

Ингибирующее действие DL-бутионинсульфоксими́на на активность Р-гликопротеина *in vitro*

Ю.В. Абаленихина*, П.Ю. Мыльников, А.В. Щулькин, Е.Н. Якушева

Рязанский государственный медицинский университет
им. И.П. Павлова, г. Рязань, Россия

Реферат

Актуальность. Р-гликопротеин (Pgp) — белок множественной лекарственной устойчивости 1, обладающий широкой субстратной специфичностью. Его функционирование может изменяться под влиянием различных веществ, поэтому поиск эндогенных и экзогенных соединений, модулирующих активность белка-транспортера, — актуальное направление исследований.

Цель. Оценить влияние DL-бутионинсульфоксими́на на активность и количество белка-транспортера Pgp в клетках линии Сасо-2.

Материалы и методы исследования. Исследование выполнено на линии клеток аденокарциномы ободочной кишки человека (Сасо-2). Клетки инкубировали с DL-бутионинсульфоксими́ном и хинидином (классический ингибитор Pgp) в концентрациях 1, 5, 10, 50, 100 и 500 мкМ в течение 3 ч. Количество Pgp оценивали методом вестерн-блот с денситометрическим анализом (Bio-Rad, США). Активность Pgp рассчитывали по транспорту его субстрата — фексофенадина, концентрацию которого определяли методом высокоэффективной жидкостной хроматографии с ультрафиолетовым детектированием (Стайер, Россия). Полученные результаты анализировали с помощью StatSoft Statistica 13.0 (ANOVA), расчёт IC_{50} проводили с использованием программы GraphPad Prism 8. Статистически значимыми считали различия при $p < 0,05$.

Результаты. Инкубация с DL-бутионинсульфоксими́ном и хинидином в концентрациях 1–500 мкМ в течение 3 ч не влияла на количество Pgp в клетках линии Сасо-2. Активность Pgp снижалась при использовании DL-бутионинсульфоксими́на в концентрациях 50–500 мкМ максимально на 47,7% ($p=0,040$). Хинидин в концентрациях 5–500 мкМ уменьшал активность Pgp максимально на 79,1% ($p=0,0002$) при концентрации 500 мкМ. Хинидин ингибировал активность Pgp в более низких концентрациях по сравнению с DL-бутионинсульфоксими́ном: IC_{50} фексофенадина при использовании хинидина составила $5,16 \pm 0,59$ мкмоль/л, для DL-бутионинсульфоксими́на — $17,21 \pm 2,46$ мкмоль/л ($p=0,001$).

Вывод. DL-бутионинсульфоксими́н оказывает прямой ингибирующий эффект на активность белка-транспортера Pgp на клеточной линии Сасо-2.

Ключевые слова: Р-гликопротеин, окислительный стресс, DL-бутионинсульфоксими́н.

Для цитирования: Абаленихина Ю.В., Мыльников П.Ю., Щулькин А.В., Якушева Е.Н. Ингибирующее действие DL-бутионинсульфоксими́на на активность Р-гликопротеина *in vitro*. *Казанский мед. ж.* 2022;103(5):780–787. DOI: 10.17816/KMJ2022-780.

ORIGINAL STUDY | DOI: 10.17816/KMJ2022-780

Inhibitory effect of DL-butionine sulfoximine on P-glycoprotein activity *in vitro*

Yu.V. Abalenikhina*, P.Yu. Mylnikov, A.V. Shchulkin, E.N. Yakusheva
Ryazan State Medical University named after I.P. Pavlova, Ryazan, Russia

Abstract

Background. P-glycoprotein (Pgp) is a multidrug resistance protein 1 with broad substrate specificity. Its functioning can change under the influence of various substances, so the search for endogenous and exogenous

*Для переписки: abalenikhina88@mail.ru
Поступила 17.12.2021; принята в печать 04.04.2022;
опубликована: 14.10.2022.
© Эко-Вектор, 2022. Все права защищены.

*For correspondence: abalenikhina88@mail.ru
Submitted 17.12.2021; accepted 04.04.2022;
published: 14.10.2022.
© Eco-Vector, 2022. All rights reserved.

compounds that modulate the activity of the transporter protein is an important area of research.

Aim. To evaluate the effect of DL-butionine sulfoximine on the activity and amount of the Pgp transporter protein in Caco-2 cells.

Material and methods. The study was performed on a human colon adenocarcinoma cell line (Caco-2). Cells were incubated with DL-butionine sulfoximine and quinidine (a classical Pgp inhibitor) at concentrations of 1, 5, 10, 50, 100, and 500 μM for 3 hours. Pgp activity was evaluated by the transport of its substrate, fexofenadine, which concentration was determined by high performance liquid chromatography with ultraviolet detection (Stayer, Russia). The results were analyzed using StatSoft Statistica 13.0 (ANOVA), IC_{50} was calculated using GraphPad Prism 8 software. Differences were considered statistically significant at $p < 0.05$.

Results. Incubation with DL-butionine sulfoximine and quinidine at concentrations of 1–500 μM for 3 hours did not affect the amount of Pgp in Caco-2 cells. Pgp activity decreased when using DL-butionine sulfoximine at concentrations of 50–500 μM by a maximum of 47.7% ($p=0.040$). Quinidine at concentrations of 5–500 μM reduced Pgp activity by a maximum of 79.1% ($p=0.0002$) at a concentration of 500 μM . Quinidine inhibited Pgp activity at lower concentrations compared to DL-butionine sulfoximine: the IC_{50} of fexofenadine with quinidine was $5.16 \pm 0.59 \mu\text{mol/l}$, for DL-butionine sulfoximine it was $17.21 \pm 2.46 \mu\text{mol/l}$ ($p=0.001$).

Conclusion. DL-butionine sulfoximine has a direct inhibitory effect on the activity of the Pgp transporter protein on the Caco-2 cell line.

Keywords: P-glycoprotein, oxidative stress, DL-butionine sulfoximine.

For citation: Abalenikhina YuV, Mylnikov PYu, Shchulkin AV, Yakusheva EN. Inhibitory effect of DL-butionine sulfoximine on P-glycoprotein activity *in vitro*. *Kazan Medical Journal*. 2022;103(5):780–787. DOI: 10.17816/KMJ2022-780.

Р-гликопротеин (Pgp, ABCB1-белок, MDR1-белок) — белок множественной лекарственной устойчивости 1, обеспечивающий удаление эндо- и ксенобиотиков из клетки и обладающий широкой субстратной специфичностью. К его субстратам относят преимущественно липофильные вещества с молекулярной массой 330–4000 Да.

Функционирование Pgp может изменяться под влиянием различных веществ. Так, рифампицин и карбамазепин повышают активность данного белка-транспортёра и, следовательно, являются его индукторами [1]. Верапамил, амиодарон, кетоконазол, хинидин ингибируют активность Pgp [2].

Изменение функционирования Pgp имеет большое значение для клинической практики, так как может приводить к нежелательным межлекарственным взаимодействиям. Так, повышенная активность Pgp может вызывать уменьшение концентрации субстратов Pgp в плазме крови и соответственно снижать эффективность проводимой терапии. Снижение активности Pgp, наоборот, сопровождается повышением содержания его субстратов в организме, что будет способствовать развитию побочных эффектов [3]. С другой стороны, наличие у веществ свойства ингибировать функциональную активность белка-транспортёра можно использовать в терапии онкологических заболеваний с целью преодоления множественной лекарственной устойчивости опухолевых клеток, которая связана с гиперэкспрессией Pgp [4].

Известно, что на функциональную активность Pgp влияют не только химические вещества и лекарственные препараты, но и изменения условий микроокружения и внутренней среды клетки [5], например окислительно-восстановительный статус. Для моделирования окислительного стресса используют вещества-ингибиторы синтеза глутатиона, например ингибитор глутамилцистеинсинтазы DL-бутионинсульфоксими́н (БСО) [6].

Показано, что в опухолевых клетках предстательной железы DU-145 воздействие БСО в концентрации 50 мМ в течение 7 дней вызвало снижение экспрессии Pgp [7], что было связано с увеличением уровня активных форм кислорода. Воздействие БСО на монослой эндотелиальных клеток сосудов головного мозга в концентрациях до 800 мкМ вызывало увеличение экспрессии Pgp, при этом концентрации от 400 мкМ снижали жизнеспособность клеток [8], что также обусловлено развитием окислительного стресса.

В настоящее время доказано, что БСО усиливает терапевтическую эффективность доксорубина — субстрата Pgp — *in vivo* [9, 10], однако механизм данного межлекарственного взаимодействия не описан. Предполагают, что эффект БСО в подавлении лекарственной устойчивости опосредован изменением уровня внутриклеточного глутатиона [11], при этом самостоятельное влияние БСО на активность Pgp не изучали, что и послужило целью настоящего исследования.

Цель

Цель исследования — оценить влияние БСО на активность и количество белка-транспортёра Pgp в клетках линии Caco-2.

Материал и методы исследования

Исследование выполнено на линии клеток аденокарциномы ободочной кишки человека (Caco-2) (ЦКП «Коллекция культур клеток позвоночных», Санкт-Петербург, Россия). Клетки культивировали при 37 °C и 5% содержании CO₂ в инкубаторе WS-189C (World Science, Корея) в модифицированной Дульбекко среде Игла (DMEM) с высоким содержанием глюкозы (4500 мг/л) (Sigma-Aldrich, Германия), с добавлением L-глутамина (4 мМ) (Sigma-Aldrich, Германия), 15% эмбриональной бычьей сыворотки (Sigma-Aldrich, Германия), 100 ЕД/мл и 100 мкг/мл пенициллина и стрептомицина соответственно (Sigma-Aldrich, Германия). Для определения количества Pgp клетки культивировали в 6-луночных планшетах, для оценки трансэпителиального сопротивления и активности Pgp — в специальных трансвелл-системах.

Срок культивирования клеток составил 21 сут, поскольку за это время происходит их спонтанная дифференцировка в энтероцитоподобные клетки, гиперэкспрессирующие Pgp.

В ходе исследования были сформированы следующие экспериментальные группы:

1) контрольная группа — клетки линии Caco-2 инкубировали в питательной среде без добавления тестируемых веществ;

2) контроль ингибирования активности Pgp с оценкой активности и количества белка-транспортёра — клетки линии Caco-2 инкубировали в питательной среде с добавлением классического ингибитора Pgp хинидина (Sigma Aldrich, США) в концентрациях 1, 5, 10, 50, 100 и 500 мкМ в течение 3 ч;

3) оценка влияния БСО на активность и количество Pgp — клетки линии Caco-2 инкубировали с БСО в концентрациях 1, 5, 10, 50, 100 и 500 мкМ в течение 3 ч.

На каждый эксперимент было выполнено 3 повторения (n=3).

Определение количества Pgp выполняли методом вестерн-блот. После окончания экспозиции с БСО и хинидином клетки снимали с лунок раствором трипсин-ЭДТА¹ (Sigma-Aldrich, Германия), трижды промывали раствором фосфатного буфера (BioRad, США) и лизировали в NP40 Cell Lysis Buffer Thermo (Thermo

Fisher Scientific, США) с добавлением смеси ингибиторов протеиназ (Sigma-Aldrich, Германия) в течение 30 мин при +4 °C и постоянном перемешивании из расчёта 10⁷ клеток на 100 мкл буфера. Полученный лизат центрифугировали при 13 000 об./мин в течение 10 мин (AvantiJXN-3, BeckmanCoulter, США).

Белки (30 мкг) подвергали электрофорезу с использованием TGX Stain-Free FastCast Acrylamide Kit (Bio-Rad) в буферной системе Laemmli (BioRad). Перед загрузкой образцы обрабатывали в соответствии с протоколом Bio-Rad. Их смешивали с буфером для образцов Laemmli (Bio-Rad), содержащим 2,5% 2-меркаптоэтанола (Bio-Rad) в соотношении 1:3, инкубировали 5 мин при температуре 70 °C. Гели прогоняли при 100 В в течение 90 мин.

Для определения относительного количества Pgp методом вестерн-блот использовали первичные мышинные поликлональные антитела [PA5-28801 Pgp Monoclonal Antibody (ID12G1), Invitrogen, США] в концентрации 1:200. Визуализацию первичных антител осуществляли с использованием вторичных кроличьих антител [Rabbit anti-Mouse IgG (H+L) Secondary Antibody, HRP, Invitrogen, США] в разведении 1:4000. Белки визуализировали хемилюминесценцией с помощью ChemiDoc XRS+ (Bio-Rad, США). Интенсивность полученных полос (бэндов) анализировали денситометрически с помощью программного обеспечения ImageLab (Bio-Rad, США). Количество Pgp оценивали относительно содержания белка домашнего хозяйства GAPDH [первичные GAPDH Loading Control Monoclonal Antibody (GA1R), DyLight 68, Invitrogen, США, разведение 1:1000, вторичные антитела — вторичные кроличьи антитела к первичным антителам GAPDH — Rabbitanti-Mouse IgG (H+L) Secondary Antibody, HRP, Invitrogen, США, разведение 1:4000].

Определение активности Pgp проводили по проникновению субстрата Pgp (фексофенадина) через билипидную мембрану клеток линии Caco-2 в специальных трансвелл-системах (рис. 1).

Трансвелл-система представлена двумя камерами: апикальной и базолатеральной. Дно апикальной камеры — полупроницаемая мембрана, на которую высевали клетки линии Caco-2 с плотностью 10⁵/см² (или 33 тыс. клеток на 1 ячейку) и культивировали в течение 21 сут.

До и после инкубации клеток с веществами оценивали целостность клеточного монослоя по величине трансэпителиального сопротивления. При его значении выше 500 МОм×см²

¹ ЭДТА — этилендиаминтетрауксусная кислота.

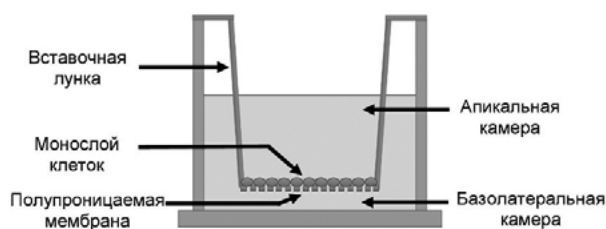


Рис. 1. Структура трансвелл-системы

выполняли транспортные эксперименты. Для этого в лунки трансвелл-системы добавляли питательную среду с БСО или хинидином в тестируемых концентрациях. После окончания инкубации питательную среду заменяли на транспортную среду, представляющую собой раствор Хэнкса (Sigma-Aldrich, Германия) с 25 мМ Хепес (Sigma-Aldrich, Германия) и 1% диметилсульфоксида (ПанЭко, Россия).

Контрольное исследование проводили следующим образом. В апикальную камеру в конечной концентрации добавляли субстрат Pgp — фексофенадин (Sigma-Aldrich, Германия) в конечной концентрации 150 мкМ [12]. Через 1, 2 и 3 ч забирали образцы из базолатеральной камеры для определения концентрации субстрата (a-b транспорт, обусловленный пассивной диффузией, против работы Pgp). В аналогичных трансвелл-системах оценивали транспорт фексофенадина из базолатеральной камеры в апикальную (b-a транспорт, обусловленный пассивной диффузией и функционированием Pgp). Для этого субстрат в той же концентрации добавляли в базолатеральную камеру, а затем через 1, 2 и 3 ч забирали образцы из апикальной камеры для определения концентрации фексофенадина.

Для оценки принадлежности вещества к ингибиторам проводили исследование, в котором в лунки трансвелл-системы добавляли питательную среду с БСО или хинидином (контроль ингибирования) в тестируемых концентрациях в обе камеры (апикальную и базолатеральную) вне зависимости от направления транспорта фексофенадина. Время инкубации составляло 3 ч.

После окончания инкубации питательную среду заменяли на транспортную среду, представляющую собой раствор Хэнкса (Sigma-Aldrich, Германия) с 25 мМ Хепес (Sigma-Aldrich, Германия) и 1% диметилсульфоксида (ПанЭко, Россия).

Транспорт маркерного субстрата рассчитывали по формуле [13]:

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

где Papp — коэффициент кажущейся проницаемости (apparent permeability coefficient); dQ/dt — изменение концентрации субстрата в камере-реципиенте за время инкубации; A — площадь полупроницаемой мембраны лунки в трансвелл-системе; C₀ — начальная концентрация субстрата в камере-доноре.

Определение концентрации фексофенадина в транспортной среде проводили методом высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) с ультрафиолетовым детектированием при длине волны 220 нм. Исследование выполняли на ВЭЖХ-хроматографе «Стайер» (Россия) по оригинальной методике [14]. Полученную пробу транспортной среды (50 мкл), содержащую фексофенадин, разводили в 150 мкл подвижной фазы, и 100 мкл полученного раствора вводили в хроматограф.

При анализе использовали хроматографическую колонку Phenomenex Synergi 4u Polar-RP 80A (250×4,6) (США) с зернением 4 мкм. Температура разделения 45 °С. Скорость потока 1 мл/мин. Состав подвижной фазы: 128 мл ацетонитрила (PanReas AppliChem, Испания), 267,4 мл воды деионизированной, 6,33 мл кислоты уксусной ледяной (PanReas AppliChem, Испания) с добавлением триэтиламина (PanReas AppliChem, Испания) до pH=6,7. Время удерживания фексофенадина в данных условиях составляло 12,8 мин. Количественное определение проводили методом абсолютной калибровки по площади пиков. Аналитический диапазон методики составлял 1,2–57,4 мкмоль/л.

На основе полученных данных рассчитывали концентрацию полумаксимального ингибирования (IC₅₀).

Статистический анализ полученных результатов проводили с помощью программ StatSoft Statistica 13.0 и Microsoft Excel. Построение графиков и расчёт IC₅₀ выполняли с использованием программы GraphPad Prism 8. Для оценки статистической значимости различий использовали дисперсионный анализ (ANOVA), попарные сравнения выполняли с помощью критерия Ньюмена–Кейлса. Статистически значимыми считали различия при p < 0,05.

Результаты

При анализе влияния БСО и хинидина на количество Pgp, оценённое методом вестерн-блот, были получены следующие результаты. Инкубация с БСО и хинидином в концентрациях 1–500 мкМ в течение 3 ч не влияла на количество белка-транспортёра в клетках линии Caco-2 (рис. 2).

Таблица 1. Влияние DL-бутионинсульфоксими́на (БСО) на транспорт субстрата Р-гликопротеина (Pgp) фексофенадина через билипидную мембрану клеток Сасо-2 ($M \pm SD$, $n=3$)

Вещество	Концентрация, мкМ	Papp b-a, см/с, $\times 10^{-6}$	Papp a-b, см/с, $\times 10^{-6}$	Papp (b-a)/ Papp (a-b)
Контроль	—	$3,02 \pm 0,12$	$1,11 \pm 0,37$	$2,90 \pm 0,89$
Хининидин	1	$2,92 \pm 0,36$	$1,54 \pm 0,21$	$1,90 \pm 0,05^*$
	5	$2,04 \pm 0,09^*$	$1,29 \pm 0,02$	$1,59 \pm 0,05^*$
	10	$0,94 \pm 0,08^*$	$1,15 \pm 0,12$	$0,83 \pm 0,09^*$
	50	$0,69 \pm 0,16^*$	$1,33 \pm 0,42$	$0,54 \pm 0,05^*$
	100	$0,65 \pm 0,09^*$	$1,31 \pm 0,37$	$0,51 \pm 0,08^*$
	500	$0,63 \pm 0,14^*$	$1,54 \pm 0,79$	$0,45 \pm 0,11^*$
БСО	1	$3,52 \pm 1,01$	$1,27 \pm 0,19$	$2,82 \pm 1,35$
	5	$3,10 \pm 0,71$	$1,39 \pm 0,18$	$2,15 \pm 0,51$
	10	$2,95 \pm 0,21^{\#}$	$1,42 \pm 0,22$	$2,12 \pm 0,47^{\#}$
	50	$1,96 \pm 0,25^{*\#}$	$1,31 \pm 0,32$	$1,53 \pm 0,27^{*\#}$
	100	$1,63 \pm 0,29^{*\#}$	$1,66 \pm 0,25$	$1,00 \pm 0,26^{*\#}$
	500	$1,58 \pm 0,28^{*\#}$	$1,67 \pm 0,17$	$0,96 \pm 0,23^{*\#}$

Примечание: *достоверное отличие от контроля ($p < 0,05$); $^{\#}$ достоверное отличие от хининидина ($p < 0,05$).

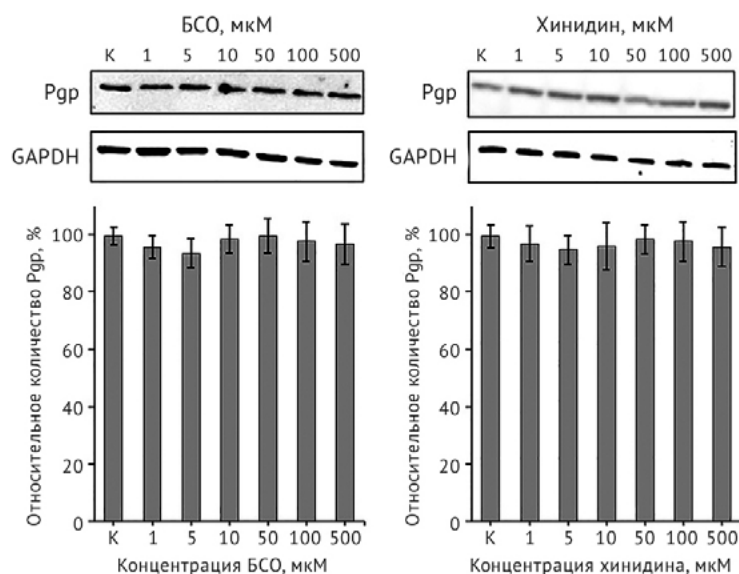


Рис. 2. Относительное количество Р-гликопротеина (Pgp) в клетках линии Сасо-2 при воздействии DL-бутионинсульфоксими́на (БСО) и хининидина в концентрациях 1–500 мкМ в течение 3 ч; К — контроль; GAPDH — глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназа

Влияние БСО на плотность межклеточных контактов оценивали по величине трансэпителиального сопротивления монослоя клеток. До начала экспериментов сопротивление клеточного монослоя составило $826,5 \pm 45,7$ мОм $\times$ см 2 . После инкубации клеток с тестируемыми веществами данный показатель не изменился и составил $799,5 \pm 26,9$ и $815,3 \pm 26,7$ мОм $\times$ см 2 ($p > 0,05$) при экспозиции с БСО и хининидином соответственно. Таким образом, полученные результаты демонстрируют, что плотность межклеточных контактов не изменялась при

воздействии БСО в течение 3 ч на клетки линии Сасо-2.

БСО и хининидин оказывали следующее влияние на активность Pgp. БСО в концентрациях 50, 100 и 500 мкМ при инкубации в течение 3 ч снижал коэффициент кажущейся проницаемости b-a (Papp b-a) для фексофенадина на 35,1% ($p=0,049$), 46,0% ($p=0,042$) и 47,7% ($p=0,040$) (табл. 1) и отношения коэффициентов кажущейся проницаемости Papp (b-a)/ Papp (a-b) на 47,2% ($p=0,046$), 65,5% ($p=0,041$) и 66,9% ($p=0,040$) соответственно (см. табл. 1). Данные результаты

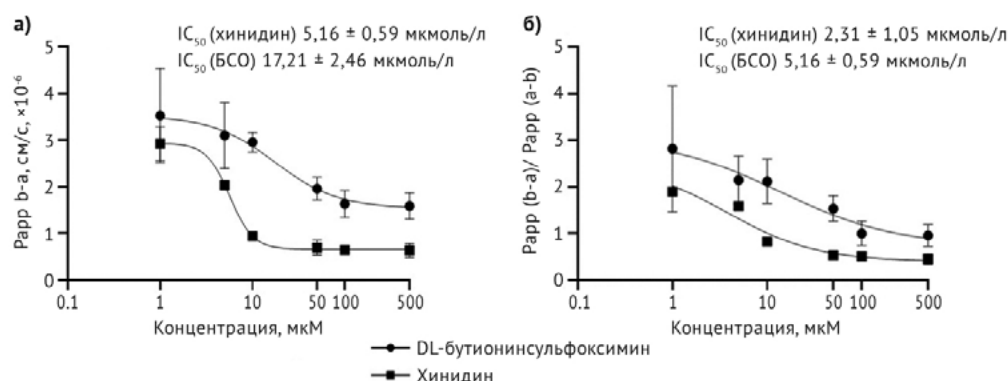


Рис. 3. Изменение коэффициента кажущейся проницаемости b-a (P_{app} b-a, а) и отношения коэффициентов кажущейся проницаемости (P_{app} b-a/ P_{app} a-b, б) фексофенадина под действием DL-бутионинсульфоксидина (БСО) и хинидина в концентрациях 1–500 мкМ; IC₅₀ — концентрация полумаксимального ингибирования. Расчёт IC₅₀ и построение графиков выполнены с использованием программы GraphPad Prism 8

свидетельствуют о снижении активности белка-транспортёра.

Таким образом, учитывая отсутствие изменений количества Pgr при данном сроке инкубации, полученные результаты доказывают, что БСО является прямым ингибитором активности Pgr за счёт непосредственного взаимодействия с молекулой белка-транспортёра.

Хининдин в концентрациях 5–500 мкМ способствовал снижению P_{app} b-a максимально на 79,1% ($p=0,0002$) при концентрации 500 мкМ. Повышение транспорта a-b и снижение отношения P_{app} (b-a)/ P_{app} (a-b) отмечено при концентрациях хинидина 1–500 мкМ максимально на 38,7% ($p=0,69$) и 84,4% ($p=0,0002$) соответственно при концентрации хинидина 500 мкМ (см. табл. 1).

При концентрациях 10, 50, 100 и 500 мкМ понижение P_{app} b-a и P_{app} (b-a)/ P_{app} (a-b) было в большей степени при инкубации клеток линии Сасо-2 с хининдином по сравнению с БСО (см. табл. 1).

Следует отметить, что хининдин ингибировал активность Pgr в более низких концентрациях по сравнению с БСО: IC₅₀ P_{app} b-a фексофенадина для хинидина составила $5,16 \pm 0,59$ мкмоль/л, для БСО — $17,21 \pm 2,46$ мкмоль/л ($p=0,001$) (рис. 3, а), а IC₅₀ P_{app} (b-a)/ P_{app} (a-b) $2,31 \pm 1,05$ мкмоль/л для хинидина и $5,16 \pm 0,59$ мкмоль/л для БСО ($p=0,003$) соответственно (рис. 3, б).

Обсуждение

Окислительный стресс — типовой патологический процесс, возникающий в результате дисбаланса между продукцией свободных радикалов и их утилизацией в сторону увеличения образования активных форм кислорода [15]. В настоящее время доказана важная роль окислительного стресса в патогенезе ши-

рокого спектра заболеваний: сердечно-сосудистых, онкологических, нейродегенеративных, бронхолегочных [16], поэтому применение антиоксидантов в их комплексной терапии патогенетически оправданно.

В ряде исследований при изучении влияния окислительного стресса, вызванного воздействием пероксида водорода, на активность и количество Pgr было выявлено индуцирующее действие [17–20].

Однако при моделировании окислительного стресса с помощью ингибитора синтеза глутатиона — БСО — были получены противоречивые результаты в отношении функциональной активности Pgr. Одной из возможных причин полученных данных может быть наличие собственной ингибирующей активности у БСО, что не было изучено и стало целью исследования.

В настоящем исследовании на клетках линии Сасо-2 установлено, что БСО в концентрациях выше 50 мкМ является прямым ингибитором Pgr (снижает активность белка-транспортёра и не изменяет его количество), однако по своей активности уступает классическому ингибитору белка-транспортёра — хининдину.

Согласно общепринятым представлениям, ингибиторы Pgr чаще всего имеют в своей структуре третичный атом азота, являются ароматическими соединениями, алкилированными эфирами или гетероциклами [21].

БСО [2-амино-4-(бутилсульфонимидоил) бутановая кислота] представляет собой производное сульфоксидина, имеет молекулярную массу 222,305 кДа и третичный атом азота в структуре. Следовательно, полученные результаты согласуются с классическими представлениями об ингибиторах Pgr.

Результаты исследования могут иметь практическое значение, например использование БСО в комплексной терапии онкологических

заболеваний, возможно, будет способствовать большему противоопухолевому эффекту, что согласуется с данными литературы [22, 23]. Ингибирующее действие БСО локально в ткани опухолей приведёт к снижению множественной лекарственной устойчивости, опосредованной гиперфункцией Pgp, и повышению эффективности химиотерапии.

Вывод

В ходе настоящего исследования на линии клеток Caco-2 был показан прямой ингибирующий эффект DL-бутионинсульфоксимины, не сопровождающийся изменением его количества.

Участие авторов. Ю.В.А. — культивирование клеток, проведение экспериментов, выполнение вестерн-блота, статистическая обработка результатов; П.Ю.М. — выполнение ВЭЖХ, статистическая обработка результатов; А.В.Щ. — научное руководство исследованием, моделирование и проведение экспериментов, написание текста статьи; Е.Н.Я. — руководство исследованием, редактирование статьи.

Источник финансирования. Исследование выполнено при финансовой поддержке гранта Президента Российской Федерации для государственной поддержки молодых российских учёных — кандидатов наук МК-1856.2020.7.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов по представленной статье.

ЛИТЕРАТУРА

1. Brueck S, Bruckmueller H, Wegner D, Busch D, Martin P, Oswald S, Cascorbi I, Siegmund W. Transcriptional and post-transcriptional regulation of duodenal P-glycoprotein and MRP2 in healthy human subjects after chronic treatment with rifampin and carbamazepine. *Mol Pharm.* 2019;16(9):3823–3830. DOI: 10.1021/acs.molpharmaceut.9b00458.
2. Mollazadeh S, Sahebkar A, Hadizadeh F, Behravan J, Arabzadeh S. Structural and functional aspects of P-glycoprotein and its inhibitors. *Life Sci.* 2018;214:118–123. DOI: 10.1016/j.lfs.2018.10.048.
3. Saravanakumar A, Sadighi A, Ryu R, Akhlaghi F. Physicochemical properties, biotransformation, and transport pathways of established and newly approved medications: A systematic review of the top 200 most prescribed drugs vs. the FDA-Approved drugs between 2005 and 2016. *Clin Pharmacokinet.* 2019;58(10):1281–1294. DOI: 10.1007/s40262-019-00750-8.
4. Gottesman MM, Ling V. The molecular basis of multidrug resistance in cancer: The early years of P-glycoprotein research. *FEBS Lett.* 2006;580(4):998–1009. DOI: 10.1016/j.febslet.2005.12.060.
5. Yano K, Tomono T, Ogihara T. Advances in studies of P-Glycoprotein and its expression regulators. *Biol Pharm Bull.* 2018;41(1):11–19. DOI: 10.1248/bpb.b17-00725.
6. Pendyala L, Perez R, Weinstein A, Zdanowicz J, Creaven PJ. Effect of glutathione depletion on the cytoto-

xicity of cisplatin and iproplatin in a human melanoma cell line. *Cancer Chemother Pharmacol.* 1997;40(1):38–44. DOI: 10.1007/s002800050622.

7. Wartenberg M, Ling FC, Schallenberg M, Bäumer AT, Petrat K, Hescheler J, Sauer H. Down-regulation of intrinsic P-glycoprotein expression in multicellular prostate tumor spheroids by reactive oxygen species. *J Biol Chem.* 2001;276(20):17420–17428. DOI: 10.1074/jbc.M100141200.

8. Hong H, Lu Y, Ji Z, Liu G. Up-regulation of P-glycoprotein expression by glutathione depletion-induced oxidative stress in rat brain microvessel endothelial cells. *J Neurochem.* 2006;98:1465–1473. DOI: 10.1111/j.1471-4159.2006.03993.x.

9. Vanhoefer U, Cao S, Minderman H, Toth K, Skenderis BS, Slovak ML, Rustum YM. DL-buthionine-(S,R)-sulfoximine potentiates *in vivo* the therapeutic efficacy of doxorubicin against multidrug resistance protein-expressing tumors. *Clin Cancer Res.* 1996;2(12):1961–1968.

10. Gong MQ, Wu C, He XY, Zong JY, Wu JL, Zhuo RX, Cheng SX. Tumor targeting synergistic drug delivery by self-assembled hybrid nanovesicles to overcome drug resistance. *Pharm Res.* 2017;34(1):148–160. DOI: 10.1007/s11095-016-2051-9.

11. Kisara S, Furusawa S, Takayanagi Y, Sasaki K. Effect of glutathione depletion by buthionine sulfoximine on doxorubicin toxicity in mice. *Res Commun Mol Pathol Pharmacol.* 1995;89(3):401–410.

12. Petri N, Tannergren C, Rungstad D, Lennernäs H. Transport characteristics of Fexofenadine in the Caco-2 cell model. *Pharmac Res.* 2004;21(8):1398–1404. DOI: 10.1023/B:PHAM.0000036913.90332.b1.

13. Elsbay R, Surry DD, Smith VN, Gray AJ. Validation and application of Caco-2 assays for the *in vitro* evaluation of development candidate drugs as substrates or inhibitors of P-glycoprotein to support regulatory submissions. *Xenobiotic.* 2008;38:1140–1164. DOI: 10.1080/00498250802050880.

14. Ерохина П.Д., Абаленихина Ю.В., Шулькин А.В., Черных И.В., Попова Н.М., Слепнев А.А., Якушева Е.Н. Изучение влияния прогестерона на активность гликопротеина-P *in vitro*. *Российский медико-биологический вестник имени академика И.П. Павлова.* 2020;28(2):135–142. [Erokhina PD, Abalenikhina YuV, Shchulkin AV, Chernykh IV, Popova NM, Slepnev AA, Yakusheva EN. A study of influence of progesterone on activity of Glycoprotein-P *in vitro*. *IP Pavlov Russian Medical Biological Herald.* 2020;28(2):135–142. (In Russ.)] DOI: 10.23888/PAVLOVJ2020282135-142.

15. Pisoschi AM, Pop A, Iordache F, Stanca L, Predoi G, Serban AI. Oxidative stress mitigation by antioxidants — An overview on their chemistry and influences on health status. *Eur J Med Chem.* 2021;209:112891. DOI: 10.1016/j.ejmech.2020.112891.

16. Halliwell B, Gutteridge JMC. *Free radicals in biology and medicine.* 5th ed. Oxford: Oxford University Press; 2015. 896 p. DOI: 10.1093/acprof:oso/9780198717478.001.0001.

17. Ziemann C, Bürkle A, Kahl GF, Hirsch-Ernst KI. Reactive oxygen species participate in mdrlb mRNA and P-glycoprotein overexpression in primary rat hepatocyte cultures. *Carcinogenesis.* 1999;20(3):407–414. DOI: 10.1093/carcin/20.3.407.

18. Felix RA, Barrand MA. P-glycoprotein expression in rat brain endothelial cells: evidence for regulation by transient oxidative stress. *J Neurochem.* 2002;80(1):64–72. DOI: 10.1046/j.0022-3042.2001.00660.x.

19. Shchulkin AV, Abalenikhina YV, Erokhina PD, Chernykh IV, Yakusheva EN. The role of P-glycoprotein in

decreasing cell membranes permeability during oxidative stress. *Biochemistry (Moscow)*. 2021;86(2):197–206. DOI: 10.1134/S0006297921020085.

20. Shchulkin AV, Abalenikhina YuV, Seidkulieva AA, Chernykh IV, Yakusheva EN. The effect of oxidative stress on the transport of the P-glycoprotein substrate through the cell monolayer. *Biochemistry (Moscow), Supplement Series A: Membrane and Cell Biology*. 2021;15(3):257–269. DOI: 10.1134/S1990747821040103.

21. Poongavanam V, Haider N, Ecker GF. Fingerprint-based in silico models for the prediction of P-gly-

coprotein substrates and inhibitors. *Bioorg Med Chem*. 2012;20(18):5388–5395. DOI: 10.1016/j.bmc.2012.03.045.

22. Lee M, Jo A, Lee S, Kim JB, Chang Y, Nam JY, Cho H, Cho YY, Cho EJ, Lee JH, Yu SJ, Yoon JH, Kim YJ. 3-Bromopyruvate and buthionine sulfoximine effectively kill anoikis-resistant hepatocellular carcinoma cells. *PLoS One*. 2017;12(3):e0174271. DOI: 10.1371/journal.pone.0174271.

23. Du M, Zhang L, Scorsone KA, Woodfield SE, Zage PE. Nifurtimox is effective against neural tumor cells and is synergistic with Buthionine Sulfoximine. *Sci Rep*. 2016;6:27458. DOI: 10.1038/srep27458.

Сведения об авторах

Абаленихина Юлия Владимировна, канд. биол. наук, доц., каф. биологической химии с курсом КЛД ФДПО, ФГБОУ ВО Рязанский ГМУ Минздрава России, г. Рязань, Россия; abalenikhina88@mail.ru; ORCID: <http://orcid.org/0000-0003-0427-0967>

Мыльников Павел Юрьевич, аспирант, каф. фармакологии с курсом фармации ФДПО, ФГБОУ ВО Рязанский ГМУ Минздрава России, г. Рязань, Россия; pavelmylnikov@mail.ru; ORCID: <http://orcid.org/0000-0001-7829-2494>

Щулькин Алексей Владимирович, докт. мед. наук, проф., каф. фармакологии с курсом фармации ФДПО, ФГБОУ ВО Рязанский ГМУ Минздрава России, г. Рязань, Россия; alekseyshulkin@rambler.ru; ORCID: <http://orcid.org/0000-0003-1688-0017>

Якушева Елена Николаевна, докт. мед. наук, проф., зав. каф., каф. фармакологии с курсом фармации ФДПО, ФГБОУ ВО Рязанский ГМУ Минздрава России, г. Рязань, Россия; enya.rzn@yandex.ru; ORCID: <http://orcid.org/0000-0001-6887-4888>

Author details

Yulia V. Abalenikhina, Cand. Sci. (Biol.), Assoc. Prof., Depart. of Biological Chemistry, Ryazan State Medical University, Ryazan, Russia; abalenikhina88@mail.ru; ORCID: <http://orcid.org/0000-0003-0427-0967>

Pavel Yu. Mylnikov, PhD-Student, Depart. of Pharmacology with a Course of Pharmacy, Continuing Professional Education Faculty, Ryazan State Medical University, Ryazan, Russia; pavelmylnikov@mail.ru; ORCID: <http://orcid.org/0000-0001-7829-2494>

Alexey V. Shchulkin, M.D., D. Sci. (Med.), Prof., Depart. of Pharmacology with a Course of Pharmacy, Continuing Professional Education Faculty, Ryazan State Medical University, Ryazan, Russia; alekseyshulkin@rambler.ru; ORCID: <http://orcid.org/0000-0003-1688-0017>

Elena N. Yakusheva, M.D., D. Sci. (Med.), Prof., Head of Depart. of Pharmacology with a Course of Pharmacy, Continuing Professional Education Faculty, Ryazan State Medical University, Ryazan, Russia; enya.rzn@yandex.ru; ORCID: <http://orcid.org/0000-0001-6887-4888>