

# Способ ингибирования белка ABCB1 в гематоэнцефалическом барьере *in vivo*

И.В. Черных, А.В. Шулькин, П.Ю. Мыльников, Е.Е. Кириченко, М.В. Гацанога, Е.Н. Якушева

ФГБОУ ВО «Рязанский государственный медицинский университет имени академика И.П. Павлова» Минздрава РФ, Рязань, Россия

## Аннотация

**Введение.** Повышенная функциональная активность белка — транспортера гликопротеина-P (ABCB1) в гематоэнцефалическом барьере (ГЭБ) является одной из возможных причин неэффективности нейропротекторной фармакотерапии последствий ишемического инсульта.

**Цель исследования** — разработать способ ингибирования функциональной активности ABCB1 в ГЭБ.

**Материалы и методы.** Работа выполнена на 60 крысах-самцах Вистар массой 200–280 г. Функциональную активность ABCB1 в ГЭБ оценивали по содержанию маркерного субстрата транспортера — фексофенадина (внутривенное введение 10 мг/кг) в плазме крови и коре головного мозга животных. Анализ проводили на фоне внутривенного введения 1 мл/кг изотонического раствора ( $n = 30$ ) или системного ингибитора транспортера — 17,6 мг/кг омепразола ( $n = 30$ ) за 30 мин до введения фексофенадина. Общее количество фексофенадина в системном кровотоке и в коре больших полушарий оценивали методом высокоэффективной жидкостной хроматографии с расчётом площади под кривой концентрация вещества–время в крови ( $AUC_{0-1(плазма)}$ ) или ткани коры больших полушарий головного мозга ( $AUC_{0-1(мозг)}$ ). Проницаемость ГЭБ оценивали по показателю  $AUC_{0-1(мозг)}/AUC_{0-1(плазма)}$ .

**Результаты.** Введение омепразола перед фексофенадином не влияло на концентрацию последнего в плазме крови крыс ни в одну из анализируемых временных точек.  $AUC_{0-1(плазма)}$  фексофенадина также не различалась между сериями. Однако введение омепразола повышало концентрацию фексофенадина в коре больших полушарий через 5 мин после введения последнего в 2,96 раза ( $p = 0,009$ ) и увеличивало  $AUC_{0-1(мозг)}$  в 1,49 раза ( $p = 0,012$ ). Показатель  $AUC_{0-1(мозг)}/AUC_{0-1(плазма)}$  при использовании омепразола возрастал в 1,71 раза ( $p = 0,003$ ). Таким образом, омепразол ингибирует функциональную активность ABCB1 в ГЭБ.

**Выводы.** Разработан и апробирован метод ингибирования активности ABCB1 в ГЭБ.

**Ключевые слова:** гликопротеин-P; белок ABCB1; функциональная активность; гематоэнцефалический барьер; омепразол; нейропротекция

**Источник финансирования.** Авторы заявляют об отсутствии внешних источников финансирования при проведении исследования.

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

**Адрес для корреспонденции:** 390026, Рязань, ул. Высоковольтная, д. 9. ФГБОУ ВО РязГМУ Минздрава России.

E-mail: ekaterinakir2013@yandex.ru. Кириченко Е.Е.

**Для цитирования:** Черных И.В., Шулькин А.В., Мыльников П.Ю., Кириченко Е.Е., Гацанога М.В., Якушева Е.Н. Способ ингибирования белка ABCB1 в гематоэнцефалическом барьере *in vivo*. *Анналы клинической и экспериментальной неврологии*. 2022; 16(3): 47–52.

DOI: <https://doi.org/10.54101/ACEN.2022.3.6>

Поступила 26.11.2021 / Принята в печать 14.02.2022 / Опубликовано 30.09.2022

## A method of inhibiting the ABCB1 protein in the blood-brain barrier *in vivo*

Ivan V. Chernykh, Aleksey V. Shchul'kin, Pavel Yu. Mylnikov, Ekaterina E. Kirichenko, Maria V. Gatsanoga, Elena N. Yakusheva

Ryazan State Medical University, Ryazan, Russia

## Abstract

**Introduction.** Increased functional activity of the P-glycoprotein transporter (ABCB1) in the blood-brain barrier (BBB) is a possible reason why neuroprotective pharmacotherapy is ineffective after ischaemic stroke.

**Study aim** — to develop a way to inhibit the functional activity of ABCB1 at the BBB.

**Materials and methods.** The study was performed on 60 male Wistar rats weighing 200–280 g. The functional activity of ABCB1 at the BBB was assessed by measuring the plasma and cortical levels of the marker transporter substrate fexofenadine (intravenous administration of 10 mg/kg). Thirty minutes before the administration of fexofenadine, 1 ml/kg of intravenous saline ( $n = 30$ ) or 17.6 mg/kg of omeprazole, the transporter's systemic inhibitor ( $n = 30$ ), was administered to the rats. The total amount of fexofenadine in the systemic circulation and the cerebral cortex was assessed using high performance liquid chromatography, by calculating the area under the blood concentration–time curve ( $AUC_{0-1(plasma)}$ ) or the cerebral cortex concentration ( $AUC_{0-1(brain)}$ ). BBB permeability was calculated using the ratio  $AUC_{0-1(brain)}/AUC_{0-1(plasma)}$ .

**Results.** The administration of omeprazole before fexofenadine did not affect the plasma level of the latter at any time point under analysis. Fexofenadine's  $AUC_{0-1(plasma)}$  also did not differ between the series. However, the administration of omeprazole increased the cortical level of fexofenadine by 2.96 times

( $p = 0.009$ ), 5 minutes after administration of the latter, and increased the  $AUC_{0-t(\text{brain})}$  by 1.49 times ( $p = 0.012$ ).  $AUC_{0-t(\text{brain})}/AUC_{0-t(\text{plasma})}$  increased by 1.71 times when omeprazole was used ( $p = 0.003$ ). Therefore, omeprazole inhibits the functional activity of ABCB1 at the BBB.

**Conclusions.** We developed and tested a method for inhibiting ABCB1 activity at the BBB.

**Keywords:** glycoprotein-P; ABCB1 protein; functional activity; blood-brain barrier; omeprazole; neuroprotection

**Source of funding.** This study was not supported by any external sources of funding.

**Conflict of interest.** The authors declare no apparent or potential conflicts of interest related to the publication of this article.

**For correspondence:** 390026, Russia, Ryazan, Vysokovoltynaya str., 9. Ryazan State Medical University.

E-mail: ekaterinakir2013@yandex.ru. Kirichenko E.E.

**For citation:** Chernykh I.V., Shchul'kin A.V., Mylnikov P.Yu., Kirichenko E.E., Gatsanoga M.V., Yakusheva E.N. A method of inhibiting the ABCB1 protein in the blood-brain barrier *in vivo*. *Annals of Clinical and Experimental Neurology*. 2022; 16(3): 47–52. (In Russ.)

DOI: <https://doi.org/10.54101/ACEN.2022.3.6>

Received 26.11.2021 / Accepted 14.02.2022 / Published 30.09.2022

## Введение

Гликопротеин Р (белок ABCB1) — продукт гена *MDR1* (Multidrug resistance gene 1), который представляет собой эффлюксный мембранный АТФ-зависимый низкоспецифичный белок-транспортёр с широкой локализацией в организме. Функционируя в гематоэнцефалическом барьере (ГЭБ), ABCB1 препятствует проникновению в ткани головного мозга лекарственных веществ, принадлежащих к числу его субстратов [1].

Функциональная активность ABCB1 зависит от генотипа [2], пола [3], изменяется на фоне введения лекарственных средств [4], при развитии ряда патологических процессов [5]. Повышение активности белка-транспортёра в ГЭБ связывают с развитием лекарственно-резистентной эпилепсии и болезни Альцгеймера [6, 7]. Кроме того, было обнаружено, что ABCB1 контролирует фармакокинетику ряда лекарственных препаратов с доказанной нейропротективной активностью: нимодипина [8], флавоноидов [9] и др. Несмотря на противоречивые результаты исследований по влиянию гипоксии различных видов на функционирование ABCB1 [5, 10–12], большинство учёных сходятся во мнении, что эффлюксная активность и экспрессия ABCB1 на фоне кислородного дефицита возрастает. В нашем предварительном исследовании также продемонстрировано возрастание абсолютного количества транспортёра на фоне перманентной билатеральной окклюзии общих сонных артерий крыс [13]. В этой связи недостаточное проникновение нейропротекторов через ГЭБ из-за их эффлюкса ABCB1, активность которого повышена при ишемическом инсульте, может являться причиной неэффективности нейропротекторной терапии [14].

Ингибирование транспортёра в ГЭБ на фоне церебральной ишемии может являться обнадеживающей стратегией для повышения эффективности нейропротекторной коррекции её последствий. С другой стороны, снижение активности ABCB1 на уровне целостного организма связано со значительным числом фармакокинетических и фармакодинамических ограничений в связи с его важной ролью в снижении энтеральной абсорбции и контроле экскреции лекарственных веществ-субстратов [15]. За последние десятилетия были созданы три поколения системных ингибиторов ABCB1 [16]. Соединения первого поколения (антигипертензивное средство верапамил) применялись в клинической практике, и в дополнение к основной фарма-

кологической активности для них был выявлен ингибирующий потенциал по отношению к ABCB1. Их химическая модификация с целью минимизировать специфическую активность, но сохранить способность снижать активность транспортёра, привела к созданию препаратов второго поколения. Средство третьего поколения тариквидар было создано путём целенаправленного синтеза с учётом особенностей химического строения ранее известных ингибиторов ABCB1. Ни одно из имеющихся на сегодня веществ — ингибиторов транспортёра не является безопасным вследствие, в частности, повышения риска системных межлекарственных взаимодействий [17]. Ряд препаратов предложен в качестве ингибиторов ABCB1 в эндотелиальных клетках ГЭБ *in vitro*: например, производные тиосемикарбазона [18], антипсихотический препарат пероспирон [19], алкилирующий агент темозоломид [20]. Показано, что внутривенная инфузия тариквидара здоровым добровольцам приводила к тотальному ингибированию ABCB1 в ГЭБ [21]. Частичное ингибирование транспортёра в ГЭБ достигалось введением добровольцам хинидина [22]. Однако тариквидар и хинидин снижают также системную активность транспортёра, что чревато непредсказуемым изменением фармакокинетики его субстратов. Селективных и безопасных ингибиторов активности ABCB1 *in vivo* в ГЭБ на сегодняшний день не предложено.

**Целью** исследования явилась разработка метода ингибирования функциональной активности ABCB1 в ГЭБ *in vivo*.

## Материалы и методы

Исследование выполнено на 60 половозрелых крысах-самцах Вистар массой 200–280 г в соответствии с правилами лабораторной практики<sup>1</sup>. Исследование было одобрено комиссией по контролю за содержанием и использованием лабораторных животных ФГБОУ ВО РязГМУ Минздрава России (протокол № 7 от 03.04.2018).

Функциональную активность ABCB1 в ГЭБ животных анализировали на фоне внутривенного введения изотонического раствора (1 мл/кг) (группа контроля;  $n = 30$ ) и на фоне инъекции блокатора протонной помпы омепразола («Dr. Reddy's») в дозе 17,6 мг/кг ( $n = 30$ ) по содержанию маркерного субстрата транспортёра — фексофенадина

<sup>1</sup> Приказ Министерства здравоохранения РФ от 01.04.2016 № 199н «Об утверждении Правил надлежащей лабораторной практики».

(ФФ) в плазме крови и коре головного мозга животных после его однократного внутривенного введения в дозе 10 мг/кг. Доза омепразола была выбрана на основе данных научной литературы о концентрации полумаксимального ингибирования ( $IC_{50}$ ) по отношению к ABCB1 *in vitro* [23–26]. Кора головного мозга была выбрана для исключения возможности забора на анализ подкорковых структур, не ограниченных от крови ГЭБ. Лекарственная форма ФФ для парентерального введения отсутствует, в связи с этим проводилась экстракция целевого вещества из таблеток («Sanofi Aventis») ацетонитрилом с последующим упариванием органического растворителя на роторно-вакуумном испарителе при 50°C, растворением сухого остатка в воде для инъекций и подтверждением концентрации раствора методом высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) с детектированием в ультрафиолетовом (УФ) свете и фильтрованием через бактериальный фильтр («Corning») с диаметром пор 0,22 мкм. Концентрация водного раствора ФФ составила 10 мг/мл.

У крыс через 5, 10, 15, 30, 45 и 60 мин после внутривенного введения ФФ под глубоким наркозом из брюшной аорты забирали 4 мл крови, а также образец лобной доли коры головного мозга после транскардиальной перфузии 100 мл изотонического раствора для удаления интраваскулярного вещества. На каждую временную точку в обеих группах приходилось по 5 животных [27].

Для выделения ФФ к 1,5 мл плазмы крови крыс прибавляли 4 мл ацетонитрила, встряхивали при 400 об/мин 15 мин, центрифугировали при 1750g 15 мин и упаривали супернатант при 50°C. Сухой остаток растворяли в 200 мкл подвижной фазы и 100 мкл вводили в хроматограф для анализа. Коэффициент извлечения ФФ из плазмы составил 83,6%. Для извлечения целевого вещества из головного мозга образцы ткани массой 0,5 г гомогенизировали в 500 мкл деионизированной воды в течение 1 мин, после чего белок осаждался 4 мл ацетонитрила путём встряхивания на приборе «Vortech» в течение 15 мин с последующим центрифугированием 15 мин при 1750g и забором надосадочного слоя, который упаривали при 50°C на роторно-вакуумном испарителе. Далее сухой остаток растворяли в 200 мкл подвижной фазы и 100 мкл вводили в хроматограф. Степень извлечения целевого вещества составляла 81,3%.

Количественный анализ ФФ проводили по оригинальным валидированным ВЭЖХ-методикам с использованием хроматографической системы «Stayer» с УФ-детектированием при длине волны 220 нм в изократическом режиме. Применялась хроматографическая колонка «Phenomenex Synergi 4u Polar-RP 80A» (250 × 4,6) с зернением 4 мкм. Температура разделения — 45°C. Скорость потока подвижной фазы — 1,0 мл/мин. Состав подвижной фазы: вода деионизированная — ацетонитрил — ледяная уксусная кислота (50–50–0,1), pH 5,5. Время удерживания ФФ в указанных условиях в обеих тканях составило  $14,91 \pm 0,25$  мин.

Количественный анализ ФФ в обеих тканях проводился методом абсолютной калибровки по площади пиков. Рабочий диапазон концентраций ФФ для плазмы крови составлял 0,1–17,0 мкг/мл, для гомогената мозга — 0,05–2,0 мкг/г, линейность методик соответствовала установленным нормам (коэффициент корреляции составлял более 0,99), ошибка метода не превышала 15%. Нижний предел обнаружения вещества в плазме крови составил

12 нг/мл, предел количественного определения — 100 нг/мл. В гомогенате мозга данные показатели составляли 35 и 50 нг/г соответственно. Верхний предел количественного определения для обеих методик соответствовал максимальной точке калибровочной кривой.

Общее количество ФФ в системном кровотоке и в коре больших полушарий оценивали по площади под кривой концентрация ФФ (в крови или ткани коры больших полушарий головного мозга)—время ( $AUC_{0-t(плазма)}$  или  $AUC_{0-t(мозг)}$ ), которые рассчитывали методом трапеций. Для оценки проницаемости ГЭБ был рассчитан показатель  $AUC_{0-t(мозг)}/AUC_{0-t(плазма)}$  [27].

Результаты исследования обрабатывали с помощью программы «Statistica v.13.0» («StatSoft Inc.»). Характер распределения данных оценивали по критерию Шапиро–Уилка, далее использовали тест ANOVA и критерий Ньюмена–Кейлса. Различия считали достоверными при уровне значимости  $p < 0,05$  [27].

## Результаты

Концентрация ФФ в плазме крови крыс через 5 мин после его внутривенного введения в дозе 10 мг/кг массы на фоне введения изотонического раствора (контроль) составила более 16 мкг/мл, затем постепенно снижалась и достигла минимума (1,0 мкг/мл) к 60 мин исследования (рис. 1). Введение омепразола существенно не влияло на концентрацию ФФ в плазме крови крыс ни в одну из анализируемых временных точек.  $AUC_{0-t(плазма)}$  ФФ также не различалась в указанных сериях.

Следует отметить, что внутривенное введение животным маркерного субстрата ABCB1 позволяет выявить изменение активности транспортера только в печени и почках (органах, ответственных за экскрецию ФФ), но не в слизистой оболочке тонкого кишечника.

ФФ в коре больших полушарий головного мозга контрольных крыс детектировался уже через 5 мин после его внутривенного введения в дозе 10 мг/кг массы: его концентрация

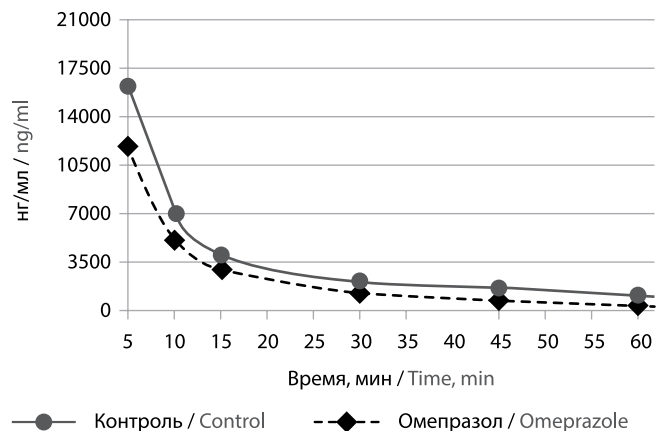
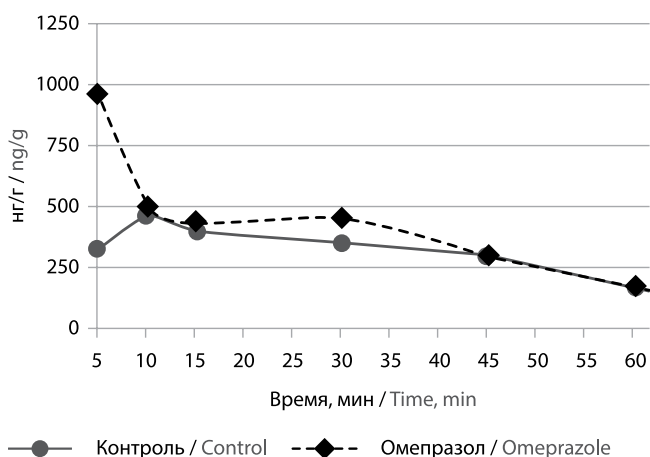


Рис. 1. Динамика концентраций ФФ в плазме крови после его внутривенного введения в дозе 10 мг/кг массы контрольным крысам и животным на фоне введения омепразола (17,6 мг/кг внутривенно).

Fig. 1. Changes in the plasma fexofenadine level after intravenous administration of 10 mg/kg of fexofenadine to rats in the control group and in the group that received omeprazole (17.6 mg/kg intravenously).



**Рис. 2.** Динамика концентраций ФФ в гомогенате коры головного мозга после его внутривенного введения в дозе 10 мг/кг массы контрольным крысам и животным на фоне введения омепразола (17,6 мг/кг внутривенно).

**Fig. 2** Changes in the cortical fexofenadine level after intravenous administration of 10 mg/kg of fexofenadine to rats in the control group and in the group that received omeprazole (17.6 mg/kg intravenously).

составляла  $320,93 \pm 140,01$  нг/г, достигала своего максимума ( $399,9 \pm 156,5$  нг/г) через 15 мин и постепенно снижалась к 60 мин исследования до  $166,2 \pm 31,7$  нг/г (рис. 2).

Применение омепразола повышало концентрацию ФФ в коре больших полушарий через 5 мин после введения последнего в 2,96 раза ( $p = 0,009$ ) по сравнению с показателями крыс, которым вводили ФФ после изотонического раствора.

Дополнительно была рассчитана  $AUC_{0-t(\text{мозг})}$  ФФ, которая характеризует общее количество ФФ, поступившее в кору мозга после введения омепразола (таблица). Установлено, что введение омепразола увеличивало данный показатель в 1,49 раза ( $p = 0,012$ ).

В связи с тем, что возрастание параметра  $AUC_{0-t(\text{мозг})}$  может быть следствием как снижения функциональной активности ABCB1 локально в ГЭБ, так и проявляться благодаря увеличению плазменной концентрации маркерного субстрата транспортера, целесообразно было оценить отношение  $AUC_{0-t(\text{мозг})}/AUC_{0-t(\text{плазма})}$ , изменение которого характеризует только активность Р-гликопротеина в ГЭБ.

**Усредненные значения  $AUC$  ФФ в гомогенате головного мозга и плазме крови крыс, а также соотношение указанных параметров у контрольных крыс и животных на фоне введения 17,6 мг/кг омепразола ( $M \pm m$ )**

Mean fexofenadine  $AUC$  values in the cortical homogenate and blood plasma of the rats, as well as comparison of these parameters in the control rats and in animals that received omeprazole 17.6 mg/kg ( $M \pm m$ )

Серия эксперимента Experimental series	$n$	$AUC_{0-t(\text{плазма})}$ , МКГ/(мл × мин) $AUC_{0-t(\text{plasma})}$ , $\mu\text{g}/(\text{ml} \times \text{min})$	$AUC_{0-t(\text{мозг})}$ , МКГ/(г × мин) $AUC_{0-t(\text{brain})}$ , $\mu\text{g}/(\text{g} \times \text{min})$	$AUC_{0-t(\text{мозг})}/AUC_{0-t(\text{плазма})}$ $AUC_{0-t(\text{brain})}/AUC_{0-t(\text{plasma})}$
Контроль Control	30	$186,82 \pm 66,41$	$16,20 \pm 3,73$	$0,087 \pm 0,046$
Омепразол Omeprazole	30	$162,29 \pm 53,12$	$24,11 \pm 4,26^*$	$0,149 \pm 0,039^*$

**Примечание.** \* – достоверные различия с группой контроля; данные представлены в виде среднего арифметического  $\pm$  стандартное отклонение.

**Note.** \* – statistically significant difference compared with the control group; values are given as the arithmetic mean  $\pm$  standard deviation.

Указанный показатель достоверно возрастал при применении ингибитора активности транспортера — омепразола в 1,71 раза ( $p = 0,003$ ).

Таким образом, омепразол в дозе 17,6 мг/кг снижает функциональную активность ABCB1 локально в ГЭБ без существенного изменения системной активности транспортера.

## Обсуждение

Одной из вероятных причин неэффективности нейропротективных лекарственных средств при коррекции последствий ишемических поражений мозга является их недостаточное проникновение через ГЭБ за счёт эффлюкса ABCB1, активность которого, как было показано ранее, повышается на фоне дефицита кислорода, неизбежного при данной нозологии. Подтверждением данному предположению является принадлежность ряда лекарственных средств указанной группы к числу субстратов транспортера. Например, при пероральном введении крысам блокатора кальциевых каналов нимодипина совместно с ингибитором ABCB1 правастатином относительная биодоступность первого возрастала в 1,12–1,31 раза относительно контроля, что свидетельствует об участии данного транспортера в регуляции его энтеральной абсорбции [28]. Подобные исследования по проникновению данного вещества в головной мозг отсутствуют, однако, вследствие локализации транспортера в ГЭБ [29], следует предполагать его участие в контроле данного процесса.

Препарат цилнидипин, обладающий антигипертензивной и нейропротективной активностью, также показал свою принадлежность к субстратам ABCB1 на культуре эпителиальных клеток почек свиньи (LLC-GA5-COL150 cells), гиперэкспрессирующих белок-транспортер, и на мышах, нокаутированных по гену *MDR1*, кодирующему ABCB1 [30].

Кроме того, большое число лекарственных средств с выявленной нейропротективной активностью (статины [31], ряд флавоноидов [9], антихолинэстеразное средство ривастигмин [7], берберин [32]) не применяются в качестве таковых в связи с тем, что в терапевтической дозе за счёт эффлюкса из головного мозга ABCB1 не достигают нейропротективной концентрации, а при повышении дозы оказывают выраженные системные побочные эффекты.

В нашем исследовании апробировался способ целенаправленного снижения функциональной активности ABCB1 локально в ГЭБ. В качестве тест-системы для анализа

функционирования транспортёра использовались крысы в связи с продемонстрированным 93% сходством спектра субстратов и модуляторов его активности с таковыми у людей [33].

Лекарственным средством с потенциальной ингибирующей активностью по отношению к ABCB1 был выбран блокатор протонной помпы омепразол. Препараты — представители данной фармакологической группы (омепразол, пантопризол, лансопризол) показали ингибирующую активность по отношению к транспортёру на культурах клеток Caco-2 и L-MDR1 с IC<sub>50</sub> 17,7, 17,9 и 62,8 мкМ соответственно, что выявлено по степени транслокации субстрата транспортёра — дигоксина [23, 24].

Эти данные принимались в расчёт при подборе дозы омепразола. Так, при внутривенном введении крысам 3,45 мг/кг вещества максимальная концентрация составляет 3,5 мкМ [25]. С учётом линейности фармакокинетики омепразола при его однократном назначении пациентам [26] (для крыс подобная информация в литературе отсутствует), чтобы получить 17,7 мкМ (IC<sub>50</sub> по отношению к ABCB1 для омепразола), необходимо ввести 17,6 мг/кг. Указанная доза превышает терапевтические значения для человека, что, однако, не исключает ингибирующего потенциала омепразола по отношению к ABCB1 в клинике в более низких концентрациях (это, естественно, требует проверки).

В качестве маркерного субстрата ABCB1 был использован H1-гистаминолитик третьего поколения — ФФ. Данное вещество обладает низкой токсичностью и отсутствием кумуляции, не метаболизируется в организме, а его фармакокинетика, в том числе проникновение в головной мозг, зависит от функционирования белка-транспортёра ABCB1 [34].

В нашем исследовании однократное внутривенное введение омепразола вызывало снижение функциональной ак-

тивности ABCB1 локально в ГЭБ, что проявлялось накоплением маркерного субстрата белка-транспортёра — ФФ в коре головного мозга крыс. Обращает на себя внимание то, что на фоне введения омепразола содержание ФФ в коре головного мозга превышает контрольные значения только через 5 мин после введения последнего, в дальнейшем его фармакокинетика весьма схожа в разных экспериментальных сериях. Вероятной причиной этому служит короткий период полувыведения ингибитора при внутривенном введении крысам (менее 0,3 ч) [35] и невозможность оказывать прямое ингибирующее действие на транспортёр в течение всего срока наблюдения. Указанное ограничение препарата возможно компенсировать, например, созданием его пролонгированной парентеральной лекарственной формы.

Полученные нами результаты создают предпосылки для использования омепразола и его дозы в качестве положительного контроля сниженной функциональной активности ABCB1 в ГЭБ при поиске веществ аналогичного действия *in vivo*, что может служить альтернативой применения нокаутированных по данному транспортёру животных. Кроме того, использование данного подхода возможно при анализе перспективности снижения активности ABCB1 для повышения эффективности фармакотерапии патологий головного мозга, при которых активность транспортёра повышается, например, при церебральной ишемии, опухолях головного мозга или фармакорезистентной эпилепсии. Данная стратегия для увеличения доставки в мозг лекарственных средств в экспериментах успешно развивается зарубежными учёными [36, 37]. После проверки подобной концепции в клинических исследованиях её можно будет рекомендовать к применению в клинической практике.

## Выводы

Разработан и апробирован метод ингибирования активности ABCB1 в ГЭБ.

## Список источников / References

- Linlin S.C., Yan C., Mruc D.D. Drug transporter, P-glycoprotein (MDR1), is an integrated component of the mammalian blood-testis barrier. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 2009; 41(12): 2578–2587. DOI: 10.1016/j.biocel.2009.08.015
- Zhou Q., Ruan Z.R., Yuan H. et al. ABCB1 gene polymorphisms, ABCB1 haplotypes and ABCG2 c.421c > A are determinants of inter-subject variability in rosuvastatin pharmacokinetics. *Pharmazie*. 2013; 68(2): 129–134.
- Гацанова М.В., Черных И.В., Шулькин А.В. и др. Можно ли оценивать принадлежность лекарственных веществ к субстратам гликопротеина-P на самках кроликов породы Шиншилла. *Наука молодых (Eruditio Juvenium)*. 2016; 4(4): 5–10.
- Gatsanoga M.V., Chernykh I.V., Shchulkin A.V. et al. The method of assessment of drugs belonging to the substrates of P-glycoprotein on female rabbits. *Наука молодых (Eruditio Juvenium)*. 2016; 4(4): 5–10.
- Vilas-Boas V., Silva R., Nunes C. et al. Mechanisms of P-gp inhibition and effects on membrane fluidity of a new rifampicin derivative, 1,8-dibenzoyl-rifampicin. *Toxicol. Lett.* 2013; 220(3): 259–266. DOI: 10.1016/j.toxlet.2013.05.005
- Черных И.В., Якушева Е.Н. Влияние экспериментальной подострой гипобарической гипоксической гипоксии на функциональную активность гликопротеина-P. *Российский медико-биологический вестник им. акад. И.П. Павлова*. 2013; 1(1): 60–64.
- Yakusheva E.N., Chernykh I.V. The influence of experimental subacute hypobaric hypoxia on P-glycoprotein functional activity. *Rossiyskiy mediko-biologicheskii vestnik im. akad. I.P. Pavlova*. 2013; 1(1): 60–64.
- Ma A., Wang C., Chen Y. et al. P-glycoprotein alters blood-brain barrier penetration of antiepileptic drugs in rats with medically intractable epilepsy. *Drug Des. Devel. Ther.* 2013; 7: 1447–454. DOI: 10.2147/DDDT.S52533

- Mohamed L.A., Keller J.N., Kaddoumi A. Role of P-glycoprotein in mediating rivastigmine effect on amyloid-β brain load and related pathology in Alzheimer's disease mouse model. *Biochim. Biophys. Acta*. 2016; 1862(4): 778–787. DOI: 10.1016/j.bbadis.2016.01.013
- Lee C., Choi J., Choi D. Effects of pravastatin on the pharmacokinetic parameters of nimodipine after oral and intravenous administration in rats: Possible role of CYP3A4 inhibition by pravastatin. *Ind. J. Pharmacol.* 2012; 44(5): 624–628. DOI: 10.4103/0253-7613.100395
- Youdim K.A., Qaiser M.Z., Begley D.J. et al. Flavonoid permeability across an *in situ* model of the blood-brain barrier. *Free Radic. Biol. Med.* 2004; 36(5): 592–604. DOI: 10.1016/j.freeradbiomed.2003.11.023
- Comerford K.M., Karhausen J., Louis N.A. et al. Hypoxia-inducible Factor-1-dependent Regulation of the Multidrug Resistance (MDR1) Gene. *Cancer Res.* 2002; 62: 3387–3394.
- Cen J., Liu L., Li M.S. et al. Alteration in P-glycoprotein at the blood-brain barrier in the early period of MCAO in rats. *J. Pharm. Pharmacol.* 2013; 65: 665–672. DOI: 10.1111/jphp.12033
- Ding Z.J., Yang L., Xie X. et al. Expression and significance of hypoxia-inducible factor-1 alpha and MDR1/P-glycoprotein in human colon carcinoma tissue and cells. *Cancer Res. Clin. Oncol.* 2010; 136(11): 1697–1707. DOI: 10.1007/s00432-010-0828-5
- Черных И.В., Якушева Е.Н., Шулькин А.В. и др. Экспрессия гликопротеина-P в гематоэнцефалическом барьере при двухсторонней окклюзии общих сонных артерий. *Научные ведомости Белгородского государственного университета*. 2015; 29(4): 91–95.
- Chernykh I.V., Yakusheva E.N., Shchulkin A.V. et al. P-glycoprotein expression in blood-brain barrier in bilateral occlusion of the common carotid artery. *Nauchnyye vedomosti Belgorodskogo gosudarstvennogo universiteta*. 2015; 29(4): 91–95. (In Russ.)



14. Jauch E.C., Saver J.L., Adams H.P. et al. Guidelines for the early management of patients with acute ischemic stroke. A guideline for healthcare professionals from the American Heart Association/American Stroke Association. *Stroke*. 2013; 44(3): 870–947.  
DOI: 10.1161/STR.0b013e318284056a
15. O'Brien F.E., Dinan T.G., Griffin B.T. et al. Interactions between anti-depressants and P-glycoprotein at the blood–brain barrier: clinical significance of *in vitro* and *in vivo* findings. *Br. J. Pharmacol.* 2012; 165(2): 289–312.  
DOI: 10.1111/j.1476-5381.2011.01557.x
16. Yang Z., Vakkalagadda B., Shen G. et al. Inhibitory effect of ketoconazole on the pharmacokinetics of a multireceptor tyrosine kinase inhibitor BMS-690514 in healthy participants: assessing the mechanism of the interaction with physiologically-based pharmacokinetic simulations. *J. Clin. Pharmacol.* 2013; 2: 217–227.  
DOI: 10.1177/0091270012439208
17. Thai K.M., Huynh N.T., Ngo T.D. et al. Three- and four-class classification models for P-glycoprotein inhibitors using counter-propagation neural networks. *SAR QSAR Environ Res.* 2015; 2: 139–63.  
DOI: 10.1080/1062936X.2014.995701
18. Salargio I.C., Abate C., Rolando B. et al. Validation of thiosemicarbazone compounds as P-Glycoprotein inhibitors in human primary brain–blood barrier and glioblastoma stem cells. *Mol. Pharmaceutics*. 2019; 16(8): 3361–3373.  
DOI: 10.1021/acs.molpharmaceut.9b00018
19. Zhou Y.-G., Li K.-Y., Li H.-D. Effect of the novel antipsychotic drug perospirone on P-glycoprotein function and expression in Caco-2 cells. *Eur. J. Clin. Pharmacol.* 2008; 64(7): 697–703.  
DOI: 10.1007/s00228-008-0487-5
20. Riganti C., Salargio I.C., Pinzón-Daza M.L. et al. Temozolomide down-regulates P-glycoprotein in human blood-brain barrier cells by disrupting Wnt3 signaling. *Cell Mol. Life Sci.* 2014; 71(3): 499–516.  
DOI: 10.1007/s00018-013-1397-y
21. Bauer M., Karch R., Zeitlinger M. et al. Approaching complete inhibition of P-glycoprotein at the human blood-brain barrier: an (R)-<sup>11</sup>C]verapamil PET study. *Clin. Trial J. Cereb. Blood Flow Metab.* 2015; 35(5): 743–746.  
DOI: 10.1038/jcbfm.2015.19
22. Liu L., Collier A.C., Link J.M. et al. Modulation of P-glycoprotein at the human blood-brain barrier by quinidine or rifampin treatment: a positron emission tomography imaging study. *Drug Metab. Dispos.* 2015; 4(11): 1795–1804.  
DOI: 10.1124/dmd.114.058685
23. Pauli-Magnus C., Rekersbrink S., Klotz U. et al. Interaction of omeprazole, lansoprazole and pantoprazole with P-glycoprotein. *Naunyn Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.* 2001; 364(6): 551–557.  
DOI: 10.1007/s00210-001-0489-7
24. Yasar S., Zafar I., Lateef A. et al. Effect of omeprazole on the pharmacokinetics of rosuvastatin in healthy male volunteers. *Am. J. Therapeutics.* 2016; 23(6): 1514–1523.  
DOI: 10.1097/MJT.0000000000000221
25. Regardh C.J., Gabrielsson M., Hoffman K.J. et al. Pharmacokinetics and metabolism of omeprazole in animals and man – an overview. *Scand. J. Gastroenterol.* 1985; 108: 79–94.  
DOI: 10.3109/00365528509095821
26. Andersson T., Cederberg C., Heggelund A. et al. The pharmacokinetics of single and repeated once-daily doses of 10, 20 and 40 mg omeprazole as enteric-coated granules. *Drug Invest.* 1991; 3(1): 45–52.
27. Черных И.В., Шулькин А.В., Мыльников П.Ю. и др. Методика анализа функциональной активности ABCB1-белка в гематоэнцефалическом барьере. В сб.: Биология в высшей школе: актуальные вопросы науки, образования и междисциплинарной интеграции. Материалы Всероссийской научной конференции с международным участием. Рязань; 2019: 98–100.
- Chernykh I.V., Shchulkin A.V., Mylnikov P.Yu. et al. Method of analysis of the functional activity of the ABCB1 protein in the blood-brain barrier. In: *Biology in higher education: topical issues of science, education and interdisciplinary integration. Materials of the All-Russian scientific conference with international participation.* Ryazan; 2019: 98–100. (In Russ.)
28. Lee C., Choi J., Choi D. Effects of pravastatin on the pharmacokinetic parameters of nimodipine after oral and intravenous administration in rats: Possible role of CYP3A4 inhibition by pravastatin. *Ind. J. Pharmacol.* 2012; 44(5): 624–628.  
DOI: 10.4103/0253-7613.100395
29. Jha N.K., Kar R., Niranjan R. ABC transporters in neurological disorders: an important gateway for botanical compounds mediated neuro-therapeutics. *Curr. Top. Med. Chem.* 2019; 19(10): 795–798.  
DOI: 10.2174/1568026619666190412121811
30. Yano K., Takimoto S., Motegi T. et al. Role of P-glycoprotein in regulating cilnidipine distribution to intact and ischemic brain. *Drug Metab. Pharmacokin.* 2014; 29(3): 254–258.  
DOI: 10.2133/dmpk.dmpk-13-rg-072
31. Rehakova R., Cebova M., Matuskova Z. Brain cholesterol and the role of statins in neuroprotection. *Act. Nerv. Super Rediviva.* 2016; 58(1): 11–17.
32. Kumar A., Ekavali M., Mishra J. et al. Possible role of P-glycoprotein in the neuroprotective mechanism of berberine in intracerebroventricular streptozotocin-induced cognitive dysfunction. *Psychopharmacology (Berl)*. 2016; 233(1): 137–152.  
DOI: 10.1007/s00213-015-4095-7
33. Feng B., Mills J.B., Davidson R.E. et al. In vitro P-glycoprotein assays to predict the in vivo interactions of P-glycoprotein with drugs in the central nervous system. *Drug Metab. Dispos.* 2008; 36: 268–275.  
DOI: 10.1124/dmd.107.017434
34. Якушева Е.Н., Сычев Д.А., Шулькин А.В. и др. Оценка принадлежности лекарственных препаратов к ингибиторам и индукторам белка-транспортера гликопротеина-P в эксперименте *in vivo*. *Экспериментальная и клиническая фармакология.* 2018; 81(1): 17–23.
- Yakusheva E.N., Sychev D.A., Shchul'kin A.V. et al. In vivo assessment of drugs belonging to inhibitors and inducers of p-glycoprotein. *Ekspierimental'naya i klinicheskaya farmakologiya.* 2018; 81(1): 17–23. (In Russ.)
35. Watanabe K., Furuno K., Eto K. et al. First-pass metabolism of omeprazole in rats. *J. Pharm. Sci.* 1994; 83(8): 1131–1134.  
DOI: 10.1002/jps.2600830812
36. Tournier N., Goutal S., Auvity S. et al. Strategies to inhibit ABCB1- and ABCG2-mediated efflux transport of erlotinib at the blood-brain barrier: a PET study on nonhuman primates. *J. Nucl. Med.* 2017; 58(1): 117–122.  
DOI: 10.2967/jnumed.116.178665
37. Damont A., Goutal S., Auvity S. et al. Imaging the impact of cyclosporin A and dipyrindamole on P-glycoprotein (ABCB1) function at the blood-brain barrier: a [<sup>11</sup>C]-N-desmethyl-loperamide PET study in nonhuman primates. *Eur. J. Pharm. Sci.* 2016; 91: 98–104.  
DOI: 10.1016/j.ejps.2016.06.005

## Информация об авторах

Черных Иван Владимирович — к.б.н., зав. каф. фармацевтической химии ФГБОУ ВО РязГМУ, Рязань, Россия, <https://orcid.org/0000-0002-5618-7607>

Шулькин Алексей Владимирович — д.м.н., доцент, профессор каф. фармакологии ФГБОУ ВО РязГМУ, Рязань, Россия, <https://orcid.org/0000-0003-1688-0017>

Мыльников Павел Юрьевич — ассистент каф. фармакологии ФГБОУ ВО РязГМУ, Рязань, Россия, <https://orcid.org/0000-0001-7829-2494>

Кириченко Екатерина Евгеньевна — к.б.н., доцент, доцент каф. фармацевтической химии ФГБОУ ВО РязГМУ, Рязань, Россия, <https://orcid.org/0000-0003-3511-7033>

Гаданого Мария Валерьевна — к.м.н., ассистент каф. фармакологии ФГБОУ ВО РязГМУ, Рязань, Россия, <https://orcid.org/0000-0002-1116-6271>

Якушева Елена Николаевна — д.м.н., профессор, зав. каф. фармакологии ФГБОУ ВО РязГМУ, Рязань, Россия, <https://orcid.org/0000-0001-6887-4888>

**Вклад авторов.** Все соавторы внесли существенный вклад в разработку концепции, проведение исследования и подготовку статьи, прочли и одобрили финальную версию перед публикацией.

## Information about the authors

Ivan V. Chernykh — Cand. Sci. (Biol), Head, Department of pharmaceutical chemistry, Ryazan State Medical University, Ryazan, Russia, <https://orcid.org/0000-0002-5618-7607>

Alexey V. Shchulkin — D. Sci. (Med), Associated Professor, Professor, Department of pharmacology, Ryazan State Medical University, Ryazan, Russia, <https://orcid.org/0000-0003-1688-0017>

Pavel Yu. Mylnikov — Assistant, Department of pharmacology, Ryazan State Medical University, Ryazan, Russia, <https://orcid.org/0000-0001-7829-2494>

Ekaterina E. Kirichenko — Cand. Sci. (Biol.), Associated Professor, Department of pharmaceutical chemistry, Ryazan State Medical University, Ryazan, Russia, <https://orcid.org/0000-0003-3511-7033>

Maria V. Gatsanoga — Cand. Sci. (Med), Assistant, Department of pharmacology, Ryazan State Medical University, Ryazan, Russia, <https://orcid.org/0000-0002-1116-6271>

Elena N. Yakusheva — D. Sci. (Med), Professor, Head, Department of pharmacology, Ryazan State Medical University, Ryazan, Russia, <https://orcid.org/0000-0001-6887-4888>

**Author contribution.** All authors made a substantial contribution to the conception of the work, acquisition, analysis, interpretation of data for the work, drafting and revising the work, final approval of the version to be published.