку данных проводили при помощи программного обеспечения Thermo Scientific Xcalibur (ver. 4.2.47).

В исследовании использовали колонку UCT Selectra C18 4,6·100 мм 5 мкм, 100 Å, предколонка Selectra C18 Guard Cartridges SLC-18 GDC46-5UM.

Извлечение метотрексата из транспортной среды осуществляли смесью метанола и воды в соотношении 1:1, митоксантрона – метанолом, кверцетина – смесью ацетонитрила и воды в соотношении 1:1. Далее образцы тщательно перемешивали на встряхивателе Vortex (Heidolph Instruments GmbH & Co KG, Германия), после чего центрифугировали в течение 10 мин при 13000 g на центрифуге Avanti® JXN-30 (Beckman Coulter Inc., США). Надосадочную жидкость переносили в виалы и помещали в автосемплер.

Условия хроматографического анализа были следующими.

Метотрексат. Объем вводимой пробы составил 2 мкл при скорости потока подвижной фазы 0,3 мл/мин и температуре разделения 35 °С. Время анализа – 10 мин. Использовали градиентный режим элюирования: соотношение раствора муравьиной кислоты и ацетонитрила: 0 мин – 75 к 25 %; 0,4 мин – 60 к 40 %; 6 мин – 20 к 80 %; 8 мин – 75 к 25 %. В данных условиях время удерживания метотрексата составило 3,11 мин.

Митоксантрон. Скорость потока подвижной фазы составила 0,3 мл/мин при температуре разделения 35 °С и объеме вводимой пробы 5 мкл. Использовали градиентный режим элюирования: соотношение раствора муравьиной кислоты и метанола: 0 мин – 70 и 30 %; 0,3 мин – 10 и 90 %; 6 мин – 70 и 30 %. Время анализа – 10 мин. В данных условиях время удерживания метотрексата составило 5,51 мин.

Кверцетин. Скорость потока элюента – 0,5 мл/мин, температура разделения – 35 °С, объем вводимой пробы – 5 мкл. Хроматографический анализ проводили в градиентном режиме: соотношение раствора 0,1%-й муравьиной кислоты и ацетонитрила составило на 0 мин 70 и 30 %; 0,3 мин 30 и 70 %; 4 мин 1 и 99 %;

Таблица 1. Масс-спектрометрические параметры детектирования метотрексата, митоксантрона и кверцетина

Table 1. Mass-spectrometric parameters for the detection of methotrexate, mitoxantrone and quercetin

Параметры детектирования Detection parameters	Анализируемые вещества Analyzed substances		
	Метотрексат Methotrexate	Митоксантрон Mitoxantrone	Кверцетин Quercetin
Режим ионизации Ionization mode	Положительный Positive	Положительный Positive	Негативный Negative
Напряжение электроспрея Spray voltage	3500 В 3500 V	3700 В 3700 V	3000 В 3000 V
Оболочечный газ Sheath gas	35 Arb	50 Arb	50 Arb
Вспомогательный газ Aux gas	7 Arb	10 Arb	10 Arb
Продувочный газ Sweep gas	0 Arb	1 Arb	10 Arb
Температура трубки для переноса ионов Ion transfer tube temperature	300 °C	300 °C	300 °C
Температура испарителя Vaporizer temperature	350 °C	350 °C	350 °C
Условия детектирования Detection conditions	455,15 → 308,125 m/z и 455,15 → 174,98 m/z 455,15 → 308,125 m/z and 455,15 → 174,98 m/z	455 → 88,2 m/z и 455 → 358,1 m/z 455 → 88,2 m/z and 455 → 358,1 m/z	301 → 150,9 m/z и 301 → 178,9 m/z 301 → 150,9 m/z and 301 → 178,9 m/z
Энергия столкновения Collision energy	22,99 и 19,74 В 22,99 and 19,74 V	25 и 18 В 25 and 18 V	22 и 17 В 22 and 17 V
Фрагментация источника Source fragmentation	5	0	5
CID-газа CID gas	2 мТорр 2 mTorr	2 мТорр 2 mTorr	1 мТорр 1 mTorr

9 мин 70 и 30 %. Продолжительность анализа – 11 мин, при данных условиях время удерживания кверцетина составило 3,91 мин.

В описанных методиках внутренний стандарт не использовался.

Аналитический диапазон методики составил для метотрексата, митоксантрона и кверцетина соответственно 60–10000 нмоль/л, 50–1000 нмоль/л, 5–500 нмоль/л целевого вещества.

Параметры детектирования указаны в таблице 1.

Биоаналитические методики были валидированы путем доказательства селективности, линейности, удовлетворительных внутри- и межцикловой точности и прецизионности, стабильности образцов в процессе заморозки/разморозки, отсутствия переноса пробы и матричного эффекта¹.

Анализ результатов проводили с помощью программы STATISTICA 13.0 (StatSoft Inc., США). Критерий Шапиро–Уилка использовали для анализа распределения данных, а критерия Стьюдента применяли для попарного сравнения данных. Результаты представлены в виде среднего арифметического ± стандартное отклонение ($M \pm SD$). Статистически значимыми считали различия при $p < 0,05$.

¹ Изучение биоэквивалентности воспроизведенных лекарственных средств. Руководство по экспертизе лекарственных средств. Том I. М.: Гриф и К; 2013. 328 с.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Содержание ВСРР в клетках линии Сасо-2 к 21-м суткам культивирования, оцененное методом гетерогенного иммуноферментного анализа, составило $4,39 \pm 0,12$ нг/мг белка. Для сравнения – уровень Рgp в данной клеточной линии превышал 100 нг/мг белка [14].

При оценке транспорта субстратов ВСРР были получены следующие результаты (таблица 2).

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

При увеличении концентрации метотрексата до 5 мкМ наблюдалась выраженная асимметрия трансцеллюлярного транспортера вещества: коэффициент кажущейся проницаемости $P_{app} b-a$ составил $1,46 \pm 0,58$, $P_{app} a-b$ – $0,44 \pm 0,18$, а их отношение $P_{app} b-a / P_{app} a-b$ превышало «2», что свидетельствует об участии ВСРР в транспорте вещества.

При добавлении метотрексата в камеру-донор в концентрациях 10 и 50 мкМ отношение коэффициентов кажущейся проницаемости достоверно снижалось по сравнению с параметром при 5 мкМ до значений ниже единицы ($p = 0,00023$, $p = 0,00024$ соответственно), что свидетельствует о снижении транс-

Таблица 2. Транспорт субстратов BCRP через монослой клеток линии Caco-2 ($M \pm SD, \times 10^{-6}$ см/сек)

Table 2. Transport of BCRP substrates through the monolayer of Caco-2 cells ($M \pm SD, \times 10^{-6}$ cm/sec)

Тестируемое вещество Test substance		Papp b-a	Papp a-b	Papp b-a / Papp a-b
Метотрексат Methotrexate	1 мкМ 1 μ M	Не рассчитывались, т.к. концентрации вещества были ниже НПКО Were not calculated, because the concentrations of the substance were lower than LLOQ		
	5 мкМ 5 μ M	1,46 \pm 0,58	0,44 \pm 0,18	3,38 \pm 0,078
	10 мкМ 10 μ M	0,41 \pm 0,13*	1,38 \pm 0,18*	0,30 \pm 0,052*
	50 мкМ 50 μ M	0,41 \pm 0,14*	0,98 \pm 0,033*#	0,42 \pm 0,14*
Митоксантрон Mitoxantrone	1 мкМ 1 μ M	ниже НПКО below the LLOQ	ниже НПКО below the LLOQ	ниже НПКО below the LLOQ
	5 мкМ 5 μ M	2,23 \pm 0,090	0,82 \pm 0,080	2,72 \pm 0,16
	10 мкМ 10 μ M	1,57 \pm 0,32*	0,25 \pm 0,045*	6,18 \pm 0,17*
	50 мкМ 50 μ M	0,75 \pm 0,018*#	0,34 \pm 0,054*	2,22 \pm 0,30*#
Кверцетин Quercetin	1 мкМ 1 μ M	ниже НПКО below the LLOQ	ниже НПКО below the LLOQ	ниже НПКО below the LLOQ
	5 мкМ 5 μ M	ниже НПКО below the LLOQ	ниже НПКО below the LLOQ	ниже НПКО below the LLOQ
	10 мкМ 10 μ M	ниже НПКО below the LLOQ	ниже НПКО below the LLOQ	ниже НПКО below the LLOQ
	50 мкМ 50 μ M	0,035 \pm 0,015	0,02 \pm 0,014	1,93 \pm 0,46

Примечание. Серым цветом выделены значения отношения Papp b-a / Papp a-b, превышающее «2», свидетельствующее об участии эффлюксных транспортеров в трансцеллюлярном переносе вещества.

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

Note. The values of the Papp b-a / Papp a-b ratio exceeding "2" are highlighted in gray, indicating the participation of efflux transporters in the transcellular transfer of the substance

* – $p < 0.05$ – significant differences with values at a concentration μ M; # – $p < 0.05$ – significant differences with values at a concentration 10 μ M.

порта метотрексата в направлении из клеток в апикальную камеру (соответствует эффлюксу в просвет кишечника). Скорее всего, полученные данные являются следствием насыщения белка-транспортера BCRP. Также возможна конкуренция BCRP с другим транспортным белком – RFC1, который также присутствует в клетках линии Caco-2 и обеспечивает инфлюкс метотрексата [15].

При концентрации митоксантрона в камере-доноре 5 мкМ наблюдалась асимметрия его транспорта через клеточный монослой: отношение коэффициентов кажущейся проницаемости превышало «2».

Увеличение концентрации митоксантрона в транспортной среде до 10 мкМ приводило к росту отношения коэффициентов кажущейся проницаемости по сравнению с параметром при концентрации 5 мкМ до 6,18 \pm 0,08 ($p = 0,00024$). Однако при содержании вещества 50 мкМ показатель снижался по сравнению с сериями 5 мкМ ($p = 0,0297$) и 10 мкМ ($p = 0,00023$) вещества, однако оставался выше критического значения «2», что возможно объяснить насыщением BCRP.

При добавлении кверцетина в концентрации 50 мкМ в камеру-донор трансвелл-системы вещество детектировалось в камере-реципиенте в количестве менее 1% от его содержания в камере-доноре, что свидетельствует о низкой проницаемости через клеточный монослой. При этом наблюдалась незначительная асимметрия его транспорта, недостаточная, однако, для утверждения участия BCRP в регуляции данного процесса в предложенных условиях.

Дальнейший эксперимент по подтверждению участия именно белка-транспортера BCRP в трансцеллюлярном переносе веществ проводился с использованием метотрексата и митоксантрона в концентрациях соответственно 5 и 10 мкМ, что связано с выявленными нами отношениями коэффициентов кажущейся проницаемости, превышающими значение «2». Для митоксантрона при этом наблюдалась максимальная асимметрия транспорта. Анализ заключался в оценке интенсивности переноса веществ через клеточный монослой в присутствии ингибитора BCRP – резерпина в концентрации 50 мкМ [16]. Полученные результаты приведены в таблице 3.

Таблица 3. Влияние ингибитора BCRP резерпина (50 мкМ) на транспорт метотрексата и митоксантрона через монослой клеток линии Caco-2 ($M \pm SD, \times 10^{-6}$ см/сек)

Table 3. Effect of BCRP inhibitor reserpine (50 μ M) on the transport of methotrexate and mitoxantrone through the monolayer of Caco-2 cells ($M \pm SD, \times 10^{-6}$ cm/sec)

Серия Series	Papp b-a	Papp a-b	Papp b-a / Papp a-b
Метотрексат 5 мкМ Methotrexate 5 μ M	1,46 \pm 0,58	0,44 \pm 0,18	3,38 \pm 0,08
Метотрексат 5 мкМ + резерпин Methotrexate 5 μ M + reserpine	0,53 \pm 0,13*	0,56 \pm 0,27	1,02 \pm 0,29*
Митоксантрон 10 мкМ Mitoxantrone 10 μ M	1,57 \pm 0,32	0,25 \pm 0,045	6,18 \pm 0,17
Митоксантрон 10 мкМ + резерпин Mitoxantrone 10 μ M + reserpine	0,39 \pm 0,057*	0,21 \pm 0,025	1,84 \pm 0,052*

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

Note. * – $p < 0.05$ – significant differences with values without reserpine addition.

Резерпин снижал коэффициент кажущейся проницаемости Papp b-a метотрексата в 2,75 раза (уровень тенденции: $p = 0,053$), достоверно не изменял коэффициент кажущейся проницаемости Papp a-b ($p = 0,539$). Отношение Papp ba / Papp a-b при этом снижалось в 3,31 раза ($p = 0,0002$), что свидетельствует об устранении асимметрии транспорта вещества, вызванной участием эффлюксного белка-транспортера BCRP в контроле данного процесса. Это подтверждает возможность использования метотрексата в указанной концентрации для оценки принадлежности лекарственных веществ к ингибиторам данного транспортера.

При концентрации митоксантрона 10 мкМ резерпин снижал его коэффициент кажущейся проницаемости Papp b-a в 4,03 раза ($p = 0,0033$), не влиял достоверно на коэффициент кажущейся проницаемости Papp a-b и уменьшал соотношение Papp b-a / Papp a-b в 3,36 раза ($p < 0,0001$). Это также свидетельствует об участии BCRP в контроле трансцеллюлярного переноса митоксантрона и позволяет рекомендовать данное вещество в указанной концентрации в качестве субстрата для оценки влияния лекарственных средств на активность белка-транспортера.

Таким образом, коммерчески доступные в России клетки линии Caco-2 могут быть использованы для тестирования лекарственных веществ на принадлежность к субстратам/ингибиторам BCRP. При этом для тестирования на принадлежность к ингибиторам белка-транспортера в качестве субстрата оптимально использовать метотрексат или митоксантрон в концентрациях соответственно 5 и 10 мкМ, а для анализа

принадлежности веществ к субстратам BCRP в качестве его ингибитора целесообразно применять резерпин в концентрации 50 мкМ.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Разработана и апробирована на клетках линии Caco-2 методика тестирования лекарственных средств на принадлежность к субстратам и ингибиторам BCRP с использованием в качестве субстратов метотрексата (5 мкМ) и митоксантрона (10 мкМ), а в качестве ингибитора – резерпина (50 мкМ). Проведение подобного тестирования лекарственных средств на этапе их доклинических исследований позволит в дальнейшем осуществлять эффективную и безопасную фармакотерапию и прогнозировать возможные фармакокинетические межлекарственные взаимодействия на уровне транспортера. Кроме того, обнаружение эффективного ингибитора BCRP может служить основанием для развития новой стратегии лечения опухолей, гиперэкспрессирующих данный мембранный белок.

ЛИТЕРАТУРА

- Sarkadi B., Homolya L., Hegedus T. The ABCG2/BCRP transporter and its variants – from structure to pathology. *FEBS Lett.* 2020;594(23):4012–4034. DOI: 10.1002/1873-3468.13947.
- Doyle L. A., Yang W., Abruzzo L. V., Krogmann T., Gao Y., Rishi A. K., Ross D. D. A multidrug resistance transporter from human MCF-7 breast cancer cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences.* 1998;95(26):15665–15670. DOI: 10.1073/pnas.95.26.15665.
- Maliepaard M., Scheffer G. L., Faneyte I. F., van Gastelen M. A., Pijnenborg A. C., Schinkel A. H., van De Vijver M. J., Scheper R. J., Schellens J. H. Subcellular localization and distribution of the breast cancer resistance protein transporter in normal human tissues. *Cancer Research.* 2001;61(8):3458–3464.
- Jonker J. W., Smit J. W., Brinkhuis R. F., Maliepaard M., Beijnen J. H., Schellens J. H., Schinkel A. H. Role of breast cancer resistance protein in the bioavailability and fetal penetration of topotecan. *Journal of the National Cancer Institute.* 2000;92(20):1651–1656. DOI: 10.1093/jnci/92.20.1651.
- Mao Q., Unadkat J. D. Role of the breast cancer resistance protein (BCRP/ABCG2) in drug transport—an update. *The AAPS Journal.* 2015;17(1):65–82. DOI: 10.1208/s12248-014-9668-6.
- Bircsak K. M., Gibson C. J., Robey R. W., Aleksunes L. M. Assessment of drug transporter function using fluorescent cell imaging. *Current Protocols in Toxicology.* 2013;57(1). DOI: 10.1002/0471140856.tx2306s57.
- Zhang Y., Gupta A., Wang H., Zhou L., Vethanayagam R. R., Unadkat J. D., Mao Q. BCRP transports dipyrindamole and is inhibited by calcium channel blockers. *Pharmaceutical Research.* 2005;22(12):2023–2034. DOI: 10.1007/s11095-005-8384-4.
- Yasuda K., Ganguly S., Schuetz E. G., Pheophorbide A. Fluorescent Bcrp Substrate to Measure Oral Drug-Drug Interactions in Real-Time In Vivo. *Drug Metabolism and Disposition.* 2018;46(11):1725–1733. DOI: 10.1124/dmd.118.083584.
- Mukkavilli R., Jadhav G., Vangala S. Evaluation of Drug Transport in MDCKII-Wild Type, MDCKII-MDR1, MDCKII-BCRP and Caco-2 Cell Lines. *Current Pharmaceutical Biotechnology.* 2017;18(14):1151–1158. DOI: 10.2174/1389201019666180308091855.
- Sesink A. L., Arts I. C., de Boer V. C., Breedveld P., Schellens J. H., Hollman P. C., Russel F. G. Breast cancer resistance protein (Bcrp1/Abcg2) limits net intestinal uptake of quercetin in rats by facilitating apical efflux of glucuronides. *Molecular Pharmacology.* 2005;67(6):1999–2006. DOI: 10.1124/mol.104.009753.

11. Якушева Е. Н., Шулькин А. В., Черных И. В., Попова Н. М., Котлярова А. А., Слепнев А. А. Метод анализа принадлежности лекарственных веществ к субстратам и ингибиторам белка-транспортера гликопротеина-P in vitro. *Обзоры по клинической фармакологии и лекарственной терапии*. 2019;17(1):71–78. DOI: 10.17816/RCF17171-78.
12. Hilgers A. R., Conradi R. A., Burton P. S. Caco-2 cell monolayers as a model for drug transport across the intestinal mucosa. *Pharmaceutical Research*. 1990;7(9):902–910. DOI: 10.1023/a:1015937605100.
13. Elsby R., Surry D. D., Smith V. N., Gray A. J. Validation and application of Caco-2 assays for the in vitro evaluation of development candidate drugs as substrates or inhibitors of P-glycoprotein to support regulatory submissions. *Xenobiotica*. 2008;38(7–8):1140–1164. DOI: 10.1080/00498250802050880.
14. Шулькин А. В., Абаленихина Ю. В., Черных И. В., Ерохина П. Д., Якушева Е. Н. Роль P-гликопротеина в ограничении проницаемости клеточных мембран при окислительном стрессе. *Биохимия*. 2021;86(2):236–247. DOI: 10.31857/S0320972521020081.
15. Maksimovic V., Pavlovic-Popovic Z., Vukmirovic S., Cvejic J., Mooranian A., Al-Salami H., Mikov M., Golocorbin-Kon S. Molecular mechanism of action and pharmacokinetic properties of methotrexate. *Molecular Biology Reports*. 2020;47(6):4699–4708. DOI: 10.1007/s11033-020-05481-9.
16. Li H., Li J., Liu L., Zhang Y., Luo Y., Zhang X., Yang P., Zhang M., Yu W., Qu S. Elucidation of the Intestinal Absorption Mechanism of Celastrol Using the Caco-2 Cell Transwell Model. *Planta Medica*. 2016;82(13):1202–1207. DOI: 10.1055/s-0035-1568597.
11. Yakusheva E. N., Shchulkin A. V., Chernykh I. V., Popova N. M., Kotlyarova A. A., Slepnev A. A. Assessment of drugs belonging to inhibitors and inductors of P-glycoprotein in vitro. *Reviews on Clinical Pharmacology and Drug Therapy*. 2019;17(1):71–78. (In Russ.) DOI: 10.17816/RCF17171-78.
12. Hilgers A. R., Conradi R. A., Burton P. S. Caco-2 cell monolayers as a model for drug transport across the intestinal mucosa. *Pharmaceutical Research*. 1990;7(9):902–910. DOI: 10.1023/a:1015937605100.
13. Elsby R., Surry D. D., Smith V. N., Gray A. J. Validation and application of Caco-2 assays for the in vitro evaluation of development candidate drugs as substrates or inhibitors of P-glycoprotein to support regulatory submissions. *Xenobiotica*. 2008;38(7–8):1140–1164. DOI: 10.1080/00498250802050880.
14. Shchulkin A. V., Abalenikhina Yu. V., Chernykh I. V., Erokhina P. D., Yakusheva E. N. Role P-glycoprotein in limitation of permeability of cell membranes during oxidative stress. *Biochemistry*. 2021;86(2):236–247. (In Russ.) DOI: 10.31857/S0320972521020081.
15. Maksimovic V., Pavlovic-Popovic Z., Vukmirovic S., Cvejic J., Mooranian A., Al-Salami H., Mikov M., Golocorbin-Kon S. Molecular mechanism of action and pharmacokinetic properties of methotrexate. *Molecular Biology Reports*. 2020;47(6):4699–4708. DOI: 10.1007/s11033-020-05481-9.
16. Li H., Li J., Liu L., Zhang Y., Luo Y., Zhang X., Yang P., Zhang M., Yu W., Qu S. Elucidation of the Intestinal Absorption Mechanism of Celastrol Using the Caco-2 Cell Transwell Model. *Planta Medica*. 2016;82(13):1202–1207. DOI: 10.1055/s-0035-1568597.

REFERENCES

1. Sarkadi B., Homolya L., Hegedus T. The ABCG2/BCRP transporter and its variants – from structure to pathology. *FEBS Lett*. 2020;594(23):4012–4034. DOI: 10.1002/1873-3468.13947.
2. Doyle L. A., Yang W., Abruzzo L. V., Krogmann T., Gao Y., Rishi A. K., Ross D. D. A multidrug resistance transporter from human MCF-7 breast cancer cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 1998;95(26):15665–15670. DOI: 10.1073/pnas.95.26.15665.
3. Maliepaard M., Scheffer G. L., Faneyte I. F., van Gastelen M. A., Pijnenborg A. C., Schinkel A. H., van De Vijver M. J., Scheper R. J., Schellens J. H. Subcellular localization and distribution of the breast cancer resistance protein transporter in normal human tissues. *Cancer Research*. 2001;61(8):3458–3464.
4. Jonker J. W., Smit J. W., Brinkhuis R. F., Maliepaard M., Beijnen J. H., Schellens J. H., Schinkel A. H. Role of breast cancer resistance protein in the bioavailability and fetal penetration of topotecan. *Journal of the National Cancer Institute*. 2000;92(20):1651–1656. DOI: 10.1093/jnci/92.20.1651.
5. Mao Q., Unadkat J. D. Role of the breast cancer resistance protein (BCRP/ABCG2) in drug transport—an update. *The AAPS Journal*. 2015;17(1):65–82. DOI: 10.1208/s12248-014-9668-6.
6. Bircsak K. M., Gibson C. J., Robey R. W., Aleksunes L. M. Assessment of drug transporter function using fluorescent cell imaging. *Current Protocols in Toxicology*. 2013;57(1). DOI: 10.1002/0471140856.tx2306s57.
7. Zhang Y., Gupta A., Wang H., Zhou L., Vethanayagam R. R., Unadkat J. D., Mao Q. BCRP transports dipyridamole and is inhibited by calcium channel blockers. *Pharmaceutical Research*. 2005;22(12):2023–2034. DOI: 10.1007/s11095-005-8384-4.
8. Yasuda K., Ganguly S., Schuetz E. G., Pheophorbide A. Fluorescent Bcrp Substrate to Measure Oral Drug-Drug Interactions in Real-Time In Vivo. *Drug Metabolism and Disposition*. 2018;46(11):1725–1733. DOI: 10.1124/dmd.118.083584.
9. Mukkavilli R., Jadhav G., Vangala S. Evaluation of Drug Transport in MDCKII-Wild Type, MDCKII-MDR1, MDCKII-BCRP and Caco-2 Cell Lines. *Current Pharmaceutical Biotechnology*. 2017;18(14):1151–1158. DOI: 10.2174/1389201019666180308091855.
10. Sesink A. L., Arts I. C., de Boer V. C., Breedveld P., Schellens J. H., Hollman P. C., Russel F. G. Breast cancer resistance protein (Bcrp1/Abcg2) limits net intestinal uptake of quercetin in rats by facilitating apical efflux of glucuronides. *Molecular Pharmacology*. 2005;67(6):1999–2006. DOI: 10.1124/mol.104.009753.