



Оценка влияния этилметилгидроксипиридина сукцината на активность белка-транспортёра BCRP *in vitro*

Поветко М. И., Мыльников П. Ю., Шулькин А. В., Якушева Е. Н.

ФГБОУ ВО «Рязанский государственный медицинский университет им. акад. И.П. Павлова»
Минздрава России, Рязань, Российская Федерация

Аннотация

Актуальность. Белок резистентности рака молочной железы (BCRP) является одним из основных клинически значимых белков-транспортёров, играющих важную роль в фармакокинетике лекарственных препаратов. Для прогнозирования развития межлекарственных взаимодействий на уровне данного транспортёра рекомендовано тестировать лекарственные препараты на принадлежность к субстратам и модуляторам активности BCRP.

Цель исследования. Сравнительная оценка влияния этилметилгидроксипиридина сукцината (ЭМГПС) на активность белка-транспортёра BCRP в условиях *in vitro* с использованием в качестве субстрата сульфасалазина.

Материалы и методы. Исследование выполнено *in vitro* на клетках линии Caco-2, которые культивировали в трансвелл-системе. В качестве субстрата BCRP использовали сульфасалазин. ЭМГПС применяли в диапазоне концентраций 0,1–500 мкМ. Как препарат сравнения использовали классический ингибитор BCRP — кверцетин. Концентрацию сульфасалазина в транспортной среде определяли методом ВЭЖХ-МС/МС.

Результаты. В ходе исследования было показано, что ЭМГПС ингибировал активность BCRP в диапазоне концентраций 50–500 мкМ. По ингибирующей активности тестируемый препарат уступал препарату сравнения кверцетину — IC_{50} кверцетина составила 0,2 мкМ, IC_{50} ЭМГПС — 37,5 мкМ. Для изучения клинической значимости ингибирующей способности ЭМГПС 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). Было показано, что ЭМГПС может клинически значимо ингибировать BCRP в кишечнике.

Заключение. Таким образом, ЭМГПС является ингибитором BCRP в условиях *in vitro*. Для подтверждения значимости полученных результатов для развития межлекарственных взаимодействий необходимо проведение клинических исследований.

Ключевые слова: этилметилгидроксипиридина сукцинат; BCRP; Caco-2; сульфасалазин; кверцетин

Для цитирования:

Поветко М. И., Мыльников П. Ю., Шулькин А. В., Якушева Е. Н. Оценка влияния этилметилгидроксипиридина сукцината на активность белка-транспортёра BCRP *in vitro*. *Фармакокинетика и фармакодинамика*. 2025;(3):57–64. <https://doi.org/10.37489/2587-7836-2025-3-57-64>. EDN: PQRGYO

Поступила: 18.08.2025. **В доработанном виде:** 18.09.2025. **Принята к печати:** 27.09.2025. **Опубликована:** 30.09.2025.

Evaluation of the effect of ethylmethylhydroxypyridine succinate on the activity of the BCRP transporter protein *in vitro*

Mariya I. Povetko, Pavel Yu. Mylnikov, Aleksey V. Shchulkin, Elena N. Yakusheva
Ryazan State Medical University, Ryazan, Russian Federation

Abstract

Relevance. Breast cancer resistance protein (BCRP) is one of the main clinically significant transporter proteins that play an important role in the pharmacokinetics of drugs. To predict the development of drug interactions at the level of this transporter, it is recommended to test drugs for belonging to substrates and BCRP inhibitors.

Objective. Comparative assessment of the effect of ethylmethylhydroxypyridine succinate (EMHPS) on the activity of the BCRP transporter protein under *in vitro* conditions using sulfasalazine as a substrate.

Materials and methods. The study was performed *in vitro* on Caco-2 cells that were cultured in a transwell-system. Sulfasalazine was used as a BCRP substrate. EMHPS was used in the concentration range of 0.1 — 500 μ M. A classic BCRP inhibitor, quercetin, was used as a comparison drug. The concentration of sulfasalazine in the transport medium was determined by HPLC-MS/MS.

Results. During the study, it was shown that EMHPS inhibited BCRP activity in the concentration range of 50–500 μ M. In terms of inhibitory activity, the tested drug was inferior to the comparison drug quercetin — the IC_{50} of quercetin was 0.2 μ M, the IC_{50} of EMHPS was 37.5 μ M. To study the clinical significance of the inhibitory ability of EMHPS, the ratio C_{max} of EMHPS / IC_{50} (predicts systemic inhibition of BCRP in the liver, kidneys, and histohematic barriers) and the ratio dose of EMHPS / 250 ml / IC_{50} (predicts inhibition of BCRP in the intestine) were calculated. It has been shown that EMHPS can clinically significantly inhibit BCRP in the intestine.

Conclusion. Thus, EMHPS is an inhibitor of BCRP *in vitro*. To confirm the significance of the obtained results for the development of drug-drug interactions, it is necessary to conduct clinical studies.

Keywords: ethylmethylhydroxypyridine succinate; BCRP; Caco-2; sulfasalazine; quercetin

For citations:

Povetko MI, Mylnikov PYu, Shchulkin AV, Yakusheva EN. Evaluation of the effect of ethylmethylhydroxypyridine succinate on the activity of the BCRP transporter protein *in vitro*. *Pharmacokinetics and pharmacodynamics*. 2025;(3):57–64. (In Russ). <https://doi.org/10.37489/2587-7836-2025-3-57-64>. EDN: PQRGYO

Received: 18.08.2025. **Revision received:** 18.09.2025. **Accepted:** 27.09.2025. **Published:** 30.09.2025.

Введение / Introduction

Значительную роль в эффективности фармакотерапии играют транспортные системы организма, способные регулировать уровень эндо- и экзогенных веществ в различных тканях и органах. Среди них, благодаря широкой субстратной специфичности, выделяются переносчики суперсемейства АТФ-связывающих кассетных (АТР-binding cassette) транспортёров (АВС-транспортёров), к которым относят, например, гликопротеин Р (Pgp, ABCB1), BCRP, белок множественной лекарственной устойчивости (MRP) и т. д. [1].

BCRP (human breast cancer resistance protein — белок резистентности рака молочной железы) (ABCG2, MXR; ABCP) — АТФ-зависимый эффлюксный белок-транспортёр, физиологически экспрессирующийся в эндотелиальных клетках различных гистогематических барьеров (ГЭБ, плацентарный и т. д.), эпителиальных клетках кишечника и почечных канальцев, в молочных железах, желчных канальцах и в различных прогениторных и стволовых клетках [2]. В перечисленных тканях данный транспортёр участвует в ключевых фармакокинетических процессах — абсорбции, распределении и выведении эндо- и ксенобиотиков, являющихся его субстратами, а в опухолевых клетках способствует формированию их резистентности к химиотерапии [3, 4].

В настоящее время BCRP признан одним из важнейших белков-транспортёров, способных существенно влиять на биодоступность, а соответственно, и активность широкого спектра лекарственных препаратов [4, 5].

Именно поэтому, FDA и другие международные агентства рекомендует тестировать лекарственные препараты в опытах *in vitro* и *in vivo* на принадлежность к субстратам и модуляторам активности белков-транспортёров, в том числе и BCRP, что может повысить безопасность и эффективность используемой терапии, а также предсказуемость межлекарственных взаимодействий [6, 7].

В Российской Федерации подобные исследования малочисленны и стали проводиться лишь в последнее время [8].

Этилметилгидроксипиридина сукцинат (ЭМГПС, «Мексидол», ООО НПК «Фармасофт», Россия) — оригинальный российский препарат, широко применяющийся в неврологии для лечения сосудистых и дегенеративных заболеваний головного мозга [9].

Ранее нами было показано, что ЭМГПС не является субстратом BCRP [10], однако была обнаружена возможная ингибирующая активность данного препарата [11].

В рамках настоящего исследования оценивалась ширина ингибирующего действия ЭМГПС и сравнение его влияния на BCRP с классическим ингибитором транспортёра — кверцетином.

Цель исследования / Objective сравнительная оценка влияния ЭМГПС на активность белка-транспортёра BCRP в условиях *in vitro* с использованием в качестве субстрата сульфасалазина.

Материалы и методы / Materials and methods

Клеточная линия. Исследование осуществляли *in vitro* на клеточной линии Сасо-2 — иммортализованные клетки колоректальной аденокарциномы человека, которые являются классической моделью для изучения абсорбции лекарственных веществ, а также оценки их принадлежности к субстратам и ингибиторам белков-транспортёров Pgp и BCRP. Клеточная линия была закуплена в ФГБУН «Институт цитологии» РАН (Санкт-Петербург) и получена из ATCC (American Type Culture Collection, США). Эксперименты выполнялись в лаборатории клеточных технологий (подразделение ЦНИЛ ФГБОУ ВО РязГМУ Минздрава России).

Условия культивирования. Клеточная линия культивировалась в условиях CO₂-инкубатора с использованием питательной Дульбекко модифицированной среды Игла (DMEM), с содержанием глюкозы (4500 мг/л), L-глутамин (4 мМ) (ООО «ПанЭко», Россия), 15 % эмбриональной бычьей сыворотки («Sigma-Aldrich», Германия), 100 ЕД/мл и 100 мкг/мл пенициллина и стрептомицина (ООО «ПанЭко», Россия) соответственно. Режим культивирования: 5 % уровень CO₂, 37 °С.

Транспортные эксперименты. При достижении конfluence 90 % на фласке клетки высаживали на полупроницаемую мембрану внутренней (апикальной, рис. 1, а) камеры трансвелл-системы (рис. 1, б) (12 mm Transwell® with 0,4 µm Pore Polycarbonate Membrane Insert, Sterile, Corning Incorporated, США), окружённой внешней (базолатеральной/базальной) камерой. Подобная система имитирует просвет кишечника (апикальная камера) и кровь/мезентериальную лимфу желудочно-кишечного тракта (базолатеральная камера), что позволяет использовать её как модель для изучения переноса соединений [12].

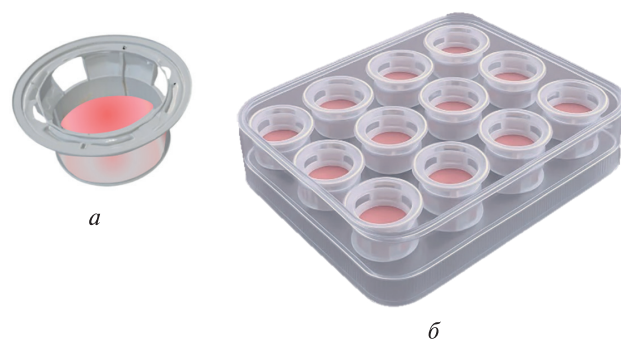


Рис. 1. Внешний вид апикальной камеры (а) и планшета для культивирования клеток (трансвелл-система) (б), наполненных питательной средой

Fig. 1. The appearance of the apical chamber (a) and the cell culture plate (transwell system) (b) filled with nutrient medium

Источник: рисунки выполнены авторами (Поветко М.И. и соавт., 2025) с помощью искусственного интеллекта Freepik AI (Freepik Company S.L., Испания).

Source: the drawings were made by the authors (Povetko MI et al., 2025) using artificial intelligence Freepik AI (Freepik Company S.L., Spain).

Клетки культивировали в течение 21 суток до образования монослоя и спонтанной дифференцировки в энтероцитоподобные клетки кишечника человека. Условия культивирования были те же.

Образование монослоя в трансвелл-системе оценивали при помощи измерения трансэпителиального сопротивления (TEER) с помощью вольтметра Millicell® ERS-2 (Millipore, США). Транспортные эксперименты выполняли при значении TEER выше 500 мОм·см².

Для проведения транспортных экспериментов питательную среду в камерах заменяли на транспортную среду с температурой 37 °С, состоящую из раствора Хэнкса (ООО «ПанЭко», Россия) с добавлением 25 % раствора HEPES (Gibco, Англия) и 1 % раствора ДМСО (ООО «ПанЭко», Россия) [13].

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

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

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 расчёт эффлюксного коэффициента (ER) — отношения $P_{app} b-a / P_{app} a-b$, характеризующего участие белков-транспортеров, в частности BCRP, в переносе соединений.

$$ER = \frac{P_{app} b-a}{P_{app} a-b}.$$

Отношение коэффициентов (эффлюксный коэффициент), превышающее «2», свидетельствует об активном переносе соединения с участием белка-транспортера, а значение от 0,5 до 2 показывает отсутствие подобного транспорта [14].

Влияние ЭМГПС 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. В первом добавление сульфасалазина производили в апикальную камеру (*a*–*b* транспорт), которая служила камерой-донором. Забор проб в объёме 100 мкл осуществляли на 1-, 2-, 3-й час эксперимента из камеры-реципиента — противоположная (базальная) камера, заполненная транспортной средой без добавления субстрата.

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) (рис. 2).

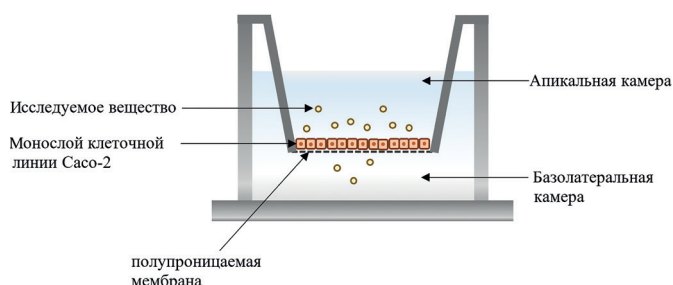


Рис. 2. Схема *a*–*b* транспорта исследуемого вещества, внесённого в апикальную камеру, через полупроницаемую мембрану

Fig. 2. Scheme *a*–*b* of transport of the test substance introduced into the apical chamber through a semipermeable membrane

Источник: Поветко М.И. и соавт., 2025.

Source: Povetko MI et al., 2025.

Полученные пробы помещали в микроцентрифужные пробирки типа «Эпандорф», замораживали в морозильной камере при –80 °С и хранили до проведения хроматографического анализа.

После проведения эксперимента трансвелл-системы очищались от исследуемых растворов путём их полного удаления из лунок с дальнейшим многократным смывом остатков веществ раствором Хэнкса. После удаления веществ и раствора Хэнкса в камеры добавлялась питательная среда для поддержания обычных условий культивирования клеток и их повторного использования. Утилизация использованного клеточного материала осуществлялась в соответствии с СОП, предусмотренных в лаборатории клеточных технологий.

Хроматографический анализ. Анализ полученных образцов проводили методом ВЭЖХ-МС/МС при помощи ВЭЖХ «Ultimate 3000» («ThermoFisher», США), оснащённого автосемплером, и масс-спектрометра TSQ Fortis («ThermoFisher», США) с применением валидированной методики количественного определения сульфасалазина [15].

Реактивы, использовавшиеся для хроматографического анализа: вода ВЭЖХ-МС («Panreac», Испания), кислота муравьиная 98 % для аналитики («Panreac», Испания), метанол для HPLC («Merck», Германия).

Пробоподготовка заключалась в добавлении к 100 мкл пробы смеси метанола с валсартаном (внутренний стандарт) в концентрации 100 нг/мл в количестве 300 мкл для извлечения сульфасалазина. Далее пробы перемешивали 5 мин на встряхивателе (Vortex (Heidolph, Германия)), разделение фаз проводили в течение 10 мин при 21000 g и 4 °C на центрифуге Avanti® JXN-30 (Beckman Coulter Inc., США). Супернатант переносили в вials и помещали в автосемплер.

Условия хроматографического анализа были следующими: колонка Luna Omega 3μm Polar C18 50×2.1, 3 μm, предколонка аналогичного типа — C18 3 мкм. Температура разделения — 35 °C, скорость потока — 0,3 мл/мин. Применяли градиентный режим элюирования, соотношение 0,1 % раствора муравьиной кислоты и метанола было следующим: 0,0 мин — 60 % / 40 %; 0,3 мин — 15 % / 85 %; 4 мин — 1 % / 99 %; 6 мин — 60 % / 40 %; 8 мин — 60 % / 40 %.

Ионизацию молекул проводили в режиме негативной ионизации. Метод детектирования — тандемная 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 °C, температура испарителя — 350 °C. В качестве фрагментирующего газа использовали аргон с потоком 2 mTorr (мTorr), фрагментация в источнике составила 10 В. Объем инъекции — 10 мкл, время анализа — 8 минут.

Валидацию методики проводили по параметрам: селективность, предел количественного определения,

линейность, правильность, прецизионность, эффект переноса, стабильность, матричный эффект и эффект извлечения.

Статистический анализ / Statistical analysis

Статистическую обработку полученных результатов выполняли с помощью программ офисного пакета «Microsoft Office XP» и программы GraphPad Prism 10.0 (GraphPad Software, Inc., США). Для определения статистически значимых различий в группах использовали дисперсионный анализ (ANOVA), сравнение групп с контролем выполняли методом Даннета. Результаты представлены в виде среднего арифметического ± стандартное отклонение (M±SD). Статистически значимыми считали различия при $p < 0,05$.

Значения концентрации полумаксимального ингибирования (IC₅₀) рассчитывали с помощью нелинейной регрессии на основе трёхпараметрической логистической функции.

Результаты / Results

Коэффициент кажущейся проницаемости сульфасалазина $P_{app} b-a$ в контроле (без добавления тестируемых веществ) составил $11,8 \times 10^{-6} \pm 3,3 \times 10^{-6}$ см/сек, $P_{app} a-b = 0,346 \times 10^{-6} \pm 0,181 \times 10^{-6}$ 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 сульфасалазина, который реализуется за счёт изучаемого белка-транспортёра BCRP.

Полученные результаты оценки влияния ЭМГПС на активность BCRP представлены в таблице 1.

ЭМГПС во всех протестированных концентрациях не влиял на коэффициент кажущейся проницаемости

Таблица 1

Влияние ЭМГПС в различных концентрациях на транспорт сульфасалазина через монослой клеточной линии Caco-2 (M±SD, см/сек)

Table 1

Effect of EMHPS in various concentrations on the transport of sulfasalazine through the monolayer of the Caco-2 cell line (M±SD, cm/sec)

Сульфасалазин (контроль)			
Концентрация сульфасалазина	$P_{app} b-a$	$P_{app} a-b$	$P_{app} b-a / P_{app} a-b$
10 мкМ	$11,8 \times 10^{-6} \pm 3,3 \times 10^{-6}$	$0,346 \times 10^{-6} \pm 0,181 \times 10^{-6}$	$37,36 \pm 10,13$
Сульфасалазин 10 мкМ + ЭМГПС в различных концентрациях			
Концентрация ЭМГПС	$P_{app} b-a$	$P_{app} a-b$	$P_{app} b-a / P_{app} a-b$
0,1 мкМ	$15,7 \times 10^{-6} \pm 0,19 \times 10^{-6}$	$0,487 \times 10^{-6} \pm 0,210 \times 10^{-6}$	$37,04 \pm 17,07$
1 мкМ	$12,3 \times 10^{-6} \pm 0,42 \times 10^{-6}$	$0,440 \times 10^{-6} \pm 0,093 \times 10^{-6}$	$28,77 \pm 6,21$
10 мкМ	$7,70 \times 10^{-6} \pm 0,71 \times 10^{-6}$	$0,331 \times 10^{-6} \pm 0,245 \times 10^{-6}$	$31,54 \pm 17,61$
50 мкМ	$7,29 \times 10^{-6} \pm 8,07 \times 10^{-6}$	$0,454 \times 10^{-6} \pm 0,288 \times 10^{-6}$	$13,21 \pm 7,04^*$
100 мкМ	$5,36 \times 10^{-6} \pm 0,71 \times 10^{-6}$	$1,73 \times 10^{-6} \pm 1,89 \times 10^{-6}$	$7,06 \pm 5,99^*$
250 мкМ	$3,57 \times 10^{-6} \pm 0,19 \times 10^{-6}$	$2,10 \times 10^{-6} \pm 1,64 \times 10^{-6}$	$2,94 \pm 2,70^{**}$
500 мкМ	$5,65 \times 10^{-6} \pm 6,82 \times 10^{-6}$	$3,42 \times 10^{-6} \pm 1,36 \times 10^{-6}$	$2,27 \pm 2,90^{**}$

Примечания: * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$ — достоверные различия с показателями контроля.
Notes: * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$ — significant differences with the control indicators.

сульфасалазина $P_{app} b-a$ и повышал коэффициент кажущейся проницаемости $P_{app} a-b$ только в концентрации 500 мкМ в 9,88 раза ($p < 0,05$).

При этом ЭМГПС снижал отношение $P_{app} b-a/P_{app} a-b$ в концентрации 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 % ($p < 0,01$).

IC_{50} для ЭМГПС составила 37,5 мкМ (рис. 3). Полученные результаты свидетельствуют о том, что ЭМГПС ингибирует активность BCRP.

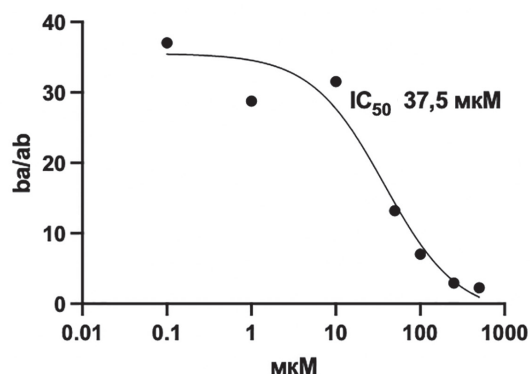


Рис. 3. Концентрация полумаксимального ингибирования этилметилгидроксипиридина сукцината
Fig. 3. The semi-maximal inhibitory concentration of ethylmethylhydroxypyridine succinate

При оценке влияния кверцетина на активность BCRP были получены следующие результаты (табл. 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.

В концентрации 500 мкМ вызывал повышение коэффициента кажущейся проницаемости сульфасалазина $P_{app} a-b$ на 400,0 % ($p < 0,05$).

Во всех применяемых концентрациях 0,1–500 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 % ($p < 0,0001$). Полученные результаты подтверждают ингибирующую активность кверцетина в отношении BCRP.

IC_{50} для кверцетина составила 0,2 мкМ (рис. 4).

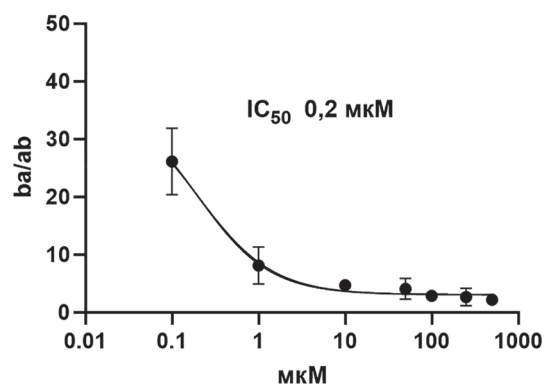


Рис. 4. Концентрация полумаксимального ингибирования кверцетина
Fig. 4. The semi-maximal inhibitory concentration of quercetin

Таблица 2

Влияние кверцетина в различных концентрациях на транспорт сульфасалазина через монослой клеточной линии Caco-2 ($M \pm SD$, см/сек)

Table 2

Effect of quercetin in various concentrations on the transport of sulfasalazine through the monolayer of the Caco-2 cell line ($M \pm SD$, cm/sec)

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

Примечания: * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, **** $p < 0,0001$ — достоверные различия с показателями контроля.

Notes: * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$ — significant differences with the control indicators.

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 (2010).

Рассчитывалось отношение C_{\max} ЭМГПС/ IC_{50} (прогнозирует системное ингибирование BCRP в печени, почках, гистогематических барьерах) и отношение доза ЭМГПС / 250 мг / 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 проведённым ранее исследованиям C_{\max} для ЭМГПС составляет 0,39 мкМ [16]. Расчёт 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 мг / IC_{50} составляет 1 мг / мг / 37,5 мкМ = 3922 мкМ / 37,5 мкМ = 104,6. Полученное значение больше 10, что свидетельствует о том, что ингибирование BCRP под действием ЭМГПС в желудочно-кишечном тракте является клинически значимым.

Обсуждение / Discussion

ЭМГПС — оригинальный российский препарат с доказанной эффективностью в лечении заболеваний, сопровождающихся ишемическими нарушениями и развитием окислительного стресса [17]. Его использование в комплексной терапии широкого спектра заболеваний обуславливает вероятность его участия в развитии межлекарственных взаимодействий [18]. С целью прогнозирования их развития и повышения эффективности и безопасности фармакотерапии ЭМГПС целесообразно изучение принадлежности 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 данных белков, а как ингибитор проявляет клиническую значимость только для гликопротеина Р в желудочно-кишечном тракте [8, 13, 19].

В отношении BCRP было доказано, что ЭМГПС не является субстратом данного транспортёра [10, 11].

В ходе выполнения настоящего исследования было установлено, что ЭМГПС в широком диапазоне концентрации (50–500 мкМ) проявляет ингибирующую активность в отношении BCRP, IC_{50} препарата составляет 37,5 мкМ.

Полученные результаты подтверждают и дополняют имеющиеся сведения об ингибирующей способности соединений дигидропиридинового ряда, к которым относится и ЭМГПС. Показана схожесть субстратов и ингибиторов эффлюксных белков-транспортёров гликопротеина Р и BCRP, несмотря на их структурные различия [20].

Предполагаемый механизм ингибирования для азотсодержащих гетероциклов в отношении BCRP не был изучен, вероятно для них характерно аллостерическое, либо конкурентное ингибирование [21]. Так как ЭМГПС не является субстратом белка, в данном случае более вероятен аллостерический механизм ингибирования.

При оценке клинической значимости ингибирующего действия ЭМГПС было установлено, что ЭМГПС может подавлять активность BCRP в желудочно-кишечном тракте. Соответственно, ЭМГПС может изменять концентрацию и активность субстратов белка-транспортёра (например, сульфасалазина, метотрексата, митоксантрона, топотекана и др. [5, 22]) при совместном применении.

В сравнении с классическим ингибитором белка-транспортёра BCRP кверцетином активность ЭМГПС значительно ниже (IC_{50} кверцетина 0,2 мкМ против 37,5 мкМ для ЭМГПС). Однако ингибирующая способность исследуемого соединения показала клиническую значимость факта подавления активности BCRP в желудочно-кишечном тракте, что свидетельствует о необходимости выполнения клинических исследований его влияния при пероральном приёме и совместном применении с субстратами транспортёра.

Заключение / Conclusion

Результаты исследования *in vitro* свидетельствуют о принадлежности этилметилгидроксипиридина сукцината к ингибиторам белка-транспортёра BCRP. Несмотря на то, что ингибирующая способность ЭМГПС (IC_{50} = 37,5 мкМ) меньше, чем у препарата сравнения, классического ингибитора — кверцетина (IC_{50} = 0,2 мкМ), установлена клиническая значимость ингибирования транспортёра на уровне желудочно-кишечного тракта под действием изучаемого препарата, которая однако требует подтверждения в клинических исследованиях.

Благодарности / Acknowledgments

Авторы выражают признательность центральной научно-исследовательской лаборатории (ЦНИЛ) и кафедре фармакологии ФГБОУ ВО РязГМУ Минздрава России за предоставление лабораторного оборудования и площадки для проведения исследования.

ДОПОЛНИТЕЛЬНАЯ ИНФОРМАЦИЯ

Конфликт интересов

Авторы декларируют отсутствие явных и потенциальных конфликтов интересов, о которых необходимо сообщить в связи с публикацией данной статьи.

Участие авторов

Поветко М. И. — культивирование клеток линии Сасо-2, проведение транспортных экспериментов, пробоподготовка образцов, написание статьи; *Мыльников П. Ю.* — разработка и валидация методики количественного определения, работа с хроматографом; *Щулькин А. В.* — анализ полученных результатов, редактирование статьи; *Якушева Е. Н.* — общее руководство работой, редактирование статьи; все авторы принимали участие в обсуждении полученных результатов.

Финансирование

Бюджет ФГБОУ ВО Рязанский государственный медицинский университет им. акад. И.П. Павлова Минздрава России.

ADDITIONAL INFORMATION

Conflict of interests

The authors declare the absence of obvious and potential conflicts of interest, which must be reported in connection with the publication of this article.

Authors' participation

Povetko MI — cultivation of Caco-2 cells, conducting transport experiments, sample preparation, writing an article; *Mylnikov PYu* — development and validation of a quantitative determination technique, working with a chromatograph; *Shchulkin AV* — analysis of the results obtained, editing the article; *Yakusheva EN* — general guidance, editing the article; all the authors participated in the discussion of the results obtained.

Funding

Budget of the Ryazan State Medical University named after Academician I.P. Pavlov of the Ministry of Health of Russia.

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ / ABOUT THE AUTHORS

Поветко Мария Ивановна — ассистент кафедры фармацевтической технологии, очный аспирант кафедры фармакологии ФГБОУ ВО РязГМУ Минздрава России, Рязань, Российская Федерация
Автор ответственный за переписку
e-mail: masha-povetko@mail.ru
ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0003-1273-520X>
РИНЦ SPIN-код: 2307-4064

Мыльников Павел Юрьевич — к. б. н., доцент кафедры фармакологии ФГБОУ ВО РязГМУ Минздрава России, Рязань, Российская Федерация
e-mail: dukeviperlr@gmail.com
ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0001-7829-2494>
РИНЦ SPIN-код: 8503-3082

Щулькин Алексей Владимирович — д. м. н., доцент, профессор кафедры фармакологии ФГБОУ ВО РязГМУ Минздрава России, Рязань, Российская Федерация
e-mail: alekseyshulkin@rambler.ru
ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0003-1688-0017>
РИНЦ SPIN-код: 2754-1702

Якушева Елена Николаевна — д. м. н., профессор, заведующий кафедрой фармакологии ФГБОУ ВО РязГМУ Минздрава России, Рязань, Российская Федерация
e-mail: e.yakusheva@rzgmu.ru
ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0001-6887-4888>
РИНЦ SPIN-код: 2865-3080

Mariya I. Povetko — Assistant at the Department of Pharmaceutical Technology, full-time postgraduate Student at the Department of Pharmacology of the Ryazan State Medical University, Ryazan, Russian Federation
Corresponding autor
e-mail: masha-povetko@mail.ru
ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0003-1273-520X>
RSCI SPIN code: 2307-4064

Pavel Yu. Mylnikov — PhD, Cand. Sci. (Biol.), Associate Professor of the Department of Pharmacology Ryazan State Medical University, Ryazan, Russian Federation
e-mail: dukeviperlr@gmail.com
ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0001-7829-2494>
RSCI SPIN code: 8503-3082

Aleksey V. Shchulkin — PhD, Dr. Sci. (Med.), Associate Professor, Professor of the Department of Pharmacology, Ryazan State Medical University, Ryazan, Russian Federation
e-mail: alekseyshulkin@rambler.ru
ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0003-1688-0017>
RSCI SPIN code: 2754-1702

Elena N. Yakusheva — PhD, Dr. Sci. (Med.), Professor, Head of the Department of Pharmacology, Ryazan State Medical University, Ryazan, Russian Federation
e-mail: e.yakusheva@rzgmu.ru
ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0001-6887-4888>
RSCI SPIN code: 2865-3080

Список литературы / References

1. Mohammad IS, He W, Yin L. Understanding of human ATP binding cassette superfamily and novel multidrug resistance modulators to overcome MDR. *Biomed Pharmacother*. 2018 Apr;100:335-348. doi: 10.1016/j.biopha.2018.02.038.
2. Sarkadi B, Homolya L, Hegedűs T. The ABCG2/BCRP transporter and its variants — from structure to pathology. *FEBS Lett*. 2020 Dec;594(23):4012-4034. doi: 10.1002/1873-3468.13947.
3. Kawabata S, Oka M, Shiozawa K, et al. Breast cancer resistance protein directly confers SN-38 resistance of lung cancer cells. *Biochem Biophys Res Commun*. 2001;280(5):1216-1223. doi: 10.1006/bbrc.2001.4267.
4. Попова Н.М., Шулькин А.В., Транова Ю.С., и др. Белок резистентности рака молочной железы: структура, локализация, функции, значение для рациональной фармакотерапии. *Российский медико-биологический вестник имени академика И. П. Павлова*. 2024;32(2):305-314. [Popova NM, Shchul'kin AV, Tranova YuS, et al. Breast Cancer Resistance Protein: Structure, Localization, Functions, Significance for Rational Pharmacotherapy. *I. P. Pavlov Russian Medical Biological Herald*. 2024;32(2):305-314. (In Russ.)]. doi: 10.17816/PAVLOV384999.
5. Mao Q, Unadkat JD. Role of the breast cancer resistance protein (BCRP/ABCG2) in drug transport—an update. *AAPS J*. 2015 Jan;17(1):65-82. doi: 10.1208/s12248-014-9668-6.
6. Guideline on the Investigation of Drug Interactions. European Medicines Agency Guideline on the Investigation of Drug Interactions European Medicines Agency Guideline Committee for Human Medicinal Products (CHMP), (2012). Доступно по: <https://www.xenotech.com/wp-content/uploads/2020/07/2012-EMA-DDI-Guidance.pdf>. Ссылка активна на 18.09.2025
7. US Food and Drug Administration (FDA). *In vitro* drug interaction studies — cytochrome P450 enzyme- and transporter-mediated drug interactions. Guidance for industry. Draft Guidance Center for Drug Evaluation and Research (CDER) Jan, (2020).
8. Якушева Е. Н., Шулькин А. В., Черных И. В. Оценка принадлежности мексидола к субстратам, ингибиторам или индукторам гликопротеина-Р. *Экспериментальная и клиническая фармакология*. 2015;78(5):19-23. [Yakusheva EN, Shchul'kin AV, Chernykh IV. Assessment of the attribution of mexidol to P-glycoprotein substrates, inhibitors, or inducers. *Ekspperimental'naya i klinicheskaya farmakologiya*. 2015;78(5):19-23. (In Russ.)]. doi: 10.30906/0869-2092-2015-78-5-19-23.
9. Стаховская Л.В., Шамалов Н.А., Хасанова Д.Р., и др. Результаты рандомизированного двойного слепого мультицентрового плацебо-контролируемого в параллельных группах исследования эффективности и безопасности мексидола при длительной последовательной терапии у пациентов в остром и раннем восстановительном периодах полшарного ишемического инсульта (ЭПИКА). *Журнал неврологии и психиатрии им. С.С. Корсакова. Спецвыпуски*. 2017;117(3-2):55-65. [Stakhovskaya LV, Shamalov NA, Khasanova DR, et al. Results of a randomized double blind multicenter placebo-controlled, in parallel groups trial of the efficacy and safety of prolonged sequential therapy with mexidol in the acute and early recovery stages of hemispheric ischemic stroke (EPICA). *S.S. Korsakov Journal of Neurology and Psychiatry*. 2017;117(3-2):55-65. (In Russ.)]. doi: 10.17116/jnevro20171173255-65.
10. Шулькин А.В., Транова Ю.С., Абаленихина Ю.В., и др. Клетки линии Сасо-2 как модель для изучения абсорбции лекарственных веществ. *Экспериментальная и клиническая гастроэнтерология*. 2022;10(206):63-69. [Shchul'kin AV, Tranova YuS, Abalenikhina YuV, et al. Cells of the Caco-2 line as a model for studying the absorption of medicinal substances. *Ekspperimental'naya i klinicheskaya gastroenterologiya*. 2022;10(206):63-69. (In Russ.)]. doi: 10.31146/1682-8658-ecg-206-10-63-69.
11. Транова Ю. Разработка методики тестирования лекарственных веществ на принадлежность к субстратам, ингибиторам и индукторам белка-транспортера BCRP *in vitro*: Дис. ... канд. биол. наук. Рязань; 2023. [Tranova Ju. Razrabotka metodiki testirovaniya lekarstvennyh veshhestv na prinaladlezhnost' k substratam, ingibitoram i induktoram belka-transportera BCRP *in vitro*. [dissertation] Rjazan'; 2023. (In Russ.)]. Доступно по: https://iemspb.ru/wp-content/uploads/2023/10/Tranova_textdiss.pdf. Ссылка активна на: 28.06.2025.
12. van Breemen RB, Li Y. Caco-2 cell permeability assays to measure drug absorption. *Expert Opin Drug Metab Toxicol*. 2005 Aug;1(2):175-85. doi: 10.1517/17425255.1.2.175.
13. Ерохина П.Д., Абаленихина Ю.В., Шулькин А.В., и др. Изучение влияния эстрадиола на активность гликопротеина-Р *in vitro*. *Наука молодых (Eruditio Juvenium)*. 2020;8(3):329-36. [Erokhina PD, Abalenikhina YuV, Shchulkin AV, et al. Study of influence of estradiol on the activity of P-glycoprotein *in vitro*. *Science of the young (Eruditio Juvenium)*. 2020;8(3):329-36. (In Russ.)]. doi: 10.23888/HMJ20208329-336.
14. Shchulkin AV, Erokhina PD, Goncharenko AV, et al. Ethylmethylhydroxypyridine Succinate Is an Inhibitor but Not a Substrate of ABCB1 and SLCO1B1. *Pharmaceuticals (Basel)*. 2023 Oct 27;16(11):1529. doi: 10.3390/ph16111529.
15. Поветко, М.И., Мыльников, П.Ю., Транова, Ю., и др. Разработка и валидация методики количественного определения сульфасалазина в плазме крови кроликов и среде культивирования клеток методом ВЭЖХ-МС/МС. *Химико-фармацевтический журнал*. 2025;59(3):45-49. [Povetko MI, Myl'nikov PYu, Tranova Yu, et al. Development and validation of a method for quantitative determination of sulfasalazine in rabbits blood plasma and cell culture medium by HPLC-MS/MS. *Khimiko-farmatsevticheskii Zhurnal*. 2025;59(3):45-49. (In Russ.)]. doi: 10.30906/0023-1134-2025-59-3-45-49. EDN: SXYUOL.
16. Шулькин А.В. Мексидол: современные аспекты фармакокинетики и фармакодинамики. *Фарматека*. 2016;s4-16:65-71. [Shchulkin AV. Mexidol: modern aspects of the pharmacokinetics and pharmacodynamics. *Farmateka*. 2016;s4-16:65-71. (In Russ.)].
17. Федин А.И., Захаров В.В., Танащян М.М., и др. 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. *Журнал неврологии и психиатрии им. С.С. Корсакова*. 2021;121(11):7-16. [Fedin AI, Zaharov VV, Tanashyan MM, et al. Results of an international multicenter, randomized, double-blind, placebo-controlled study assessing the efficacy and safety of sequential therapy with Mexidol and Mexidol FORTE 250 in patients with chronic brain ischemia (MEMO). *S.S. Korsakov Journal of Neurology and Psychiatry*. 2021;121(11):7-16. (In Russ.)]. doi: 10.17116/jnevro20211211117.
18. Воронина Т.А., Иванова Е.А. Комбинированное применение мексидола с известными лекарственными средствами. *Журнал неврологии и психиатрии им. С.С. Корсакова*. 2019;119(4):115-124. [Voronina TA, Ivanova EA. Combined administration of mexidol with known medicines. *S.S. Korsakov Journal of Neurology and Psychiatry*. 2019;119(4):115-124. (In Russ.)]. doi: 10.17116/jnevro2019119041115. EDN: ZSOSEH.
19. Ерохина П.Д., Абаленихина Ю.В., Мыльников П.Ю., и др. Влияние оригинальных отечественных нейротропных препаратов на полипептиды, транспортирующие органические анионы OATP1B1 и OATP1B3. *Бюллетень экспериментальной биологии и медицины*. 2023;176(8):198-203. [Erokhina PD, Abalenikhina YuV, Myl'nikov PYu, et al. The effect of original Russian neurotropic drugs on organic anion transporting polypeptides OATP1B1 and OATP1B3. *Bulletin of Experimental Biology and Medicine*. 2023;176(8):198-203. (In Russ.)]. doi: 10.47056/0365-9615-2023-176-8-198-203. EDN: CVOVNV.
20. Haimeur A, Conseil G, Deeley RG, Cole SP. (Section A: Molecular, Structural, and Cellular Biology of Drug Transporters). The MRP-related and BCRP/ABCG2 multidrug resistance proteins: biology, substrate specificity and regulation. *Curr Drug Metab*. 2004 Feb;5(1):21-53. doi: 10.2174/1389200043489199.
21. Zhang Y, Gupta A, Wang H, et al. BCRP transports dipyrindamole and is inhibited by calcium channel blockers. *Pharm Res*. 2005 Dec;22(12):2023-34. doi: 10.1007/s10955-005-8384-4.
22. Safar Z, Kis E, Erdo F, et al. ABCG2/BCRP: variants, transporter interaction profile of substrates and inhibitors. *Expert Opin Drug Metab Toxicol*. 2019 Apr;15(4):313-328. doi: 10.1080/17425255.2019.1591373.