



# Экспериментальное обоснование *in vivo* методики оценки субстратов и модуляторов активности белка-транспортера BCRP

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.** BCRP (human breast cancer resistance protein — белок резистентности рака молочной железы человека) (ABCG2, MXR; ABCP) — эффлюксный АТФ-зависимый белок-транспортер, играющий важную роль в фармакокинетике широкого спектра лекарственных веществ. Для повышения безопасности проводимой терапии и прогнозирования развития фармакокинетических межлекарственных взаимодействий международные регуляторные органы рекомендуют тестировать лекарственные вещества на принадлежность к субстратам и ингибиторам BCRP. На доклиническом этапе исследования проводятся в основном *in vitro* на линиях клеток гиперэкспрессирующих BCRP.

**Цель исследования.** Разработать и экспериментально обосновать методику тестирования лекарственных веществ на принадлежность к субстратам и модуляторам активности BCRP в опытах *in vivo*.

**Материалы и методы.** В исследовании использовали 6 половозрелых самцов кроликов породы Советская Шиншилла, массой 3000–4000 г. В качестве классического субстрата BCRP выбрали сульфасалазин, который вводили внутривентрикулярно в дозе 125 мг/кг. Для оценки его фармакокинетики у животных после введения сульфасалазина из ушной вены забирали кровь через — 0,25 ч; 0,5 ч; 1 ч; 1,5 ч; 2 ч; 3 ч; 5 ч; 8 ч; 12 ч; 24 ч. В качестве известного ингибитора транспортера применяли кверцетин, который вводили животным внутривентрикулярно в дозе 100 мг/кг однократно и курсом (25 мг/кг) 7 дней один раз в день. После однократного и курсового введения кверцетина животным вновь вводили сульфасалазин и оценивали его фармакокинетику. Концентрацию сульфасалазина в плазме крови анализировали методом ВЭЖХ-МС/МС. Фармакокинетические параметры рассчитывали модельнонезависимым методом. Достоверности различий оценивали дисперсионным анализом исходя из логнормального распределения данных.

**Результаты.** При однократном введении ингибитора BCRP кверцетина кроликам из всех протестированных фармакокинетических параметров сульфасалазина достоверно повышалась только  $C_{max}$ , а остальные показатели ( $AUC_{0-12}$ ;  $AUC_{0-\infty}$  и  $T_{1/2}$ ) достоверно не изменялись ( $p > 0,05$ ). При курсовом введении ингибитора BCRP наблюдали достоверное увеличение значений  $C_{max}$  в 3,1 раза,  $AUC_{0-12}$  и  $AUC_{0-\infty}$  в 2,81 раза ( $p = 0,0048^{**}$ ) и в 2,49 раза ( $p = 0,0192^*$ ) соответственно субстрата транспортера сульфасалазина, что свидетельствует о снижении активности BCRP. Ингибирование при этом зависит от длительности введения кверцетина, что подтверждается достоверным различием фармакокинетических параметров между сериями однократного и курсового введения вещества ( $p < 0,05$ ).

**Заключение.** Разработана и экспериментально обоснована оригинальная методика тестирования лекарственных веществ на принадлежность к субстратам и модуляторам активности BCRP в экспериментах *in vivo* с использованием в качестве тест-системы кроликов-самцов породы Советская Шиншилла, в качестве субстрата транспортера — сульфасалазина (125 мг/кг), а его ингибитора — кверцетина при однократном (100 мг/кг) и курсовом (25 мг/кг 7 дней) введении.

**Ключевые слова:** BCRP; кролики; субстрат; ингибитор; фармакокинетика; сульфасалазин; кверцетин

## Для цитирования:

Поветко М. И., Мыльников П. Ю., Шулькин А. В., Якушева Е. Н. Экспериментальное обоснование *in vivo* методики оценки субстратов и модуляторов активности белка-транспортера BCRP. *Фармакокинетика и фармакодинамика*. 2026;(1):49–57. <https://doi.org/10.37489/2587-7836-2026-1-49-57>. EDN: QHCTTI

**Поступила:** 12.12.2025. **В доработанном виде:** 20.02.2026. **Принята к печати:** 10.03.2026. **Опубликована:** 30.03.2026.

## Experimental substantiation of *in vivo* methods for evaluating substrates and modulators of BCRP transporter protein activity

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

## Abstract

**Relevance.** BCRP (Human Breast Cancer Resistance Protein) (ABCG2, MXR; ABCP) is an efflux ATP-dependent transporter protein that plays a crucial role in the pharmacokinetics of a wide range of drugs. To enhance therapeutic safety and predict potential pharmacokinetic drug-drug interactions, international regulatory bodies recommend testing medicinal substances for their affiliation with substrates and inhibitors of BCRP. Preclinical studies are primarily conducted using cell lines that overexpress BCRP *in vitro*.

**Objective.** The aim was to develop and experimentally validate a methodology for assessing medicinal substances as substrates or modulators of BCRP activity *in vivo*.

**Materials and methods.** Six sexually mature male rabbits of the Soviet Chinchilla breed, weighing between 3000 g and 4000 g, were used in this study. Sulphasalazine was chosen as the classical substrate for BCRP and was administered intragastrically at a dose of 125 mg/kg. Pharmacokinetic evaluation involved blood sampling from ear veins at time points 0.25 h; 0.5 h; 1 h; 1.5 h; 2 h; 3 h; 5 h; 8 h; 12 h; and 24 h post-administration. Quercetin, known as a potent inhibitor of the transporter, was also administered either as a single dose (100 mg/kg) or chronically (25 mg/kg daily for seven days). After both acute and chronic quercetin administration, sulphasalazine was reintroduced, and its pharmacokinetics were assessed again. Plasma concentrations of sulphasalazine were analyzed by HPLC-MS/MS. Model-independent methods were employed to calculate pharmacokinetic parameters. Differences among groups were evaluated via analysis of variance, assuming a log-normal distribution of data.

**Results.** With a single administration of the BCRP inhibitor quercetin to rabbits, of all the tested pharmacokinetic parameters of sulfasalazine, only  $C_{max}$  significantly increased, while the remaining parameters ( $AUC_{0-12}$ ;  $AUC_{0-\infty}$  and  $T_{1/2}$ ) did not significantly change ( $p > 0,05$ ). With the course administration of the BCRP inhibitor, a significant increase in  $C_{max}$  values was observed by 3.1 times,  $AUC_{0-12}$  and  $AUC_{0-\infty}$  by 2.81 times ( $p = 0,0048^{**}$ ) and 2.49 times ( $p = 0,0192^*$ ), respectively, of

the sulfasalazine transporter substrate, indicating a decrease in BCRP activity. In this case, inhibition depends on the duration of quercetin administration, which is confirmed by a significant difference in pharmacokinetic parameters between a series of single and course injections of the substance ( $p < 0.05$ ).

**Conclusion.** An original method has been developed and experimentally validated for testing medicinal compounds as substrates or modulators of BCRP activity in vivo using male Soviet Chinchilla rabbits as test subjects, with sulphasalazine (125 mg/kg) serving as the transporter substrate and quercetin (administered either as a single dose of 100 mg/kg or as a course of 25 mg/kg/day for seven days) as the inhibitor.

**Keywords:** BCRP; rabbits; substrate; inhibitor; pharmacokinetics; sulfasalazine; quercetin

**For citations:**

Povetko MI, Mylnikov PYu, Shchulkin AV, Yakusheva EN. Experimental substantiation of *in vivo* methods for evaluating substrates and modulators of BCRP transporter protein activity. *Farmakokinetika i farmakodinamika = Pharmacokinetics and pharmacodynamics*. 2026;(1):49–57. (In Russ). <https://doi.org/10.37489/2587-7836-2026-1-49-57>. EDN: QHCTPI

**Received:** 12.12.2025. **Revision received:** 20.02.2026. **Accepted:** 10.03.2026. **Published:** 30.03.2026.

## Введение / Introduction

BCRP (breast cancer resistance protein — белок резистентности рака молочной железы) (ABCG2, MXR; ABCP) — эффлюксный АТФ-зависимый белок-транспортёр, в норме локализующийся в различных гистогематических барьерах, таких как гематоэнцефалический, плацентарный и гематотестикулярный барьеры [1]. Транскрипты белка были обнаружены в тонком и толстом кишечнике, печени, почках, желчных протоках и ряде других органов. Подобное расположение подтверждает его участие в процессах всасывания, распределения и выведения лекарственных веществ, которые относятся к его субстратам [2, 3].

Данный белок обладает широкой субстратной специфичностью и способен переносить многочисленный ряд лекарственных препаратов: митоксантрон, метотрексат, сульфасалазин, розувастатин и т. д. [2–4]. Некоторые из этих соединений могут существенно влиять на его функциональную активность, так в настоящее время изучены следующие ингибиторы белка-транспортёра (кверцетин, резерпин, нимодипин, омепразол и др.) [2, 3]. Активно разрабатываются индукторы BCRP [2, 3, 5].

При совместном назначении субстрата и ингибитора BCRP концентрация субстрата в крови повышается, что, в свою очередь, сопровождается развитием нежелательных лекарственных реакций [6]. Например, одновременное назначение сульфасалазина и антагониста нейрокинина I ролапитапта может привести к увеличению всасывания сульфасалазина из тонкого кишечника, а вследствие этого, к уменьшению количества препарата в просвете кишечника и снижению терапевтической эффективности при лечении болезни Крона. К тому же повышение концентрации субстрата в плазме крови в этом случае может вызвать увеличение частоты проявления системных побочных эффектов [7].

Учитывая вышеизложенное, для повышения эффективности и безопасности проводимой терапии, прогнозирования развития фармакокинетических межлекарственных взаимодействий ведущие мировые регуляторные органы рекомендуют тестировать лекарственные вещества на принадлежность к субстратам и ингибиторам BCRP, а также других клинически значимых транспортёров (Pgp, OATP1B1, OATP1B3, OAT1, OAT3, OCT2) [8, 9].

Согласно международным рекомендациям, первоначально подобные исследования проводят *in vitro* на линии клеток гиперэкспрессирующих BCRP. А затем при положительном результате рекомендуется проводить клинические исследования без проведения тестирования на лабораторных животных. Однако данный подход не учитывает не прямое действие лекарственных веществ на транспортёры, в частности, влияние на уровень экспрессии гена, кодирующего транспортёр, что показывает увеличение или уменьшение его синтеза, с чем может быть связано изменение его количества и функциональной активности. Например, явление индукции транспортёров невозможно установить в опытах *in vitro*, подобных рекомендаций в существующих руководствах нет. Такое влияние можно оценить только в опытах *in vivo* на экспериментальных животных при курсовом введении тестируемого препарата [10].

Поэтому необходимо разработать адекватную воспроизводимую экспериментальную методику, позволяющую оценивать принадлежность лекарственных веществ к субстратам и модуляторам активности BCRP в опытах *in vivo*.

Учитывая схожесть аминокислотного состава BCRP у человека и кроликов, возможность многократного забора крови у одного животного и планирование дизайна эксперимента по аналогии с клиническим исследованием, биоэтические проблемы при использовании большого количества крыс и мышей, предшествующий опыт исследований *in vivo*, именно кролики были выбраны в качестве удобной и адекватной тест-системы в настоящем исследовании [11, 12].

**Цель / Objective** — разработать и экспериментально обосновать методику тестирования лекарственных веществ на принадлежность к субстратам и модуляторам активности BCRP в опытах *in vivo*.

## Материалы и методы / Materials and Methods

В исследовании использовали 6 половозрелых самцов кроликов породы Советская Шиншилла, массой 3000–4000 г.

Кроликов содержали в условиях стандартной экспериментальной биологически чистой комнаты вивария ФГБОУ ВО РязГМУ Минздрава России, с системой «чистого» и «грязного» коридоров и автоматической

сменной дневного и ночного периода. В помещении с животными поддерживалась температура 21–24 °С и влажность 55–65 %, при как минимум 12-кратной смене воздушного объёма в час.

Исследования выполняли в соответствии с правилами надлежащей лабораторной практики (Решение Совета Евразийской экономической комиссии от 03.11.2016 N 81 «Об утверждении Правил надлежащей лабораторной практики Евразийского экономического союза в сфере обращения лекарственных средств») [13].

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.).

По окончании эксперимента животным производилась эвтаназия путём передозировки средств для наркоза в соответствии с СОП вивария ФГБОУ ВО РязГМУ Минздрава России (внутримышечным введением золетила в дозе 30 мг/кг массы и ксилазина в дозе 20 мг/кг массы с помощью стерильного одноразового шприца объёмом 2 мл).

**Дизайн исследования.** Исследование выполнено в последовательном эксперименте на 6 кроликах самцах. Для оценки принадлежности веществ к субстратам и ингибиторам BCRP в качестве субстрата использовали сульфасалазин, а ингибитора — кверцетин.

Сульфасалазин и кверцетин были выбраны как классические вещества с доказанной субстратной принадлежностью (первое) и ингибирующей активностью (второе), а также мало выраженными системными побочными эффектами при пероральном введении, связанными с плохим всасыванием из кишечника, что могло бы повлиять на результаты эксперимента.

Для оценки принадлежности тестируемого вещества к субстратам BCRP следует сравнить его ключевые фармакокинетические параметры, связанные с концентрацией в крови ( $C_{max}$ ,  $AUC_{0-t}$ ,  $AUC_{0-\infty}$ ), на фоне введения ингибитора с исходными. Если 90 % ДИ отношения средних геометрических указанных параметров достоверно увеличился более чем на 25 %, то тестируемое вещество является субстратом изучаемого транспортёра.

Для оценки принадлежности тестируемого вещества к ингибиторам транспортёра в эксперименте *in vivo* выбирают известный субстрат BCRP. В настоящем исследовании мы использовали сульфасалазин, а тестируемое вещество вводят однократно и/или курсом перед вторым введением сульфасалазина. Если 90 % ДИ отношения средних геометрических величин фармакокинетических параметров сульфасалазина ( $C_{max}$ ,  $AUC_{0-t}$ ,  $AUC_{0-\infty}$ ) 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.

В ходе эксперимента в 1-й серии исследования животным внутрижелудочно (в/ж) вводили классический субстрат BCRP — сульфасалазин («Сульфасалазин», 500 мг, ООО «Озон», Россия) в дозе 125 мг/кг [14]. Затем из

краевой вены уха кроликов забирали образцы крови в количестве 1 мл в гепаринизированные центрифужные пробирки объёмом 15 мл в следующие временные точки — 0,25 ч; 0,5 ч; 1 ч; 1,5 ч; 2 ч; 3 ч; 5 ч; 8 ч; 12 ч; 24 ч. После чего образцы центрифугировали (центрифуга «Elmi CM 6M», Латвия (1750 g, 10 мин) для получения плазмы крови, которую замораживали при –80 °С до выполнения количественного анализа (серия 1 — в/ж введение сульфасалазина).

После отмывочного периода продолжительностью 7 дней, необходимого для полного выведения сульфасалазина и восстановления животных после забора крови [15] следовала 2-я серия эксперимента, состоящая из двух этапов. Изначально животным однократно вводили классический ингибитор BCRP — кверцетин («Кверцетин», 25 мг, «Эвалар», Россия) в дозировке 100 мг/кг и через 30 мин повторно вводили сульфасалазин в той же дозе и забирали кровь у животных в тех же временных точках (рис. 1).

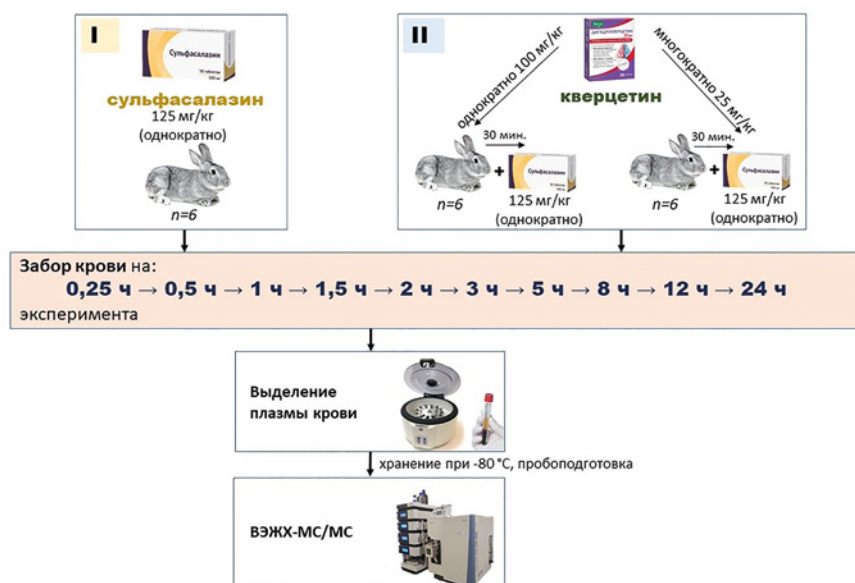
Далее также следовал отмывочный период, после которого начинали курсовое введение кверцетина в дозировке 25 мг/кг в течение 7 дней. На 7-й день животным вводили кверцетин — 25 мг/кг и через 30 мин сульфасалазин в дозе 125 мг/кг и забирали кровь у животных в тех же 10 временных точках.

Количественный анализ сульфасалазина в полученных образцах плазмы крови осуществляли методом ВЭЖХ-МС/МС при помощи ВЭЖХ «Ultimate 3000» («ThermoFisher», США), оснащённого автосемплером, и масс-спектрометра TSQ Fortis («ThermoFisher», США) по ранее разработанной и валидированной методике [16].

Пробоподготовка заключалась в осаждении белков плазмы после разморозки проб путём добавления к 200 мкл образца 600 мкл смеси метанола с валсартаном (внутренний стандарт) в концентрации 100 нг/мл. Затем пробы встряхивали 5 мин на встряхивателе (Vortex (Heidolph Instruments GmbH & Co KG, Германия)), центрифугировали 10 мин при 21000 g и 4 °С (центрифуга Avanti® JXN-30 (Beckman Coulter Inc., США). Супернатант переносили в вials и помещали в автосамплер, объём инъекции — 100 мкл.

**Условия хроматографического анализа** были следующие: колонка Luna Omega 3 мкм Polar C18 50×2.1, 3 μm, предколонка аналогичного типа — C18 3 мкм. Температура разделения — 35 °С, скорость потока — 0,3 мл/мин. Применяли градиентный режим элюирования (соотношение 0,1 % раствор муравьиной кислоты/метанол): 0,0 мин — 60/40 %, 0,3 мин — 15/85 %, 4 мин — 1/99 %, 6 мин — 60/40 %, 8 мин — 60/40 %. Использовали режим негативной ионизации. Метод детектирования — tandemная масс-спектрометрия. Температура ион-транспортующего капилляра — 300 °С, температура испарителя — 350 °С. Фрагментирующий газ — аргон с потоком 2 mTorr (mTorr), фрагментация в источнике составила 10В. Объём инъекции — 10 мкл, время анализа — 8 минут.

Методика была валидирована по параметрам: селективность, нижний предел количественного опре-



**Рис. 1.** Схема выполнения экспериментов для 1- и 2-й серий исследований  
**Fig. 1.** Diagram of the experimental setup for series 1 and 2 of the studies  
*Источник:* Поветко М. И. и соавт., 2025.  
*Source:* Povetko MI et al., 2025.

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

Согласно полученным концентрациям субстрата строили фармакокинетические кривые. Далее модельно-независимым методом рассчитывали следующие фармакокинетические параметры сульфасалазина:  $C_{\max}$  — максимальная концентрация (нг/мл);  $AUC_{0-t}$  — площадь под фармакокинетической кривой концентрация—время от нуля до времени последнего забора крови (нг×ч/мл) (рассчитывали методом трапеций);  $AUC_{0-\infty}$  — площадь под фармакокинетической кривой концентрация—время от нуля до бесконечности (нг×ч/мл);  $T_{1/2}$  — период полувыведения (ч).

#### 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 Тьюки. Полученные результаты представлены в виде среднего геометрического и его 90 % доверительного интервала. Дополнительно рассчитывали двухсторонний 90 % доверительный интервал (ДИ) отношения средних геометрических фармакокинетических параметров сульфасалазина. Статистически значимыми считали различия при  $p < 0,05$ .

#### Результаты / Results

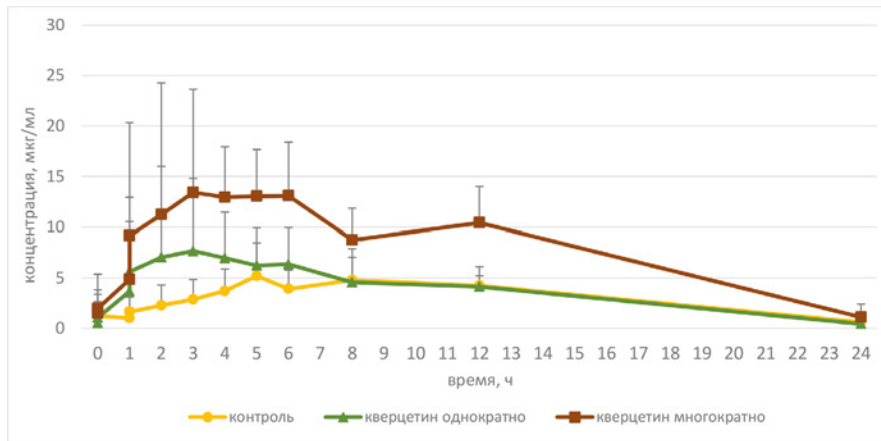
Полученные результаты представлены на рис. 2 и в табл. 1–3.

Из представленных данных видно, что в серии контроля (исходные данные) у кроликов сульфасалазин медленно всасывается и достигает  $C_{\max}$  к 5 часам, при этом он также медленно выводится и сохраняется в системном кровотоке до 24 часов.

Однократное введение кверцетина достоверно повышало значение  $C_{\max}$  сульфасалазина в 1,62 раза (90 % ДИ отношения средних геометрических 1,12–2,35;  $p = 0,0418$ ), остальные изучаемые фармакокинетические параметры  $AUC_{0-t}$ ,  $AUC_{0-\infty}$  и  $T_{1/2}$  достоверно не изменялись ( $p > 0,05$ ). Полученные данные показывают увеличение концентрации сульфасалазина в крови и свидетельствуют о повышении скорости всасывания сульфасалазина после однократного введения кверцетина, что характеризует ингибирование эффлюксного транспортера BCRP (табл. 1).

После курсового внутрижелудочного введения кверцетина в течение 7 дней  $C_{\max}$  сульфасалазина увеличивалась 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;  $p = 0,0192$ ) (табл. 2).

Полученные результаты свидетельствуют о значительном увеличении концентрации сульфасалазина в крови, ускорении скорости и степени его всасывания после курсового введения кверцетина, что характеризует ингибирование BCRP.



**Рис. 2.** Усреднённые фармакокинетические кривые «концентрация–время» сульфасалазина (125 мг/кг) в серии контроля, после однократного (100 мг/кг) и курсового (25 мг/кг) введения кверцетина

**Fig. 2.** Averaged pharmacokinetic "concentration-time" curves of sulfasalazine (125 mg/kg) in the control series, after a single dose (100 mg/kg) and a course dose (25 mg/kg) of quercetin administration.

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

Source: Povetko MI et al., 2025.

Таблица 1

Усреднённые фармакокинетические параметры сульфасалазина (125 мг/кг) у кроликов до и после однократного введения кверцетина в дозе 100 мг/кг массы (среднее геометрическое и его 90 % ДИ)

Table 1

Average pharmacokinetic parameters of sulfasalazine (125 mg/kg) in rabbits before and after a single administration of quercetin at a dose of 100 mg / kg body weight (Geom Mean and its 90 % CI)

Параметры фармакокинетики	Исходные значения (контроль)	Значения после однократного введения кверцетина	90 % ДИ отношения средних геометрических
$C_{max}$ , нг/мл	6210,64 (2675,04; 6808,39)	11588,02 (3728,69; 19292,47)	1,12–2,35; $p = 0,0418^*$
$AUC_{0-t}$ , нг×ч/мл	67464,71 (33360,54; 106560,79)	90389,18 (42928,82; 130291,55)	0,997–1,62; $p = 0,1038$
$AUC_{0-\infty}$ , нг×ч/мл	80459,95 (45852,07; 171624,87)	93549,85 (43095,50; 133729,29)	0,71–1,70; $p = 0,8168$
$T_{1/2}$ , ч	6,35 (2,78; 38,33)	4,3 (2,0; 5,43)	0,23–1,84; $p = 0,5334$

Примечание: \* —  $p < 0,05$  — достоверные различия с показателями контроля.

Note: \* —  $p < 0.05$  — significant differences with control values.

Таблица 2

Усреднённые фармакокинетические параметры сульфасалазина (125 мг/кг) у кроликов до и после курсового введения кверцетина в дозе 25 мг/кг массы в течение 7 дней (среднее геометрическое и его 90 % ДИ)

Table 2

Average pharmacokinetic parameters of sulfasalazine (125 mg/kg) in rabbits before and after a course of quercetin administration at a dose of 25 mg / kg body weight for 7 days (Geom Mean and its 90 % CI)

Параметры фармакокинетики	Исходные значения (контроль)	Значения после курсового введения кверцетина	90 % ДИ отношения средних геометрических
$C_{max}$ , нг/мл	6210,64 (2675,04; 6808,39)	20189,65 (14312,4; 34034,29)	1,97–4,90; $p = 0,0032^{**}$
$AUC_{0-t}$ , нг×ч/мл	67464,71 (33360,54; 106560,79)	192025,97 (144401,64; 228023,01)	1,78–4,45; $p = 0,0048^{**}$
$AUC_{0-\infty}$ , нг×ч/мл	80459,95 (45852,07; 171624,87)	203322,99 (158898,94; 264936,49)	1,42–4,38; $p = 0,0192^*$
$T_{1/2}$ , ч	6,35 (2,78; 38,33)	4,83 (2,55; 8,77)	0,25–1,86; $p = 0,5884$

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

Notes: \* —  $p < 0.05$ , \*\* —  $p < 0.01$  — significant differences with control values.

Более выраженные изменения концентрации субстрата белка-транспортёра после курсового введения кверцетина доказывают, что для выявления ингибирующего эффекта тестируемого препарата предпочтительно использование его курсового, а не однократного введения (рекомендуемый курс 7 дней) для более значимого изменения активности BCRP.

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

Сопоставление однократного и курсового введения ингибитора BCRP кверцетина наглядно демонстрирует зависимость изменения фармакокинетических параметров, определяющих концентрацию вещества-субстрата в крови, не только от дозы, но и длительности введения исследуемого вещества в качестве предполагаемого ингибитора (табл. 3).

$C_{max}$  при курсовом введении в сравнении с однократным достоверно увеличивалась в 1,91 раза (90 % ДИ отношения средних геометрических 1,18–3,13;  $p = 0,0386$ ),  $AUC_{0-t}$  — в 2,12 раза (90 % ДИ отношения средних геометрических 1,44–3,39;  $p = 0,0106$ ),  $AUC_{0-\infty}$  — в 2,17 раза (90 % ДИ отношения средних геометрических 1,28–3,99;  $p = 0,0127$ ). При этом  $T_{1/2}$  также статистически значимо не изменялся.

### Обсуждение/ Discussion

Сульфасалазин, выбранный в качестве субстрата для разработки и экспериментального обоснования методики оценки принадлежности тестируемых веществ к субстратам и модуляторам активности BCRP, обладает высоким аффинитетом к данному белку-транспортёру [17]. Сульфасалазин считается селективным субстратом BCRP, т. к. в его трансмембранном переносе не участвуют другие ABC-транспортёры — P-гликопротеин и MRP2 [18–20]. При этом, в отличие от ряда иных высокоселективных субстратов (митоксантрон, ме-

тотрексат), для него не характерны цитотоксические свойства и высокая частота проявления системных побочных эффектов, которые способны оказать влияние на активность транспортёра [21]. Перечисленные характеристики делают его оптимальным кандидатом-субстратом для экспериментального обоснования, указанной выше методики, в опытах *in vivo*.

Кверцетин — селективный ингибитор, обладающий низкой себестоимостью и малым количеством побочных эффектов, в отличие от иных ингибиторов, рекомендуемых для исследований (лапатиниб, gefитиниб, рабепразол) [22]. В сравнении с куркумином, другим пищевым биологически активным продуктом, данное вещество имеет большую ингибирующую активность:  $IC_{50}$  куркумина = 1,6 мкМ;  $IC_{50}$  кверцетина = 0,6 мкМ [21, 22].

Таким образом, выбранные для разработки и экспериментального обоснования методики вещества являются оптимальными, селективными и безопасными при однократном и курсовом использовании у лабораторных животных. При анализе данных литературы подобное сочетание субстрата и ингибитора в экспериментах показало возможность его использования у крыс и собак породы бигль [22, 23], однако авторы применяли другие дозы, однократное введение кверцетина и целью их работы было подтвердить ингибирующее влияние кверцетина в экспериментах *in vivo*.

Полученные нами результаты выявили наличие у кверцетина ингибирующей способности в отношении белка-транспортёра BCRP в экспериментах *in vivo* у кроликов и согласуются с полученным ранее результатом на других видах животных. 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 [24].

Значимое снижение активности белка-транспортёра наблюдалось как при однократном (100 мг/кг), так и при курсовом введении кверцетина в дозировке 25 мг/кг,

Таблица 3

Сравнение усреднённых фармакокинетических параметров сульфасалазина (125 мг/кг) у кроликов после однократного (100 мг/кг массы) и курсового (25 мг/кг массы) введения кверцетина в течение 7 дней (среднее геометрическое и его 90 % ДИ)

Table 3

Comparison of the average pharmacokinetic parameters of sulfasalazine (125 mg/kg) in rabbits after a single (100 mg/kg body weight) and course (25 mg/kg body weight) administration of quercetin for 7 days (Geom Mean and its 90 % CI)

Параметры фармакокинетики	Значения после однократного введения кверцетина	Значения после курсового введения кверцетина	90 % ДИ отношения средних геометрических
$C_{max}$ , нг/мл	11588,02 (3728,69; 19292,47)	20189,65 (14312,4; 34034,29)	1,18–3,13; $p = 0,0386^*$
$AUC_{0-t}$ , нг×ч/мл	90389,18 (42928,82; 130291,55)	192025,97 (144401,64; 228023,01)	1,44–3,39; $p = 0,0106^*$
$AUC_{0-\infty}$ , нг×ч/мл	93549,85 (43095,50; 133729,29)	203322,99 (158898,94; 264936,49)	1,28–3,99; $p = 0,0127^*$
$T_{1/2}$ , ч	4,3 (2,0; 5,43)	4,83 (2,55; 8,77)	0,53–2,11; $p = 0,9608$

Примечание: \* —  $p < 0,05$  — достоверные различия между сериями однократного и курсового введения кверцетина.

Note: \* —  $p < 0,05$  — significant differences between the single-dose and course-dosed quercetin administration series.

но было достоверно более выражено для большего количества фармакокинетических параметров при курсовом применении в течение 7 дней по сравнению с серией однократного применения ингибитора.

При этом обращает на себя внимание достоверное изменение параметров  $C_{max}$  и AUC, которые характеризуют его концентрацию в крови, скорость и степень всасывания вещества, в то время как  $T_{1/2}$ , показывающий выведение препарата, не изменился, что согласуется с данными других исследований [22].

Полученные результаты свидетельствуют о том, что ингибирование BCRP развивается, в основном, на уровне ЖКТ. Вероятнее всего это связано с низкой биодоступностью кверцетина [25] и как следствие с тем, что в системном кровотоке его концентрация недостаточна для ингибирования белка-транспортёра в других органах и тканях.

## Заключение / Conclusion

В ходе исследования была разработана и экспериментально обоснована оригинальная методика тестирования лекарственных веществ на принадлежность к субстратам и модуляторам активности белка-транспортёра BCRP с использованием в качестве тест-системы кроликов-самцов породы «Советская Шиншилла», в качестве субстрата транспортёра — сульфасалазина (125 мг/кг), а его ингибитора — кверцетина при однократном (100 мг/кг) и курсовом (25 мг/кг 7 дней) введении. Данную методику можно использовать для изучения функциональной активности белка-транспортёра на фоне лекарственных веществ с целью прогнозирования фармакокинетических межлекарственных взаимодействий на уровне BCRP.

## Благодарности / Acknowledgments

Авторы выражают признательность виварию 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.* — изготовление суспензий лекарственных препаратов, проведение экспериментов на лабораторных животных, пробоподготовка образцов, написание статьи; *Мыльников П. Ю.* — разработка и валидация методики количественного определения, работа с хроматографом; *Шулькин 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* — preparation of drug suspensions, conducting experiments on laboratory animals, sample preparation, writing an article; *Mylnikov PYu* — development and validation of a method of quantitative determination, 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

**Шулькин 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. 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
2. 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, Shchulkin 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/PAVLOVJ384999.
3. 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.
4. Lemos C, Jansen G, Peters GJ. Drug transporters: recent advances concerning BCRP and tyrosine kinase inhibitors. *Br J Cancer.* 2008 Mar 11;98(5):857-62. doi: 10.1038/sj.bjc.6604213.
5. Zattoni IF, Delabio LC, Dutra JP, et al. Targeting breast cancer resistance protein (BCRP/ABCG2): Functional inhibitors and expression

modulators. *Eur J Med Chem.* 2022 Jul 5;237:114346. doi: 10.1016/j.ejmech.2022.114346.

6. Choi YH. Interpretation of Drug Interaction Using Systemic and Local Tissue Exposure Changes. *Pharmaceutics.* 2020 May 2;12(5):417. doi: 10.3390/pharmaceutics12050417.

7. 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.

8. Agency EM. 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).

9. 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).

10. Шулькин А.В. Регуляция функционирования гликопротеина-P гормональными лекарственными средствами: Дис. ... доктора медицинских наук. — Рязань, 2019. [Shchulkin AV. Regulation of glycoprotein-P function by hormonal medications. [dissertation] Ryazan; 2019. (In Russ.)]. Доступно по <https://www.dissercat.com/content/regulyatsiya>

funktionsirovaniya-glikoproteina-g-gormonalnymi-lekarstvennymi-sredstvami?ysclid=mlfsrlhecy3922705148. Ссылка активна на 12.12.2014.

11. Halwachs S, Kneuer C, Gohlsch K, et al. The ABCG2 efflux transporter from rabbit placenta: Cloning and functional characterization. *Placenta*. 2016 Feb;38:8-15. doi: 10.1016/j.placenta.2015.12.005.

12. Якушева Е.Н., Черных И.В., Шулькин А.В., Гацаного М.В. Методика определения принадлежности лекарственных средств к числу субстратов гликопротеина-Р. *Российский медико-биологический вестник имени академика И.П. Павлова*. 2015;23(3):49-53. [Yakusheva EN, Chernykh IV, Shulkin AV, Gatsanoga MV. Methods of identification of drugs as P-glycoprotein substrates. *I.P. Pavlov Russian Medical Biological Herald*. 2015;23(3):49-53. (In Russ.)].

13. Решение Совета Евразийской экономической комиссии от 03.11.2016 № 81 «Об утверждении Правил надлежащей лабораторной практики Евразийского экономического союза в сфере обращения лекарственных средств». [Decision No. 81 of the Council of the Eurasian Economic Commission dated November 3, 2016, "On Approval of the Rules of Good Laboratory Practice of the Eurasian Economic Union in the Field of Medicinal Products Circulation". (In Russ.)].

14. Rawoof M, Rajnarayana K, Ajitha M. Formulation and in vivo Evaluation of Sulfasalazine Tablets for Colon Targeting Using Design of Experiment. *American Journal of PharmTech Research*. 2019 Apr; 9(02): 32-44. doi: 10.46624/ajptr.2019.v9.i2.004.

15. Рекомендация Коллегии Евразийской экономической комиссии от 14.11.2023 N 33 «О Руководстве по работе с лабораторными (экспериментальными) животными при проведении доклинических (неклинических) исследований». [Recommendation of the Board of the Eurasian Economic Commission dated 14.11.2023 N 33 "On the Guidelines for Working with Laboratory (Experimental) Animals in Preclinical (Non-Clinical) Research". (In Russ.)].

16. 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.

17. Zaher H, Khan AA, Palandra J, et al. Breast cancer resistance protein (BCRP/abcg2) is a major determinant of sulfasalazine absorption and elimination in the mouse. *Mol Pharm*. 2006 Jan-Feb;3(1):55-61. doi: 10.1021/mp050113v.

18. Kusuvara H, Furuie H, Inano A, et al. Pharmacokinetic interaction study of sulphasalazine in healthy subjects and the impact of curcumin as an in vivo inhibitor of BCRP. *Br J Pharmacol*. 2012 Jul;166(6):1793-803. doi: 10.1111/j.1476-5381.2012.01887.x.

19. Tomaru A, Morimoto N, Morishita M, et al. Studies on the intestinal absorption characteristics of sulfasalazine, a breast cancer resistance protein (BCRP) substrate. *Drug Metab Pharmacokin*. 2013;28(1):71-4. doi: 10.2133/dmpk.dmpk-12-nt-024.

20. Ikai A, Watanabe M, Sowa Y, et al. Phosphorylated retinoblastoma protein is a potential predictive marker of irinotecan efficacy for colorectal cancer. *Int J Oncol*. 2016 Mar;48(3):1297-304. doi: 10.3892/ijo.2016.3332.

21. Lee CA, O'Connor MA, Ritchie TK, et al. Breast cancer resistance protein (ABCG2) in clinical pharmacokinetics and drug interactions: practical recommendations for clinical victim and perpetrator drug-drug interaction study design. *Drug Metab Dispos*. 2015 Apr;43(4):490-509. doi: 10.1124/dmd.114.062174.

22. Song YK, Yoon JH, Woo JK, et al. Quercetin Is a Flavonoid Breast Cancer Resistance Protein Inhibitor with an Impact on the Oral Pharmacokinetics of Sulfasalazine in Rats. *Pharmaceutics*. 2020 Apr 26;12(5):397. doi: 10.3390/pharmaceutics12050397.

23. Oh JH, Kim D, Lee H, et al. Negligible Effect of Quercetin in the Pharmacokinetics of Sulfasalazine in Rats and Beagles: Metabolic Inactivation of the Interaction Potential of Quercetin with BCRP. *Pharmaceutics*. 2021 Nov 23;13(12):1989. doi: 10.3390/pharmaceutics13121989.

24. Peña-Solórzano D, Stark SA, König B, et al. ABCG2/BCRP: Specific and Nonspecific Modulators. *Med Res Rev*. 2017 Sep;37(5):987-1050. doi: 10.1002/med.21428.

25. Cai X, Fang Z, Dou J, et al. Bioavailability of quercetin: problems and promises. *Curr Med Chem*. 2013;20(20):2572-82. doi: 10.2174/09298673113209990120.