

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

На правах рукописи

АНАНЬЕВА ПЕЛАГЕЯ ДМИТРИЕВНА

**ОЦЕНКА ПРИНАДЛЕЖНОСТИ ЭТИЛМЕТИЛГИДРОКСИПИРИДИНА
СУКЦИНАТА К СУБСТРАТАМ И МОДУЛЯТОРАМ АКТИВНОСТИ
OATP1B1 *IN VITRO***

3.3.6. Фармакология, клиническая фармакология (медицинские науки)

Диссертация на соискание ученой степени
кандидата медицинских наук

Научный руководитель:
доктор медицинских наук, доцент
Щулькин Алексей Владимирович

Рязань – 2024

ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ	4
ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ	14
1.1. Структура, локализация и механизмы регуляции полипептида, транспортирующего органические анионы, 1B1 (OATP1B1)	14
1.2. Роль OATP1B1 в развитии межлекарственных взаимодействии	30
1.3. Фармакокинетика и фармакодинамика этилметилгидроксипиридина сукцината	36
ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ.....	42
2.1. Клеточная линия HepG2	42
2.2. Клеточные линии HEK293 и HEK293-OATP1B1	42
2.3. Методы детекции и визуализации <i>SLCO1B1</i> /OATP1B1 в клеточных линиях	44
2.4. Определение активности OATP1B1 в клетках HEK293-OATP1B1	47
2.5. Определение концентрации аторвастатина в лизате клеток	49
2.6. Определение принадлежности этилметилгидроксипиридина к субстратам и модуляторам OATP1B1	51
2.7. Определение концентрации этилметилгидроксипиридина	52
в лизате клеток	52
2.8. Статистический анализ полученных результатов	54
ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ	56
3.1. Разработка рекомбинантной клеточной линии, гиперэкспрессирующей полипептид, транспортирующий органические анионы, 1B1 (OATP1B1).....	56
3.2. Разработка и валидация методики количественного определения аторвастатина	58

3.3. Разработка методики оценки принадлежности лекарственных веществ к субстратам и модуляторам OATP1B1 с помощью рекомбинантной клеточной линии HEK293-OATP1B1	66
3.4. Разработка и валидация методики количественного определения ЭМГП в лизате клеток	70
3.5. Оценка принадлежности этилметилгидроксипиридина к субстратам и модуляторам OATP1B1 на клетках HEK293-OATP1B1	76
3.6. Оценка влияния этилметилгидроксипиридина сукцината на экспрессию гена <i>SLCO1B1</i> , относительное количество и активность OATP1B1 в клетках линии HepG2	80
3.7. Оценка клинической значимости полученных результатов	83
ОБСУЖДЕНИЕ ПОЛУЧЕННЫХ РЕЗУЛЬТАТОВ	84
ЗАКЛЮЧЕНИЕ	90
ВЫВОДЫ	91
ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ	93
ПЕРСПЕКТИВЫ ДАЛЬНЕЙШЕЙ РАЗРАБОТКИ ТЕМЫ	94
СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ	95
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ	98

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность темы исследования

Нежелательные лекарственные реакции (НЛР) остаются одной из важнейших проблем современной фармакотерапии, причем их распространенность продолжает расти. Так, по данным мировой статистики, в 2019 году было зарегистрировано до 2 миллионов случаев НЛР, более 150 тысяч из них были классифицированы как тяжелые и имели фатальные последствия [44, 92].

Аналогичная ситуация наблюдается и в России. Анализ федеральной базы данных спонтанных сообщений показал, что с 2009 года ежегодное количество спонтанных сообщений о НЛР постоянно возрастало, достигнув в 2019 году 30 000. Доля серьезных НЛР в общем объеме также неуклонно растет. Так, в 2016 году как серьезные были классифицированы 23% НЛР, в 2017 – 39%, в 2018 – 69% [1]. Прием таких препаратов, как β -адреноблокаторы, диуретики, ингибиторы ангиотензинпревращающего фермента, варфарин, антипсихотики и наркотические анальгетики, продемонстрировал наибольшую частоту ассоциации с развитием НЛР [24, 109].

Частой причиной НЛР становятся межлекарственные взаимодействия. Традиционно их делят на фармакокинетические и фармакодинамические. Одним из уровней, на котором могут развиваться фармакокинетические межлекарственные взаимодействия, является уровень белков-транспортеров [43].

Полипептид, транспортирующий органические анионы, 1B1 (OATP1B1) относят к клинически значимым транспортерам. Он локализован на базолатеральной мембране гепатоцитов и отвечает за проникновение веществ-субстратов внутрь клеток печени, где происходит их биотрансформация. Транспортер обладает широкой субстратной специфичностью, в частности, отвечает за транспорт статинов, ингибиторов ангиотензинпревращающего фермента, блокаторов рецепторов ангиотензина II, сердечных гликозидов, многих антибактериальных и противовирусных лекарственных средств [130].

Ингибирование активности данного переносчика приводит к накоплению его субстрата в крови и возможному развитию НЛР. Так, было описано повышение плазменной концентрации розувастатина в 5-10 раз вследствие ингибирования ОАТР1В1 циклоспорином [146]. Учитывая существенную клиническую роль ОАТР1В1 в межлекарственных взаимодействиях, основные мировые регуляторные органы рекомендуют тестировать все новые лекарственные препараты на принадлежность к субстратам и ингибиторам данного белка-переносчика с целью повышения безопасности фармакотерапии [29, 90, 170].

Этилметилгидроксипиридина сукцинат (ЭМГПС, «Мексидол®») – препарат с мультитаргетным и полимодальным действием, который был разработан в середине 1980-х годов и доказал свою эффективность в многочисленных клинических исследованиях [32, 36, 52]. ЭМГПС обладает выраженным антигипоксическим, антиоксидантным, мембраностабилизирующим и нейропротекторным эффектами, а также рядом других, что позволяет применять его при широком спектре нозологий и у коморбидных пациентов [12, 14, 30]. Учитывая данные обстоятельства, ЭМГПС часто назначается совместно с другими лекарственными веществами, что может приводить к возникновению межлекарственных взаимодействий. Для повышения безопасности проводимой комбинированной терапии и прогнозирования развития фармакокинетических межлекарственных взаимодействий необходимо точно знать, какие белки-транспортеры принимают участие в фармакокинетике препарата.

Таким образом, оценка принадлежности ЭМГПС к субстратам и модуляторам белка-транспортера ОАТР1В1 представляется важной и актуальной задачей фармакологии, решению которой посвящена настоящая работа.

Степень разработанности темы исследования

Этилметилгидроксипиридина сукцинат (ЭМГПС) – оригинальный отечественный антиоксидант и антигипоксант [14, 35, 52]. В ходе проведения доклинических и клинических исследований было показано, что ЭМГПС быстро всасывается и достигает максимальной концентрации в среднем через 30 мин. Исследуемое вещество равномерно распределяется по органам и тканям, проникая в

головной мозг через гематоэнцефалический барьер [49]. В ходе биотрансформации ЭМГПС было идентифицировано 5 метаболитов: 3-оксипиридина фосфат, 2-метил-6-метил-3-оксипиридин, 6-метил-3-оксипиридин, конъюгат 2-метил-6-метил-3-оксипиридина с глюкуроновой кислотой, конъюгат 3-гидрокси-6-метил-2-этилпиридина фосфата с глюкуроновой кислотой [22]. Основное количество лекарственного вещества выводится почками в виде глюкуроноконъюгата в первые 4 часа [22]. Показано, что ЭМГПС повышает активность изоформы 3A4 цитохрома P450 [6].

На базе кафедры фармакологии Рязанского государственного медицинского университета в течение более 10 лет успешно выполняются исследования по оценке принадлежности различных лекарственных препаратов к субстратам и модуляторам клинически значимых белков-транспортеров. Были разработаны и валидированы методики тестирования лекарственных веществ на принадлежность к субстратам, индукторам и ингибиторам Р-гликопротеина и белка резистентности рака молочной железы [23, 31, 50].

С помощью разработанных подходов был протестирован ряд лекарственных препаратов: фабомотизол, омберацетам, вилдаглиптин, тиамазол, финастерид и др. [46, 54-55]. В частности, установлено, что ЭМГПС не является субстратом Р-гликопротеина и белка резистентности рака молочной железы, но ингибирует активность данных транспортеров [23, 31].

ОАТР1В1 является клинически значимым транспортером, обеспечивающим проникновение субстратов внутрь гепатоцитов, где в дальнейшем происходит их биотрансформация. Снижение активности ОАТР1В1, например, вследствие межлекарственных взаимодействий, является одной из причин развития статин-индуцированной миопатии (статины являются субстратами ОАТР1В1) в результате повышения их концентрации в плазме крови [65, 99, 149].

Несмотря на достаточное число исследований, посвященных изучению эффектов и клинического применения ЭМГПС, принадлежность ЭМГПС к субстратам и модуляторам полипептида, транспортирующего органические анионы, 1В1

(OATP1B1) остается неизученным разделом, что и определило цель и задачи настоящего исследования.

Цель исследования

Определить принадлежность этилметилгидроксипиридина сукцината к субстратам и модуляторам полипептида, транспортирующего органические анионы, 1B1 (OATP1B1) *in vitro* и оценить его участие в развитии фармакокинетических межлекарственных взаимодействий.

Задачи исследования

1. Разработать рекомбинантную линию клеток, гиперэкспрессирующую полипептид, транспортирующий органические анионы, 1B1 (HEK293-OATP1B1).
2. Разработать методику оценки принадлежности лекарственных веществ к субстратам и модуляторам OATP1B1 с помощью созданной рекомбинантной клеточной линии.
3. Разработать и валидировать методики количественного определения аторвастатина и этилметилгидроксипиридина в лизате клеток с помощью ВЭЖХ-МС/МС.
4. Протестировать этилметилгидроксипиридина сукцинат на принадлежность к субстратам, индукторам и ингибиторам OATP1B1 и оценить его участие в развитии фармакокинетических межлекарственных взаимодействий на уровне данного транспортера.

Научная новизна исследования

Разработана первая в России рекомбинантная линия клеток, гиперэкспрессирующая полипептид, транспортирующий органические анионы, 1B1 (OATP1B1).

Налажена и апробирована методика тестирования лекарственных веществ на принадлежность к субстратам, ингибиторам и индукторам OATP1B1 с помощью клеточных линий HEK293-OATP1B1 и HepG2. Установлено, что данная методика позволяет прогнозировать развитие фармакокинетических межлекарственных

взаимодействий на уровне данного транспортера.

Разработаны и валидированы ВЭЖХ-МС/МС методики количественного определения этилметилгидроксипиридина и аторвастатина в образцах лизатов клеток. Установлено, что данные методики являются высокочувствительными, что позволяет использовать их в биоаналитических исследованиях.

Оценена принадлежность этилметилгидроксипиридина сукцината к субстратам и ингибиторам транспортера OATP1B1.

Расширены представления об участии этилметилгидроксипиридина сукцината в развитии фармакокинетических межлекарственных взаимодействий. Доказано, что этилметилгидроксипиридина сукцинат может безопасно комбинироваться в клинической практике с субстратами и ингибиторами OATP1B1 и не вступает с ними в фармакокинетические межлекарственные взаимодействия.

Получены новые данные о влиянии этилметилгидроксипиридина сукцината на экспрессию гена *SLCO1B1* и относительное количество OATP1B1.

Теоретическая и практическая значимость исследования

Разработана технология создания рекомбинантных клеточных линий, селективно гиперэкспрессирующих клинически значимые белки-транспортеры.

С помощью данной технологии создана клеточная линия, селективно гиперэкспрессирующая OATP1B1 (НЕК293-OATP1B1).

С применением клеток НЕК293-OATP1B1 налажена методика тестирования лекарственных веществ на принадлежность к субстратам, индукторам и ингибиторам OATP1B1.

Показано, что оригинальный отечественный антиоксидант и антигипоксанта ЭМГПС не является субстратом OATP1B1, не влияет на количество транспортера, однако ингибирует его активность в высоких концентрациях (существенно выше плазменных). Полученные результаты свидетельствуют о том, что ЭМГПС является безопасным в плане развития фармакокинетических межлекарственных взаимодействий на уровне OATP1B1, то есть может длительно совместно применяться с субстратами/ингибиторами данного транспортера.

Установлено, что изменение экспрессии гена *SLCO1B1* не является ведущим механизмом регуляции ОАТР1В1, так как гиперэкспрессия гена не приводит к эквивалентному увеличению уровня белка.

Разработаны методики ВЭЖХ-МС/МС анализа ЭМГП и аторвастатина. Они являются чувствительными, селективными, точными и прецизионными и пригодны для количественного определения данных веществ в биологических образцах.

Методология и методы исследования

Исследование выполнено *in vitro*.

Для создания рекомбинантной клеточной линии использовались клетки линии НЕК293. С помощью методов генной инженерии конструировали плазмиду с геном *SLCO1B1* (англ.: *Solute carrier organic anion transporter family member 1B1*), кодирующим транспортер ОАТР1В1, затем с помощью липофектамина 3000 проводили трансфекцию клеток и селекцию полученных клонов. В полученной клеточной линии (НЕК293-ОАТР1В1) с помощью метода ПЦР (полимеразная цепная реакция) в реальном времени подтверждали экспрессию гена *SLCO1B1*, методом вестерн-блот оценивали количество изучаемого белка. Активность ОАТР1В1 в рекомбинантной клеточной линии определяли по проникновению классического субстрата транспортера аторвастатина внутрь клеток, концентрацию которого детектировали методом ВЭЖХ-МС/МС.

Принадлежность ЭМГП к субстратам ОАТР1В1 анализировали с помощью сравнения его проникновения в клетки НЕК293 и НЕК293-ОАТР1В1, а концентрацию тестируемого вещества детектировали методом ВЭЖХ-МС/МС. Влияние ЭМГПС на активность ОАТР1В1 оценивали по изменению проникновения субстрата транспортера аторвастатина внутрь клеток НЕК293-ОАТР1В1.

Влияние ЭМГПС на экспрессию гена *SLCO1B1* анализировали в клетках HepG2 методом ПЦР в реальном времени, на количество белка ОАТР1В1 – методом вестерн-блот.

Для подтверждения полученных результатов об ингибировании ЭМГПС активности ОАТР1В1 выполняли аналогичные эксперименты на клеточной линии

гепатоцеллюлярной карциномы – HepG2, экспрессирующей OATP1B1.

Клиническую значимость полученных результатов оценивали с помощью подхода международных регуляторных организаций (FDA, EMA) с расчетом отношения C_{max} (максимальная концентрация ЭМГПС в плазме крови пациентов) к IC_{50} (концентрация полумаксимального ингибирования) ЭМГПС, установленной в выполненных экспериментах *in vitro*.

Полученные результаты анализировались с помощью программ «Statsoft Statistica 13.0» (США, номер лицензии JPZ811I521319AR25ACD-W) и GraphPad Prism 8.1.2. (GraphPad Software, США). Данные в работе представлены как среднее арифметическое $\pm$ стандартное отклонение (SD). Различия между группами определяли с помощью дисперсионного анализа (ANOVA) с последующим применением критерия Даннетта при сравнении более чем двух групп и непарного t-критерия Стьюдента при сравнении двух групп. Значения $p < 0,05$ считались статистически значимыми. Кинетические параметры K_m (константа Михаэлиса) и V_{max} (максимальная скорость поглощения) рассчитывали с использованием уравнения конкурентного ингибирования.

Положения, выносимые на защиту

1. Использование разработанной и апробированной в ходе исследования методики тестирования лекарственных веществ на принадлежность к субстратам, ингибиторам и индукторам полипептида, транспортирующего органические анионы, 1B1, позволяет прогнозировать развитие фармакокинетических межлекарственных взаимодействий на уровне данного транспортера.
2. Предложенные оптимизированные и валидированные ВЭЖХ-МС/МС методики детекции этилметилгидроксипиридина и аторвастатина пригодны для их быстрого и точного количественного определения в биологических образцах.
3. Этилметилгидроксипиридин не является субстратом и клинически значимым ингибитором полипептида, транспортирующего органические анионы, 1B1, поэтому не участвует в развитии фармакокинетических межлекарственных взаимодействий на уровне транспортера OATP1B1.

Степень достоверности исследования

Высокая степень достоверности результатов обусловлена достаточным объемом экспериментальных данных, полученных на клетках *in vitro* с использованием адекватных и современных методов исследований (генной инженерии, микроскопии, полимеразной цепной реакции в режиме реального времени, вестерн блот, высокоэффективной жидкостной хроматографии с tandemным масс-спектрометрическим детектированием) с последующей систематизацией и статистической обработкой. Степень достоверности проведенного исследования подтверждается использованием современных, адекватных и корректных методик обработки полученных результатов с помощью специализированного программного обеспечения – «Statsoft Statistica 13.0» (США) и GraphPad Prism 8.1.2. (GraphPad Software, США).

Апробация работы

Основные положения диссертации представлены, обсуждены и опубликованы в материалах Студенческого биохимического форума – 2023 (Москва, 2023); VIII Всероссийской с международным участием студенческой научно-образовательной конференции «Актуальные вопросы студенческой медицинской науки и образования» (Рязань, 2022); XXIX Международной научной конференции студентов, аспирантов и молодых ученых «Ломоносов» (Москва, 2022); 25-й Пущинской школы-конференции молодых ученых с международным участием «Биология – наука XXI века» (Пущино, 2022); 26-й Пущинской школы-конференции молодых ученых с международным участием «Биология – наука XXI века» (Пущино, 2023); Всероссийской научно-практической конференции, посвященной 15-летию создания фармацевтического отделения на факультете фундаментальной медицины МГУ (Москва, 2023).

Апробация работы состоялась 25 декабря 2023 года на заседании кафедр ФГБОУ ВО РязГМУ Минздрава России: фармакологии; биологической химии; биологии; фармацевтической химии и фармакогнозии; управления экономики и фармации, фармацевтической технологии (Протокол №1 от 25.12.23).

Внедрение результатов исследования в практику

Основные результаты диссертационной работы успешно внедрены и используются в учебном процессе при обучении студентов и клинических ординаторов на кафедре фармакологии института фармации и медицинской химии ФГАОУ ВО «Российский национальный исследовательский медицинский университет им. Н.И. Пирогова» Минздрава России (Протокол №1 от 28.08.23), в работе лаборатории клеточных технологий НЦИЛС ФГБОУ ВО «Волгоградский государственный медицинский университет Минздрава России» (Акт внедрения от 17.11.2023), в работе ЦНИЛ ФГБОУ ВО «Рязанский государственный медицинский университет имени И.П. Павлова Минздрава России» (Акт внедрения от 01.09.2023).

Личный вклад автора в исследование

Автору принадлежит основная роль на всех этапах исследования. Автор самостоятельно выбрал тему диссертационного исследования, изучил литературу по тематике исследования и подготовил обзор литературы по направлению темы диссертационной работы. Автор принимал непосредственное участие в разработке методологии и определении необходимых методов исследования. Автор лично провел эксперименты *in vitro*, выполнил молекулярно-генетические (ПЦР-анализ), масс-спектрометрические (ВЭЖХ-МС/МС) исследования, а также исследования методом вестерн-блот. Автор самостоятельно провел обработку и интерпретацию полученных в ходе исследования результатов и подготовил текст диссертации. Автор самостоятельно подготовил и опубликовал научные работы по результатам диссертационного исследования, а также внедрил их в образовательный и рабочий процесс. Результаты исследования были доложены автором лично на конференциях различного уровня.

Соответствие диссертации паспорту научной специальности

Научные положения диссертации соответствуют паспорту специальности 3.3.6. Фармакология, клиническая фармакология (медицинские науки) и соответствующим направлениям исследований: п. 6. Изучение фармакодинамики,

фармакокинетики и метаболизма лекарственных средств. Установление связей между дозами, концентрациями и эффективностью лекарственных средств. Экстраполяция полученных данных с биологических моделей на человека; п. 9. Изучение взаимодействия лекарственных средств, разработка наиболее рациональных комбинаций при проведении современной фармакотерапии.

Публикации по теме диссертации

По теме исследования опубликовано 6 печатных работ, отражающих основные результаты диссертации, в т.ч. 5 статей, в журналах, рекомендованных ВАК при Министерстве науки и высшего образования Российской Федерации для опубликования основных научных результатов диссертаций, из которых в журналах, включенных в международные базы данных SCOPUS и Web of Science – 4 статьи.

Структура и объем диссертации

Диссертационная работа изложена на 119 страницах и включает в себя следующие разделы: введение, глава 1 – обзор литературы, глава 2 – материалы и методы исследования, глава 3 – результаты исследования, обсуждение полученных результатов, заключение, выводы, практические рекомендации, перспективы дальнейшей разработки темы, список сокращений, список литературы.

Диссертация иллюстрирована 21 рисунком и 15 таблицами. Список литературы представлен 178 источниками, включая 57 источников отечественной и 121 источник зарубежной литературы.

ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1. Структура, локализация и механизмы регуляции полипептида, транспортирующего органические анионы, 1B1 (OATP1B1)

Белки-транспортеры, способные переносить эндо- и экзобиотики, играют одну из ключевых ролей в фармакокинетике веществ, являющихся их субстратами, регулируя процессы всасывания, распределения, биотрансформации и выведения.

Все белки-транспортеры можно разделить на две большие группы: ABC-транспортеры и SLC-транспортеры.

ABC-транспортеры (*англ.: ATP-binding cassette transporters*) для переноса субстратов через билипидную мембрану из цитоплазмы во внеклеточное пространство и биологические жидкости (эффлюксные транспортеры) используют энергию, выделяющуюся при гидролизе молекулы АТФ [171].

SLC-белки (*англ.: Solute carrier transporters*) транспортируют субстраты за счет разности электрохимических потенциалов или ионного градиента, не используя при этом энергию АТФ, т.е. SLC-транспортеры относятся ко вторично-активным транспортерам [83]. В основном SLC-транспортеры опосредуют проникновение веществ в клетки, то есть являются инфлюксными транспортерами, однако некоторые могут функционировать как эффлюксные транспортеры (например, MATEs (*англ.: multidrug and toxin extrusion proteins*)) или же опосредовать двунаправленный транспорт веществ [150, 169].

У человека на сегодняшний день идентифицировано более 550 представителей SLC-белков [155], которые объединены в несколько надсемейств (Таблица 1).

Таблица 1 – Ключевые надсемейства SLC-белков (Цит. по: D. Drew, 2021 [155])

Название надсемейства	Функция
SLC2	Переносчики GLUT (facilitated diffusion glucose transporters family)
SLC15	Котранспортеры белковых олигопептидов (protein oligopeptide cotransporter family, PEPTs)
SLC16	Транспортеры монокарбоксилатов (monocarboxylate transporter family)
SLC17	Везикулярные переносчики глутамата (vesicular glutamate transporter family)
SLC18	Везикулярные переносчики аминов (vesicular amine transporter family)
SLC19	Переносчики фолатов и тиаминов (folate/thiamine transporter family)
SLCO/SLC21	Транспортеры органических анионов (organic anion-transporting polypeptides, OATPs)
SLC22	Транспортеры органических катионов/анионов/цвиттерионов (organic anion transporters, OATs; organic cation transporters, OCTs; organic cation/carnitine transporters, OCTNs)
SLC29	Облегченные переносчики нуклеозидов (facilitative nucleoside transporter family)
SLC33	Переносчики ацетил-КоА (acetyl-CoA transporter family)

SLC40	Базолатеральные переносчики железа (basolateral iron transporter family)
SLC43	Na ⁺ -независимые системо-L-подобные переносчики аминокислот (Na ⁺ - independent, system-L like amino acid transporter family)
SLC45	Протон/сахарные котранспортеры (putative sugar transporter family)
SLC46	Транспортеры фолатов (folate transporter family)
SLC47	Эффлюксные переносчики лекарств и токсинов (multidrug and toxin extrusion, MATEs)
SLC49	Транспортеры, связанные с клеточным рецептором подгруппы C вируса лейкемии кошек (Feline Leukemia Virus Subgroup C Cellular Receptor - related transporter family)

Практически все SLC-транспортеры сходны по своему строению: 12 трансмембранных доменов (TMD), N- и C-концевые участки переносчика зафиксированы на цитоплазматической мембране (Рисунок 1) [40].

Часто N-концевая часть молекулы (трансмембранные домены 1-6) демонстрирует слабую гомологию последовательностей с C-концевой частью (трансмембранные домены 7-12). Это может означать, что молекула переносчика могла возникнуть после удвоения или слияния генов.

Однако в «правиле 12 доменов» есть и исключения: некоторые семейства переносчиков содержат 14, 24 и 6 трансмембранных доменов, что отличает их от всех остальных представителей суперсемейства. Наличие 14 доменов, вероятно,

произошло из-за встраивания центральной петли белка в цитоплазматическую мембрану клетки; появление 24-доменных белков, предположительно, произошло в результате слияния генов; 6-доменный белок может функционировать как гомодимер [113].

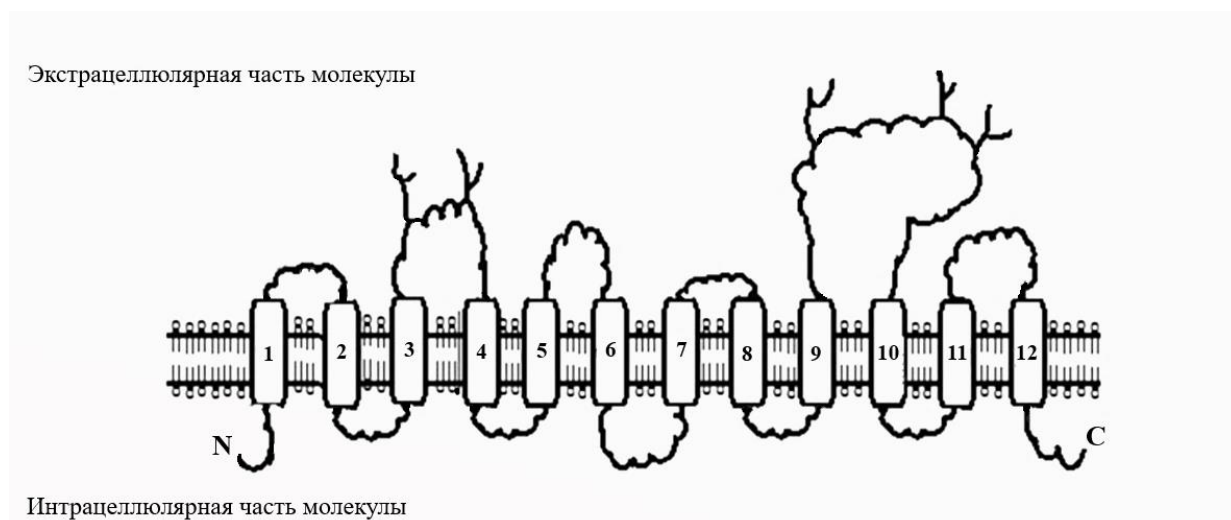


Рисунок 1 – Вторичная структура SLC-транспортера на примере ОАТР-надсемейства (Цит. по X. Liu, 2019 [116-117])

Примечание – буквами «N» и «C» отмечены N- и C-концевой фрагменты молекулы; цифрами от 1 до 12 промаркированы трансмембранные домены молекулы.

Надсемейство ОАТР является одним из самых изученных и клинически значимых членов суперсемейства SLC-транспортеров. Транспортеры органических анионов (ОАТР, *англ.: organic anion transporting polypeptides*) были обнаружены у бактерий, низших эукариот, растений и животных, причем не только у человека и лабораторных мышей и крыс, но также и у плодовой мушки (*Drosophila melanogaster*), пчелы (*Apis mellifera*), нематоды (*Caenorabditis elegans*), морского ежа (*Strongylocentrotus purpuratus*), канального сома (*Ictalurus punctatus*), данио (*Danio rerio*), фугу (*Fugu rubripes*), шпорцевой лягушки (*Xenopus laevis*), курицы (*Gallus gallus*), коровы (*Bos taurus*) и свиньи (*Sus scrofa*). ОАТР человека обозначаются заглавными буквами, а Oatp других животных – строчными [95], [116-117].

Согласно классификации, предложенной комитетом по номенклатуре генов HUGO (2004), ОАТР разделяются на семейства и подсемейства согласно гомологии аминокислотной последовательности.

ОАТР/Oatp, у которых аминокислотная последовательность идентична более чем на 40%, относят к одному семейству (ОАТР1, ОАТР2, ОАТР3, ОАТР4, ОАТР5 и ОАТР6). Белки с аминокислотной идентичностью 60% и более объединяются в одно подсемейство (ОАТР1А, ОАТР1В, ОАТР1С) [95]. Идентифицированные у человека транспортеры органических анионов (всего – 11) разделены на 6 семейств. Самым изученным и крупным из них является ОАТР1-семейство, которое, в свою очередь, состоит из 3 подсемейств: ОАТР1А, ОАТР1В и ОАТР1С (Рисунок 2).

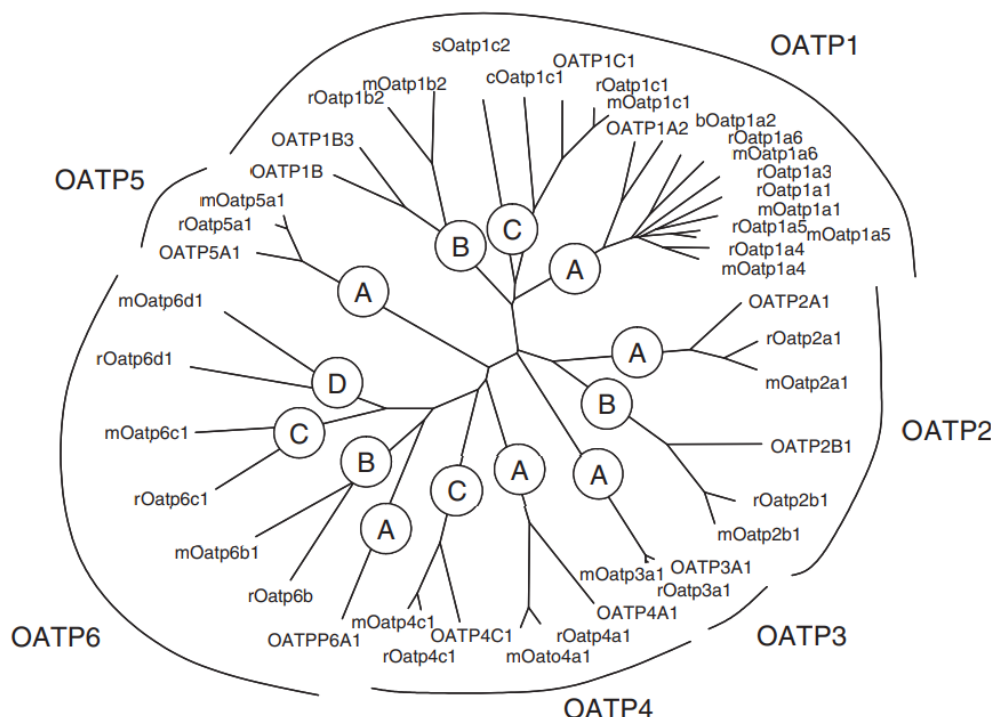


Рисунок 2 – Филогенетическое дерево надсемейства ОАТР-белков (Цит. по: В. Hagenbuch & C. Gui, 2008 [97])

Подсемейство ОАТР1В включает два представителя (ОАТР1В1 и ОАТР1В3), которые считаются специфичными печеночными белками, так как экспрессированы преимущественно в гепатоцитах [97].

Структура ОАТР1В1

ОАТР1В1 (в литературе встречаются более старые названия – ОАТР2, ОАТР-С, LST-1, SLC21A6) человека представляет собой гликопротеин с 691 аминокислотным остатком, который кодируется геном *SLCO1B1*. Транспортер

обладает молекулярной массой около 84 кДа, которая после дегликозилирования уменьшается примерно до 54 кДа [62, 97].

ОАТР1В1, как и все представители надсемейства транспортеров органических анионов, состоит из 12 трансмембранных доменов (TMDs, *англ.: transmembrane domains*), причем N- и C-концевые фрагменты расположены на цитоплазматической части мембраны [132, 142].

Считается, что N-концевой фрагмент молекулы практически не оказывает влияния на транспортную функцию переносчика, в отличие от C-концевой части [94].

Молекула ОАТР1В1 как бы пронизана 6 экстра- и 7 интрацеллюлярными гидрофильными петлями, самая крупная из которых (экстрацеллюлярная петля 5) соединяет домены 9 и 10. Эта петля содержит множество цистеиновых остатков, образующих между собой дисульфидные мостики. Предположительно, остатки цистеина могут быть необходимы для встраивания белка в плазматическую мембрану. Экстрацеллюлярные петли 2 и 5 содержат сайты N-гликозилирования [129, 132], а негликозилированный белок расположен в эндоплазматическом ретикулуме [154]. Интрацеллюлярная петля между 6 и 7 доменами содержит сайты фосфорилирования [132].

Кроме того, описана так называемая «сигнатурная область» (*англ.: «signature region»*) D-X-RW-(I,V)-GAWW-XG-(F,L)-L, которая расположена на границе между 3 экстрацеллюлярной петлей и TMD 6 [158].

Консервативные аминокислоты (обуславливают эволюционное родство белков) обнаруживаются преимущественно в TMD 2 - 6, в экстрацеллюлярных петлях 1, 3, 5 и в интрацеллюлярных петлях 1, 2, 4 и 5. Консервативные заряженные аминокислоты располагаются, как правило, на границах TMD, причем особенно часто — на цитоплазматической части мембраны молекулы. Внутри мембраны заряженных аминокислот существенно меньше, единственные сохранившиеся из них находятся в доменах 2, 11 и 12 [96].

Считается, что ведущую роль для осуществления транспортных функций ОАТР1В1 играют TMD 2, 6, 8, 9, 10, а также экстрацеллюлярная петля 6 [63, 142].

Четыре аминокислотных остатка в TMD 10 (L545, F546, L550 и S554) важны для осуществления транспортных функций OATP1B1. Анализ спирального колеса и молекулярное моделирование показывают, что L545 обращен к предполагаемому пути перемещения субстрата и может взаимодействовать непосредственно с субстратами, тогда как F546, L550 и S554, по прогнозам, обращены к внутренней части белка. Эти три аминокислотных остатка, скорее всего, влияют на нормальную структуру белка [94].

Аминокислотные остатки, локализованные в TMD 2, необходимы для стабилизации белка с помощью солевого мостика (E74) и для распознавания субстрата (D70) [162].

Замена A45 в TMD 1, L545 в TMD 10 и T615 в экстрацеллюлярной петле 6 OATP1B1 на соответствующие аминокислоты в OATP1B3 привела к тому, что OATP1B1 начал транспортировать холецистокинин-октапептид (ССК-8, *англ.: cholecystokinin octapeptide*), который является специфическим субстратом OATP1B3 [106].

Домены связаны между собой тремя водородными связями. Эти же связи участвуют в формировании центральной поры, имеющей суммарный положительный заряд. Положительный заряд обеспечивается остатками аргинина, лизина, аспарагина, глутамина и гистидина, помещенными внутрь поры, причем аргинин в положении 181 является уникальным для семейства OATP1 остатком [40, 123].

Для того чтобы создать предполагаемую трехмерную модель OATP1B1, был использован метод гомологического моделирования. Основываясь на этих моделях, группа ученых выявила несколько положительно заряженных аминокислот (R57, K361 и R580), которые покрывают изнутри пору для субстрата и являются важными участниками транспортного цикла [174]. Предположительно, эти аминокислотные остатки являются частями сайта связывания субстрата. В пользу этой гипотезы говорит тот факт, что мутации этих аминокислот приводили к снижению сродства молекулы к эстрадиол-17-β-глюкурониду, являющемуся

субстратом OATP1B1 [154]. Считается, что именно эти аминокислоты играют ведущую роль в формировании трехмерной структуры транспортера (Рисунок 3).

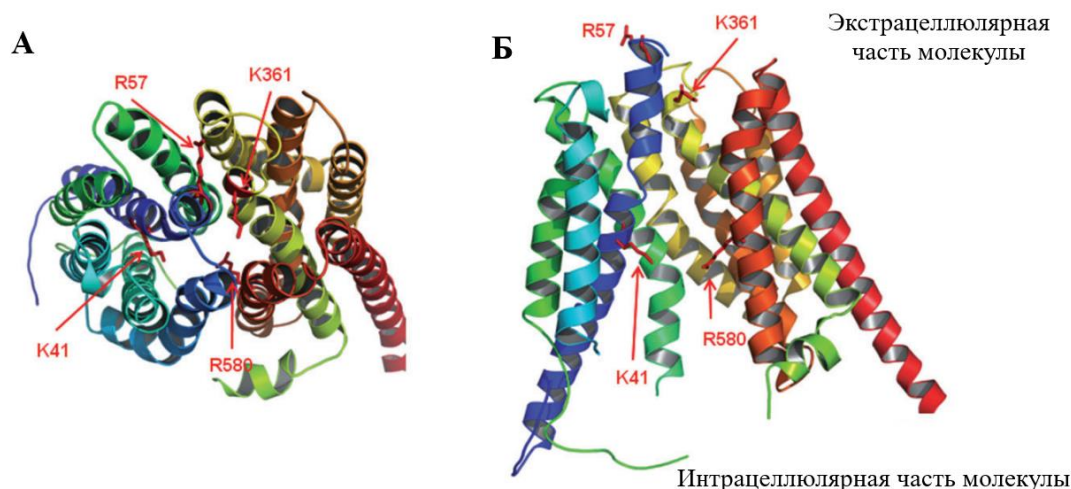


Рисунок 3 – Строение OATP1B1 (Цит. по: M. Roth; 2012 [147])

Примечание – А – OATP1B1 с внеклеточной стороны; Б – OATP1B1 с внутренней стороны липидного бислоя.

Мутации внутриклеточных K90, H92 и R93 снижали транспортную активность переносчика. Мутантные R181K и R580A снижали экспрессию человеческого OATP1B1 [154].

Транспортный цикл OATP1B1

До настоящего времени транспортный механизм всего надсемейства OATP-белков остается малоизученным.

Считается, что OATP-опосредованный транспорт не связан с концентрацией калия, натрия, хлорид-иона и уровнем АТФ [116-117].

Одна из первых гипотез [151] предполагала, что OATP-белки работают как антипортеры, причем антипорт осуществляется по электронейтральному механизму [157]. Так, на клетках линии HeLa-Oatp1b1 было установлено, что транспорт таурохолата (является субстратом натрий-таурохолат-котранспортёра, также относящегося к SLC-переносчикам, и OATP1B1) был сопряжен с эффлюксом бикарбонат-иона [151].

Предположительно, рН способен влиять на транспортные функции OATP1B1. Р. Martinez-Becerra и др. (2011) установили, что функциональная активность белка-транспортера снижается при снижении рН [93].

J.C. Taylor-Wells (2013) высказала предположение, что рН способен облегчить перенос субстрата OATP1B1, возможно, посредством индукции конформационного изменения или в качестве движущей силы для оттока протонов или бикарбоната [157].

S. Leuthold и др. (2009) сообщают, что снижение внеклеточного рН до 6,5 стимулирует перенос таурохолата, эстрон-3-сульфата, простагландина E2 и тироксина, по сравнению с аналогичными показателями транспорта при рН 8,0 [121].

В другом исследовании было описано, что основной движущей силой при транспорте с участием Oatp у грызунов и у человека является восстановленный глутатион и его конъюгат S-(2,4-динитрофенил)-глутатион [101]. Однако более поздние исследования говорят о том, что глутатион не является субстратом или активатором OATP1B1 [98].

Известно, что транспортные функции OATP1B1 не связаны с обменом α -кетоглутарата, в отличие от OATP1A1 [102].

D. Drew и др. (2021) в своей работе отметили, что, несмотря на структурное сходство OATP с каналами, их активность подобна ферментам и описывается кинетикой Михаэлиса-Ментен. Это значит, что активность OATP достигает максимума при высоких концентрациях субстрата, а транспорт субстрата в этот момент выходит на плато, что говорит о насыщении белка. Транспортер в этот период находится в окклюдированном состоянии, причем доступ к сайтам связывания закрыт с обеих сторон [155].

Локализация и функции OATP1B1

OATP1B1 был выделен из человеческой печени с использованием кДНК-библиотеки тремя независимыми научными группами [61-62, 100]. Этими же авторами с помощью метода Northern blot было установлено, что OATP1B1 является специфичным для печени белком.

В гепатоцитах OATP1B1 локализован преимущественно на базолатеральной мембране. Интересно, что OATP1B1 экспрессирован в печеночной дольке диффузно, в отличие от его ближайшего гомолога OATP1B3, который локализован вокруг центральной вены дольки (Рисунок 4) [114, 142].

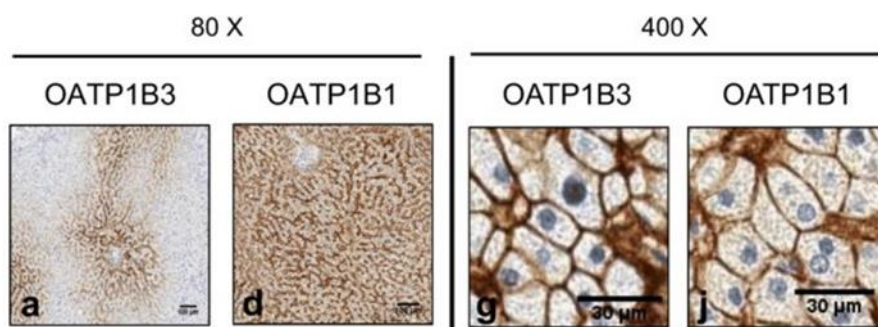


Рисунок 4 – Локализация представителей OATP1B подсемейства в печени

(Цит. по: A. Crowe & W. Zheng, 2019 [71])

В ряде исследований говорится о том, что мРНК *SLCO1B1* также была обнаружена в энтероцитах, клетках рака молочной железы, клетках карциномы яичников, гепатоцеллюлярной карциноме, полипах толстого кишечника, клетках рака толстого кишечника, простаты, легкого, поджелудочной железы [117, 142].

OATP1B1 также был выявлен на базальной мембране клеток Сертоли и диффузно – в клетках Лейдига [120].

Вне зависимости от локализации OATP1B1 его функция заключается в инфлюксе, то есть, переносе экзо- и эндобиотиков в клетки.

Учитывая преимущественную локализацию OATP1B1 в гепатоцитах, считается, что выполняемая им функция в основном заключается в переносе веществ-субстратов из крови в гепатоциты, где они подвергаются биотрансформации.

Субстраты OATP1B1

OATP1B1 обладает широкой субстратной специфичностью, что может быть объяснено наличием нескольких сайтов связывания субстрата в структуре белка. Это предположение подтверждается несколькими исследованиями.

C. Gui и B. Hagenbuch (2009), J. Noe et al. (2007) изучали кинетику одного из субстратов OATP1B1, эстрон-3-сульфата, и обнаружили ее двухфазность. Все

научные группы объяснили это наличием 2 сайтов связывания субстрата, один из которых является высокоаффинным и имеет малую емкость (high-affinity, low-capacity binding site), а второй является низкоаффинным, но имеет большую емкость (low-affinity, high-capacity binding site) [94, 156].

Субстратами данного транспортера являются преимущественно амфифильные вещества с молекулярной массой более 350 Да. Ими могут быть как препараты, относящиеся к различным фармакологическим группам (антигипертензивные, сердечные гликозиды, статины, антигистаминные, противоопухолевые, антибактериальные), так и эндогенные соединения (стероидные и тиреоидные гормоны, билирубин и его соли, желчные кислоты и их соли (таурохолат, гликохолат), простеноиды) (Таблица 2) [137, 163].

Модель фармакофора, разработанная для ОАТР1В1 на основе опубликованных значений Км субстратов ОАТР, предполагает, что субстраты содержат два акцептора водородных связей, один донор водородных связей и две гидрофобные области [147].

Таблица 2 – Основные субстраты ОАТР1В1 (по [130] и [147])

Эндогенные соединения	
Желчные кислоты	Холевая кислота
	Гликохолевая кислота
	Урсодезоксихолевая кислота
	Гликоурсодезоксихолевая
	Таурохолевая кислота
	Тауроурсодезоксихолевая кислота
Тиреоидные гормоны	Трийодтиронин
	Тироксин

Продолжение Таблицы 2

Билирубин и его соли	Билирубин Билирубин-глюкуронид Бисглюкуронозил билирубин Моноглюкуронозил билирубин
Простеноиды	Pg E ₁ PgE ₂ LTC ₄ LTE ₄ TxA ₂ TxV ₂
Конъюгированные стероиды	Дегидроэпиандростерона сульфат Эстрадиол-17β-глюкуронид Эстрон-3-сульфат
Ксенобиотики	
Ингибиторы ГМГ-КоА-редуктазы	Аторвастатин Питавастатин Правастатин Флувастатин Розувастатин Симвастатин
Ингибиторы всасывания холестерина	Эзетимиб
Антибактериальные средства	Бензилпенициллин Нафциллин Цефазолин Цефдиторен

	Цефоперазон Рифампицин Эритромицин Кларитромицин
Ингибиторы АПФ	Эналаприл Темокаприл
Блокаторы рецепторов ангиотензина II	Валсартан Олмесартан
Антагонисты эндотелиновых рецепторов	Бозентан
Противогрибковые средства	Каспофунгин
Антиретровирусные средства	Дарунавир Лопинавир Саквинавир Маравирок
Стимуляторы гемопоэза	Эльтромбопаг
Противоопухолевые	Гиматекан Пазопаниб
Цитостатики	Гидроксикарбамид
Салицилаты	Месалазин
Антиметаболиты	Метотрексат
Тиазолидиндионы	Троглитазон
Диуретики	Торасемид

Ингибиторы OATP1B1

Для ряда лекарственных веществ была показана способность ингибировать активность OATP1B1 (Таблица 3).

ОАТР1В1 играет важную роль в развитии фармакокинетических МЛВ. Так как данный транспортер участвует в транспорте субстратов в гепатоциты, где осуществляется их метаболизм, ингибирование функциональной активности ОАТР1В1 может привести к накоплению его субстратов в крови и развитию нежелательных лекарственных реакций.

Таблица 3 – Ингибиторы функциональной активности ОАТР1В1 (Цит. по: А. Kalliokoski, & М. Niemi, (2009), Y. Shitara (2011) [108, 149])

Фармакологическая группа	Препарат
Противоэпилептические средства	Карбамазепин
Макролиды	Кларитромицин Эритромицин Рокситромицин Телитромицин
Иммунодепрессанты	Циклоспорин
Противогрибковые средства	Клотримазол Кетоконазол
Сердечные гликозиды	Дигоксин
Пероральные сахароснижающие средства (производные сульфонилмочевины)	Глибенкламид
Антиретровирусные средства	Индинавир Ритонавир
Ингибиторы ГМГ-КоА-редуктазы (статины)	Ловастатин Симвастатин
Противотуберкулезные	Рифампицин
Блокаторы рецепторов ангиотензина II	Валсартан

Полиморфизм гена SLCO1B1

На сегодняшний день для ОАТР1В1 описано достаточное количество однонуклеотидных полиморфизмов (SNP, *англ.: single nucleotide polymorphism*),

однако далеко не все из них влияют на транспортные функции или экспрессию транспортера (Таблица 4). SNP rs4149056 (с.521 T>C, или *SLCO1B1**5) и rs2306283 (с.388 A>G) значительно изменяют транспорт субстратов ОАТР1В1. SNP rs11045879 (с.1865 + 4846 T>C), rs10841753 (с.85–4214 T>C) не изменяют активность ОАТР1В1, но изменяют ответ на метотрексат, а *SLCO1B1**15 (с.388G-с.463C-с.521C-с.1929A, содержит одновременно с.521 T>C и с.388 A> G) изменяет ответ на таксаны и иринотекан, а также снижает функциональную активность транспортера [135, 165].

Также снижают функциональную активность и ряд других полиморфных вариантов, например, *SLCO1B1**23, *SLCO1B1**31, *SLCO1B1**46–*49. И напротив, SNP *SLCO1B1**14 (с.388G-с.463A-с.521T-с.1929A) и *SLCO1B1**20 повышали активность ОАТР1В1, так как стимулировали его экспрессию.

Гендерные различия также отражаются на клиническом эффекте отдельных SNP. Так, в исследовании было показано, что пациенты женского пола с с.521T>C (р.V174A), *SLCO1B1**5 и *SLCO1B1**15 имеют более высокий уровень холестерина по сравнению с мужчинами, а также отмечали более низкую эффективность статинотерапии, в связи с чем самостоятельно ее прекращали [152].

Кроме однонуклеотидных, известны также варианты больших делеций, захватывающих как отдельные участки, так и весь *SLCO1B1* ген полностью, хотя подобные варианты встречаются крайне редко (0,15% всех случаев) [160].

Самые большие известные делеции распространяются более чем на 400 килобаз и, как правило, включают сразу три гена – *SLCO1B7*, *SLCO1B1* и *SLCO1A2* (так как они находятся в непосредственной близости друг от друга на 12p12 участке). Частичные делеции *SLCO1B1* чаще всего затрагивают экзоны 1 и 2, реже – экзоны с 1 по 6. Консорциум по фармакогенным вариациям (PharmVar) присвоил наименование *SLCO1B1**48 для описания полных делеций гена, и *SLCO1B1**49 – для частичных [135].

Также было установлено, что носительство хотя бы одной С-аллели по аллельному варианту *SLCO1B1**5 (T521C) способно значительно повышать риск

развития статин-индуцированной миопатии, причем у носителей генотипа СС данная патология диагностировалась намного чаще (до 60%) [34].

Вариант OATP1B1*15/*15 значительно снизил транспорт розувастатина. Было установлено, что транспорт розувастатина в клетках линии НЕК-OATP1B1*15 практически не отличался от клеток, трансфицированных вектором (то есть вообще не экспрессирующих транспортер) [82].

Также полиморфный вариант OATP1B1*5 был сопряжен с низким инфлюксом антибактериального препарата эритромицин, опосредованным OATP1B1 [39].

У носителей аллели 521T>C (причем как у гомозигот, так и гетерозигот) были зафиксированы более высокие значения AUC (*англ. area under the curve*), C_{max} и C_{min} антиретровирусного препарата маравирок по сравнению с референсной гомозиготой ТТ [111].

Таблица 4 – Краткая характеристика наиболее изученных однонуклеотидных полиморфизмов *SLCO1B1* (Цит. по: N. Anabtawi, 2022 и L. Ramsey, 2023) [135, 165]

SNP	Изменения нуклеотидов	Изменения функций OATP1B1	Фармакологический эффект	Ссылки
rs4149056	c.521 T > C	Снижена	Изменение ответа на терапию статинами, метотрексатом, антрациклинами	[110, 134]
rs2306283	c.388A>G	Снижена/ Не изменена	Развитие синдрома Ротора, синдрома Гилберта; изменение ответа на терапию метотрексатом	[110, 134]
rs11045879	c.1865 + 4846 T > C	Неизвестно	Изменение ответа на терапию метотрексатом	[165]
rs10841753	c.85–4214 T > C	Неизвестно	Изменение ответа на терапию метотрексатом	[165]

rs4149056 и rs2306283 одновременно	c.521 T > C c.388A>G	Снижена	Изменение ответа на терапию таксанами и иринотеканом	[165]
rs4149080	NG_011745.1:g.98 432G>C	Неизвестно	Изменение ответа на терапию метотрексатом	[135]
rs2900478	NG_011745.1:g.89 670T>A	Неизвестно	Изменение ответа на статинотерапию	[133]
rs10841753	c.85–4214 T > C	Неизвестно	Изменение ответа на терапию метотрексатом	[165]

Таким образом, OATP1B1 является инфлюксным транспортером, экспрессирующимся преимущественно в гепатоцитах и обладающим широкой субстратной специфичностью. Функционирование и механизмы регуляции OATP1B1 активно изучаются в настоящее время. Однако, несмотря на большое число научных работ, посвященных данной проблеме, единого мнения о механизмах работы белка-транспортера до сих пор нет. Учитывая локализацию OATP1B1 в гепатоцитах, считается, что выполняемая им функция в основном заключается в переносе веществ-субстратов без затраты энергии АТФ из крови в гепатоциты, где они подвергаются биотрансформации.

1.2. Роль OATP1B1 в развитии межлекарственных взаимодействий

Межлекарственные взаимодействия остаются одной из важнейших проблем современной фармакотерапии, так как могут стать причиной развития нежелательных лекарственных реакций. Последние систематические обзоры сообщают, что 8,3% [6,4–10,7%] экстренных обращений в стационары связаны с развитием НЛР, причем 2/3 из них (71,0 % [65,9; 75,6%]) оценивались как минимум как предотвратимые [175].

Частой причиной НЛР становятся межлекарственные взаимодействия (МЛВ). Традиционно их делят на фармакокинетические и фармакодинамические. Одним из

уровней, на котором могут развиваться фармакокинетические МЛВ, является уровень белков-транспортёров [43], в том числе и OATP1B1.

Несмотря на широкую субстратную специфичность, включающую множество кардиологических лекарственных веществ (статины, сартаны, ингибиторы АПФ, сердечные гликозиды), основную роль OATP1B1 играет в фармакокинетике статинов (аторвастатина, питевастатина, правастатина, флувастатина, розувастатина, симвастатина) [167].

Являясь группой выбора при терапии гиперхолестеринемий различного генеза, они могут вызывать опасные побочные эффекты, такие, как гепатотоксичность, миалгия, миопатии и рабдомиолиз, который считается самым опасным из них [38, 64 153, 173].

В исследовании Т. Hirota и др. (2020) было показано, что однократное внутривенное введение рифампицина - ингибитора OATP1B1 вызвало увеличение площади под фармакокинетической кривой для аторвастатина в 6,8 раз, а для розувастатина – более, чем в 2-3 раза. Авторы также изучили влияние комбинации глекапревира и пибрентасвира (препараты для лечения гепатита С) на активность OATP1B1 и кинетику правастатина. Так, совместное назначение данных противовирусных средств с правастатином привело к повышению его AUC на 128% у здоровых добровольцев, что объясняется ингибирующим действием глекапревира и пибрентасвира на OATP1B1 [65, 73].

Фалдапревир (ингибитор протеазы, применяемый для терапии хронического гепатита С) при приеме в дозе 240 мг/д в течение 6 дней повышал AUC аторвастатина после его однократного применения в дозе 10 мг на 842%, а AUC розувастатина в эквивалентной дозе – на 1370% [87].

В другом исследовании изучалось влияние гемфиброзила на фармакокинетические параметры церивастатина. Авторы установили, что совместное назначение гемфиброзила и церивастатина привело к увеличению AUC церивастатина в 6 раз. Это обусловило развитие побочных эффектов церивастатина, в результате чего был зарегистрирован 31 летальный исход, что привело к отзыву церивастатина с рынка США компанией Bayer в 2001 г.

Считается, что основным механизмом, лежащим в основе этого взаимодействия, является ингибирование фермента CYP2C8, отвечающего за метаболизм церивастатина; однако ингибирование инфлюксных транспортеров OATP1B1, OATP1B3, OATP2B1 также внесло вклад в развитие данных эффектов [127].

В исследовании D.W. Schneck и др. (2004) было показано, что прием гемфиброзила в дозе 600 мг 2 раза в день в течение 7 дней вызывал повышение плазменной концентрации розувастатина в 2 раза, что может приводить к развитию статин-индуцированной миопатии [161].

Циклоспорин А часто используется в исследованиях как ингибитор функциональной активности OATP1B1 [126]. Однако в исследовании S.W. Yee (2019) и др. было показано, что влияние циклоспорина А на фармакокинетику правастатина было снижено у лиц, гомозиготных по с.521С, по сравнению с гетерозиготами и лицами, гомозиготными по референсному аллелю с.521Т. Более того, плазменная концентрация правастатина была статистически значимо выше у пациентов, гомозиготных по с.521-СС, так как данная мутация в целом характеризуется сниженной функцией транспортера. Аналогичные результаты были получены и при исследовании другого ингибитора OATP1B1 рифампицина. Вероятно, в том случае, когда функциональная активность белка-переносчика уже снижена по причине мутации, ингибирующий эффект рифампицина и циклоспорина А нивелируется [131].

Было изучено влияние полиморфизмов гена *SLCO1B1* *SLCO1B1**1b/*1b (с.388G-с.463C-с.521T-с.1929A) и *SLCO1B1**15/*15 (с.388G-с.463C-с.521C-с.1929A) на фармакокинетику и взаимодействие между олмесартаном и правастатином. Максимальная плазменная концентрация была выше в группе гаплотипа *15/*15, а клиренс, напротив, ниже, чем в группе *1b/*1b. Однако после одновременного назначения правастатина и олмесартана в группе *1b/*1b C_{max} значительно возросла, а клиренс упал, в то время как аналогичные показатели в группе *15/*15 претерпели лишь незначительные изменения. Это говорит о конкуренции олмесартана и правастатина за OATP1B1 у лиц с гаплотипом *SLCO1B1**1b/*1b, что можно объяснить предположительной более высокой

активностью OATP1B1 в гепатоцитах у лиц с вариантом *1b/*1b. Таким образом, комбинировать олмесартан и правастатин можно лишь с осторожностью, так как требуются дополнительные исследования [164].

Кроме ксенобиотиков, однократный прием циклоспорина А и рифампицина повышал плазменные концентрации и AUC таких эндогенных субстратов OATP1B1, как копропорфирин I, прямой билирубин, сульфатированные желчные кислоты и ω -дикарбоновые жирные кислоты [86].

Ингибитор андрогеновых рецепторов даролутамид также изучался как потенциальный ингибитор функциональной активности OATP1B1. Так, в *in vitro* и *in vivo* исследовании С. Zurth и др. (2019) изучались фармакокинетические параметры субстратов OATP1B1 розувастатина и аторвастатина при воздействии даролутамида. В исследовании *in vitro* даролутамид снизил проникновение аторвастатина в клетки линии НЕК293, трансфицированные OATP1B1. При инкубировании клеток с обоими веществами одновременно концентрация полумаксимального ингибирования IC_{50} для даролутамида составила 16,8 мкМ. В эксперименте, где клетки преинкубировались с даролутамидом, IC_{50} была существенно ниже и составила 3,8 мкМ.

В исследовании *in vivo* совместное назначение даролутамида с розувастатином привело к повышению AUC и C_{max} розувастатина в 5 раз (t_{max} и почечный клиренс не отличались в группах «розувастатин» и «розувастатин+даролутамид») [81].

Пероральные сахароснижающие средства репаглинид и росиглитазон в эксперименте на трансфицированных клетках НЕК293, стабильно экспрессирующих OATP1B1, показали снижение инфлюкса правастатина, причем репаглинид проявил ингибирующую активность в низкой концентрации (10 мкМ), а росиглитазон – в высокой (100 мкМ). Интересно, что низкая концентрация росиглитазона статистически значимо увеличила проникновение правастатина в клетки (в 1,7 раз), таким образом, изменение плазменной концентрации статина может являться следствием как ингибирующего, так и индуцирующего действия росиглитазона [112].

Как ингибиторы OATP1B1 себя проявили и другие пероральные сахароснижающие средства. Глибурид, глимепирид, глипизид, троглитазон и пиоглитазон значительно снижали OATP1B1- и OATP1B1*15 (Asn130Asp и Val174Ala)-опосредованный транспорт розувастатина *in vitro* [82].

Антиагрегант клопидогрел, часто назначаемый кардиологическим пациентам, значительно ингибировал OATP1B1-опосредованное проникновение розувастатина в клетки, котрансфицированные OATP1B1 и OATP1B3. Однако маловероятно, что данный эффект является клинически значимым из-за высокого значения IC₅₀ (27,39 мкМ) [91].

Блокатор кальциевых каналов никардипин также является возможным участником межлекарственных взаимодействий на уровне OATP1B1. В ходе исследования Kayesh и др. было установлено, что преинкубация клеток HEK293-FLAG-OATP1B1 с никардипином (0,5 – 4 мкМ) в течение 30 и 60 мин статистически значимо снижала инфлюкс субстрата OATP1B1 эстрадиол-17β-глюкуронида (в $0,78 \pm 0,04$ и $0,82 \pm 0,04$ раза по сравнению с контролем), при этом 10-минутная преинкубация не оказала подобного действия [76].

S. Billington и др. (2019) изучали транспорт и концентрацию в печени [¹¹C] розувастатина на фоне применения иммуносупрессанта циклоспорина А. Циклоспорин А является мощным ингибитором OATP1B1, Na⁺-таурохолат-котранспортера и BCRP (белок резистентности рака молочной железы, *англ. breast cancer resistance protein*). Внутривенное введение циклоспорина А увеличило концентрацию [¹¹C] розувастатина в крови на 45%, снизило его желчный клиренс на 52% и проникновение в печень – на 25% [136].

Стоит отметить, что циклоспорин А демонстрирует зависимое от преинкубации длительное ингибирование активности OATP1B1. Так, было установлено, что на восстановление функций OATP1B1 после удаления циклоспорина А из транспортной среды потребовалось более 18 часов [84].

Было также изучено влияние ингибиторов mTOR (механистическая мишень рапамицина, *англ.: mechanistic target of rapamycin*) эверолимуса и сиролимуса на транспорт субстратов OATP1B1 (эстрадиол-17β-глюкуронида, эстрон-сульфата и

розувастатина). Установлено, что преинкубация клеток линии НЕК293-ОАТР1В1 с эверолимусом и сиролимусом и последующая коинкубация с ними значительно снизили проникновение всех изученных субстратов ОАТР1В1 в клетки, причем эффект сохранялся не менее 4 часов. IC_{50} для эверолимуса составил: для эстрадиол-17 β -глюкуронида – 0,48 мкМ, для эстрон-сульфата – 0,61 мкМ, для розувастатина – 1,58 мкМ. Для сиролимуса аналогичные показатели составили 0,64 мкМ, 0,83 мкМ и 0,56 мкМ соответственно. Это влияние является статистически значимым и может привести к развитию побочных эффектов (в частности, к побочным эффектам статинов) [138].

Учитывая важную роль ОАТР1В1 в фармакокинетике эндогенных веществ и ксенобиотиков, ICH (*англ.: International Council For Harmonisation Of Technical Requirements For Pharmaceuticals For Human Use*) [107] и FDA (*англ.: Food and Drug Administration*) [170] рекомендуют тестировать все новые лекарственные средства на принадлежность к субстратам и модуляторам ОАТР1В1. Сходной стратегии придерживаются в ЕМА (*англ.: European medicines agency*) [90], а также в России [29].

Согласно международным рекомендациям, первоначально исследования выполняют *in vitro*, а при получении положительных результатов (если тестируемое вещество является субстратом/ингибитором), проводят и исследования *in vivo*.

Исследования *in vitro* выполняют на клетках, экспрессирующих изучаемый белок-транспортер. При этом приоритет стоит отдавать рекомбинантным клеточным линиям, селективно гиперэкспрессирующим транспортеры, так как они позволяют изучить влияние тестируемых веществ на изолированный белок.

Для получения рекомбинантных клеточных линий чаще всего используют клетки эмбриональной почки человека НЕК293, так как они просты в культивировании и хорошо поддаются трансфекции [58, 167].

Альтернативой трансфицированным линиям клеток могут выступать первичные гепатоциты, как суспензионные, так и адгезивные, однако преимущество среди всех первичных культур клеток отдают сендвичным

культурам гепатоцитов (культивируются между двух слоев коллагенового геля) [167]. Считается, что сендвич-культивированные гепатоциты сохраняют архитектуру клетки (включая плотные контакты) и канальцевую билиарную сеть, экспрессирующую функциональный билиарный транспортер, чего суспензионные культуры сделать не способны [167].

Культуры первичных гепатоцитов позволяют оценить лишь относительный вклад OATP1B1 в фармакокинетику того или иного вещества, так как, кроме OATP1B1, содержат и другие переносчики, причем как инфлюксные, так и эффлюксные, что может искажать результаты эксперимента [167].

На основании вышеизложенного можно сделать вывод о том, что белок-переносчик OATP1B1 является одним из важнейших транспортеров, а изучение межлекарственных взаимодействий, развивающихся на его уровне, представляется важной и актуальной задачей современной фармакологии, так как в первую очередь нацелено на снижение риска развития опасных взаимодействий и повышение безопасности проводимой фармакотерапии [45]. При этом, первоначально исследования выполняют *in vitro*, а при получении положительных результатов – и исследования *in vivo*. Исследования *in vitro* желательно проводить на рекомбинантных клеточных линиях, селективно гиперэкспрессирующих изучаемый белок-транспортер.

1.3. Фармакокинетика и фармакодинамика этилметилгидроксипиридина сукцината

Молекула этилметилгидроксипиридина сукцината (ЭМГПС) состоит из двух функционально значимых компонентов – этилметилгидроксипиридина и сукцината (янтарной кислоты) [17].

Янтарная кислота в составе ЭМГПС обеспечивает его высокую антигипоксическую активность. В период гипоксии сукцинат в составе ЭМГПС поддерживает работу II комплекса дыхательной цепи митохондрий, который обеспечивает образование до 80% АТФ при снижении концентрации кислорода [15-16].

Более того, сукцинат в составе ЭМГПС активирует свои специфические сукцинатные рецепторы, что приводит к повышению экспрессии фактора, индуцируемого гипоксией (субъединицы 1 альфа) (HIF-1 α , *англ.: hypoxia-inducible factor-1 α*) и адаптации клеток и тканей к сниженному содержанию кислорода, стимуляции ангиогенез, повышению экспрессию эндотелиального сосудистого фактора роста (VEGF, *англ.: vascular endothelial growth factor*) [8, 10].

Этилметилгидроксипиридин в составе ЭМГПС обеспечивает прямое антиоксидантное действие за счет нейтрализации свободных радикалов (супероксидного анион-радикала, гидроксил-радикала), препятствуя повреждению клеточных структур [2, 11, 15, 55].

ЭМГПС не обладает прооксидантным действием, а также повышает активность эндогенных антиоксидантных ферментов супероксиддисмутазы и глутатионпероксидазы [15-16, 27].

ЭМГПС повышает экспрессию редокс-чувствительного транскрипционного фактора, регулирующего антиоксидантную защиту NRF2 (ядерный фактор эритроидного происхождения-2, *англ.: nuclear factor erythroid 2-related factor 2*) [7, 10].

Хемореактомный анализ молекулы ЭМГПС показал, что ее отличают более низкий риск развития межлекарственных взаимодействий и гораздо более благоприятный профиль безопасности (Рисунок 5). Низкий риск развития межлекарственных взаимодействий препарата объясняется меньшим влиянием на серотониновые, дофаминовые и адренорецепторы, меньшей степенью взаимодействия с калиевыми каналами кардиомиоцитов, моноаминооксидазой и изоформами цитохрома P450.

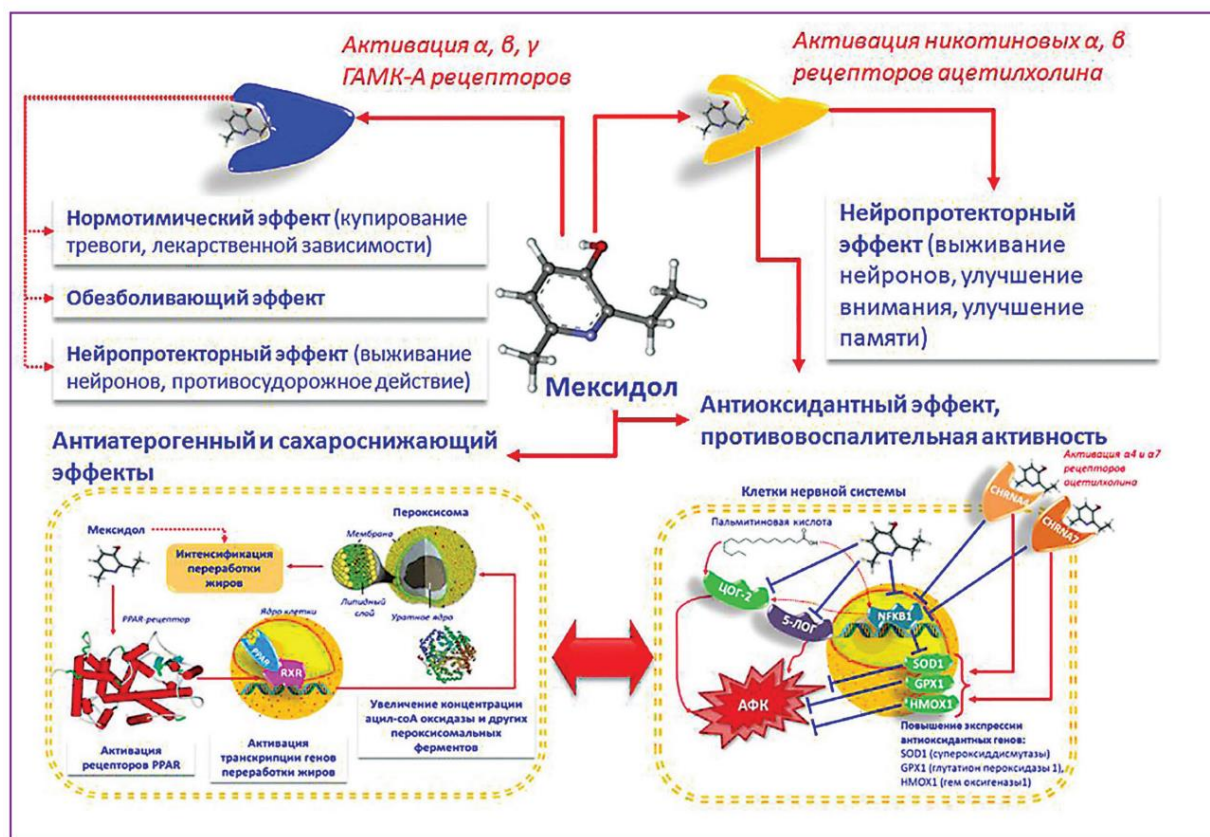


Рисунок 5 – Хемореактомный анализ молекулы ЭМГПС (Цит. по: Громова, 2018) [32]

Экспериментально подтверждено, что этилметилгидроксипиридина сукцинат обладает следующими свойствами:

1. Оказывает мембраностабилизирующее действие [20, 27];
2. Восстанавливает функционирование нарушенных мембраносвязанных ферментов (аденилатциклазы, ацетилхолинэстеразы), ГАМК-ергического рецепторного комплекса, мускариновых и никотиновых ацетилхолиновых рецепторов [15, 37];
3. В условиях гипоксии и ишемии усиливает компенсаторную активацию аэробного гликолиза и энергосинтезирующую функцию митохондрий, снижает степень угнетения окислительных процессов в цикле Кребса с увеличением содержания аденозинтрифосфата и креатинфосфата [26, 33];
4. При остром нарушении мозгового кровообращения уменьшает выраженность глутаматной эксайтотоксичности и апоптоза нейронов, активирует нейропластичность [16, 55];

5. Оказывает ноотропное действие [57, 172];
6. Проявляет анксиолитическую активность [16, 20];
7. Обладает противосудорожным эффектом (купирует развитие судорог) [18-19];
8. Оказывает антистрессовое действие при хроническом стрессе [21];
9. При нарушении коронарного кровотока (моделировании инфаркта миокарда) уменьшает площадь поражения миокарда, снижает частоту возникновения аритмий [4];
10. Уменьшает выраженность острой и хронической алкогольной интоксикации [16];

В мультицентровом рандомизированном двойном слепом плацебо-контролируемом исследовании (исследование ЭПИКА) у пациентов с полушарным ишемическим инсультом в остром и раннем восстановительном периодах длительная последовательная терапия этилметилгидроксипиридина сукцинатом (вначале 500 мг внутривенно капельно один раз в день в течение 10 дней, затем 125 мг три раза в день в течение 8 недель) уменьшала нарушения жизнедеятельности (инвалидизации), неврологический дефицит, оказывала антидепрессивное действие, повышала качество жизни [51].

В международном многоцентровом рандомизированном двойном слепом плацебо-контролируемом исследовании (исследование MEMO) у пациентов с хронической ишемией мозга этилметилгидроксипиридина сукцинат при длительной последовательной терапии (вначале 500 мг внутривенно капельно один раз в день в течение 14 дней, затем 250 мг три раза в день в течение 8 недель) повышал когнитивные функции пациентов и их двигательную активность, уменьшал выраженность астенического синдрома, вегетативных нарушений, улучшал качество жизни, оказывал анксиолитическое действие [52].

В многоцентровом двойном слепом рандомизированном плацебо-контролируемом исследовании (исследование МЕГА) у детей и подростков с синдромом дефицита внимания с гиперактивностью Мексидол в дозе 125 мг один

или два раза в сутки при приеме в течение 6 недель уменьшал невнимательность, гиперактивность/импульсивность, а также улучшал общее состояние [13, 17, 36].

Учитывая высокую клиническую эффективность, ЭМГПС часто применяется в реальной терапевтической практике при широком спектре нозологий у пациентов с полипрагмазией и полифармацией, что сопровождается его совместным приемом с другими препаратами и может приводить к развитию межлекарственных взаимодействий.

Основные аспекты фармакокинетики ЭМГПС на сегодняшний день изучены достаточно подробно. В ходе экспериментов на кроликах и крысах, а также в клинических исследованиях было показано, что ЭМГПС быстро всасывается из желудочно-кишечного тракта и достигает системного кровотока. $C_{\max}$ достигается примерно через 30 мин [48-49].

ЭМГПС быстро распределяется по органам и тканям, особенно активно – в головной мозг (благодаря своей способности проникать через гематоэнцефалический барьер), не депонируется [48].

Одной из особенностей ЭМГПС является его способность проникать в митохондрии при внутривенном и пероральном введении, где реализуется его основное фармакологическое действие [49].

ЭМГПС подвергается биотрансформации в печени. На сегодняшний день идентифицировано 5 его метаболитов [31]: 3-оксипиридина фосфат, 2-метил-6-метил-3-оксипиридин, 6-метил-3-оксипиридин, конъюгат 2-метил-6-метил-3-оксипиридина с глюкуроновой кислотой, конъюгат 3-гидрокси-6-метил-2-этилпиридина фосфата с глюкуроновой кислотой.

ЭМГПС быстро подвергается экскреции, что обуславливает необходимость назначения препарата 3 раза в сутки либо использование лекарственных форм с модифицированным высвобождением [47].

Экскретируется препарат преимущественно почками в виде глюкуроната (в неизмененном виде экскретируются лишь следовые количества ЭМГПС). Пик интенсивности экскреции приходится на первые 4 часа выведения [31].

В ряде исследований было оценено влияние ЭМГПС на функционирование изоферментов семейства цитохромов P450 и некоторых белков-транспортеров.

В клиническом исследовании было установлено, что ЭМГПС повышает активность изофермента 3A4 цитохрома P450 [6].

В исследованиях *in vitro* на клетках линии Caco-2 и в экспериментах на крысах wistar и кроликах породы шиншилла было показано, что ЭМГПС не является субстратом белка-транспортера Р-гликопротеина, однако может снижать его активность, то есть, является его ингибитором [31, 56].

В исследовании *in vitro* также на клетках линии Caco-2 выявлено, что ЭМГПС не является субстратом другого ABC-транспортера – BCRP и является его ингибитором [41].

Принадлежность ЭМГПС к субстратам/ингибиторам/индукторам транспортеров суперсемейства SLC на данный момент не оценивалась.

Таким образом для повышения безопасности и эффективности терапии с использованием ЭМГПС целесообразно его тестирование на принадлежность к субстратам/ингибиторам/индукторам OATP1B1 как одного из основных клинически значимых представителей суперсемейства SLC-переносчиков, с целью прогнозирования развития межлекарственных взаимодействий.

ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Исследование выполнено *in vitro* на клеточных линиях НЕК293, НЕК293-ОАТР1В1 и НерG2.

2.1. Клеточная линия НерG2

Линия клеток НерG2 (гепатоцеллюлярная карцинома человека) была получена из ФГБУН ИНЦ РАН (Санкт-Петербург). Данная клеточная линия широко используется для изучения функционирования и механизмов регуляции ОАТР1В1 [9, 70].

Клетки культивировали при 37°C и 5% содержании CO₂ в инкубаторе WS-189C (World Science, Корея) в Дульбекко-модифицированной среде Игла (ДМЕМ) (ПанЭко, Россия) с высоким содержанием глюкозы (4,5 г/л) с добавлением 10% фетальной бычьей сыворотки (Sigma-Aldrich, Германия), 2мМ L-глутамин (Sigma-Aldrich, Германия), 100 ЕД/мл и 100 мкг/мл пенициллина и стрептомицина (Sigma-Aldrich, Германия), соответственно.

По достижении 70-90% конфлюентности клетки снимали с фласка добавлением раствора трипсин-ЭДТА (0,25% трипсина и 0,2% ЭДТА, Sigma-Aldrich, Германия), после чего высевали на 6-луночные планшеты для определения влияния ЭМГПС на экспрессию *SLCO1B1* и относительное количество ОАТР1В1 и на 24-луночные планшеты для определения влияния ЭМГПС на функциональную активность ОАТР1В1.

2.2. Клеточные линии НЕК293 и НЕК293-ОАТР1В1

Клеточная линия НЕК293 (англ.: *human embryonic kidney*), представляющая собой клетки почки человеческого эмбриона, была получена из ФГБУН ИНЦ РАН (Санкт-Петербург).

Клетки линии НЕК293 и НЕК293-ОАТР1В1 культивировали при 37°C и 5% содержании CO₂ в Дульбекко-модифицированной среде Игла (ДМЕМ) (ПанЭко, Россия) с высоким содержанием глюкозы (4,5 г/л) с добавлением 10% фетальной бычьей сыворотки (Sigma-Aldrich, Германия), 2мМ L-глутамин (Sigma-Aldrich,

Германия), 100 ЕД/мл и 100 мкг/мл пенициллина и стрептомицина (Sigma-Aldrich, Германия) соответственно.

После формирования монослоя клетки НЕК293 и НЕК293-OATP1B1 также снимались с фласка методом трипсинизации и высевались в 24-луночные планшеты для изучения влияния ЭМГПС на функциональную активность OATP1B1 или 6-луночные планшеты для оценки экспрессии гена *SLCO1B1* и относительного количества OATP1B1.

Рекомбинантную клеточную линию, гиперэкспрессирующую полипептид, транспортирующий органические анионы, 1B1 (OATP1B1) получали самостоятельно по приведенной ниже методике.

Ген *SLCO1B1* (Gene ID:10599, NCBI Reference Sequence: NM_006446.5) был получен путем синтеза (Atagenix, Китай) и клонирован по сайтам XhoI и HindIII в линеаризованный вектор pEGFP-N1 (Clontech, Китай) путем лигазного клонирования с Т4 ДНК-полимеразой, в результате чего была получена плаزمиды pEGFP-SLCO1B1 (Рисунок 6). Адекватность последовательности в клонированном гене была подтверждена методом секвенирования.

Целевой ген был клонирован в вектор pEGFP-N1 в одной рамке считывания с геном, кодирующим EGFP (англ.: *Enhanced Green Fluorescent Protein*) на С-конце. Поскольку ген EGFP находится в той же рамке считывания, что и таргетный ген *SLCO1B1*, появление флуоресценции в трансфицированных клетках должно указывать на экспрессию *SLCO1B1*.



Рисунок 6 – Фрагмент экспрессионного вектора pEGFP- SLCO1B1

Клетки линии НЕК293 высевались в 96-луночный планшет плотностью 1×10^4 клеток/лунку. По достижении 70% конфлюентности клетки подвергались

процедуре трансфекции полученной плазмидой pEGFP-SLCO1B1 методом липофекции с использованием реактива Lipofectamine™ 3000 Reagent (Invitrogen, США). Все манипуляции производились в строгом соответствии с инструкцией производителя. Через 48 часов экспрессия GFP оценивалась с помощью флуоресцентного микроскопа Olympus CKX53 (Olympus, Япония).

Для получения клонов HEK293-OATP1B1, стабильно экспрессирующих OATP1B1, была проведена селекция с использованием антибиотика G-418 (генетицин, *англ.: geneticin*) (Promega, США) в концентрации 500 мкг/мл. После процедуры селекции были отобраны 4 стабильных клона, которых подвергли клональной селекции методом предельных разведений. Через 14 суток культивирования клоны с сохраненной флуоресценцией перестали получать антибиотики и подверглись вторичному клонированию. Для дальнейшей работы были использованы клоны, отобранные по интенсивности флуоресценции.

2.3. Методы детекции и визуализации *SLCO1B1*/OATP1B1 в клеточных линиях

Полимеразная цепная реакция в реальном времени

Экспрессия гена *SLCO1B1* в полученной линии клеток и в клетках линии НерG2 анализировалась методом полимеразной цепной реакции в реальном времени. Для этого клетки культивировали в 6-луночных планшетах (Corning, США) до формирования монослоя, а после воздействия тестируемых веществ и проведения экспериментов механически снимали с лунок скребком, трижды промывали в фосфатно-солевом буфере и центрифугировали в течение 5 мин при 3000 об/мин.

Суммарную РНК выделяли с использованием набора RNeasy Mini Kit (QIAGEN, Германия) в соответствии с инструкцией производителя.

Концентрацию РНК в образцах определяли спектрофотометрически с помощью прибора NanoPhotometr NP80-Touch (Implen GmbH, Германия).

Для проведения ПЦР в реальном времени на первом этапе РНК в количестве 1 мкг подвергали обратной транскрипции с использованием набора реактивов

«БиоМастер ОТ-ПЦР SYBR Blue (2×) для проведения ОТ-ПЦР в реальном времени с SYBR Green I» (Биолабмикс, Россия). Обратная транскрипция проводилась при температуре 45°C, время инкубации составило 10 минут, количество циклов – 1. Этот этап необходим для синтеза цепей кДНК. На втором этапе с синтезированной кДНК проводили ПЦР в реальном времени.

В качестве референсного гена, относительно которого вычислялась экспрессия *SLCO1B1*, был выбран ген, кодирующий глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназу (GAPDH).

Последовательности прямого и обратного праймеров были подобраны с помощью программы DNASTAR Lasergene, PrimerSelect (Таблица 5).

Таблица 5 – Праймеры, использованные в работе (Евроген, Россия)

Для <i>SLCO1B1</i>	
Прямой праймер	5'-GGTGAATGCCCAAGAGATGATG-3'
Обратный праймер	5'-TGGAACCCAGTGCAAGTGATT-3'
Для <i>GAPDH</i>	
Прямой праймер	5'-GTCTCCTCTGACTTCAACAGCG-3'
Обратный праймер	5'-ACCACCCTGTTGCTGTAGCCAA-3'

Исследование проводилось по нижеприведенным условиям температурных циклов: денатурация (нагрев реакционной смеси) – при 95°C, охлаждение – при 53°C, элонгация – при 72°C.

Дальнейший анализ осуществлялся на амплификаторе нуклеиновых кислот Applied Biosystems Quant Studio 5 с гибридизационно-флуоресцентной детекцией продуктов ПЦР в режиме реального времени (Life Technologies Holdings Pte. Ltd., Сингапур) с программным обеспечением QuantStudio Design and Analysis (Thermo Fisher Scientific, США). Расчет уровня экспрессии *SLCO1B1* относительно референсного гена был осуществлен с помощью программного обеспечения LinRegPCR v.11.0 (Heart failure research center, Нидерланды).

Вестерн-блот

Метод вестерн-блот использовался для подтверждения наличия белка ОАТР1В1 в созданной рекомбинантной линии клеток (НЕК293-ОАТР1В1), а также для определения влияния ЭМГПС на относительное количество изучаемого белка в клетках гепатоцеллюлярной карциномы (НерG2).

Клетки культивировали в 6-луночных планшетах (Corning, США) до формирования монослоя.

После образования монослоя клетки снимали с лунок раствором трипсин–ЭДТА (0,25% трипсина и 0,2% ЭДТА, Sigma-Aldrich, США), а затем подвергали лизису при помощи буфера NP-40 (Thermo Fisher Scientific, США) с ингибиторами протеаз (Sigma Aldrich, США). Буфер добавлялся из расчета 100 мкл буфера на 10^7 клеток в образце. Клетки инкубировали с буфером в течение 30 минут при 4°C, каждые 10 минут образцы перемешивали на встряхивателе Vortex (Heidolph, Германия). После окончания инкубации образцы центрифугировали в течение 10 минут при 20 440 g и 4°C на высокоскоростной центрифуге Avanti JXN-3 Beckman Coulter (Beckman Coulter, США). Супернатант переносили в эппендорфы и до проведения анализа хранили при -80°C в ультранизкотемпературной морозильной камере UniFreez U80 (DAIHAN Scientific, Корея).

Для определения концентрации белка в пробах был использован метод Бредфорда [68]. Для этого 10 мкл образца добавляли в 490 мкл реактива Бредфорда (Bio-Rad, США) и встряхивали. Интенсивность окраски оценивали на спектрофотометре «SmartSpec Plus» (Bio-Rad, США) при длине волны 595 нм.

Белки супернатанта в количестве 30 мкг подвергали электрофорезу с использованием TGX Stain-Free FastCast Acrylamide Kit (Bio-Rad, США) в буферной системе Laemmli (BioRad, США). Перед загрузкой образцы смешивали с буфером Laemmli, содержащим 2,5% β-меркаптоэтанола (Bio-Rad, США) в соотношении 1:3 (v:v), инкубировали 10 мин при температуре 70°C. Электрофорез осуществлялся при 100 В в течение 90 мин. После окончания электрофореза образцы переносили полусухим методом на нитроцеллюлозную мембрану с размером пор 0,2 мкм при помощи прибора Transblot (Bio-Rad, США). Затем

мембраны на 1 час помещали в раствор казеина (BioRad, США) с добавлением Tween-20 («Sigma», Германия), после чего образцы оставляли для инкубации с первичными поликлональными кроличьими антителами (OATP2 Polyclonal Antibody, Invitrogen, США) в разведении 1:200 при 4°C на ночь. После инкубации с первичными антителами мембрана промывалась трис-солевым буферным раствором (BioRad, США), а затем инкубировалась в течение 1 часа при комнатной температуре со вторичными антителами (Goat anti-Rabbit IgG (H+L) Cross-Adsorbed Secondary Antibody, HRP, Invitrogen, США) в разведении 1:4000.

Белки на мембране визуализировали при помощи системы геле-документирования Chemi Doc XRS+ (Bio-Rad, США). Количество OATP1B1 оценивали относительно содержания белка домашнего хозяйства глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназы GAPDH (первичные антитела: GAPDH Loading Control Monoclonal Antibody (GA1R), DyLight 68, Invitrogen, США, разведение 1:1000; вторичные антитела: Rabbit anti-Mouse IgG (H+L) Secondary Antibody, HRP, Invitrogen, США, разведение 1:4000). Интенсивность окраски полос (бэндов) оценивали денситометрически с использованием программного обеспечения ImageLab (BioRad, США).

Конфокальная микроскопия

Мембранная локализация OATP1B1 была подтверждена с помощью конфокальной микроскопии. Для этого 10^5 клеток линии HEK293-OATP1B1 высевали на 35-мм чашку со стеклянным дном, на следующие сутки изучали клетки с использованием микроскопа Nikon TE2000-U, оснащенного конфокальной сканирующей системой DCS-120 с детектором PMC-100 Becker&Hickl (Nikon, Германия). Были получены серии оптических срезов с шагом в 1 мкм.

2.4. Определение активности OATP1B1 в клетках HEK293-OATP1B1

Активность OATP1B1 в трансфицированных клетках HEK293-OATP1B1 оценивали по проникновению в клетки субстрата белка-транспортера аторвастатина (Sigma-Aldrich, Германия). Аторвастатин (навеска 3,1 мг) растворяли в 600 мкл диметилсульфоксида (ДМСО, ПанЭко, Россия) и доводили объем

раствора до 2,5 мл транспортной средой (состоит из раствора Хэнкса (ПанЭко, Россия), забуференного 25 mM HEPES при pH 7,4 (Sigma-Aldrich, Германия) с содержанием 1% ДМСО). Полученный раствор последовательно разводили транспортной средой до концентрации 1 мкМ. В качестве контроля использовали интактные клетки НЕК293.

Непосредственно перед проведением транспортного эксперимента из лунок удаляли ростовую среду, а клетки однократно промывали нагретой до 37°C транспортной средой, после чего в лунки добавляли транспортную среду, содержащую аторвастатин в конечной концентрации 1 мкМ. Для подавления функциональной активности OATP1B1 был использован классический ингибитор транспортера – рифампицин в концентрации 100 мкМ [66, 149].

2 мг рифампицина (Sigma-Aldrich, США) растворяли в 5 мл транспортной среды и получали маточный раствор в концентрации 500 мкМ, который использовали для приготовления 100 мкМ раствора рифампицина для эксперимента.

Перед проведением транспортного эксперимента клетки НЕК293-OATP1B1 15 минут преинкубировались со 100 мкМ раствором рифампицина [170], предварительно нагретым до 37°C, после чего рифампицин удаляли из лунок, а к клеткам добавляли раствор, состоящий из смеси 100 мкМ рифампицина и 1 мкМ аторвастатина.

Клетки инкубировали в течение 5, 15, 30, 45 и 60 минут. Реакцию останавливали удалением транспортной среды, содержащей тестируемое вещество, и немедленной промывкой клеток 500 мкл ледяной транспортной среды. После этого клетки трижды промывали 500 мкл ледяного фосфатно-солевого буфера (ПанЭко, Россия). Лизис клеток осуществляли трехкратным циклом заморозки-разморозки (замораживание при -80°C, затем размораживание при комнатной температуре). Концентрацию общего белка в образцах определяли по методу Бредфорда с помощью коммерческого набора Pierce Coomassie Plus Bradford Assay Kit (ThermoFisher, США). Интенсивность окраски оценивали на спектрофотометре «SmartSpec Plus» (Bio-Rad, США) при длине волны 595 нм.

2.5. Определение концентрации atorвастатина в лизате клеток

Концентрацию atorвастатина в лизате клеток анализировали методом высокоэффективной жидкостной хроматографии с tandemным масс-спектрометрическим детектированием (ВЭЖХ-МС/МС).

Для приготовления лизата клетки снимали с культурального фласка (Corning, США) скребком, центрифугировали 5 мин при 151 g на центрифуге ELMi CM-6M (ELMi, Латвия), затем трижды промывали фосфатно-солевым буфером, после чего проводили 3 цикла заморозки/разморозки при -80°C . Образцы матрицы замораживали и хранили в ультранизкотемпературной морозильной камере UniFreez U80 (DAIHAN Scientific, Корея) до использования.

Для извлечения atorвастатина из образцов к 300 мкл лизата клеток добавляли 300 мкл ацетонитрила с внутренним стандартом (валсартан 10 нг/мл), перемешивали с помощью встряхивателя Vortex (Heidolph, Германия). Затем образцы центрифугировали 10 мин при 4°C и скорости 21 000 g на высокоскоростной центрифуге Avanti JXN-3 Beckman Coulter (Beckman Coulter, США). Супернатант переносили в вials объемом 1 мл (ThermoFisher, США) и помещали в автосемплер.

Анализ был выполнен на высокоэффективном жидкостном хроматографе «Ultimate 3000» (ThermoFisher, США) с tandemным масс-селективным детектором TSQ Fortis (ThermoFisher, США), градиентным насосом, дегазатором и автосемплером.

Условия анализа на хроматографе: предколонка Selectra C18 Guard Cartridges SLC-18GDC46-5UM, хроматографическая колонка UCT Selectra C18 4,6 mm $\times$ 100 mm 5 μm , 100 Å, термостатирование колонки 35°C .

В работе был применен градиентный режим элюирования. Профиль градиента представлен в Таблице 6.

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

Время, мин	Раствор 0,1% муравьиной кислоты (%)	Ацетонитрил (%)
0,0	35	65
0,3	35	65
0,6	5	95
5,0	5	95
5,05	35	65
8,0	35	65

Молекулы ионизировали в режиме положительной ионизации на электроспрее при атмосферном давлении. Напряжение спрея составило 3500 В.

Детектирование вещества проводилось в следующем режиме: оболочечный газ (sheath gas) – 50 arb, вспомогательный газ (aux gas) – 10 arb, продувочный газ (sweep gas) – 1 arb, температурный режим трубки для переноса ионов 300°C, температура испарителя составляла 350°C.

Детектирование вещества осуществлялось по нижеприведенным условиям: аторвастатин – положительный режим ионизации, 559,30 m/z → 466,20 m/z, энергия столкновения – 17 В, фрагментация источника – 0, CID gas (collision-induced dissociation gas) – 2 мТорр (использовался для количественного анализа); 559,30 m/z → 440,20 m/z, энергия столкновения 32 В, фрагментация источника – 0, CID gas – 2 мТорр; валсартан 436,2 m/z → 206,3* m/z (использовался для количественного анализа), энергия столкновения – 27 В, фрагментация источника – 0, CID gas (collision-induced dissociation gas) – 2 мТорр; валсартан – 436,2 m/z → 234,9 m/z, энергия столкновения – 18 В, напряжение линз 104 В, фрагментация источника – 0, CID gas (collision-induced dissociation gas) – 2 мТорр.

Скорость потока – 0,3 мл/мин, пробы вводились в хроматограф в объеме 2 мкл. Анализ проводился в течение 10 мин.

При данных условиях время удерживания аторвастатина составило 4,53 мин, валсартана – 4,45 мин.

2.6. Определение принадлежности этилметилгидроксипиридина к субстратам и модуляторам OATP1B1

Для оценки принадлежности ЭМГП к субстратам OATP1B1 были выполнены транспортные эксперименты на клетках линии HEK293 и HEK293-OATP1B1.

Для этого 10 мкМ раствор ЭМГПС добавляли к клеткам и инкубировали в течение 5, 15, 30, 45 и 60 минут. После окончания инкубации реакцию немедленно останавливали промыванием клеток ледяным фосфатным буфером, а из клеток готовили лизаты методом, описанным выше. Количество ЭМГП в образцах оценивали методом ВЭЖХ-МС/МС.

Для оценки влияния ЭМГПС на активность OATP1B1 анализировали проникновение аторвастатина внутрь клеток HEK293-OATP1B1 в присутствии и отсутствии ЭМГПС (1-500 мкМ). В качестве позитивного контроля ингибирования использовался рифампицин (1-500 мкМ) – классический ингибитор OATP1B1.

Также с целью дифференцировки влияния ЭМГП и сукцината на активность OATP1B1 были выполнены эксперименты по оценке влияния сукцината (1-500 мкМ) на активность белка-транспортера.

ЭМГПС (5 мг субстанции) растворяли в 200 мкл ДМСО и дополняли 3,8 мл транспортной среды, в результате получали маточный раствор в концентрации 5 мМ. Затем маточный раствор последовательно разводили и получали необходимые для эксперимента концентрации ЭМГПС (1, 10, 100 и 500 мкМ).

4 мг субстанции рифампицина растворяли в 10 мл транспортной среды, содержащей 1% ДМСО, в результате чего получали 500 мкМ маточный раствор, который последовательно разводили до необходимых концентраций – 1, 10, 100 и 500 мкМ.

2,3 мг субстанции янтарной кислоты растворяли в 4 мл транспортной среды, в результате получали маточный раствор в концентрации 5 мМ. Затем маточный

раствор последовательно разводили и получали необходимые для эксперимента концентрации сукцината (1, 10, 100 и 500 мкМ).

В контрольные лунки добавляли транспортную среду, содержащую 1% ДМСО.

Ход транспортного эксперимента, лизис и пробоподготовка осуществлялись по вышеприведенной методике.

Одной из возможных причин влияния ЭМГПС на активность OATP1B1 является изменение экспрессии гена *SLCO1B1* и относительного количества OATP1B1 под действием препарата. Для оценки влияния ЭМГПС на экспрессию гена *SLCO1B1* и относительное количество OATP1B1 навеску ЭМГПС (5 мг) растворяли в 200 мкл ДМСО и добавляли 3,8 мл полной ростовой среды. Из полученного маточного раствора (5 мМ) последовательно готовили разведения – 1, 10, 100 и 500 мкМ ЭМГПС. 1,5 мл раствора каждой концентрации добавляли к клеткам линии НерG2, инкубация осуществлялась в течение 24 часов. В контрольные лунки добавляли 1% раствор ДМСО.

После окончания инкубации клетки снимали с лунок и подвергали лизису по вышеописанной методике. Экспрессию гена *SLCO1B1* оценивали методом ПЦР в реальном времени, относительное количество OATP1B1 в клетках – методом вестерн-блот. На каждый эксперимент было выполнено по 3 повторения.

2.7. Определение концентрации этилметилгидроксипиридина в лизате клеток

Концентрацию ЭМГП в лизате клеток анализировали методом ВЭЖХ-МС/МС.

Так как детектировалось именно количество ЭМГП, без янтарной кислоты, везде по тексту диссертации при анализе концентрации тестируемого вещества был указан именно ЭМГП. Когда анализировалось влияние целой молекулы – и этилметилгидроксипиридина, и янтарной кислоты – указано влияние ЭМГПС.

Для приготовления лизата клетки снимали с культурального фласка (Corning, США) скребком, центрифугировали 5 мин при 151 g на центрифуге ELMi CM-6M

(ELMI, Латвия), затем трижды промывали 300 мкл фосфатно-солевого буфера, после чего проводили 3 цикла заморозки/разморозки при -80°C . Полученные лизаты замораживали и хранили в ультранизкотемпературной морозильной камере UniFreez U80 (DAIHAN Scientific, Корея) до использования.

Для извлечения ЭМГПС из образцов к 300 мкл лизата клеток добавляли 300 мкл метанола с внутренним стандартом (амантадин 10 нг/мл), перемешивали с помощью встряхивателя Vortex (Heidolph, Германия). Затем образцы центрифугировали 10 мин при 4°C и скорости 21 000 g на высокоскоростной центрифуге Avanti JXN-3 Beckman Coulter (Beckman Coulter, США). Супернатант переносили в вials объемом 1 мл (ThermoFisher, США) и помещали в автосемплер.

Концентрацию этилметилгидроксипиридина в лизате клеток определяли методом ВЭЖХ-МС/МС на хроматографе Ultimate 3000 и МС/МС детекторе TSQ Fortis (Thermo Fisher Scientific, США). Управление совмещенной системой ВЭЖХ-МС/МС и обработку данных проводили при помощи программного обеспечения «Thermo Scientific Xcalibur (ver. 4.2.47)».

Условия хроматографического анализа были следующими.

Колонка UCT Selectra C18 4,6 mm *100 mm 3um, 100A, предколонка Selectra C18 Guard Cartridges SLC-18GDC46-5UM, температура разделения 40°C . Скорость потока 0,5 мл/мин. Использовали градиентный режим элюирования по следующей программе (Таблица 7).

Таблица 7 – Соотношение компонентов подвижной фазы в зависимости от времени, прошедшего с начала хроматографического анализа

Время	Метанол	Раствор муравьиной кислоты 0,1%
0,0 мин	10%	90%
0,01 мин	30%	70%
3,5 мин	50%	50%
3,5 мин	90%	10%
5 мин	90%	10%

Продолжение Таблицы 7

5 мин	10%	90%
7,5 мин	10%	90%

Объем вводимой пробы – 10 мкл. Время анализа – 7,5 мин. В данных условиях время удерживания: ЭМГП – 3,69-3,9 мин, амантадина 5,7-6,07 мин.

Ионизацию молекул этилметилгидроксипиридина и амантадина (внутренний стандарт) проводили в режиме положительной ионизации на электроспрее при атмосферном давлении и напряжении 3500 В.

Условия детектирования: sheath gas (оболочечный газ) 50 arb, aux gas (вспомогательный газ) 10 arb, sweep gas (продувочный газ) 1 arb, температура трубки для переноса ионов 300 °С, температура испарителя 350 °С.

Детектирование анализируемых веществ проводили в режиме мониторинга множественных реакций (MRM) при следующих условиях:

ЭМГП – позитивный режим ионизации, 138,1 m/z → 123 m/z, энергия столкновения 21 В, напряжение линз 72 В (использовался для количественного определения), 138,1 m/z → 94,08 m/z, энергия столкновения 32 В, напряжение линз 72 В;

Амантадин – позитивный режим ионизации, 152,1 m/z → 135,08 m/z, энергия столкновения 17 В, напряжение линз 55 В (использовался для количественного определения), 152,1 m/z → 79,08 m/z, энергия столкновения 33 В, напряжение линз 55 В.

Во все случаях фрагментация источника составила 5 В, CID gas – 1,5 мТорр.

В качестве матрицы использовали лизат интактных клеток, который замораживали и хранили при -80 °С до анализа.

2.8. Статистический анализ полученных результатов

Статистический анализ проводился с использованием программ «Statsoft Statistica 13.0» (США, номер лицензии JPZ811I521319AR25ACD-W) и GraphPad

Prism 8.1.2. (GraphPad Software, США). Полученные данные представлены как среднее арифметическое $\pm$ стандартное отклонение (SD). Различия между группами определяли с помощью дисперсионного анализа (ANOVA) с последующим применением критерия Даннетта при сравнении более чем двух групп и непарного t-критерия Стьюдента при сравнении двух групп. Значения $p < 0,05$ считались статистически значимыми. Кинетические параметры K_m (константа Михаэлиса) и V_{max} (максимальная скорость поглощения) рассчитывали с использованием уравнения конкурентного ингибирования.

ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

3.1. Разработка рекомбинантной клеточной линии, гиперэкспрессирующей полипептид, транспортирующий органические анионы, 1B1 (OATP1B1)

Клетки линии HEK293 трансфицировали плазмидой pEGFP-SLCO1B1. Целевой белок экспрессировался в виде белка, слитого с EGFP, на С-конце.

Через 48 часов после выполнения трансфекции оценивали ее эффективность с использованием флуоресцентного микроскопа. В среднем около 70% клеток экспрессировали EGFP. Для получения стабильной клеточной линии производили селекцию с использованием G-418 в концентрации 500 мкг/мл.

Трансфицированные EGFP-экспрессирующие клетки отбирали методом предельных разведений. Выбранный клеточный клон HEK293-OATP1B1 в течение месяца наблюдения сохранял флуоресценцию, что свидетельствовало об интеграции в геном. На рисунке 7 приведена серия оптических срезов клеток HEK293-OATP1B1, полученная методом конфокальной микроскопии. Отмечалась преимущественно мембранная локализация EGFP, что указывает на встраивание транспортера OATP1B1 в клеточную мембрану. Также области флуоресценции присутствовали в перинуклеарной области, предположительно, в области эндоплазматического ретикулума и аппарата Гольджи, что связано с синтезом и транслокацией белка (Рисунок 7). При оценке стабильности полученной клеточной линии было показано, что HEK293-OATP1B1 стабильно экспрессирует функционально активный OATP1B1 в течение 10 пассажей. Клон был размножен и использован для дальнейшей характеристики.

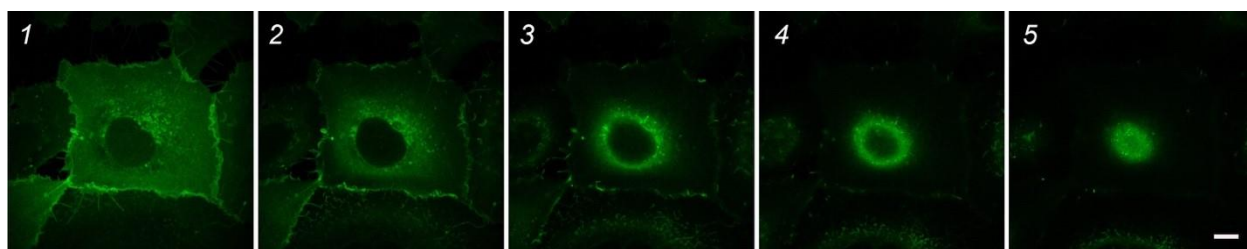


Рисунок 7 – Флуоресценция клеток линии HEK293-OATP1B1

Примечание – Масштабная линейка – 20 мкм; цифрами 1-5 промаркированы оптические срезы, шаг – 1 мкм.

На следующем этапе исследования методом ОТ-ПЦР в реальном времени была оценена экспрессия гена *SLCO1B1* в полученной клеточной линии. Было показано, что экспрессия мРНК *SLCO1B1* в созданной клеточной линии HEK293-OATP1B1 существенно превышает данный показатель в нативных клетках HEK293, что подтверждает экспрессию рекомбинантного гена (Рисунок 8).

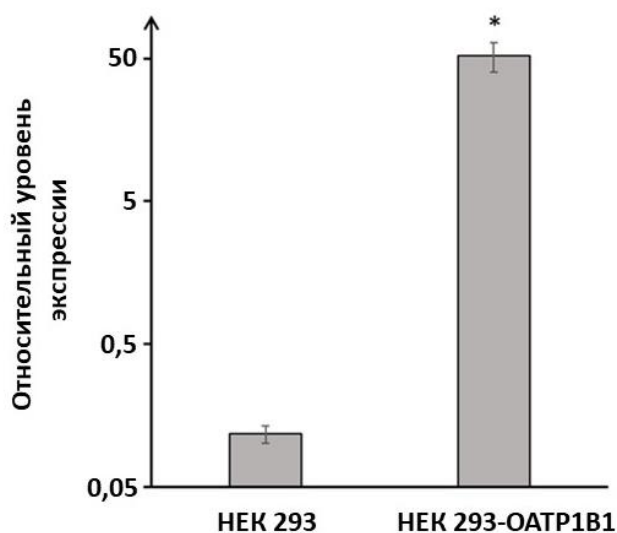


Рисунок 8 – Относительная представленность ампликонов гена *SLCO1B1* в клетках линий HEK293 и HEK293-OATP1B1 по результатам количественного ОТ-ПЦР-анализа в реальном времени

Примечание – * – статистически значимые отличия по сравнению с показателями клеток HEK293, $p < 0,05$.

Относительное количество белка OATP1B1 в лизатах клеток оценивали методом вестерн-блот. Интактные клетки линии HEK293 не содержали OATP1B1 (об этом говорит отсутствие специфических бэндов на мембране), в отличие от образцов клеток линии HEK293-OATP1B1. Бэнд образцов из HEK293-OATP1B1 располагался на 30 кДа выше, чем бэнд образцов клеток линии НерG2, которые были использованы в качестве позитивного контроля, что свидетельствует о том, что OATP1B1 синтезировался в виде слитого с EGFP (28 кДа) белка (Рисунок 9).

Стоит отметить, что по данным вестерн-блота в клетках HEK293- OATP1B1 наблюдается расщепление слитого белка до исходного OATP1B1 (Рисунок 9, двойной бэнд). Данный факт может объясняться попаданием EGFP во внутренние компартменты клетки.

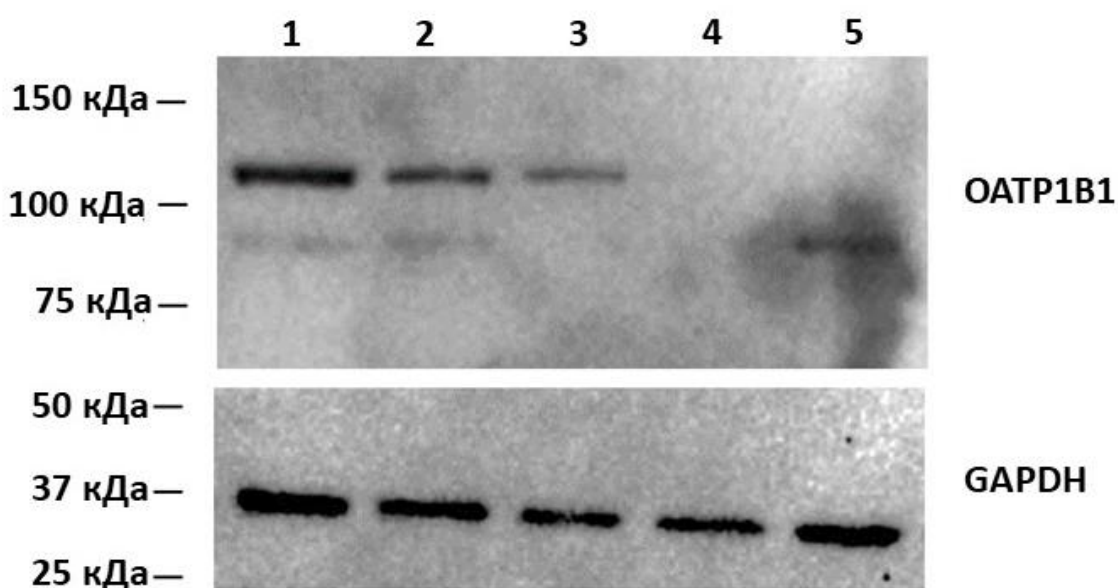


Рисунок 9 – Относительное содержание ОАТР1В1 в образцах лизатов клеток НЕК293-ОАТР1В1, НЕК293 и НерG2 по результатам вестерн-блот анализа

Примечания

- 1 – НЕК293-ОАТР1В1 (20 мкг белка в лизате);
- 2 – НЕК293-ОАТР1В1 (10 мкг);
- 3 – НЕК293-ОАТР1В1 (5 мкг);
- 4 – НЕК293 (20 мкг);
- 5 – НерG2 (20 мкг).

Таким образом, в ходе работы создана рекомбинантная клеточная линия, которая селективно и стабильно гиперэкспрессировала транспортер ОАТР1В1.

3.2. Разработка и валидация методики количественного определения аторвастатина

Концентрацию аторвастатина в лизате клеток определяли методом ВЭЖХ-МС/МС.

Валидация биоаналитической методики выполнялась согласно Руководству по экспертизе лекарственных средств (Том III), правилам проведения исследований биоэквивалентности лекарственных препаратов в рамках Евразийского экономического союза [29, 90, 107, 170] по следующим параметрам: селективность; калибровочная кривая (линейность); точность; прецизионность; нижний предел

количественного определения (НПКО); перенос пробы; стабильность аторвастатина; матричный эффект; степень извлечения.

В качестве внутреннего стандарта использовался валсартан.

Селективность. Анализировалась холостая проба лизата смеси клеток линий НЕК293, НЕК293-ОАТР1В1 и НерG2 без добавления стандартных растворов аторвастатина и валсартана, затем проводили анализ проб с добавлением аторвастатина до конечных концентраций 0,5 – 200 нмоль/л и валсартана 10 нг/мл. На хроматограммах холостой пробы (без добавления аторвастатина и валсартана) не было зафиксировано пиков со временем удерживания, аналогичному времени удерживания аторвастатина или валсартана (Рисунки 10,11).

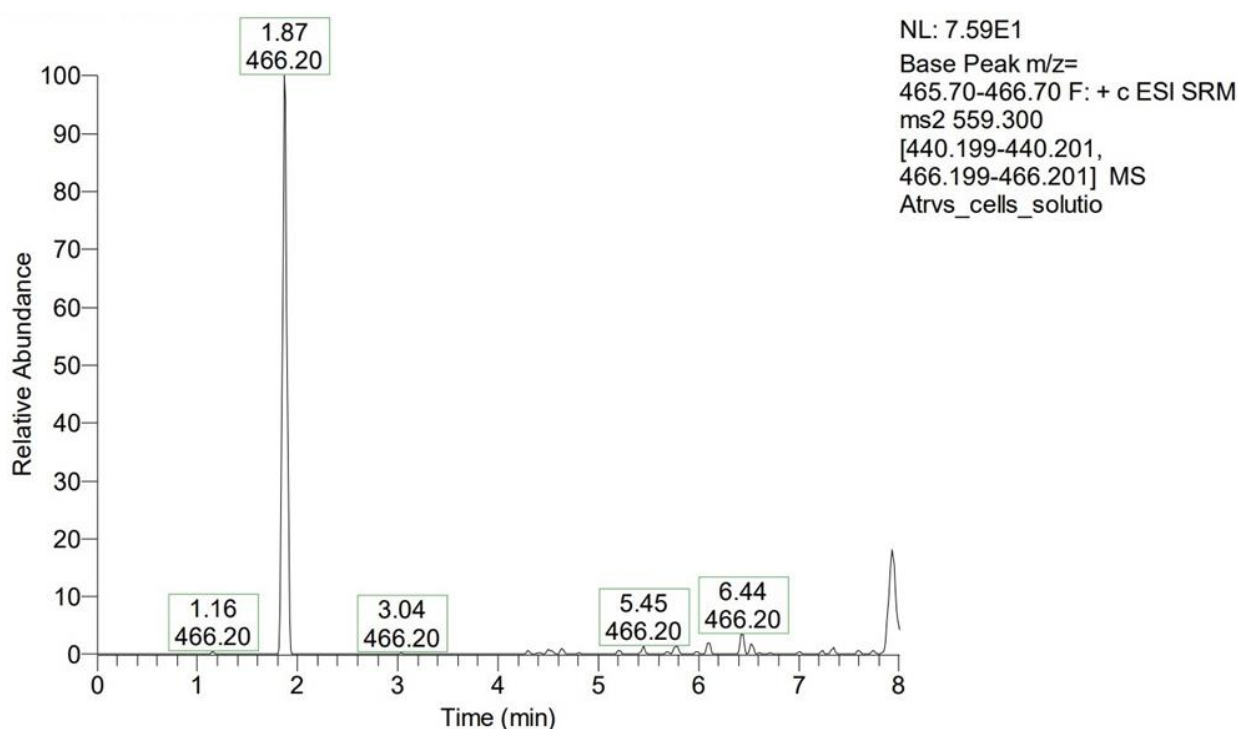


Рисунок 10 – Хроматограмма холостой пробы без добавления стандарта аторвастатина

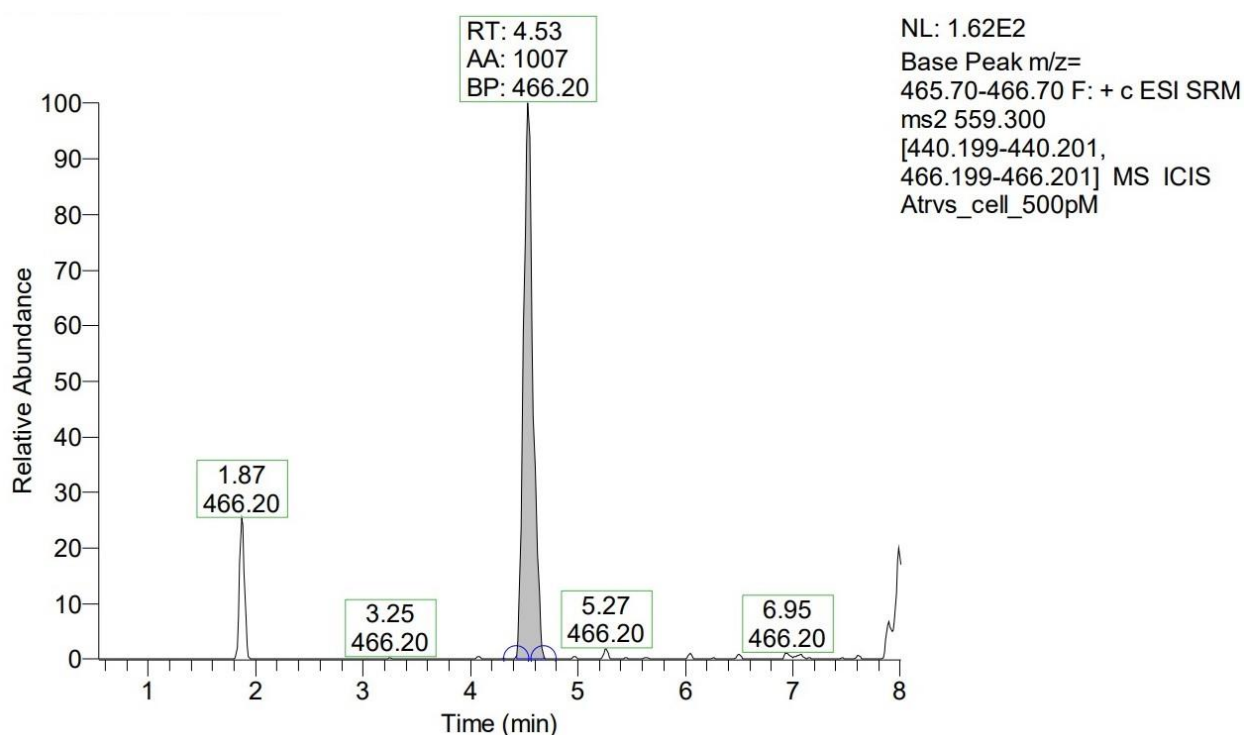


Рисунок 11 – Хроматограмма холостой пробы с добавлением стандарта аторвастатина до конечной концентрации 0,5 нмоль/л

Предел обнаружения аторвастатина в образцах лизата смеси клеток линий НЕК293 и НЕК293-ОАТР1В1 при использовании данной аналитической методики составил 0,160 нмоль/л, при нем соотношение «сигнал/шум» составляло не менее 3.

Нижний предел количественного определения аторвастатина был зарегистрирован на уровне 0,5 нмоль/л, точность и прецизионность не превышали 20%, а отношение «сигнал/шум» составляло не менее 10.

Калибровочная кривая. Для построения калибровочной кривой был проведен анализ 8 образцов холостого лизата смеси клеток линий НЕК293, НЕК293-ОАТР1В1 и НерG2 с добавлением аторвастатина до получения конечных концентраций 0,5; 1; 5; 10; 20; 50; 100; 200 нмоль/л. С использованием полученных в ходе анализа значений были построены калибровочные графики в координатах зависимости отношения площади пика аторвастатина к площади пика валсартана от концентрации аторвастатина.

Ниже приведены полученные уравнения линейной регрессии:

$$Y = -0,0517995 + 0,191819 \cdot X, R^2 = 0,9913, 1/X^2;$$

$$Y = -0,034411 + 0,19056 \cdot X, R^2 = 0,9917, 1/X^2;$$

$$Y = -0,0431565 + 0,197431 \cdot X, R^2 = 0,9937, 1/X^2.$$

Полученные коэффициенты корреляции составили не менее 0,99, что соответствует принятым нормам. По уравнениям линейной зависимости были рассчитаны отклонения концентраций калибровочных растворов от номинальных значений (Таблица 8).

Таблица 8 – Отклонения концентраций аторвастатина в калибровочных растворах от их номинальных значений

Номинальная концентрация, нмоль/л	График 1		График 2		График 3	
	Рассчитанная концентрация, нмоль/л	Точность	Рассчитанная концентрация, нмоль/л	Точность	Рассчитанная концентрация, нмоль/л	Точность
0,5	0,53	6,6%	0,53	6,9%	0,52	3,9%
1,0	0,89	-11,0%	0,88	-11,8%	0,93	-7,3%
5,0	4,61	-7,9%	4,61	-7,8%	5,16	3,2%
10,0	9,28	-7,2%	9,54	-4,6%	9,10	-9,0%
20,0	19,81	-1,0%	19,68	-1,6%	18,11	-9,4%
50,0	49,62	-0,8%	49,82	-0,4%	52,87	5,7%
100,0	111,16	11,2%	112,89	12,9%	106,90	6,9%
200,0	220,11	10,1%	212,71	6,4%	212,02	6,0%

Точность и прецизионность. Проводился анализ образцов лизатов смеси клеток линий НЕК293, НЕК293-ОАТР1В1 и НерG2 с добавлением стандартных растворов аторвастатина до получения контролей качества, следующих концентраций 0,5; 2; 100 и 150 нмоль/л. Образцы анализировались в рамках трех циклов. Для оценки точности и прецизионности внутри первого цикла анализировались 5 образцов каждой концентрации аторвастатина.

Межцикловые точность и прецизионность анализировались во втором и третьем циклах. Значения стандартного отклонения (величина прецизионности) и

относительной погрешности (величина точности) не превышали 20% (для нижнего предела количественного определения) и 15% (для всех остальных точек), что соответствует общепринятым нормам (Таблица 9).

Стабильность стандартных растворов аторвастатина анализировалась при их хранении при -80°C в течение 60 сут. Стабильность растворов аторвастатина в концентрациях 2 и 150 нмоль/л в лизате клеток оценивалась при краткосрочном хранении в условиях комнатной температуры, трехкратном цикле заморозки-разморозки при -80°C , при хранении при -80°C в течение 60 сут, после пробоподготовки и нахождении в течение 24 ч в автосемплере. Анализировали по 3 образца для каждой концентрации и каждого вида стабильности.

Правильность (точность) для каждой концентрации (для средних значений) находилась в пределах 15% от номинальных значений.

Матричный эффект. В холостой лизат клеток из шести различных источников после экстракции были добавлены рабочие растворы аналита для получения нижнего и верхнего контроля качества. Чистые растворы аналита (на воде) были приготовлены с такими же концентрациями. Матричный эффект рассчитывали как отношение площади пика в присутствии матрицы к площади пика в отсутствие матрицы для каждого контроля качества и внутреннего стандарта. Также рассчитывали нормализованный эффект матрицы по внутреннему стандарту (как частное от деления эффекта матрицы анализируемого вещества на эффект матрицы внутреннего стандарта). Рассчитанные относительное стандартное отклонение матричного эффекта аторвастатина, валсартана и нормализованного матричного эффекта аторвастатина находились в пределах нормы (не превышали 15%) (Таблица 10).

Степень извлечения. В холостой лизат клеток из шести различных источников после экстракции были добавлены рабочие растворы аторвастатина для получения нижнего и верхнего контроля качества и внутреннего стандарта. Растворы аторвастатина и внутреннего стандарта в лизате клеток были приготовлены с такими же концентрациями.

Степень извлечения рассчитывали как отношение площади пиков после экстракции из клеток к площади пиков в присутствии матрицы для каждого контроля качества и внутреннего стандарта. Также рассчитывали нормализованную по внутреннему стандарту степень извлечения (как частное от деления извлечения анализируемого вещества на извлечение внутреннего стандарта).

Рассчитанные относительное стандартное отклонение извлечения аторвастатина, валсартана и нормализованного извлечения аторвастатина находились в пределах нормы (не более 15%) (Таблица 10).

Перенос пробы. Для подтверждения отсутствия переноса пробы последовательно анализировались образцы лизатов с концентрацией аторвастатина 200 нмоль/л и образцы клеточных лизатов без добавления препарата. На хроматограммах клеточных лизатов без добавления аналита пиков, соответствующих времени удержания аторвастатина и валсартана, зафиксировано не было.

Таким образом, разработанная биоаналитическая методика является чувствительной, селективной, точной и прецизионной и может быть использована для оценки проникновения аторвастатина внутрь клеток с целью изучения активности OATP1B1.

Таблица 9 – Точность и прецизионность методики количественного определения аторвастатина в лизате клеток внутри цикла и между циклами

Концентрация, нмоль/л	Концентрация, рассчитанная внутри цикла, нмоль/л	SD внутри цикла	Внутрицикловая точность, %	Внутрицикловая прецизионность, %	Концентрация, рассчитанная между циклами, нмоль/л	SD между циклами	Межцикловая точность, %	Межцикловая прецизионность, %
0,5	0,54	0,04	-7,96	7,57	0,53	0,06	-5,67	11,32
2	1,97	0,20	1,50	10,03	2,01	0,20	-0,40	10,18
100	94,78	3,71	5,22	3,71	101,79	10,49	-1,79	10,31
150	145,93	6,26	2,71	4,29	145,49	7,87	3,01	5,41

Таблица 10 – Эффект матрицы и степень извлечения аторвастатина и валсартана

Препарат	Концентрация, нмоль/л	Матричный эффект, %	Нормализованный матричный эффект, %	Эффект извлечения, %	Нормализованный эффект извлечения, %
Аторвастатин	2	93,0±3,6	100,0±6,6	95,4±2,4	108,1±6,9
	150	94,3±4,4	111,1±13,2	96,6±2,5	105,9±5,5
Валсартан	2	93,4±7,8	-	88,4±4,0	-
	150	85,7±8,5	-	91,3±3,2	-

3.3. Разработка методики оценки принадлежности лекарственных веществ к субстратам и модуляторам OATP1B1 с помощью рекомбинантной клеточной линии HEK293-OATP1B1

Клеточные линии HEK293-OATP1B1 и HEK293 культивировали в 24-луночных планшетах до формирования монослоя.

Перед транспортным экспериментом клетки однократно промывали предварительно нагретой до 37°C транспортной средой, представляющей собой раствор Хэнкса (без фенолового красного) и 1% ДМСО, забуференный до pH 7,4 12,5 mM HEPES, в течение 15 мин. Затем к монослою клеток добавляли раствор субстрата OATP1B1 – аторвастатина.

На каждую концентрацию и на каждый срок инкубации было выполнено по 3 повтора. По окончании инкубации клетки промывали ледяным фосфатным буфером для остановки транспорта, снимали с лунок и готовили лизат. В полученном лизате оценивали концентрацию аторвастатина методом ВЭЖХ-МС/МС.

На первом этапе исследования оценивали эффективность разных способов лизиса клеток (3 цикла заморозки/разморозки при -80°C; применение буфера NP-40; добавление 0,1% муравьиной кислоты; разрушение клеток с помощью ультразвука) (Рисунок 12). Для этого после 30 мин инкубации с 1 мкМ аторвастатином клетки HEK293-OATP1B1 снимали с лунок, лизировали и оценивали концентрацию субстрата в полученных лизатах.

Максимальная концентрация аторвастатина в лизате клеток HEK293-OATP1B1 была получена при лизисе клеток трехкратной заморозкой-разморозкой (Рисунок 12). Поэтому этот способ лизиса использовался при дальнейших исследованиях.

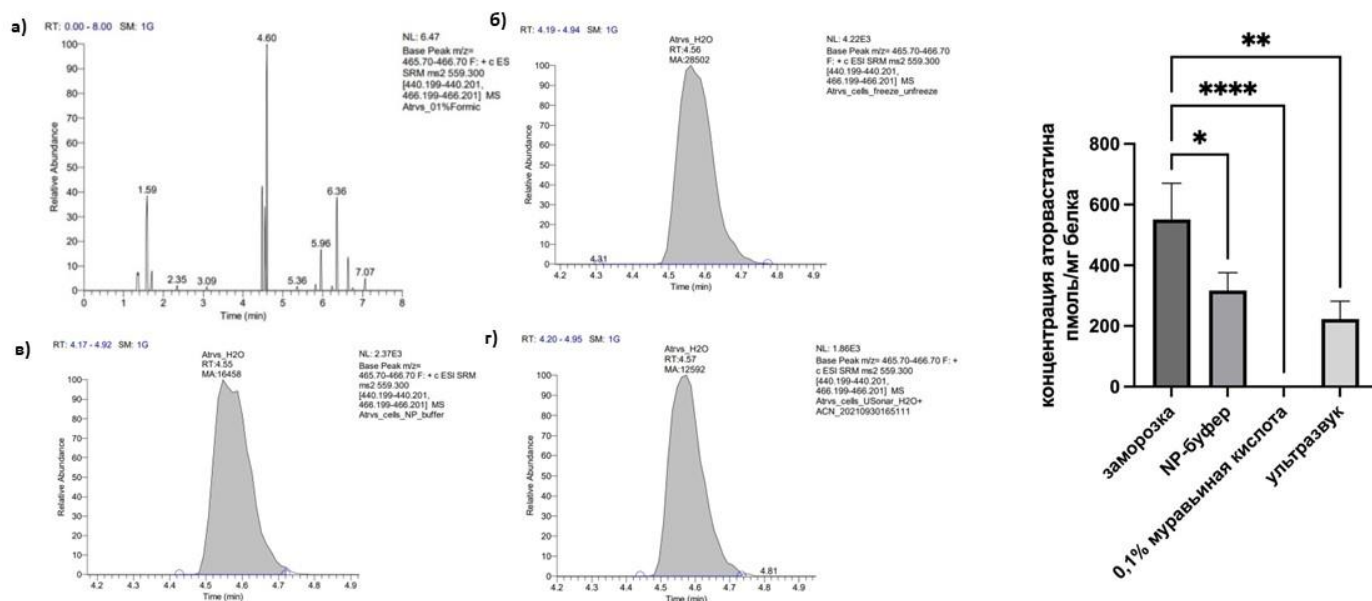


Рисунок 12 – Эффективность разных способов лизиса клеток HepG2 ($M \pm SD$)

Примечания:

а) лизис клеток 0,1% муравьиной кислотой;

б) лизис клеток трехкратной заморозкой-разморозкой;

в) лизис клеток буфером NP-40;

г) лизис клеток ультразвуком;

* – $p < 0,05$, ** – $p < 0,01$, **** – $p < 0,0001$ – статистически значимые отличия по сравнению с лизисом клеток заморозкой-разморозкой.

После подбора способа лизиса оценивалась скорость транспорта аторвастатина в клетки HEK293-OATP1B1 в зависимости от концентрации субстрата при длительности эксперимента 5 мин. Использовались следующие концентрации аторвастатина: 1, 5, 10 и 50 мкМ. Полученные результаты представлены на Рисунке 13.

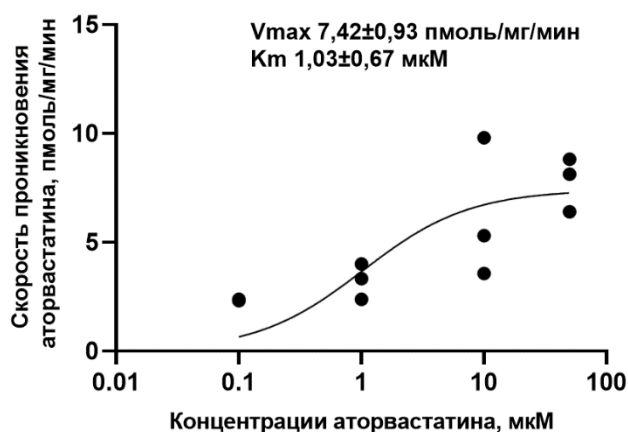


Рисунок 13 – Зависимость проникновения аторвастатина внутрь клеток HEK293-OATP1B1 от его концентрации

Было установлено, что скорость проникновения аторвастатина постепенно нарастает с увеличением концентрации и выходит на плато при концентрации 10 мкМ. При расчете константы Михаэлиса (K_m) и скорости реакции при насыщении фермента субстратом (V_{max}) были получены следующие результаты: $K_m = 1,03 \pm 0,67$ мкМ, $V_{max} = 7,42 \pm 0,93$ пмоль*мг⁻¹*мин⁻¹ (Рисунок 13).

На основании полученных данных в дальнейшем исследовании использовалась концентрация аторвастатина 1 мкМ как концентрация ниже насыщающей.

Затем была оценена скорость проникновения аторвастатина в зависимости от длительности инкубации. Тестировались следующие сроки инкубации: 5, 15, 30, 45 и 60 минут.

Максимальная скорость проникновения аторвастатина внутрь клеток отмечалась через 5 мин от начала инкубации, затем она постепенно снижалась и выходила на плато к 45-60 минуте.

На основе полученных данных была выбрана длительность эксперимента 5 мин как срока с максимальной скоростью транспорта.

На заключительном этапе было выполнено сравнение скорости проникновения аторвастатина в интактные клетки HEK293 и клетки HEK293-OATP1B1, а также влияние ингибитора транспортера – рифампицина в

концентрации 100 мкМ на скорость проникновения аторвастатина в клетки HEK293-ОАТР1В1.

Проникновение аторвастатина в клетки HEK293-ОАТР1В1 во временных точках эксперимента 5, 15 и 30 минут достоверно ($p < 0,05$) превышало проникновение субстрата в интактные клетки HEK293 (Рисунок 14 а). Ингибитор ОАТР1В1 рифампицин в концентрации 100 мкМ снижал транспорт аторвастатина в клетки HEK293-ОАТР1В1 до уровня интактных HEK293 во всех временных точках эксперимента (Рисунок 14 б).

Полученные данные свидетельствуют о том, что ОАТР1В1 в созданной клеточной линии HEK293-ОАТР1В1 является функционально активным.

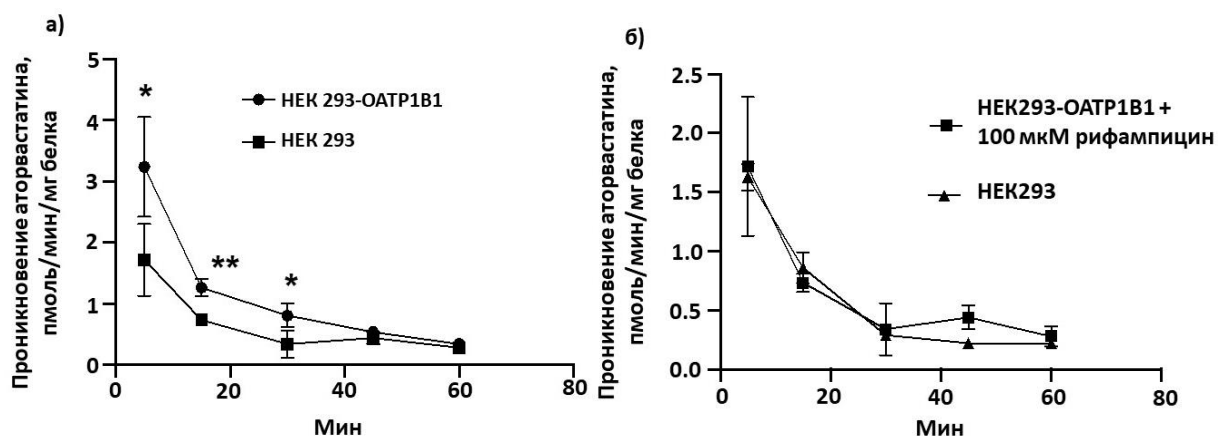


Рисунок 14 – Проникновение аторвастатина (1 мкМ) в клетки HEK293 и HEK293-ОАТР1В1 в отсутствие (а) и в присутствии рифампицина (б)

Примечание: * – $p < 0,05$, ** – $p < 0,01$ – статистически значимые отличия по сравнению с показателями клеток HEK293.

Таким образом, разработана методика оценки активности ОАТР1В1, которая заключается в использовании созданной рекомбинантной клеточной линии HEK293-ОАТР1В1, гиперэкспрессирующей ОАТР1В1, аторвастатина в концентрации 1 мкМ в качестве субстрата и длительности инкубации 5 мин.

3.4. Разработка и валидация методики количественного определения ЭМГП в лизате клеток

Концентрацию ЭМГП в лизате клеток определяли методом ВЭЖХ-МС/МС. В качестве внутреннего стандарта использовали амантадин.

Селективность. Анализировалась холостая проба лизата смеси клеток линий НЕК293 и НЕК293-ОАТР1В1 без добавления стандартных растворов ЭМГПС, затем проводили анализ проб с добавлением ЭМГПС до конечных концентраций 0,1 – 50 нмоль/л. На хроматограммах холостой пробы (без добавления ЭМГПС) не было зафиксировано пиков со временем удерживания, аналогичному времени удерживания ЭМГП (Рисунки 15, 16).

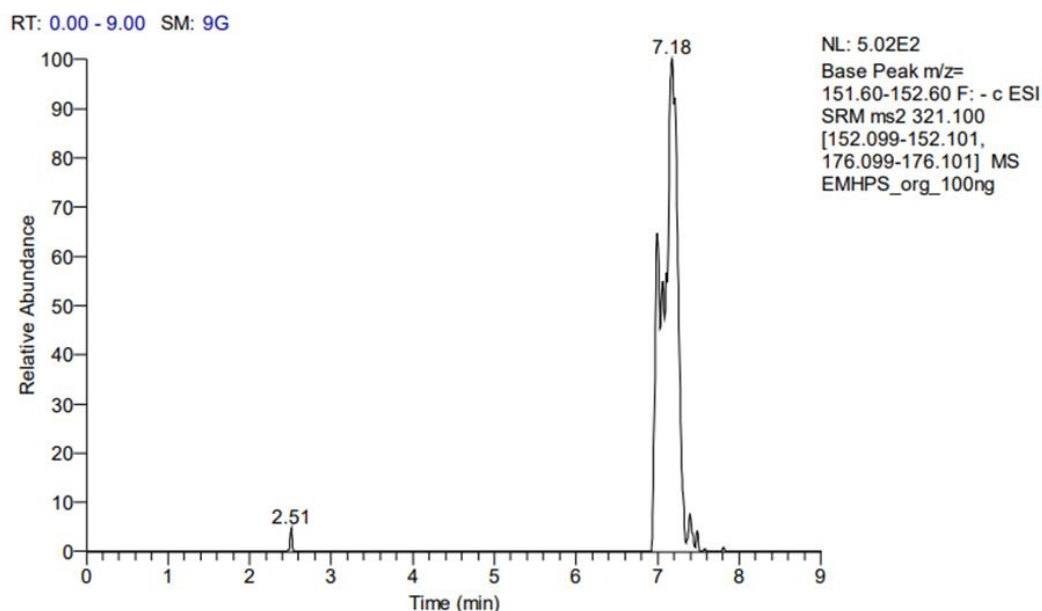


Рисунок 15 – Хроматограмма холостой пробы без добавления стандарта ЭМГПС

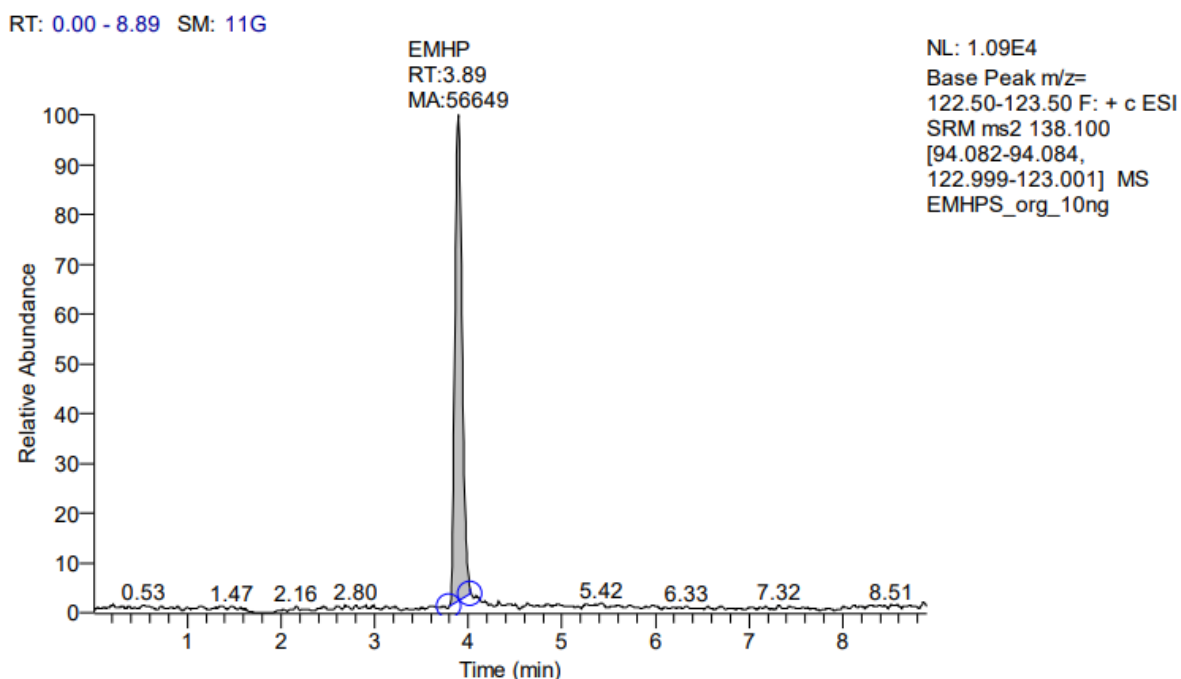


Рисунок 16 – Хроматограмма холостой пробы с добавлением стандарта ЭМГПС до конечной концентрации 30 нмоль/л

Предел обнаружения ЭМГП в образцах лизата смеси клеток линий НЕК293 и НЕК293-ОАТР1В1 при использовании данной аналитической методики составил 0,03 нмоль/л, при нем соотношение «сигнал/шум» составляло не менее 3.

Нижний предел количественного определения ЭМГП составил 0,1 нмоль/л, точность и прецизионность не превышали 20%, а отношение сигнала к шуму составляло не менее 10.

Калибровочная кривая. Для построения калибровочной кривой был проведен анализ 8 образцов холостого лизата смеси клеток линий НЕК293 и НЕК293-ОАТР1В1 с добавлением ЭМГПС до получения конечных концентраций 0,1; 0,3; 1; 3; 5; 10; 30; 50 нмоль/л. С использованием полученных в ходе анализа значений были построены калибровочные графики в координатах зависимости отношения площади пика ЭМГП к площади пика амантадина от концентрации ЭМГП.

Ниже приведены полученные уравнения линейной регрессии:

$$Y = 0,258989 + 0,13312 \cdot X, R^2 = 0,9990, 1/X$$

$$Y = 0,213448 + 0,127991 \cdot X, R^2 = 0,9997, 1/X$$

$$Y = 0,222422 + 0,130872 \cdot X, R^2 = 0,9967, 1/X$$

Полученные коэффициенты корреляции составили не менее 0,99, что соответствует принятым нормам. По уравнению линейной зависимости были рассчитаны отклонения концентраций калибровочных растворов от номинальных значений (Таблица 11).

Точность и прецизионность. Проводился анализ образцов лизатов смеси клеток линий НЕК293 и НЕК293-ОАТР1В1 с добавлением стандартных растворов ЭМГПС до получения контролей качества следующих концентраций: 0,1; 0,3; 30 и 50 нмоль/л. Образцы анализировались в рамках трех циклов. Для оценки точности и прецизионности внутри первого цикла анализировались 5 образцов каждой концентрации ЭМГПС (Таблица 12).

Таблица 11 – Отклонения концентраций ЭМГП в калибровочных растворах от их номинальных значений

Номинальная концентрация , нмоль/л	График 1		График 2		График 3	
	Рассчитанная концентрация , нмоль/л	Точность	Рассчитанная концентрация, нмоль/л	Точность	Рассчитанная концентрация, нмоль/л	Точность
0,1	0,089	-10,7%	0,086	-14,2%	0,093	-7,4%
0,3	0,299	-0,3%	0,340	13,2%	0,285	-5,1%
1,0	1,111	11,1%	1,019	1,9%	0,902	-9,8%
3,0	2,804	-6,5%	2,849	-5,0%	3,077	2,6%
5,0	5,162	3,2%	5,056	1,1%	5,626	12,5%
10,0	10,579	5,8%	10,389	3,9%	10,879	8,8%
30,0	29,037	-3,2%	29,811	-0,6%	30,979	3,3%
50,0	50,320	0,6%	49,851	-0,3%	47,559	-4,9%

Таблица 12 – Точность и прецизионность методики количественного определения ЭМГП в лизате клеток внутри цикла и между циклами

Концентрация, нмоль/л	Концентрация, рассчитанная внутри цикла, нмоль/л	SD внутри цикла	Внутрицикловая точность, %	Внутрицикловая прецизионность, %	Концентрация, рассчитанная между циклами, нмоль/л	SD между циклами	Межцикловая точность, %	Межцикловая прецизионность, %
0,1	0,09	0,01	12,55	14,62	0,10	0,02	-1,17	16,99
0,3	0,30	0,04	-1,32	14,24	0,30	0,03	1,13	9,19
30	28,64	1,20	4,53	1,31	29,35	1,71	2,17	5,84
50	48,43	2,84	3,15	5,86	49,70	3,06	0,60	6,16

Таблица 13 – Эффект матрицы и степень извлечения ЭМГП и амантадина

Препарат	Концентрация, нмоль/л	Матричный эффект, %	Нормализованный матричный эффект, %	Эффект извлечения, %	Нормализованный эффект извлечения, %
ЭМГП	0,3	93,8±3,9	96,1±6,2	96,6±9,9	108,6±10,6
	50	95,3±2,2	98,6±5,1	95,7±1,1	104,3±3,1
Амантадин	0,3	97,8±5,8	-	89,0±5,3	-
	50	96,9±5,6	-	91,8±2,1	-

Стабильность стандартных растворов ЭМГПС анализировалась при их хранении при -80°C в течение 60 сут. Стабильность растворов ЭМГПС в концентрациях 0,3 и 50 нмоль/л в лизате клеток оценивалась при краткосрочном хранении в условиях комнатной температуры, трехкратном цикле заморозки-разморозки при -80°C , при хранении при -80°C в течение 60 сут, после пробоподготовки и нахождении в течение 24 ч в автосемплере. Анализировали по 3 образца для каждой концентрации и каждого вида стабильности.

Правильность для каждой концентрации (для средних значений) находилась в пределах 15% от номинальных значений.

Матричный эффект. В холостой лизат клеток из шести различных источников после экстракции были добавлены рабочие растворы аналита для получения нижнего и верхнего контроля качества. Чистые растворы аналита (на воде) были приготовлены с такими же концентрациями. Матричный эффект рассчитывали как отношение площади пика в присутствии матрицы к площади пика в отсутствие матрицы для каждого контроля качества и внутреннего стандарта. Также рассчитывали нормализованный эффект матрицы по внутреннему стандарту (как частное от деления эффекта матрицы анализируемого вещества на эффект матрицы внутреннего стандарта). Рассчитанные относительное стандартное отклонение матричного эффекта ЭМГП, амантадина и нормализованного матричного эффекта ЭМГП находились в пределах нормы (не превышали 15%) (Таблица 13).

Степень извлечения. В холостой лизат клеток из шести различных источников после экстракции были добавлены рабочие растворы ЭМГПС для получения нижнего и верхнего контроля качества и внутреннего стандарта. Растворы ЭМГПС и внутреннего стандарта в лизате клеток были приготовлены с такими же концентрациями.

Степень извлечения рассчитывали как отношение площади пиков после экстракции из клеток к площади пиков в присутствии матрицы для каждого контроля качества и внутреннего стандарта. Также рассчитывали нормализованную по внутреннему стандарту степень извлечения (как частное от деления извлечения анализируемого вещества на извлечение внутреннего стандарта).

Рассчитанные относительное стандартное отклонение извлечения ЭМГП, амантадина и нормализованного извлечения ЭМГП находились в пределах нормы (не более 15%) (Таблица 13).

Перенос пробы. Для подтверждения отсутствия переноса пробы последовательно анализировались образцы лизатов с концентрацией ЭМГПС 50 нмоль/л и образцы клеточных лизатов без добавления препарата. На хроматограммах клеточных лизатов без добавления аналита пиков, соответствующих времени удержания ЭМГП, зафиксировано не было.

Таким образом, разработанная биоаналитическая методика является чувствительной, селективной, точной и прецизионной и может быть использована для оценки проникновения ЭМГП внутрь клеток.

3.5. Оценка принадлежности этилметилгидроксипиридина к субстратам и модуляторам ОАТР1В1 на клетках НЕК293-ОАТР1В1

Для оценки участия ОАТР1В1 в транспорте ЭМГП сравнивали проникновение анализируемого вещества в клетки линии НЕК293-ОАТР1В1 и НЕК293. Клетки культивировали на 24-луночных планшетах до формирования монослоя, после чего оценивали проникновение ЭМГП в концентрациях 1 и 10 мкМ внутрь клеток. При анализе проникновения 1 мкМ ЭМГП концентрации тестируемого вещества внутри клеток были ниже НПКО, поэтому в исследовании мы использовали концентрацию 10 мкМ.

Не было зарегистрировано статистически значимых различий в проникновении 10 мкМ ЭМГП в клетки НЕК293-ОАТР1В1 и НЕК293 в течение 5, 15, 30, 45 и 60 минут инкубации (Рисунок 17).

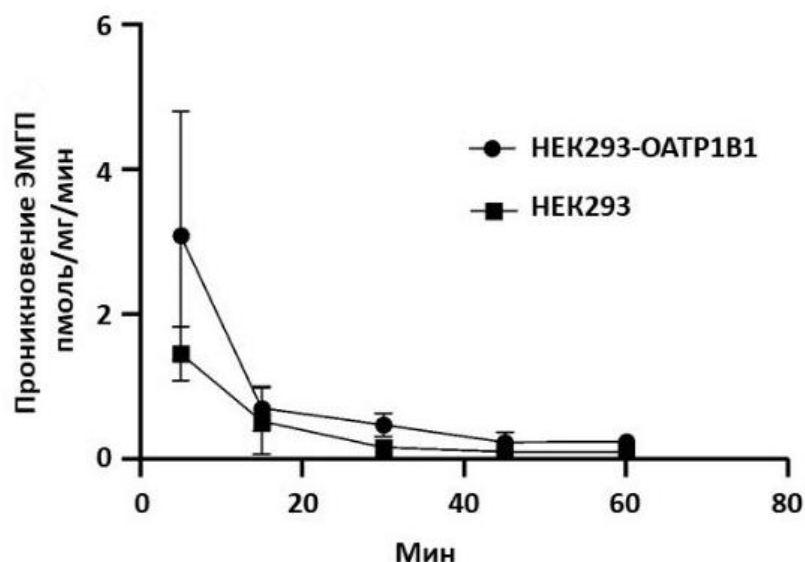


Рисунок 17 – Проникновение 10 мкМ ЭМГП в клетки HEK293-OATP1B1 и HEK293

Таким образом, полученные данные свидетельствуют о том, что ЭМГП не является субстратом OATP1B1.

Для оценки влияния ЭМГПС на активность OATP1B1 оценивали проникновение субстрата транспортера аторвастатина (1 мкМ) в отсутствие и в присутствии ЭМГПС (1-500 мкМ). В качестве позитивного контроля использовался рифампицин (классический ингибитор OATP1B1) в аналогичных концентрациях (1-500 мкМ). Дополнительно также изучалось влияние янтарной кислоты на активность OATP1B1 (1-500 мкМ).

В контроле скорость проникновения 1 мкМ аторвастатина внутрь клеток составила – $6,27 \pm 0,57$ пмоль/мин/мг белка.

ЭМГПС дозозависимо ингибировал проникновение аторвастатина в клетки HEK293-OATP1B1 в концентрации 1 мкМ – на 27,3% ($p=0,011$), 5 мкМ – на 32,9% ($p=0,006$), 10 мкМ – на 44,5% ($p=0,0029$), 100 мкМ – на 64,8% ($p<0,001$), 500 мкМ – на 90,4% ($p<0,001$) (Таблица 14).

Значение константы полумаксимального ингибирования (IC_{50}) ЭМГПС составило $12,1 \pm 7,64$ мкМ (Рисунок 18 а).

Классический ингибитор OATP1B1 – рифампицин также дозозависимо ингибировал проникновение аторвастатина в клетки HEK293-OATP1B1 в

концентрации 1 мкМ – на 30,6% ($p<0,001$), 5 мкМ – на 59,5% ($p<0,001$), 10 мкМ – на 83,1% ($p<0,001$), 100 мкМ – на 91,2% ($p<0,001$), 500 мкМ – на 95,2% ($p<0,001$).

Значение IC_{50} рифампицина составило $2,51\pm1,35$ мкМ (Рисунок 18 б) и было достоверно ниже, чем IC_{50} ЭМГПС ($p=0,049$).

При сравнении проникновения аторвастатина внутрь клеток НЕК293-ОАТР1В1 на фоне применения ЭМГПС и рифампицина были получены следующие результаты. В концентрациях 1 и 500 мкМ различия между проникновением аторвастатина были статистически не значимы ($p>0,05$), а в концентрациях 5, 10 и 100 мкМ транспорт аторвастатина внутрь клеток при применении ЭМГПС был достоверно выше, чем при использовании рифампицина: в концентрации 5 мкМ на 65,7% ($p=0,016$), 10 мкМ – на 228,3% ($p=0,002$), 100 мкМ – на 301,8% ($p=0,0063$) (Таблица 14).

Таблица 14 – Влияние ЭМГПС, рифампицина и сукцината на проникновение аторвастатина внутрь клеток НЕК293-ОАТР1В1 (пмоль/мин/мг белка; $M\pm SD$; $n=3$)

	ЭМГПС	Рифампицин	Янтарная кислота
Контроль	$6,27\pm0,57$		
1 мкМ	$4,56\pm0,53^*$	$4,35\pm0,34^{***}$	$5,83\pm0,57$
5 мкМ	$4,21\pm0,57^{**}$	$2,54\pm0,70^{***\#}$	$6,39\pm0,52$
10 мкМ	$3,48\pm0,69^{**}$	$1,06\pm0,16^{***\#}$	$5,0\pm0,70$
100 мкМ	$2,21\pm0,62^{***}$	$0,55\pm0,24^{***\#}$	$5,97\pm0,47$
500 мкМ	$0,60\pm0,22^{***}$	$0,30\pm0,17^{***}$	$5,33\pm0,66$

Примечания

* – $p<0,05$, ** – $p<0,01$, *** – $p<0,001$ – статистически значимые различия с показателями контроля;

– $p<0,05$ – статистически значимые различия между ЭМГПС и рифампицином.

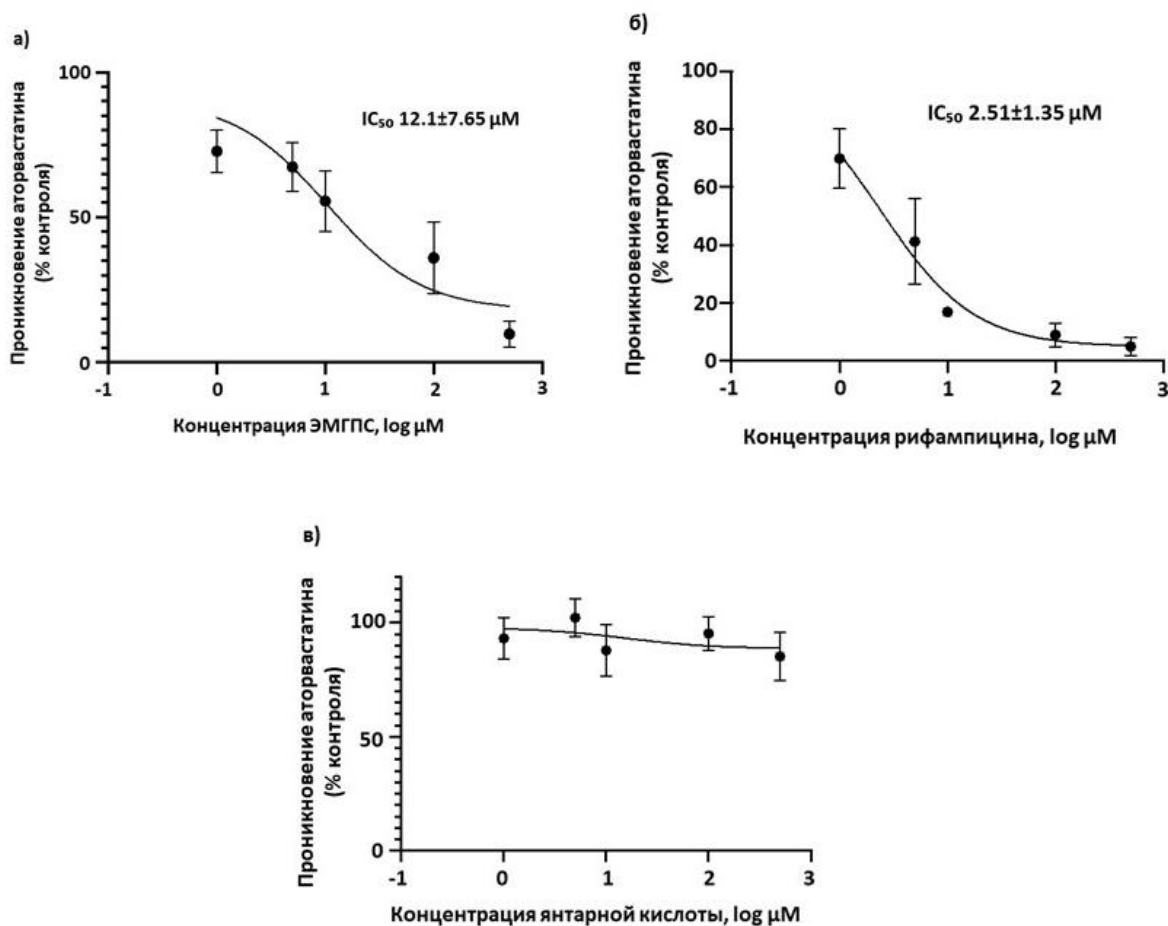


Рисунок 18 – Ингибирование ОАТР1В1-опосредованного транспорта аторвастатина под действием ЭМГПС (а), рифампицина (б) и янтарной кислоты (в)

Молекула ЭМГПС включает в себя два функционально значимых компонента – ЭМГП и янтарную кислоту. Для изучения роли каждого компонента во влиянии на активность ОАТР1В1 было оценено действие янтарной кислоты на активность белка-транспортера. В ходе анализа было показано, что во всех протестированных концентрациях янтарная кислота достоверного эффекта на изучаемый показатель не оказала (Таблица 14, Рисунок 18 в).

Таким образом, ЭМГПС ингибирует активность ОАТР1В1 за счет наличия ЭМГП в его молекуле, однако по своей ингибирующей активности он уступает классическому ингибитору ОАТР1В1 – рифампицину.

3.6. Оценка влияния этилметилгидроксипиридина сукцината на экспрессию гена *SLCO1B1*, относительное количество и активность OATP1B1 в клетках линии HepG2

Для оценки влияния ЭМГПС на экспрессию мРНК гена *SLCO1B1*, кодирующего OATP1B1, и на относительное количество изучаемого белка клетки HepG2 инкубировали с тестируемым веществом в концентрациях 1, 10 и 100 мкМ в течение 24 часов.

В ходе исследования было показано, что ЭМГПС во всех протестированных концентрациях повышал экспрессию мРНК *SLCO1B1* на 102,7% ($p=0,0013$), 101,6% ($p=0,0014$) и на 54,2% ($p=0,0484$) по сравнению с контролем соответственно (Рисунок 19), однако не влиял на относительное количество OATP1B1 (Рисунок 20).

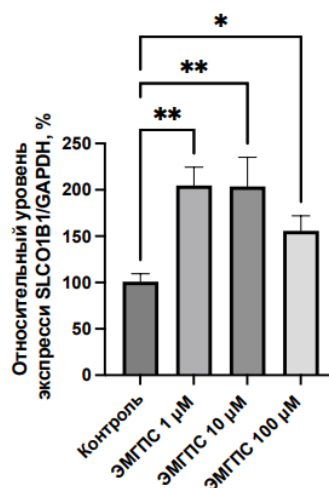


Рисунок 19 – Влияние ЭМГПС на экспрессию *SLCO1B1* в клетках HepG2

Примечание: * – $p<0,05$, ** – $p<0,01$ – статистически значимые отличия по сравнению с показателями контроля.

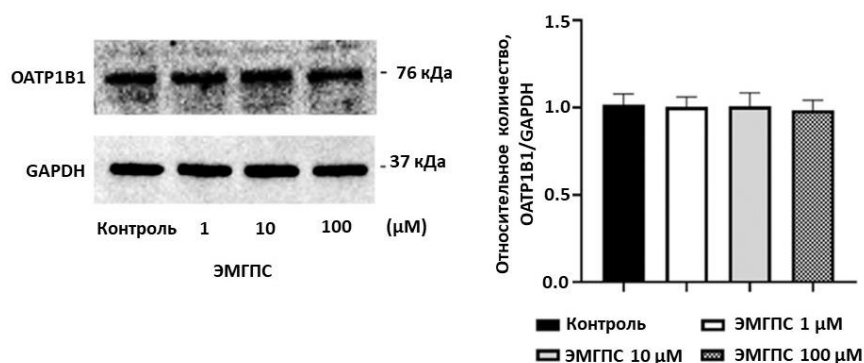


Рисунок 20 – Влияние ЭМГПС на относительное количество OATP1B1 в клетках HepG2

Таким образом, в ходе настоящего исследования установлено, что ЭМГПС повышает экспрессию гена *SLCO1B1* и не влияет на относительное количество ОАТР1В1 в клетках НерG2.

Классические эксперименты по оценке влияния тестируемых веществ на активность ОАТР1В1 (анализ веществ на принадлежность к ингибиторам/индукторам) проводят на трансфицированных клеточных линиях, селективно экспрессирующих необходимый белок, что и было выполнено нами на созданной клеточной линии НЕК293-ОАТР1В1.

Однако, поскольку одно и то же вещество может одновременно являться субстратом и влиять на несколько транспортеров, данный подход не всегда позволяет адекватно прогнозировать межлекарственные взаимодействия в клинике [177]. Клетки линии НерG2 экспрессируют все основные транспортеры гепатоцитов человека, в том числе ОАТР1В1 [75], поэтому на завершающем этапе были выполнены эксперименты по оценке влияния ЭМГПС на проникновение аторвастатина внутрь клеток НерG2.

ЭМГПС в концентрациях 10, 100 и 500 мкМ снижал проникновение аторвастатина в клетки НерG2 на 17,2% ($p=0,012$), 36,4% ($p=0,0029$), 50,8% ($p=0,0002$) соответственно по сравнению с контролем (Таблица 15).

Аналогичным образом рифампицин – классический ингибитор ОАТР1В1 – снижал концентрацию субстрата транспортера аторвастатина в концентрациях 10, 100 и 500 мкМ на 24,1% ($p=0,007$), 29,1% ($p=0,002$) и 38,7% ($p=0,0003$) по сравнению с контролем, что характеризует его ингибирующее действие. Причем по ингибирующей активности (IC_{50}) ЭМГПС был сопоставим с рифампицином (Рисунок 21).

Таблица 15 – Влияние ЭМГПС и рифампицина на проникновение аторвастатина внутрь клеток HepG2 (пмоль/мг/мин; $M \pm SD$; $n=3$)

Концентрация вещества	Рифампицин	ЭМГПС
Контроль	4,78±0,49	
1 мкМ	4,52±0.13	3,96±0.62
10 мкМ	3,63±0.32*	3,39±0.31*
100 мкМ	3,39±0.35*	3,04±0.46*
500 мкМ	2,93±0.34*	2,35±0.31*

Примечание – * – $p < 0,05$ - по сравнению с контролем (4.78±0.49 пмоль/мг/мин).

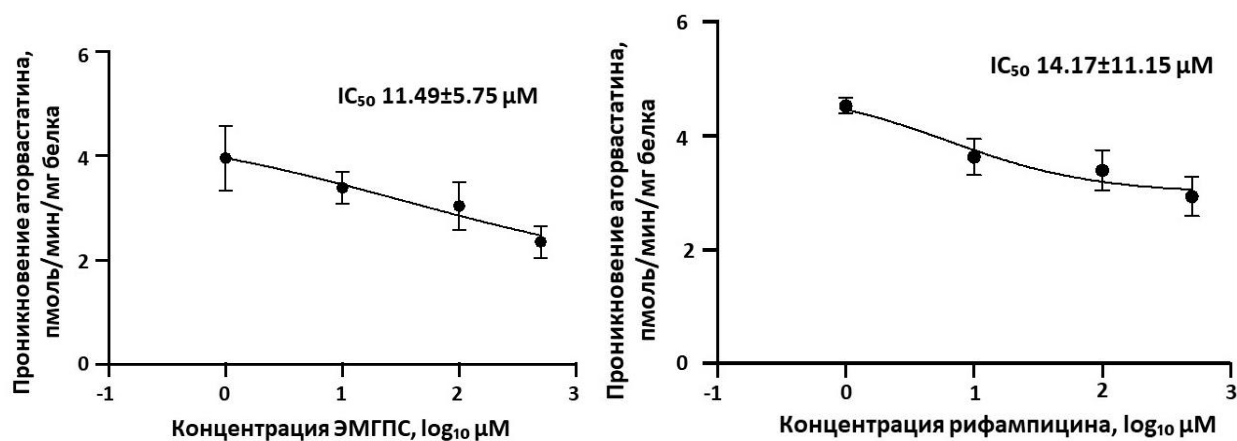


Рисунок 21 – Влияние ЭМГПС и рифампицина на проникновение аторвастатина внутрь клеток HepG2

Таким образом, и на модели гепатоцитов – линии клеток HepG2, ЭМГПС ингибирует проникновение аторвастатина внутрь клеток.

3.7. Оценка клинической значимости полученных результатов

Согласно международным рекомендациям [90, 107, 170], для оценки клинической значимости полученных результатов и принятия решения о необходимости проведения клинических исследований межлекарственных взаимодействий на уровне ОАТР1В1 с субстратами транспортера, необходимо рассчитать отношение C_{max} ЭМГПС в плазме к уровню IC_{50} , полученному в результате эксперимента на клетках. Если значение данного соотношения составит 0,1 или более, межлекарственное взаимодействие может быть клинически значимым, и необходимо проведение клинических исследований.

Согласно данным литературы, C_{max} ЭМГПС составляет 0,39 мкМ [48]. Рассчитанное отношение C_{max}/IC_{50} на клетках НЕК293-ОАТР1В1 для ЭМГПС составило 0,032 ($0,39 \text{ мкМ} / 12,1 \text{ мкМ} = 0,032$), C_{max}/IC_{50} на клетках HepG2 – $0,39 \text{ мкМ} / 11,49 \text{ мкМ} = 0,034$.

Полученные значения $C_{\text{max}}/IC_{50} < 0,1$, что свидетельствует о том, что влияние ЭМГПС на активность ОАТР1В1 у пациентов является клинически не значимым и совместное применение ЭМГПС с субстратами ОАТР1В1 не будет приводить к развитию межлекарственных взаимодействий и, соответственно, побочных эффектов препаратов, связанных с их накоплением в крови пациентов.

Согласно международным рекомендациям, дополнительные клинические исследования для подтверждения полученных результатов проводить не требуется.

ОБСУЖДЕНИЕ ПОЛУЧЕННЫХ РЕЗУЛЬТАТОВ

ЭМГПС – это оригинальный отечественный препарат, обладающий политаргетным и мультимодальным действием и широко применяющийся для лечения большого спектра заболеваний в неврологии и ряде других специальностей. Препарат обладает выраженными нейро-, гепато- и кардиопротективным, антигипоксанта́ным, антиоксидантным, мембраностабилизирующим, анксиолитическим эффектами, улучшает мозговое кровообращение, а также липидный профиль крови [14].

Многочисленные клинические исследования доказывают эффективность применения ЭМГПС при ишемическом инсульте, хроническом нарушении мозгового кровообращения, синдроме дефицита внимания с гиперактивностью у детей, хронической сердечной недостаточности [35-36, 51, 53].

Учитывая, что терапия вышеперечисленных заболеваний в большинстве случаев предполагает одновременное назначение большого количества препаратов из разных фармакологических групп, высока вероятность развития межлекарственных взаимодействий с участием ЭМГПС.

Классически межлекарственные взаимодействия могут быть разделены на фармакодинамические и фармакокинетические, а среди последних важную роль играют взаимодействия на уровне белков-транспортеров [43].

Белки-транспортеры, имеющие клиническое значение, относятся к двум основным группам: ABC-транспортеры, переносящие вещества за счет энергии АТФ, и SLC-транспортеры, выполняющие перенос веществ без затраты энергии за счет электрохимического потенциала.

Полипептид, транспортирующий органические анионы, 1B1 (OATP1B1) – представитель SLC-транспортеров, является самым изученным членом OATP1-семейства [97, 130].

OATP1B1 был выделен из человеческой печени тремя независимыми группами ученых чуть более 20 лет назад (Т. Abe и др., 1999; В. Hsiang и др., 1999; J. König и др., 2000) [61-62, 100].

ОАТР1В1, как и его ближайший гомолог ОАТР1В3, считается селективным печеночным транспортером, так как экспрессируется преимущественно на базолатеральной мембране гепатоцитов [97].

ОАТР1В1 обладает широкой субстратной специфичностью и транспортирует большое количество лекарственных средств, таких, как статины, ингибиторы АПФ, блокаторы рецепторов ангиотензина II, кларитромицин, метотрексат, а также ряд других [130, 163].

ОАТР1В1 играет важную роль в развитии МЛВ, так как опосредует проникновение его субстратов в гепатоциты, где происходит их биотрансформация. Ингибирование функциональной активности данного транспортера под действием различных лекарственных препаратов может приводить к накоплению субстратов ОАТР1В1 в крови и развитию НЛР [81, 86, 127, 138].

Учитывая роль ОАТР1В1 в фармакокинетике эндо- и экзобиотиков, ведущие регуляторные органы (ICH, FDA, EMA) рекомендуют тестировать все новые лекарственные средства на принадлежность к субстратам и модуляторам ОАТР1В1, так как это позволит увеличить профиль безопасности проводимой фармакотерапии [29, 90, 107, 170].

Влияние ЭМГПС на функциональную активность ОАТР1В1 на сегодняшний день не изучено несмотря на то, что ЭМГПС назначается врачами при широком спектре патологий, а субстратами ОАТР1В1 являются препараты, назначаемые большинству неврологических и кардиологических больных.

В ходе настоящего исследования была оценена принадлежность ЭМГПС к субстратам и модуляторам функционирования белка-переносчика ОАТР1В1.

Классически данные исследования проводят на рекомбинантных клеточных линиях, селективно гиперэкспрессирующих целевой белок-транспортер [170].

На данный момент подобные клеточные линии в России отсутствуют, поэтому на первом этапе исследования была создана рекомбинантная клеточная линия, селективно гиперэкспрессирующая ОАТР1В1.

Для трансфекции была выбрана клеточная линия НЕК293. Клетки данной линии характеризуются низкой эндогенной экспрессией транспортеров, в том числе

OATP1B1, что позволяет рассматривать их как оптимальную культуру для получения модельной линии для гиперэкспрессии целевого гена [88]. Также преимуществами клеток HEK293 являются высокая эффективность трансфекции, высокая скорость роста и простота поддержания культуры, а также способность осуществлять правильный фолдинг целевого белка [63].

Целевой ген был введен в клетки HEK293 в составе плазмиды pEGFP-N1-SLCO1B1, обеспечивающей экспрессию OATP1B1, слитого с EGFP, на С-конце. Затем была проведена селекция с использованием G-418 и отбор клонов с интегрированной в геном генетической конструкцией методом предельных разведений. При нелегитимной рекомбинации экспрессионный вектор встраивается в случайное место в геноме. В результате этого большинство клонов, экспрессирующих целевой продукт, могут быть нестабильны или обеспечивать низкий выход белка. Выделение стабильных клонов клеток, экспрессирующих рекомбинантный белок с высоким выходом, является ключевой задачей в разработке стабильной клеточной линии.

В данной работе значительная часть клонов выживала в среде с антибиотиком, однако не обладала способностью к флуоресценции. Вероятно, в таких клонах интеграция плазмиды произошла с нарушением структуры гена слитого белка. Так как ген *EGFP* находился после *SLCO1B1* в той же рамке считывания, появление зеленой флуоресценции указывает на экспрессию целевого гена. Использование флуоресцентной метки облегчает селекцию, что позволило нам получить стабильно экспрессирующие белок клоны даже при трансфекции небольшой исходной популяции (10^4 клеток).

Ранее, в работе, где была получена линия HEK293, транзистентно экспрессирующая *SLCO1B1*, было показано, что использование EGFP в качестве С-концевой метки не препятствует функциональности белка. Так, было установлено, что при временной экспрессии такого химерного белка в клетках HEK293 поглощение эстрон-3-сульфата возросло более чем в 6 раз по сравнению с нативными клетками [124].

В полученной клеточной линии флуоресцентная метка была локализована преимущественно на клеточной мембране, а рекомбинантный OATP1B1 обладал функциональной активностью. В исследовании поглощения аторвастатина были получены следующие значения константы Михаэлиса и скорости реакции: $K_m = 1,03 \pm 0,67$ мкМ, $V_{max} = 7,42 \pm 0,93$ пмоль*мг⁻¹*мин⁻¹. Полученные значения активности OATP1B1 в созданной клеточной линии соответствуют показателям, полученным другими авторами: в работе M. Karlgren с соавт. (2012) [104] значение K_m составляло $0,77 \pm 0,24$ мкМ, а $V_{max} = 6,61 \pm 1,24$ пмоль*мг⁻¹*мин⁻¹, в работе R. Amundsen и др. (2010) были получены значения $K_m = 0,93 \pm 0,23$ мкМ, $V_{max} = 3,84 \pm 0,27$ пмоль*мг⁻¹*мин⁻¹ [74].

Таким образом, созданная клеточная линия стабильно экспрессирует функционально активный OATP1B1 и может быть использована для изучения работы транспортера, а также в качестве модели для тестирования лекарственных веществ и прогнозирования развития межлекарственных взаимодействий, опосредованных OATP1B1.

На следующем этапе исследования оценивалась принадлежность ЭМГПС к субстратам, индукторам и ингибиторам OATP1B1.

Для оценки принадлежности ЭМГП к субстратам OATP1B1 изучали его проникновение в клетки линий НЕК293 и НЕК293-OATP1B1. Проникновение 10 мкМ ЭМГП в обе клеточные линии статистически значимо не различалось во всех временных точках (5, 15, 30, 45, 60 минут), что свидетельствует о том, что ЭМГП не является субстратом OATP1B1.

В отличие от ЭМГП, проникновение аторвастатина в клетки НЕК293-OATP1B1 существенно превосходило его проникновение в клетки НЕК293, что еще раз подтверждает адекватность созданной клеточной линии.

Затем было изучено влияние ЭМГПС на активность OATP1B1.

Для этого оценивали проникновение субстрата транспортера аторвастатина в концентрации 1 мкМ в отсутствие и в присутствии ЭМГПС (1, 10, 100, 500 мкМ) или рифампицина (1, 10, 100, 500 мкМ), являющегося классическим ингибитором функциональной активности OATP1B1. Проникновение аторвастатина в клетки

НЕК293-ОАТР1В1 дозозависимо снижалось в присутствии ЭМГПС, причем значение константы полумаксимального ингибирования IC_{50} для ЭМГПС составило $12,1 \pm 7,64$ мкМ. Однако значение IC_{50} для ЭМГПС было статистически значимо выше, чем значение IC_{50} для классического ингибитора ОАТР1В1 рифампицина ($2,51 \pm 1,35$ мкМ) ($p=0,049$).

Таким образом, ЭМГПС ингибирует активность ОАТР1В1, однако по своей ингибирующей активности уступает классическому ингибитору ОАТР1В1-рифампицину.

Аналогичные результаты были получены в экспериментах на клетках гепатоцеллюлярной карциномы НерG2, экспрессирующей все основные транспортеры и транскрипционные факторы гепатоцитов [69].

Молекула ЭМГПС включает в себя два функционально значимых компонента – ЭМГП и янтарную кислоту. Для изучения роли каждого компонента во влиянии на активность ОАТР1В1 было оценено действие янтарной кислоты на активность белка-транспортера. В ходе исследования было установлено, что янтарная кислота не влияла на активность ОАТР1В1, что свидетельствует о том, что ЭМГПС ингибирует транспортер за счет оксипиридинового компонента.

Для оценки клинической значимости полученных результатов необходимо рассчитать отношение C_{max} ЭМГПС в плазме к уровню IC_{50} , полученному в результате эксперимента. Если данное соотношение составит 0,1 или более, межлекарственное взаимодействие может быть клинически значимым [90, 107, 170].

Согласно данным литературы, C_{max} ЭМГПС составляет 0,39 мкМ [48]. Рассчитанное отношение C_{max}/IC_{50} на клетках НЕК293-ОАТР1В1 для ЭМГПС составило 0,032 ($0,39 \text{ мкМ} / 12,1 \text{ мкМ} = 0,032$), C_{max}/IC_{50} на клетках НерG2 - 0,034 ($0,39 \text{ мкМ} / 11,49 \text{ мкМ} = 0,034$).

Значения $C_{max}/IC_{50} < 0,1$ свидетельствуют о том, что влияние ЭМГПС на активность ОАТР1В1 у пациентов является клинически не значимым и совместное применение ЭМГПС с субстратами ОАТР1В1 не будет приводить к развитию межлекарственных взаимодействий.

Полученные данные согласуются с представлениями о структурах клинически значимых ингибиторов OATP1B1, для которых IC_{50} составляет <10 мкМ. Если лекарственное средство имеет прогнозируемое значение $ClogP > 3,5$ и 1 или более отрицательно заряженных атомов, соединение является ингибитором OATP1B1 в 94% случаев [103].

Помимо прямого ингибирующего действия, ЭМГПС теоретически может влиять на OATP1B1, влияя на экспрессию гена *SLCO1B1*, кодирующего транспортер, и изменяя уровень белка OATP1B1.

Для изучения данного действия ЭМГПС были выполнены эксперименты на культуре клеток HepG2. В ходе исследования было установлено, что при экспозиции 24 ч ЭМГПС в концентрациях 1-100 мкМ повышал экспрессию гена *SLCO1B1*, однако не влиял на уровень OATP1B1. Так как количество белка-транспортера не изменялось, полученные данные свидетельствуют о том, что и при длительном введении ЭМГПС не повлияет на активность OATP1B1.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В ходе настоящего исследования была создана рекомбинантная линия клеток, селективно гиперэкспрессирующая OATP1B1, разработаны и валидированы ВЭЖХ-МС/МС методики количественного определения ЭМГП и аторвастатина в лизатах клеток.

Проникновение ЭМГП в клетки HEK293 и HEK293-OATP1B1 статистически не различалось, что говорит о том, что ЭМГП не является субстратом белка-транспортера OATP1B1.

Установлено, что этилметилгидроксипиридина сукцинат в концентрациях 1-500 мкМ дозозависимо ингибирует проникновение субстрата OATP1B1 аторвастатина в клетки, то есть является ингибитором функциональной активности OATP1B1, но по своей ингибирующей активности уступает рифампицину. Способность ЭМГПС ингибировать OATP1B1 была подтверждена и на клетках гепатоцеллюлярной карциномы HepG2, экспрессирующей основные транспортные белки гепатоцитов.

ЭМГПС во всех протестированных концентрациях при сроке инкубации 24ч повышает экспрессию гена *SLCO1B1* и не влияет на относительное количество OATP1B1.

Полученные результаты свидетельствуют о том, ЭМГПС может длительно безопасно комбинироваться как с субстратами OATP1B1 (например, статинами), так и с ингибиторами транспортера (например, рифампицином) и не будет вызывать развитие фармакокинетических межлекарственных взаимодействий.

ВЫВОДЫ

1. Разработанная клеточная линия НЕК293-ОАТР1В1, селективно гиперэкспрессирующая полипептид, транспортирующий органические анионы, 1В1, характеризуется следующими показателями транспорта 1 мкМ аторвастатина: $K_m = 1,03 \pm 0,67$ мкМ, $V_{max} = 7,42 \pm 0,93$ пмоль*мг⁻¹*мин⁻¹.

2. Разработана методика оценки принадлежности лекарственных веществ к субстратам и модуляторам полипептида, транспортирующего органические анионы, 1В1 с помощью созданной рекомбинантной клеточной линии. Для тестирования веществ на принадлежность к субстратам транспортера сравнивают их проникновение в клетки НЕК293 и НЕК293-ОАТР1В1 в концентрациях 1 или 10 мкМ в течение 5 мин. Для тестирования на принадлежность к ингибиторам полипептида, транспортирующего органические анионы, 1В1 анализируют влияние изучаемых веществ на проникновение 1 мкМ аторвастатина в клетки НЕК293-ОАТР1В1 в течение 5 мин.

3. Разработанные и валидированные методики количественного определения аторвастатина и этилметилгидроксипиридина в лизате клеток с помощью ВЭЖХ-МС/МС являются высокочувствительными, а также соответствуют требованиям, предъявляемым к биоаналитическим методикам, что делает целесообразным их использование для определения тестируемых веществ в образцах лизатов клеток в установленном диапазоне концентраций.

4. Установлено, что этилметилгидроксипиридин не является субстратом полипептида, транспортирующего органические анионы, 1В1, следовательно, не участвует в развитии межлекарственных взаимодействий с ингибиторами данного транспортера и может длительно безопасно назначаться с ними в комбинации.

5. Доказано, что этилметилгидроксипиридина сукцинат не влияет на относительное количество полипептида, транспортирующего органические анионы, 1В1, но ингибирует его активность со значением $IC_{50} 12,1 \pm 7,64$ мкМ (на клетках линии НЕК293-ОАТР1В1) и $IC_{50} 11,49 \pm 5,75$ мкМ (на клетках линии НерG2). Рассчитанные соотношения S_{max}/IC_{50} составили 0,032 и 0,034, что

свидетельствует о том, что ингибирование OATP1B1 под действием этилметилгидроксипиридина сукцината не является клинически значимым, и данный препарат не участвует в развитии межлекарственных взаимодействий с субстратами транспортера, что также позволяет длительно назначать его с ними в комбинации.

ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

1. Разработчикам лекарственных препаратов рекомендуется использовать созданную клеточную линию НЕК293-ОАТР1В1, селективно гиперэкспрессирующую полипептид, транспортирующий органические анионы, 1В1, для оценки принадлежности лекарственных веществ к субстратам, индукторам и ингибиторам данного транспортера.
2. Методики количественного определения этилметилгидроксипиридина и аторвастатина целесообразно использовать разработчикам лекарственных препаратов для анализа фармакокинетики при создании дженерических препаратов, а также фармакокинетикам при проведении терапевтического лекарственного мониторинга.
3. Практикующим врачам-клиническим фармакологам можно безопасно комбинировать этилметилгидроксипиридина сукцинат с субстратами и ингибиторами транспортера ОАТР1В1, так как между ними не развиваются фармакокинетические межлекарственные взаимодействия.

ПЕРСПЕКТИВЫ ДАЛЬНЕЙШЕЙ РАЗРАБОТКИ ТЕМЫ

Технологию создания клеточной линии НЕК293-ОАТР1В1, селективно гиперэкспрессирующую полипептид, транспортирующий органические анионы 1В1, целесообразно использовать для разработки аналогичных клеточных линий, селективно гиперэкспрессирующих клинически значимые белки-транспортеры.

Выявленная в данном исследовании способность этилметилгидроксипиридина сукцината ингибировать активность полипептида, транспортирующего органические анионы 1В1, требует дальнейшего уточнения, в частности, установления механизма ингибирования и сайтов связывания тестируемого вещества в молекуле транспортера.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

АПФ – ангиотензинпревращающий фермент

АТФ – аденозинтрифосфат

ВЭЖХ-МС/МС – высокоэффективная жидкостная хроматография с tandemным масс-спектрометрическим детектированием

ГАМК – гамма-аминомасляная кислота

ГМГ-КоА-редуктаза – 3-гидрокси-3-метил-глутарил-коэнзим А-редуктаза

ДМСО – диметилсульфоксид

ИЛ – интерлейкин

кДНК – комплементарная дезоксирибонуклеиновая кислота

ЛТ – лейкотриен

МЛВ – межлекарственные взаимодействия

Мин - минута

мРНК – матричная рибонуклеиновая кислота

НЛР – нежелательные лекарственные реакции

НПКО – нижний предел количественного определения

ОАТР1В1 – полипептид, транспортирующий органические анионы, 1В1

ОАТР1В3 – полипептид, транспортирующий органические анионы, 1В3

ОТ-ПЦР – полимеразная цепная реакция с обратной транскрипцией

ПЦР – полимеразная цепная реакция

ЭДТА – этилендиаминтетрауксусная кислота

ЭМГПС – этилметилгидроксипиридина сукцинат

АВС – АТФ-связывающие белки (англ.: ATP-binding cassette transporters)

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

BCRP – белок устойчивости рака молочной железы (англ.: breast cancer resistance protein)

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

ССК-8 – холецистокинин октапептид (англ.: cholecystokinin octapeptide)

CYP – цитохром P (англ.: Cytochrome P)

DMEM – Дульбекко модифицированная среда Игла

EGFP – улучшенный зелёный флуоресцентный белок (англ.: Enhanced Green Fluorescent Protein)

EMA – Европейское агентство лекарственных средств (англ.: The European Medicines Agency)

FDA – Управление по контролю качества пищевых продуктов и лекарственных средств (англ.: Food and Drug Administration)

G-418 – генетицин (англ.: geneticin)

GAPDH – глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназа

HeLa – культура клеток эпителиоидной карциномы шейки матки, полученная из клеток Генриетты Лакс (англ.: Henrietta Lacks)

HEK293 – клетки эмбриональной почки человека (англ.: human embryonic kidney)

HepG2 – клетки гепатоцеллюлярной карциномы (англ.: hepatocellular carcinoma)

HIF-1 α , HIF-4 α – факторы, индуцируемые гипоксией (англ.: hypoxia inducible factor)

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

ICH – Международный совет по гармонизации (англ.: International Council For Harmonisation Of Technical Requirements For Pharmaceuticals For Human Use)

LST – liver-specific transporter

MATEs – белки эффлюкса лекарств и токсикантов (англ.: multidrug and toxin extrusion proteins)

mTOR – механическая мишень рапамицина (англ.: mechanistic target of rapamycin)

NRF2 – ядерный фактор эритроидного происхождения-2 (англ.: nuclear factor erythroid 2-related factor 2)

Pg – простагландин (англ.: prostaglandin)

SD – стандартное отклонение (англ.: standard deviation)

SLC – транспортёры растворённых веществ (англ.: solute carrier transporters)

SLCO1B1 – ген, кодирующий белок OATP1B1

SNP – однонуклеотидный полиморфизм (англ.: Single Nucleotide Polymorphism)

TMD – трансмембранный домен (англ.: transmembrane domain)

Tx – тромбоксан (англ.: thromboxane)

VEGF – эндотелиальный сосудистый фактор роста (англ.: vascular endothelial growth factor)

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Актуальные вопросы безопасности лекарственных средств, возможности совершенствования системы фармаконадзора / М.В. Журавлева, Б.К. Романов, Г.И. Городецкая [и др.]. – Текст: непосредственный // Безопасность и риск фармакотерапии. – 2019. – Т. 7, №3. – С. 109–119.
2. Антиоксидантные свойства производных 3-оксипиридина: препарата Мексидол®, эмоксипина и проксипина / Г.И. Клебанов, О.Б. Любицкий, О.В. Васильева [и др.]. – Текст: непосредственный // Вопросы медицинской химии. – 2001. – Т. 47. – С. 288–300.
3. Влияние афобазола на активность ABCB1-белка у пациентов с низкой тревожностью / А.В. Щулькин, И.В. Черных, М.В. Гацаного [и др.]. – Текст: непосредственный // Фармакогенетика и фармакогеномика. – 2019. – Т. 2. – С. 35–37.
4. Влияние изменения метаболического и антиоксидантного статуса миокарда на выраженность его ишемического и реперфузионного повреждения / А. В. Сыренский, М. М. Галагудза, Е. И. Егорова [и др.] // Российский физиологический журнал им. И.М. Сеченова. – 2008. – Т. 94, № 10. – С. 1171–1180.
5. Влияние Мексидола на качество жизни и функциональный статус пациентов с хронической ишемией головного мозга и хронической сердечной недостаточностью с низкой фракцией выброса / В.В. Толкачева, Э.Р. Казахмедов, Ж.Д. Кобалава [и др.]. – Текст: непосредственный // Кардиология и сердечно-сосудистая хирургия. – 2021. – Т. 14. – С. 80–89.
6. Влияние мексидола на соотношение 6 β -гидрокортизол/свободный кортизол. Возможная индукция CYP3A4 / П.А. Баранов, С.А. Апполонова, Г.М. Родченков [и др.]. – Текст: непосредственный // Экспериментальная и клиническая фармакология. – 2010. – Т. 73, №11. – С. 39–40.
7. Влияние мексидола на экспрессию транскрипционного фактора Nrf2 в коре больших полушарий головного мозга при экспериментальной ишемии/ Е.Н.

Якушева, П.Ю. Мыльников, И.В. Черных [и др.]. – Текст: непосредственный // Журнал неврологии и психиатрии им. С.С. Корсакова. – 2018. – Т. 5. – С. 63–67.

8. Влияние мексидола на экспрессию фактора, индуцируемого гипоксией HIF-1 α , в коре больших полушарий головного мозга крыс при ишемии / Е.Н. Якушева, П.Ю. Мыльников, И.В. Черных [и др.]. – Текст: непосредственный // Журнал неврологии и психиатрии им. С.С. Корсакова. – 2017. – Т. 10. – С.62–66.

9. Влияние оригинальных отечественных нейротропных препаратов на полипептиды, транспортирующие органические анионы OATP1B1 и OATP1B3 / П.Д. Ерохина, Ю.В. Абаленихина, П.Ю. Мыльников [и др.]. – Текст: непосредственный // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. – 2023. – Т. 8.– С. 198–203.

10. Влияние препарата Мексидол® на церебральный митохондриогенез в молодом возрасте и при старении / Ю.И. Кирова, Ф.М. Шакова, Э.Л. Германова [и др.]. – Текст: непосредственный // Журнал неврологии и психиатрии им. С.С. Корсакова. – 2020. – Т. 120, №1. – С. 62–69.

11. Влияние производных 3-оксипиридина на процессы перекисного окисления липидов / Л.Г. Комаров, М.В. Биленко, А.А. Шведова [и др.]. – Текст: непосредственный // Вопросы медицинской химии. – 1985. – Т. 2. – С. 40–45.

12. Возможности мультимодальной нейропротекции у пациентов с хронической ишемией головного мозга на фоне артериальной гипертензии и атеросклероза / И.А. Грибачева, Т.Ф. Попова, Е.В. Петрова [и др.]. – Текст: непосредственный // Неврология, нейропсихиатрия, психосоматика. – 2023. – Т. 15, №2. – С. 19–26.

13. Воронина Т.А. Антиоксиданты/антигипоксанты – недостающий пазл эффективной патогенетической терапии пациентов с COVID-19 / Т.А. Воронина. – Текст: непосредственный // Инфекционные болезни. – 2020. – Т. 18, №11. – С. 97–102.

14. Воронина Т.А. Комбинированное применение мексидола с известными лекарственными средствами / Т.А. Воронина, Е.А. Иванова. – Текст:

непосредственный // Журнал неврологии и психиатрии им. С.С. Корсакова. – 2019. – Т. 119, №4. – С. 115–124.

15. Воронина Т.А. Мексидол. Основные нейropsychотропные эффекты и механизм действия / Т.А. Воронина. – Текст: непосредственный // Фарматека. – 2009. – Т. 180, №6. – С. 1–4.

16. Воронина Т.А. Мексидол: спектр фармакологических эффектов / Т.А. Воронина. – Текст: непосредственный // Журнал неврологии и психиатрии. – 2012. – Т. 12. – С. 86–90.

17. Воронина Т.А. Пионер антиоксидантной нейропротекции. 20 лет в клинической практике / Т.А. Воронина. – Текст: непосредственный // РМЖ. – 2016. – Т. 12. – С. 434–438.

18. Воронина, Т.А. Антиоксидант Мексидол®. Основные нейropsychотропные эффекты и механизм действия / Т.А. Воронина. – Текст: непосредственный // Психофармакология, биология, наркология. – 2001. – Т. 1. – С. 2-12.

19. Воронина, Т.А. Мексидол®. Отечественный препарат нового поколения, основные эффекты, механизм действия, применение / Т.А. Воронина. – Текст: непосредственный // Журнал неврологии и психиатрии им. С.С. Корсакова. – 2003. – Т. 5. – С. 34–38.

20. Еременко, А.В. Роль мембранотропных свойств производных 3-оксипиридина в фармакологическом эффекте: автореф. дис. ... канд. биол. наук: 14.00.25 / Еременко Аркадий Вениаминович. – М., 1986. – 24 с.

21. Изучение антистрессорного и анальгетического эффектов мексидола, диазепама, парацетамола и их комбинаций / Т.А. Воронина, Г. М. Молодавкин, И.И. Бабаев [и др.]. – Текст: непосредственный // Экспериментальная и клиническая фармакология. – 2006. – Т. 69, № 4. – С. 6–9.

22. Кинетика выведения мексидола и его глюкуроноконъюгата с мочой больных / А.К. Сариев, В.П. Жердев, А.А. Литвин [и др.]. – Текст: непосредственный // Эксперим. и клин. фармакол. – 1999. – Т. 62, №5. – С. 42–46.

23. Кирова, Ю.И. Новые аспекты энерготропного действия препарата Мексидол® / Ю.И. Кирова, Э.Л. Германова. – Текст: непосредственный // Патологическая физиология и экспериментальная терапия. – 2018. – Т. 62, № 4. – С. 42–46.
24. Лекарственно-индуцированные заболевания: эпидемиология и актуальность проблемы / Д.А. Сычев, О.Д. Остроумова, А.И. Кочетков [и др.]. – Текст: непосредственный // Фарматека. – 2020. – Т. 5. – С. 77–84.
25. Линия клеток НерG2 как модель для изучения проникновения статинов в гепатоциты / П.Д. Ерохина, А.А. Слепнев, П.Ю. Мыльников [и др.]. – Текст: непосредственный // Экспериментальная и клиническая гастроэнтерология. – 2022. – Т. 10. – С. 70–76.
26. Лукьянова, Л.Д. Сигнальные механизмы гипоксии / Л.Д. Лукьянова. – Текст: непосредственный // – М: РАН, 2019. – 215 с.
27. Мембраномодулирующие эффекты производных 3-оксипиридина / Е.Б. Бурлакова, Ч.Б. Кайране, Е.М. Молочкина [и др.]. – Текст: непосредственный // Вопросы медицинской химии. – 1984. – Т. 1. – С. 66–72.
28. Методика тестирования лекарственных средств на принадлежность к субстратам и ингибиторам белка-транспортера BCRP на клетках линии Сасо-2 / Ю.С. Транова, А.А. Слепнев, И.В. Черных [и др.]. – Текст: непосредственный // Разработка и регистрация лекарственных средств. – 2023 – Т.12, №2. – С.87–94.
29. Методические рекомендации по изучению биотрансформации и транспортеров новых лекарственных средств: дизайн исследований, анализ данных. Руководство по экспертизе лекарственных средств. Том III. – Текст: непосредственный – М.: Гриф и К. – 2014.
30. Мовсисян, А.Б. Возможности и результаты применения антиоксидантной терапии в офтальмологической практике / А.Б. Мовсисян, Ж.Г. Оганезова, Е.А. Егоров. – Текст: непосредственный // Вестник офтальмологии. – 2022. – Т. 138, №5. – С. 126–132.
31. Мыльников, П.Ю. Влияние этилметилгидроксипиридина сукцината на функционирование гликопротеина-Р в гематоэнцефалическом барьере в норме и

при острой гипоксической гипобарической гипоксии: автореф. дис. ...канд.биол.наук : 3.3.6 / Мыльников Павел Юрьевич. – М., 2021.

32. Опыт применения мексидола в неврологической практике / О.А. Громова, И.Ю. Торшин, Л.В. Стаховская [и др.]. – Текст: непосредственный // Журнал неврологии и психиатрии им. С.С. Корсакова. – 2018. – Т. 118, №10. – С. 97–107.

33. Особенности антигипоксического действия мексидола связанные с его специфическим влиянием на энергетический обмен / Л.Д. Лукьянова, В.Е. Романова, Г.Н. Чернобаева [и др.]. – Текст: непосредственный // Химико-фармацевтический журнал. – 1990. – Т. 8. – С. 9–11.

34. Полиморфизм гена SLCO1B1, ассоциированный с развитием миопатии при приеме статинов, у пациентов с гиперлипидемией русских и якутов (саха) / Я.В. Чертовских, Г.Н. Шувев, Н.В. Попова [и др.]. – Текст: непосредственный // Молекулярная медицина. – 2016. – Т. 14, № 1. – С. 54–58.

35. 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 (исследование МЕМО) / А.И. Федин, В.В. Захаров, М.М. Танащян [и др.]. – Текст: непосредственный // Журнал неврологии и психиатрии им. С.С. Корсакова. – 2021. – Т. 121, №11. – С.7–16.

36. Результаты многоцентрового двойного слепого рандомизированного плацебо-контролируемого клинического исследования по оценке эффективности и безопасности препарата Мексидол в лечении синдрома дефицита внимания с гиперактивностью у детей (МЕГА) / Н.Н. Заваденко, Н.Ю. Суворинова, Т.Т. Батышева [и др.]. – Текст: непосредственный // Журнал неврологии и психиатрии им. С.С. Корсакова. – 2022. – Т. 122, №4. – С. 75–86.

37. Середенин, С.Б. Влияние мембраномодулятора 3-оксипиридина на эмоционально-стрессовую реакцию и связывание НЗ-диазепама в мозге инбредных мышей. С.Б. Середенин, Ю.А. Бледнов, Т.А. Воронина. – Текст: непосредственный // Химико-фармацевтический журнал. – 1987. – Т. 2. – С. 134–137.

38. Сивков, А.С. Комплексная оценка эффективности широко применяемых статинов в клинической практике / А.С. Сивков, Е.В. Ших, М.А. Осадчук [и др.]. – Текст: непосредственный // Кардиоваскулярная терапия и профилактика. – 2018. – Т. 17, № 3. – С. 22–26.
39. Скрыбина, А.А. Особенности фармакокинетики и фармакогенетики антибиотиков из группы макролидов (обзор литературы) / А.А. Скрыбина, В.В. Никифоров, М.З. Шахмарданов. – Текст: непосредственный // Иммунопатология, аллергология, инфектология. – 2022. – Т. 1. – С. 11–16.
40. Смирнов, Л.П. 1. Транспортёры органических анионов (ОАТ). Молекулярное разнообразие, структура, функция, участие в функционировании системы биотрансформации ксенобиотиков у животных (обзор) / Л.П. Смирнов, И.В. Суховская, Е.В. Борвинская. – Текст: непосредственный // Труды КарНЦ РАН. – 2017. – Т. 1. – С. 28–42.
41. Транова, Ю. Разработка методики тестирования лекарственных веществ на принадлежность к субстратам, ингибиторам и индукторам белка-транспортера BCRP in vitro: дис. ... канд. биол. наук: 3.3.6 / Транова Юлия. – Рязань, 2023.
42. Ушкалова, Е.А. Безопасность Мексидола® (этилметилгидроксипиридина сукцината) у взрослых пациентов разных возрастных групп / Е.А. Ушкалова, С.К. Зырянов, О.И. Бутранова – Текст: непосредственный // Неврология, нейропсихиатрия, психосоматика. – 2022. – Т.14, №5. – С.77–82.
43. Факторы риска лекарственно-индуцированных заболеваний. Часть 3. Межлекарственные взаимодействия и взаимодействие лекарственных средств с пищей / Д.А. Сычев, О.Д. Остроумова, А.П. Переверзев [и др.]. – Текст: непосредственный // Фарматека. - 2022. – Т. 1. – С. 10–18.
44. Фармаконадзор: фокус на анализ спонтанных сообщений / Т.С. Литвиненко, Т.А. Полинская, М.А. Шишов [и др.]. – Текст: непосредственный // Южно-Российский журнал терапевтической практики. – 2023. – Т. 4, №1. – С. 46–52.

45. Фармакотерапия больных с коморбидностью: возможность взаимодействия лекарственных препаратов на уровне метаболизма / Е. Фомин, И. Байчоров, Е. Ших [и др.]. – Текст: непосредственный // Врач. – 2014. – Т. 25, №1. – С. 13–17.
46. Черных, И.В. Влияние финастерида, альфузозина и их комбинации на функциональную активность гликопротеина-Р в условиях нормы и экспериментальной гипоксии: автореф. дис. ... канд. биол. наук: 14.03.06 / Черных Иван Владимирович. – Смоленск. – 2013.
47. Щулькин, А.В. Влияние мексидола на развитие феномена эксайтотоксичности нейронов *in vitro* / А.В. Щулькин. – Текст: непосредственный // Журнал неврологии и психиатрии имени С.С. Корсакова. – 2012. – Т. 112, № 2. – С. 35–39.
48. Щулькин, А.В. Мексидол: современные аспекты фармакокинетики и фармакодинамики / А.В. Щулькин. – Текст: непосредственный // Фарматека. – 2016. – Т. 16, № 4. – С. 65–71.
49. Щулькин, А.В. Распределение мексидола в структурах головного мозга, его клеточных элементах и субклеточных фракциях / А.В. Щулькин, Е.Н. Якушева, И.В. Черных. – Текст: непосредственный // Журнал неврологии и психиатрии. – 2014. – Т. 114, № 8. – С. 70–73.
50. Щулькин, А.В. Регуляция функционирования гликопротеина-Р гормональными лекарственными средствами: дис. ... д-ра мед. наук: 14.03.06 / Щулькин Алексей Владимирович. – М., 2019.
51. Эффективность и безопасность Мексидола у пациентов разных возрастных групп в остром и раннем восстановительном периодах полушарного ишемического инсульта (результаты субанализа рандомизированного двойного слепого мультицентрового плацебоконтролируемого в параллельных группах исследования ЭПИКА) / Л.В. Стаховская, Э.А. Мхитарян, О.Н. Ткачева [и др.]. – Текст: непосредственный // Журнал неврологии и психиатрии им. С.С. Корсакова. Спецвыпуски. – 2020. – Т. 120, № 8-2. – С. 49–57.

52. Эффективность Мексидола у пациентов разных возрастных групп с хронической ишемией головного мозга с когнитивными нарушениями (результаты субанализа международного многоцентрового рандомизированного двойного слепого плацебо-контролируемого исследования МЕМО / В.В. Захаров, О.Н. Ткачева, Э.А. Мхитарян [и др.]. – Текст: непосредственный // Журнал неврологии и психиатрии им. С.С. Корсакова. Спецвыпуски. – 2022. – Т. 122, №11-2. – С. 73–80.

53. Эффекты мексидола у пациентов с ХИМ и ХСН II — III функционального класса / А.В. Щулькин, Э.Р. Казахмедов, С.А. Галочкин [и др.]. – Текст: непосредственный // Кардиология и сердечно-сосудистая хирургия. – 2020. – Т. 13, № 5. – С. 427–434.

54. Якушева, Е.Н. Влияние комбинации вилдаглиптина и гликвидона на функциональную активность и экспрессию гликопротеина-Р на фоне нормы и при экспериментальном аллоксан-индуцированном сахарном диабете 2-го типа / Е.Н. Якушева, Д.С. Титов, А.А. Никифоров – Текст: непосредственный // Рос. мед.-биол. вестн. им. акад. И.П. Павлова. – 2016. – Т. 3. – С. 208–216.

55. Якушева, Е.Н. Влияние тиамазола на функциональную активность гликопротеина-Р / Е.Н. Якушева, А.С. Бирюкова, А.В. Щулькин. – Текст: непосредственный // Актуальные проблемы медицины. – 2012. – Т. 10. – С. 133–138.

56. Якушева, Е.Н. Оценка принадлежности мексидола к субстратам, ингибиторам или индукторам гликопротеина-Р / Е.Н. Якушева, А.В. Щулькин, И.В. Черных. – Текст: непосредственный // Эксперим. и клин. фармакол. – 2015. – Т. 78, № 5. – С. 19–23.

57. Яснецов, В.В. Действие семакса и мексидола на модели ишемии мозга у крыс / В.В. Яснецов, Т.А. Воронина. – Текст: непосредственный // Экспер и клин фармакология. – 2009. – Т. 22, № 1. – С. 68–70.

58. 2020 FDA Drug-drug Interaction Guidance: A Comparison Analysis and Action Plan by Pharmaceutical Industrial Scientists / S. Sudsakorn, P. Bahadduri, J. Fretland [et al.]. – Text: visual // Curr Drug Metab. – 2020. – Vol. 21, N 6. – P. 403–426.

59. A common polymorphism in the bile acid receptor farnesoid X receptor is associated with decreased hepatic target gene expression / C. Marzolini, R.G. Tirona, G. Gervasini [et al.]. – Text: visual // *Mol Endocrinol.* – 2007. – Vol. 21, N 8. – P. 1769-1780.
60. A Guide to Transient Expression of Membrane Proteins in HEK-293 Cells for Functional Characterization / A. Ooi, A. Wong, L. Esau [et al.]. – Text: visual // *Front Physiol.* – 2016. – Vol. 7. – P. 300–314.
61. A novel human hepatic organic anion transporting polypeptide (OATP2) / B. Hsiang, Y. Zhu, Z. Wang [et al.]. – Text: visual // *J Biol Chem.* – 1999. – Vol. 274. – P. 37161–37168.
62. A novel human organic anion transporting polypeptide localized to the basolateral hepatocyte membrane / J. Konig, Y. Cui, A.T. Nies [et al.]. – Text: visual // *Am J Physiol.* – 2000. – Vol. 278. G156–G16.
63. Amino-terminal region of human organic anion transporting polypeptide 1B1 dictates transporter stability and substrate interaction / X. Wang, J. Chen, S. Xu [et al.]. – Text: visual // *Toxicol Appl Pharmacol.* – 2019. – Vol. 378. – P. 114642.
64. An overview of statin-induced myopathy and perspectives for the future / D. Nikolic, M. Banach, R. Chianetta [et al.]. – Text: visual // *Expert Opinion on Drug Safety.* – 2020. – Vol. 19, N 5. – P. 601–615.
65. An updated review of pharmacokinetic drug interactions and pharmacogenetics of statins / T. Hirota, Y. Fujita, I. Ieiri [et al.]. – Text: visual // *Expert Opinion on Drug Metabolism & Toxicology.* – 2020. – Vol. 16, N 9. – P. 809–822.
66. Baillie T. A. Metabolism and toxicity of drugs. Two decades of progress in industrial drug metabolism / T. A. Baillie. – Text: visual // *Chemical research in toxicology.* – 2008. – Vol. 21, N 1. – P. 129–137.
67. Berberine Promotes OATP1B1 Expression and Rosuvastatin Uptake by Inducing Nuclear Translocation of FXR and LXR α / M. Liu, D. Zhu, J. Wen [et al.]. – Text: visual // *Front Pharmacol.* – 2020. – Vol. 11. – P. 375–384.

68. Bradford, M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding / M.M. Bradford. – Text: visual // *Anal Biochem.* – 1976. – Vol. 72. – P. 248-254.
69. Cell Lines: A Tool for In Vitro Drug Metabolism Studies / M. Gomez-Lechon, M. Donato, A. Lahoz [et al.]. – Text: visual // *Current Drug Metabolism.* – 2008. – Vol. 9, N 1. – P. 1–11.
70. Cellular uptake of rose bengal is mediated by OATP1B1/1B3 transporters / K. Sztandera, M. Gorzkiewicz, E.A. Zizzi [et al.]. – Text: visual // *Bioelectrochemistry.* – 2023. – Vol. 152. – P. 108449.
71. Characterization of Plasma Membrane Localization and Phosphorylation Status of Organic Anion Transporting Polypeptide (OATP) 1B1 c.521 T>C Nonsynonymous Single-Nucleotide Polymorphism / A. Crowe, W. Zheng, J. Miller [et al.]. – Text: visual // *Pharmaceutical research.* – 2019. – Vol. 36, N 7. – P. 101–1032.
72. Characterization of the human OATP-C (SLC21A6) gene promoter and regulation of liver-specific OATP genes by hepatocyte nuclear factor 1 alpha / D. Jung, B. Hagenbuch, L. Gresh [et al.]. – Text: visual // *J Biochem.* – 2001. – Vol. 276, N 40. – P. 37206–37214.
73. Coproporphyrin I Can Serve as an Endogenous Biomarker for OATP1B1 Inhibition: Assessment Using a Glecaprevir/Pibrentasvir Clinical Study / H. V. Kalluri, R. Kikuchi, S. Coppola [et al.]. – Text: visual // *Clinical and translational science.* – 2021. – Vol. 14, N 1. – P. 373–381.
74. Cyclosporine A, but not tacrolimus, shows relevant inhibition of organic anion-transporting protein 1B1-mediated transport of atorvastatin / R. Amundsen, H. Christensen, B. Zabihiyan [et al.]. – Text: visual // *Drug Metab Dispos.* – 2010. – Vol. 38. – P. 1499–1504.
75. Detection of statin cytotoxicity is increased in cells expressing the OATP1B1 transporter / X. Zhang, R.J. Scialis, B. Feng [et al.]. – Text: visual // *Toxicol Sci.* – 2013. – Vol. 134, N 1. – P. 73–82.
76. Differential Preincubation Effects of Nicardipine on OATP1B1- and OATP1B3-Mediated Transport in the Presence and Absence of Protein: Implications in

Assessing OATP1B1- and OATP1B3-Mediated Drug-Drug Interactions / R. Kayesh, V. Tambe, C. Xu [et al.]. – Text: visual // *Pharmaceutics*. – 2023. – Vol. 15, N 3. – P. 1020–1032.

77. Differential regulation of drug transporter expression by all-trans retinoic acid in hepatoma HepaRG cells and human hepatocytes / M. Le Vee, E. Jouan, B. Stieger, O. Fardel [et al.]. – Text: visual // *Eur J Pharm Sci*. – 2013. – Vol. 48, N 4–5. – P. 767–774.

78. Differential regulation of sinusoidal and canalicular hepatic drug transporter expression by xenobiotics activating drug-sensing receptors in primary human hepatocytes / E. Jigorel, M. Le Vee, C. Boursier-Neyret [et al.]. – Text: visual // *Drug Metab Dispos*. – 2006. – Vol. 34, N 10. – P. 1756–1763.

79. DNA methylation and histone modification profiles of mouse organic anion transporting polypeptides / S. Imai, R. Kikuchi, H. Kusuhara [et al.]. – Text: visual // *Drug Metab Dispos*. – 2013. – Vol. 41, N 1. – P. 72–78.

80. Downregulation of organic anion transporting polypeptide (OATP) 1B1 transport function by lysosomotropic drug chloroquine: Implication in oatp-mediated drug-drug interactions / K. Alam, S. Pahwa, X. Wang [et al.]. – Text: visual // *Mol. Pharm*. – 2016. – Vol. 13. – P. 839–851.

81. Drug–Drug Interaction Potential of Darolutamide: In Vitro and Clinical Studies / C. Zurth, M. Koskinen, R. Fricke [et al.]. – Text: visual // *Eur J Drug Metab Pharmacokinet*. – 2019. – Vol. 44, N 6. – P. 747–759.

82. Drug-Drug Interactions between Rosuvastatin and Oral Antidiabetic Drugs Occurring at the Level of OATP1B1 / E. van de Steeg, R. Greupink, M. Schreurs [et al.]. – Text: visual // *Drug Metabolism and Disposition*. – 2013. – Vol. 41, N 3. – P. 592–601.

83. Dvorak, V. Structural and functional annotation of solute carrier transporters: implication for drug discovery / V. Dvorak, G. Superti-Furga. – Text: visual // *Expert Opinion on Drug Discovery*. – 2023. – T. 18, №. 10. – P. 1099–1115.

84. Effect of Cyclosporin A and Impact of Dose Staggering on OATP1B1/1B3 Endogenous Substrates and Drug Probes for Assessing Clinical Drug Interactions / T.

Mochizuki, M.J. Zamek-Gliszczyński, K. Yoshida [et al.]. – Text: visual // Clin Pharmacol Ther. – 2022. – Vol. 116, N 6. – P. 1315–1323.

85. Effect of Genetic Variations in Drug-Metabolizing Enzymes and Drug Transporters on the Pharmacokinetics of Rifamycins: A Systematic Review / T. Sileshi, G. Mekonen, E. Makonnen [et al.]. – Text: visual // Pharmgenomics Pers Med. – 2022. – Vol. 15. – P. 561–571.

86. Effect of OATP1B1 genotypes on plasma concentrations of endogenous OATP1B1 substrates and drugs, and their association in healthy volunteers / D. Mori, Y. Kashiwara, T. Yoshikado [et al.]. – Text: visual // Drug Metab Pharmacokinet. – 2019. – Vol. 34, N 1. – P. 78–86.

87. Effect of Steady-State Faldaprevir on Pharmacokinetics of Atorvastatin or Rosuvastatin in Healthy Volunteers: A Prospective Open-Label, Fixed-Sequence Crossover Study / F. Huang, K. Marzin, R. Koenen Lin [et al.]. – Text: visual // J Clin Pharmacol. – 2017. – Vol. 57, N 10. – P. 1305–1314.

88. Endogenous gene and protein expression of drug-transporting proteins in cell lines routinely used in drug discovery programs / G. Ahlin, C. Hilgendorf, J. Karlsson [et al.]. – Text: visual // Drug Metab Dispos. – 2009. – Vol. 37. – P. 2275–2283.

89. Epigenetic regulation of drug transporter expression in human tissues / T. Hirota, T. Tanaka, H. Takesue [et al.]. – Text: visual // Expert Opin Drug Metab Toxicol. – 2017. – Vol. 13, N 1. – P. 19–30.

90. European medicines agency (EMA), Guideline on bioanalytical method validation. – 2012. – Text: electronic. URL: https://www.ema.europa.eu/en/documents/scientific-guideline/guideline-bioanalytical-method-validation_en.pdf (date accessed: 17.12.2023).

91. Evaluation of a Clinically Relevant Drug-Drug Interaction Between Rosuvastatin and Clopidogrel and the Risk of Hepatotoxicity / C. Ning, S. Su, J. Li [et al.]. – Text: visual // Frontiers in pharmacology. – 2021. – Vol. 12. – P. 715577–715590.

92. Fall-risk increasing adverse reactions-is there value in easily accessible drug information? A case-control study / S. Schiek, K. Hildebrandt, O. Zube [et al.]. – Text:

visual // European Journal of Clinical Pharmacology. – 2019. – Vol. 75, N 6. – P. 849–857.

93. Further Characterization of the Electrogenicity and pH Sensitivity of the Human Organic Anion-Transporting Polypeptides OATP1B1 and OATP1B3 / P. Martinez-Becerra, O. Briz, M. R. Romero [et al.]. – Text: visual // Molecular Pharmacology. – 2011. – Vol. 79, N 3. – P. 596–607.

94. Gui, C. Role of transmembrane domain 10 for the function of organic anion transporting polypeptide 1B1 / C. Gui, B. Hagenbuch. – Text: visual // Protein Sci. – 2009. – Vol. 18, N 11. – P. 2298-2306.

95. Hagenbuch, B. Organic anion transporting polypeptides of the OATP/SLC21 family: phylogenetic classification as OATP/SLCO superfamily, new nomenclature and molecular/functional properties / B. Hagenbuch, P.J. Meier. – Text: visual // Pflugers Arch. – 2004. – Vol. 447, N 5. – P. 653–665.

96. Hagenbuch, B. The superfamily of organic anion transporting polypeptides / B. Hagenbuch, P.J. Meier. – Text: visual // Biochim Biophys Acta. – 2003. – Vol. 1609, N 1. – P. 1–18.

97. Hagenbuch, B. Xenobiotic transporters of the human organic anion transporting polypeptides (OATP) family / B. Hagenbuch, C. Gui. – Text: visual // Xenobiotica. – 2008. – Vol. 38, N 7-8. – P. 778–801.

98. Human organic anion transporter 1B1 and 1B3 function as bidirectional carriers and do not mediate GSH-bile acid cotransport / C. Mahagita, S. M. Grassl, P. Piyachaturawat [et al.]. – Text: visual // American journal of physiology. Gastrointestinal and liver physiology. – 2007. – Vol. 293, N 1. – P. 271–278.

99. Identification and mechanistic investigation of drug–drug interactions associated with myopathy: a translational approach / X. Han, S. K. Quinney, Z. Wang [et al.]. – Text: visual // Clinical Pharmacology & Therapeutics. – 2015. – Vol. 98, N 3. – P. 321–327.

100. Identification of a novel gene family encoding human liver-specific organic anion transporter LST-1 / T. Abe, M. Kakyo, T. Tokui [et al.]. – Text: visual // J Biol Chem. – 1999. – Vol. 274. – P. 17159–17163.

101. Identification of glutathione as a driving force and leukotriene C4 as a substrate for oatp1, the hepatic sinusoidal organic solute transporter / L. Li, T. K. Lee, P. J. Meier. – Text: visual // Journal of Biological Chemistry. – 1998. – Vol. 273, N 26. – P.16184–16191.
102. Identification of multispecific organic anion transporter 2 expressed predominantly in the liver / T. Sekine, S.H. Cha, M. Tsuda [et al.]. – Text: visual // FEBS letters. – 1998. – Vol. 429, N 2. – P. 179–182.
103. In Silico and in Vitro Assessment of OATP1B1 Inhibition in Drug Discovery. / M.L. Danielson, G.A. Sawada, T.J. Raub [et al.]. – Text: visual // Mol Pharm. – 2018. – Vol. 15. – P. 3060–3068.
104. In vitro and in silico strategies to identify OATP1B1 inhibitors and predict clinical drug-drug interactions / M. Karlgren, G. Ahlin, C.A. Bergström [et al.]. – Text: visual // Pharm Res. – 2012. – Vol. 29. – P. 411–26.
105. Induction of Human Intestinal and Hepatic Organic Anion Transporting Polypeptides: Where Is the Evidence for Its Relevance in Drug-Drug Interactions? / A.D. Rodrigues, Y. Lai, H. Shen [et al.]. – Text: visual // Drug Metab Dispos. – 2020. – Vol. 48. – P. 205–216.
106. Interaction of three regiospecific amino acid residues is required for OATP1B1 gain of OATP1B3 substrate specificity. / M.K. DeGorter, R.H. Ho, B.F. Leake [et al.]. – Text: visual // Mol Pharm. – 2012. – Vol. 9, N 4. – P. 986–995.
107. International Council For Harmonisation Of Technical Requirements For Pharmaceuticals For Human Use - drug interaction studies M12. – 2022. – Text: electronic. URL: https://www.ema.europa.eu/en/documents/scientific-guideline/draft-ich-guideline-m12-drug-interaction-studies-step-2b_en.pdf (date accessed: 17.12.2023).
108. Kalliokoski, A. Impact of OATP transporters on pharmacokinetics / A. Kalliokoski, M. Niemi. – Text: visual // British journal of pharmacology. – 2009. – Vol. 158, N 3. – P. 693–705.
109. Khalil, H. Adverse drug reactions in primary care: a scoping review / H. Khalil, C. Huang. – Text: visual // BMC Health Serv Res. – 2020. – Vol. 20, N 1. – P. 5–17.

110. Kim, J.A. Pharmacogenomic Biomarkers in US FDA-Approved Drug Labels (2000-2020) / J.A. Kim, R. Ceccarelli, C.Y. Lu. – Text: visual // J Pers Med. – 2021. – Vol. 11, N 3. – P. 179–191.
111. Kimoto, E. Mechanistic Evaluation of the Complex Drug-Drug Interactions of Maraviroc: Contribution of Cytochrome P450 3A, P-Glycoprotein and Organic Anion Transporting Polypeptide 1B1 / E. Kimoto, M. Vourvahis, R. J. Scialis. – Text: visual // Drug metabolism and disposition: the biological fate of chemicals. – 2019. – Vol. 47, N 5. – P. 493–503.
112. Kindla, J. In vitro evidence for the role of OATP and OCT uptake transporters in drug–drug interactions / J. Kindla, M.F. Fromm, J. König [et al.]. – Text: visual // Expert Opinion on Drug Metabolism & Toxicology. – 2009. – Vol. 5, N 5. – P. 489–500.
113. Law, C.J. Ins and outs of major facilitator superfamily antiporters / C.J. Law, P.C. Maloney, D.N. Wang. – Text: visual // Annu Rev Microbiol. – 2008. – Vol. 62. – P. 289–305.
114. Lee, W. Post-translational regulation of the major drug transporters in the families of organic anion transporters and organic anion-transporting polypeptides / W. Lee, J. M. Ha, Y. Sugiyama. – Text: visual // The Journal of biological chemistry. – 2020. – Vol. 295, N 50. – P. 17349–17364.
115. Lefebvre, P. Retinoid X receptors: common heterodimerization partners with distinct functions / P. Lefebvre, Y. Benomar, B. Staels. – Text: visual // Trends in Endocrinology & Metabolism. – 2010. – Vol. 21, N 50. – P. 676–683.
116. Liu, X. Overview: Role of Drug Transporters in Drug Disposition and Its Clinical Significance / X. Liu. – Text: visual // Adv Exp Med Biol. – 2019. – Vol. 1141. – P. 1–12.
117. Liu, Xiaodong. Drug Transporters in Drug Disposition, Effects and Toxicity / X. Liu, G. Pan. – Text: visual // Advances in Experimental Medicine and Biology. – 2019. – Vol. 1141. 588 P.
118. Liver X receptor α and farnesoid X receptor are major transcriptional regulators of OATP1B1 / H.E. Meyer Zu Schwabedissen, K. Böttcher, A. Chaudhry [et al.]. – Text: visual // Hepatology. – 2010. – Vol. 52, N 5. – P. 1797–1807.

119. LncRNA HOTAIR modulates the expression of OATP1B1 in HepG2 cells by sponging miR-206/miR-613 / Y. Xu, J. Hu, Y. Zhang [et al.]. – Text: visual // *Xenobiotica: the fate of foreign compounds in biological systems*. – 2020. – Vol. 50, N 12. – P. 1494–1500.
120. Localization of Xenobiotic Transporters Expressed at the Human Blood-Testis Barrier / R.K. Hau, R.R. Klein, S.H. Wright [et al.]. – Text: visual // *Drug Metab Dispos.* – 2022. – Vol. 50, N 6. – P. 770–780.
121. Mechanisms of pH-gradient driven transport mediated by organic anion polypeptide transporters / S. Leuthold, B. Hagenbuch, N. Mohebbi. – Text: visual // *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* – 2009. – Vol. 296. – P. 570–582.
122. Meier-Abt, F. Organic Anion Transporting Polypeptides of the OATP/SLCOSuperfamily: Identification of New Members in Nonmammalian Species / F. Meier-Abt, Y. Mokrab; K. Mizuguchi // *Comparative Modeling and a Potential Transport Mode*. – 2006. – Vol. 208, N 3. – P. 213–227.
123. Meier-Abt, F. Organic anion transporting polypeptides of the OATP/SLCO superfamily: identification of new members in nonmammalian species, comparative modeling and a potential transport mode / F. Meier-Abt, Y. Mokrab, K. Mizuguchi. – Text: visual // *J Membr Biol.* – 2005. – Vol. 208, N 3. – P. 213–227.
124. Membrane trafficking of the human organic anion-transporting polypeptide C (hOATPC) / A.Q. Sun, V.M. Ponamgi, J.L. Boyer [et al.]. – Text: visual // *Pharm Res.* – 2008. – Vol. 25. – P. 463–74.
125. microRNA-206 modulates the hepatic expression of the organic anion-transporting polypeptide 1B1 / T. El Saadany, B. van Rosmalen, Z. Gai [et al.]. – Text: visual // *Liver international: official journal of the International Association for the Study of the Liver*. – 2019. – Vol. 39, N 12. – P. 2350–2359.
126. Mochizuki, T. Progress in the quantitative assessment of transporter-mediated drug-drug interactions using endogenous substrates in clinical studies / T. Mochizuki, H. Kusuvara. – Text: visual // *Drug metabolism and disposition: the biological fate of chemicals*. – 2023. – Vol. 51, N 9. – P. 1105–1113.

127. Müller, F. Transporter-mediated drug-drug interactions / F. Müller, M.F. Fromm. – Text: visual // *Pharmacogenomics*. – 2011. – Vol. 12, N 7. – P. 1017–1037.
128. Murray, M. Trafficking and other regulatory mechanisms for organic anion transporting polypeptides and organic anion transporters that modulate cellular drug and xenobiotic influx and that are dysregulated in disease / M. Murray, F. Zhou. – Text: visual // *Br J Pharmacol*. – 2017. – Vol. 174, N 13. – P. 1908–1924.
129. N-Glycosylation dictates proper processing of organic anion transporting polypeptide 1B1 / J. Yao, W. Hong, J. Huang [et al.]. – Text: visual // *PLoS One*. – 2012. – Vol. 7, N 12. – P. 52563.
130. Niemi, M. Organic anion transporting polypeptide 1B1: a genetically polymorphic transporter of major importance for hepatic drug uptake / M. Niemi, M.K. Pasanen, P.J. Neuvonen. – Text: visual // *Pharmacol Rev*. – 2011. – Vol. 63, N 1. – P. 157–181.
131. Organic Anion Transporter Polypeptide 1B1 Polymorphism Modulates the Extent of Drug-Drug Interaction and Associated Biomarker Levels in Healthy Volunteers / S.W. Yee, M.M. Giacomini, H. Shen [et al.]. – Text: visual // *Clin Transl Sci*. – 2019. – Vol. 12, N 4. – P. 388–399.
132. Overview of organic anion transporters and organic anion transporter polypeptides and their roles in the liver / T.T. Li, J.X. An, J.Y. Xu. – Text: visual // *World J Clin Cases*. – 2019. – Vol. 7, N 23. – P. 3915–3933.
133. Pharmacogenetic meta-analysis of genome-wide association studies of LDL cholesterol response to statins / I. Postmus, S. Trompet, H.A. Deshmukh [et al.]. – Text: visual // *Nat Commun*. – 2014. – Vol. 5. – P. 5068–5077.
134. Pharmacogenomics and patient care: one size does not fit all / K.M. Giacomini, S.W. Yee, M.J. Ratain [et al.]. – Text: visual // *Sci Transl Med*. – 2012. – Vol. 4, N 153. – P. 153–ps18.
135. PharmVar GeneFocus: SLCO1B1 / L.B. Ramsey, L. Gong, S.B. Lee [et al.]. – Text: visual // *Clinical pharmacology and therapeutics*. – 2023. – Vol. 113, N 4. – P. 782–793.

136. Positron Emission Tomography Imaging of [11 C] Rosuvastatin Hepatic Concentrations and Hepatobiliary Transport in Humans in the Absence and Presence of Cyclosporin A / S. Billington, S. Shoner, S. Lee [et al.]. – Text: visual // Clin Pharmacol Ther. – 2019. – Vol. 106, N 5. – P. 1056–1066.

137. Prediction of the in vivo OATP1B1-mediated drug-drug interaction potential of an investigational drug against a range of statins / P. Sharma, C.J. Butters, V. Smith [et al.]. – Text: visual // European journal of pharmaceutical sciences: official journal of the European Federation for Pharmaceutical Sciences. – 2012. – Vol. 47, N 1. – P. 244–255.

138. Preincubation With Everolimus and Sirolimus Reduces Organic Anion-Transporting Polypeptide (OATP)1B1- and 1B3-Mediated Transport Independently of mTOR Kinase Inhibition: Implication in Assessing OATP1B1- and OATP1B3-Mediated Drug-Drug Interactions / T. Farasyn, A. Crowe, O. Hatley [et al.]. – Text: visual // J Pharm Sci. – 2019. – Vol. 108, N 10. – P. 3443–3456.

139. Protein Kinases C-Mediated Regulations of Drug Transporter Activity, Localization and Expression / A. Mayati, A. Moreau, M. Le Vée [et al.]. – Text: visual // Int J Mol Sci. – 2017. – Vol. 18, N 4. – P. 764–785.

140. Puris, E. The Role of Solute Carrier Transporters in Efficient Anticancer Drug Delivery and Therapy. / E. Puris, G. Fricker, M. Gynther. – Text: visual // Pharmaceutics. – 2023. – Vol. 15. – P. 364–402.

141. Regulation of drug transporter expression in human hepatocytes exposed to the proinflammatory cytokines tumor necrosis factor-alpha or interleukin-6 / M. Le Vee, V. Lecureur, B. Stieger [et al.]. – Text: visual // Drug Metab Dispos. – 2009. – Vol. 37, N 3. – P. 685–693.

142. Regulation of Organic Anion Transporting Polypeptides (OATP) 1B1- and OATP1B3-Mediated Transport: An Updated Review in the Context of OATP-Mediated Drug-Drug Interactions / K. Alam, A. Crowe, X. Wang [et al.]. – Text: visual // Int J Mol Sci. – 2018. – Vol. 19, N 3. – P. 855–874.

143. Regulation of RXR-RAR Heterodimers by RXR- and RAR-Specific Ligands and Their Combinations / A. le Maire, C. Teyssier, P. Balaguer [et al.]. – Text: visual // Cells. – 2019. – Vol. 8, N 11. – P. 1392–1416.

144. Role of human hepatocyte nuclear factor 4alpha in the expression of drug-metabolizing enzymes and transporters in human hepatocytes assessed by use of small interfering RNA / Y. Kamiyama, T. Matsubara, K. Yoshinari [et al.]. – Text: visual // Drug Metab Pharmacokinet. – 2007. – Vol. 22, N 4. – P. 287–298.
145. Role of miR-511 in the Regulation of OATP1B1 Expression by Free Fatty Acid / J.F. Peng, L. Liu, C.X. Guo [et al.]. – Text: visual // Biomol Ther (Seoul). – 2015. – Vol. 23, N 5. – P. 400–406.
146. Rosuvastatin pharmacokinetics in heart transplant recipients administered an antirejection regimen including cyclosporine / S.G. Simonson, A. Raza, P.D. Martin [et al.]. – Text: visual // Clin Pharmacol Ther. – 2004. – Vol. 76, N 2. – P. 167–177.
147. Roth, M. OATPs, OATs and OCTs: the organic anion and cation transporters of the SLCO and SLC22A gene superfamilies / M. Roth, A. Obaidat, B. Hagenbuch. – Text: visual // Br J Pharmacol. – 2012. – Vol. 165, N 5. – P. 1260–1287.
148. Shikonin upregulates the expression of drug-metabolizing enzymes and drug transporters in primary rat hepatocytes / C.S. Huang, H.W. Chen, T.Y. Lin [et al.]. – Text: visual // J Ethnopharmacol. – 2018. – Vol. 216. – P. 18–25.
149. Shitara, Y. Clinical importance of OATP1B1 and OATP1B3 in drug-drug interactions / Y. Shitara. – Text: visual // Drug metabolism and pharmacokinetics. – 2011. – Vol. 26, N 3. – P. 220–227.
150. Solute carrier transporters: the metabolic gatekeepers of immune cells / W. Song, D. Li, L. Tao [et al.]. – Text: visual // Acta Pharm Sin B. – 2020. – Vol. 10, N 1. – P. 61–78.
151. Stable inducible expression of a functional rat liver organic anion transport protein in HeLa cells / X. Shi, S. Bai, A.C. Ford [et al.]. – Text: visual // J Biol Chem. – 1995. – Vol. 270, N 43. – P. 25591–25595.
152. Statin treatment effectiveness and the SLCO1B1*5 reduced function genotype: long-term outcomes in women and men / D. Türkmen, J.A.H. Masoli, C.L. Kuo [et al.]. – Text: visual // Br. J. Clin. Pharmacol. – 2022. – Vol. 88, N 7. – P. 3230–3240.

153. Statins Neuromuscular Adverse Effects / S. Attardo, O. Musumeci, D. Velardo [et al.]. – Text: visual // International journal of molecular sciences. – 2022. – Vol. 23, N 15. – P. 8364–8378.
154. Stieger, B. Organic anion-transporting polypeptides / B. Stieger, B. Hagenbuch. – Text: visual // Curr Top Membr. – 2014. – Vol. 73. – P. 205–232.
155. Structures and General Transport Mechanisms by the Major Facilitator Superfamily (MFS). / D. Drew, R.A. North, K. Nagarathinam [et al.]. – Text: visual // Chem Rev. – 2021. – Vol. 121, N 9. – P. 5289–5335.
156. Substrate-dependent drug-drug interactions between gemfibrozil, fluvastatin and other organic anion-transporting peptide (OATP) substrates on OATP1B1, OATP2B1, and OATP1B3 / J. Noe, R. Portmann, M. E. Brun [et al.]. – Text: visual // Drug metabolism and disposition: the biological fate of chemicals. – 2007. – Vol. 35, N 8. – P. 1308–1314.
157. Taylor-Wells, J. C. Structural and Functional Investigation of the Organic Anion Transporting Polypeptide 1B1 (OATP1B1) / J.C. Taylor-Wells. – Text: visual // Doctoral dissertation, Oxford Brookes University. – 2013.
158. Taylor-Wells, J.C. The Signature Sequence Region of the Human Drug Transporter Organic Anion Transporting Polypeptide 1B1 Is Important for Protein Surface Expression / J.C. Taylor-Wells, D.J. Meredith. – Text: visual // Drug Deliv. – 2014. – Vol. 2014. – P. 129849.
159. The Clinical Pharmacogenetics Implementation Consortium Guideline for SLCO1B1, ABCG2, and CYP2C9 genotypes and Statin-Associated Musculoskeletal Symptoms / R.M. Cooper-DeHoff, M. Niemi, L.B. Ramsey [et al.]. – Text: visual // Clin Pharmacol Ther. – 2022. – Vol. 111, N 5. – P. 51007–51021.
160. The Database of Genomic Variants: a curated collection of structural variation in the human genome / J.R. MacDonald, R. Ziman, R.K. Yuen Nucleic [et al.]. – Text: visual // Acids Res. – 2014. – Vol. 42. – P. 986–992.
161. The effect of gemfibrozil on the pharmacokinetics of rosuvastatin / D.W. Schneck, B.K. Birmingham, J.A. Zalikowski [et al.]. – Text: visual // Clin Pharmacol Ther. – 2004. – Vol. 75. – P. 455–463.

162. The eighth and ninth transmembrane domains in organic anion transporting polypeptide 1B1 affect the transport kinetics of estrone-3-sulfate and estradiol-17-beta-D-glucuronide / M. Miyagawa, K. Maeda, A. Aoyama [et al.]. – Text: visual // *J Pharmacol Exp Ther.* – 2009. – Vol. 329, N 2. – P. 551–557.
163. The organic anion transporter (OATP) family / T. Mikkaichi, T. Suzuki, M. Tanemoto [et al.]. – Text: visual // *Drug Metab Pharmacokinet.* – 2004. – Vol. 19, N 3. – P. 171–179.
164. The role of OATP1B1 and BCRP in pharmacokinetics and DDI of novel statins / W. J. Hua, W. X. Hua, H. J. Fang [et al.]. – Text: visual // *Cardiovascular therapeutics.* – 2012. – Vol. 30, N 5. – P. e234–e241.
165. The role of OATP1B1 and OATP1B3 transporter polymorphisms in drug disposition and response to anticancer drugs: a review of the recent literature / N. Anabtawi, T. Drabison, S. Hu [et al.]. – Text: visual // *Expert opinion on drug metabolism & toxicology.* – 2022. – Vol. 18. – P. 459–468.
166. Transcriptional profiling of genes induced in the livers of patients treated with carbamazepine / M. Oscarson, U. Zanger, O. Rifki [et al.]. – Text: visual // *Clinical pharmacology and therapeutics.* – 2006. – Vol. 80. – P. 440–456.
167. Transporter-mediated drug–drug interactions – Study design, data analysis, and implications for in vitro evaluations / F. Shujun, Y. Feifei, S. Tao [et al.]. – Text: visual // *Medicine in Drug Discovery.* – 2021. – Vol. 11, N 3. – P. 100096.
168. Treatment with proteasome inhibitor bortezomib decreases organic anion transporting polypeptide (OATP) 1B3-mediated transport in a substrate-dependent manner / K. Alam, T. Farasyn, A. Crowe [et al.]. – Text: visual // *PLoS One.* – 2017. – Vol. 12, N 11. – P. e0186924.
169. Türkova, A. Current Advances in Studying Clinically Relevant Transporters of the Solute Carrier (SLC) Family by Connecting Computational Modeling and Data Science / A. Türkova, B. Zdrazil. – Text: visual // *Comput Struct Biotechnol J.* – 2019. – Vol. 17. – P. 390–405.
170. U.S. Department of Health and Human Services, Food and Drug Administration, Center for Drug Evaluation and Research (CDER) Clinical Drug

Interaction Studies — Cytochrome P450 Enzyme- and Transporter-Mediated Drug Interactions. Guidance for Industry. – 2020. – Text: electronic. – URL: <https://www.fda.gov/regulatory-information/search-fda-guidance-documents/clinical-drug-interaction-studies-cytochrome-p450-enzyme-and-transporter-mediated-drug-interactions> (date accessed: 17.12.2023).

171. Vasiliou, V. Human ATP-binding cassette (ABC) transporter family / V. Vasiliou, K. Vasiliou, D.W. Nebert. – Text: visual // Hum Genomics. – 2009. – Vol. 3, N 3. – P. 281–290.

172. Voronina, T.A. Experimentally established geropsychotropic properties of 3-hydroxypyridine antioxidant / T.A. Voronina, O.A. Kutepova. – Text: visual // Drug Dev Res. – 1988. – T. 14. – P. 353–358.

173. Ward, N.C. Statin Toxicity / N.C. Ward, G.F. Watts, R.H. Eckel – Text: visual // Circ Res. – 2019. – Vol. 124, N 2. – P. 328–350.

174. Weaver, Y.M. Several conserved positively charged amino acids in OATP1B1 are involved in binding or translocation of different substrates / Y.M. Weaver, B. Hagenbuch – Text: visual // J Membr Biol. – 2010. – Vol. 236, N 3. – P. 279–290.

175. Which Adverse Events and Which Drugs Are Implicated in Drug-Related Hospital Admissions? A Systematic Review and Meta-Analysis / A. Haerdlein, E. Debold, M. Rottenkolber [et al.]. – Text: visual // Journal of clinical medicine. – 2023. – Vol. 12, N 4. – P. 1320–1338.

176. Yan, N. Structural Biology of the Major Facilitator Superfamily Transporters / N. Yan. – Text: visual // Annu Rev Biophys. – 2015. – Vol. 44. – P. 257–283.

177. Zhang, Y. OATP1B3 Expression and Function is Modulated by Coexpression with OCT1, OATP1B1, and NTCP / Y. Zhang, M. Ruggiero, B. Hagenbuch. – Text: visual // Drug Metab Dispos. – 2020. – Vol. 48, N 8. – P. 622–630.

178. Zhou, S. Transcriptional Regulation of Solute Carrier Drug Transporters / S. Zhou, Y. Shu. – Text: visual // Drug Metabolism and Disposition. – 2022. – Vol. 50, N 9. – P. 1238–1250.