

УДК 615.322:547.458]015.42

ВЛИЯНИЕ ПОЛИСАХАРИДНЫХ КОМПЛЕКСОВ РАСТЕНИЙ СРЕДНЕЙ ПОЛОСЫ РОССИИ НА АКТИВНОСТЬ БЕЛКА-ТРАНСПОРТЕРА ГЛИКОПРОТЕИНА-P *IN VITRO*

© *И.В. Черных*, А.В. Шулькин, Е.Е. Кириченко, С.К. Правкин, Е.Н. Якушева*

*Рязанский государственный медицинский университет имени академика И.П. Павлова, ул. Высоковольтная, 9, Рязань, 390026 (Россия),
e-mail: ivchernykh88@mail.ru*

Цель исследования – изучение влияния полисахаридных комплексов цветков пижмы обыкновенной (*Tanacetum vulgare* L., сем. *Asteraceae*) и травы донника лекарственного (*Melilotus officinalis* L., сем. *Fabaceae*) на активность гликопротеина-P (Pgp, ABCB1-белка) *in vitro*.

На культуре клеточной линии Сасо-2 изучено влияние полисахаридных комплексов, выделенных из цветков пижмы обыкновенной и травы донника лекарственного на активность Pgp. Активность Pgp *in vitro* оценивали по транспорту его маркерного субстрата – фексофенадина в трансвелл-системе. Для определения содержания фексофенадина в транспортной среде применяли метод высокоэффективной жидкостной хроматографии с УФ-детектированием при длине волны 220 нм.

Выявлено, что при добавлении в транспортную среду полисахарида, выделенного из цветков пижмы обыкновенной, в концентрациях 10 и 100 мкМ отмечалось снижение отношения коэффициентов кажущейся проницаемости фексофенадина *b-a/a-b* в 1.81 и 2.65 раза соответственно по сравнению с серией изолированного транспорта фексофенадина, что свидетельствует о снижении функциональной активности Pgp под действием полисахарида. Полисахаридный комплекс травы донника лекарственного не изменял отношение *b-a/a-b* ни в одной из примененных концентраций, то есть не оказывал влияния на активность данного белка-транспортера. Таким образом, целесообразно продолжить исследование полисахарида цветков пижмы обыкновенной в качестве ингибитора белка-транспортера Pgp с целью возможного применения в клинической практике для лечения фармакорезистентных форм онкологических заболеваний за счет преодоления феномена множественной лекарственной устойчивости клеток.

Ключевые слова: гликопротеин-P, ABCB1-белок, ингибиторы, полисахариды растительного происхождения, пижма обыкновенная, донник лекарственный, линия клеток Сасо-2.

Исследование поддержано грантом Российского фонда фундаментальных исследований №18-315-00159 мол.а.

Введение

В настоящее время одним из актуальных направлений фармакологической науки является поиск и изучение новых источников получения лекарственных веществ, в том числе растительного сырья. Лекар-

Черных Иван Владимирович – кандидат биологических наук, заведующий кафедрой фармацевтической химии, e-mail: ivchernykh88@mail.ru

Шулькин Алексей Владимирович – кандидат медицинских наук, доцент, доцент кафедры фармакологии с курсом фармации, e-mail: alekseishulkin@rambler.ru

Кириченко Екатерина Евгеньевна – кандидат биологических наук, доцент кафедры фармацевтической химии, e-mail: ekaterinakir2013@yandex.ru

Правкин Сергей Константинович – кандидат медицинских наук, доцент кафедры фармакологии с курсом фармации, e-mail: psc0@mail.ru

Якушева Елена Николаевна – доктор медицинских наук, профессор, заведующая кафедрой фармакологии с курсом фармации, e-mail: e.yakusheva@rzgmu.ru

ственные средства растительного происхождения обладают рядом преимуществ, такими как разно-сторонняя фармакологическая активность, большая широта терапевтического действия, относительная безопасность, низкая частота развития ал-лергических реакций [1, 2].

Гликопротеин-P (Pgp, ABCB1-белок) функционирует как АТФ-зависимый мембранный эф-флюксный белок-транспортер, который экспрес-сируется во многих органах, тканях и барьерах, за-щищая организм от потенциально токсичных ксе-

* Автор, с которым следует вести переписку.

нобиотиков, их метаболитов и эндогенных веществ липофильной природы. Также данный белок-транспортер участвует в формировании феномена фармакорезистентности, играя ключевую роль в развитии множественной лекарственной устойчивости опухолевых клеток к проводимой химиотерапии [3–5]. Обладая широкой субстратной специфичностью, Pgp осуществляет удаление из клеток большого спектра веществ, в том числе цитостатиков, делая внутриклеточные мишени недоступными для лекарственных препаратов, а опухолевую ткань – невосприимчивой к фармакотерапии (фармакорезистентной) [2]. Таким образом, ингибирование Pgp позволяет увеличить эффективность лекарственного лечения за счет повышения проникновения лекарственных веществ внутрь клеток-мишеней.

В эксперименте и клинике предпринимались попытки ингибирования Pgp синтетическими лекарственными средствами, применяемыми в медицинской практике (например, антиаритмическим препаратом – верапамилом) [6], а также синтеза новых ингибиторов белка-транспортера на основе модификации химической структуры известных веществ. Однако использование новых синтетических ингибиторов Pgp, в том числе селективных, приводило к манифестации их побочных эффектов, которые усугубляли нежелательные лекарственные реакции, наблюдаемые вследствие фармакотерапии основного заболевания [7]. Также следует отметить высокую стоимость вновь синтезированных селективных ингибиторов белка-транспортера (например, тариквидара).

Несмотря на разностороннюю фармакологическую активность и относительную безопасность растительных лекарственных препаратов, ни один из них не был предложен к использованию в качестве ингибитора Pgp. Перспективными биологически активными веществами растительного происхождения считаются полисахариды. Они являются биосовместимыми, биоразлагаемыми и обладают незначительной аллергенностью [2]. Полисахариды растительного происхождения могут быть подвергнуты разнообразным химическим модификациям для придания их химической структуре особенностей, характерных для известных ингибиторов Pgp [8, 9]. Среди растений, являющихся источниками полисахаридов, были выбраны широко представленные в средней полосе России пижма обыкновенная (*Tanacetum vulgare* L., сем. *Asteraceae*) и донник лекарственный (*Melilotus officinalis* L., сем. *Fabaceae*). Оба растения официальные, имеют сложный химический состав, представленный в основном фенольными соединениями, флавоноидами, кумаринами. Ни в одном из вышеуказанных растений полисахариды не рассматриваются как основные биологически активные вещества, несмотря на их высокое содержание и потенциальную фармакологическую, в том числе антиоксидантную, активность [1, 2]. Важно подчеркнуть экономическую доступность сырья, из которого могут быть получены полисахариды.

Цель исследования – изучить влияние полисахаридных комплексов цветков пижмы обыкновенной (*Tanacetum vulgare* L., сем. *Asteraceae*) и травы донника лекарственного (*Melilotus officinalis* L., сем. *Fabaceae*) на активность Pgp *in vitro*.

Экспериментальная химическая часть

Полисахариды экстрагировали из воздушно-сухого сырья цветков пижмы обыкновенной («Фитофарм», Россия) и донника лекарственного («Лекра-СЭТ», Россия) 0.1%-ным раствором аммония оксалата и водой очищенной соответственно. Проводили обработку полученных комплексов по ранее описанной методике [10] с последующим кислотным гидролизом полисахаридного комплекса цветков пижмы 0.1 М раствором кислоты серной путем кипячения в течение 3 ч с обратным холодильником для уменьшения его молекулярной массы. Молекулярную массу полученных полисахаридов определяли вискозиметрически. Готовили серию растворов полисахарида цветков пижмы обыкновенной и полисахарида травы донника лекарственного, измеряли время их истечения из вискозиметра Оствальда с диаметром капилляра 0.54 см. Рассчитывали удельную вязкость каждого раствора по формуле

$$\eta_{уд} = \frac{t_{раствора} - t_{H_2O}}{t_{H_2O}}$$

где $\eta_{уд}$ – удельная вязкость раствора, $t_{раствора}$ – время истечения раствора из вискозиметра, t_{H_2O} – время истечения воды очищенной из вискозиметра.

Далее рассчитывали приведенную вязкость $\eta_{уд}/C$. По полученным данным строили график зависимости приведенной вязкости от концентрации раствора и экстраполировали его к $C = 0$, таким образом, рассчитав характеристическую вязкость $[\eta]$.

Для расчета молекулярной массы использовали нелинейное уравнение Марка-Хувинка

$$[\eta] = K \times M^\alpha,$$

где K и α – константы для данной системы полимер-растворитель при температуре 20 °С ($K = 1.1 \cdot 10^{-5}$, $\alpha = 1.22$), а M – молекулярная масса.

Константы $K = 1.1 \cdot 10^{-5}$ дл/г, $\alpha = 1.22$ являются общепринятыми для полисахаридов пектинового ряда [11].

УФ-спектры 0.5%-ных водных растворов полисахаридных комплексов цветков пижмы обыкновенной и полисахарида донника лекарственного снимали на спектрофотометре ПЭ-5400УФ (Россия), ИК-спектры исследуемых веществ – на Фурье-спектрометре инфракрасном ФСМ-2201 (Россия) в диске с КВг. Оптическому анализу подвергались 5 образцов полисахаридных комплексов, полученных в разное время и из разных партий растительного сырья с последующим усреднением данных.

Стандартизация полисахаридов осуществлялась алкалиметрически по количеству свободных карбоксильных групп и спектрофотометрически по содержанию восстанавливающих моносахаридов (в пересчете на глюкозу) после полного кислотного гидролиза веществ по реакции с пикриновой кислотой [10]. Данная реакция является стехиометрической, чувствительность ее составляет 0.03 мг/л в пересчете на глюкозу и является более точной и быстрой по сравнению с фармакопейным гравиметрическим методом [12].

Экспериментальная биологическая часть

Исследование влияния полисахаридных комплексов растений на активность Pgp проведено на линии клеток аденокарциномы ободочной кишки человека (Caco-2), которые гиперэкспрессируют данный белок-транспортер. Культура клеток была получена в ФГБУН ИНЦ РАН, Санкт-Петербург.

Условия культивирования клеток описаны нами ранее [13]. Эксперименты проводились в трансвелл-системе (рис. 1).

Активность Pgp оценивали по транспорту маркерного субстрата транспортера – фексофенадина в трансвелл-системе. Для анализа исходной активности Pgp изучали изолированный транспорт фексофенадина («Sigma», США) в концентрации 150 мкМ из апикальной камеры в базолатеральную (a - b транспорт за счет пассивной диффузии против работы транспортера) и в обратном направлении (b - a транспорт за счет пассивной диффузии и эффлюксной активности транспортера) (контрольная серия) [14]. Для этого фексофенадин добавляли в камеру-донор, а через 1, 2 и 3 ч забирали по 50 мкл образцов среды из камеры-реципиента для определения концентрации маркерного субстрата транспортера методом ВЭЖХ с УФ-детектированием при 220 нм.

Транспорт фексофенадина оценивали по формуле [15]

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

где P_{app} – коэффициент кажущейся проницаемости, dQ/dt – изменение концентрации субстрата в камере-реципиенте за время инкубации, A – площадь полупроницаемой мембраны, C_0 – начальная концентрация субстрата в камере-доноре.

Затем рассчитывали отношение коэффициентов кажущейся проницаемости: b - a к a - b , которое характеризует значимость Pgp для транспорта фексофенадина через билипидную мембрану. Отношение b - a/a - b больше 2 указывает на принадлежность изучаемого вещества к субстратам Pgp.

Далее оценивали транспорт маркерного субстрата Pgp с добавлением одновременно в апикальную и базолатеральную камеры классического ингибитора Pgp – хинидина («Sigma», США) в концентрациях 1, 10 и 100 мкМ [16] с преинкубацией в течение 30 мин. Далее исследовали транспорт фексофенадина в присутствии полисахаридных комплексов цветков пижмы обыкновенной и травы донника лекарственного в аналогичных концентрациях.

Каждая экспериментальная серия включала 3 анализа.

Концентрацию фексофенадина в транспортной среде определяли методом ВЭЖХ с УФ-детектированием при длине волны 220 нм на хроматографе «Стайер» (Россия) по описанной ранее методике [13].

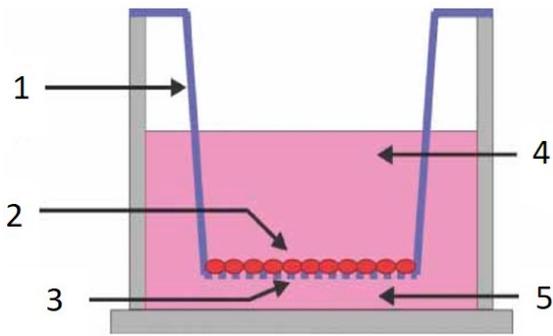


Рис. 1. Схематическое изображение трансвелл-системы: 1 – вставочная лунка; 2 – монослой клеток; 3 – полупроницаемая мембрана; 4 – апикальная мембрана; 5 – базолатеральная мембрана

Статистическую обработку результатов, полученных в ходе химических исследований, проводили согласно требованиям Государственной фармакопеи XIV издания, результатов опытов *in vitro* – в программе StatsoftStatistica 7.0. Для оценки статистической значимости различий использовался критерий Крускала-Уоллиса, попарные сравнения выполнялись с помощью критерия Манна-Уитни с поправкой Бонферрони. Данные в таблицах представлены в виде медианы, нижнего и верхнего квартилей. Достоверными считались различия при уровне значимости менее 0.05.

Обсуждение результатов

Полученные полисахариды представляют собой порошки светло-бежевого цвета. Молекулярная масса гидролизата полисахарида цветков пижмы обыкновенной составляет 3.8 кДа, полисахарида травы донника лекарственного – 4.0 кДа.

УФ-спектр полисахарида цветков пижмы имеет максимум поглощения при длине волны 310 нм, полисахарида травы донника – при 296 нм. ИК-спектры исследуемых полисахаридов представлены на рисунках 2 и 3.

Полученные УФ-спектры и ИК-спектры свидетельствуют о различной химической структуре полученных полисахаридных комплексов и целесообразности исследования влияния обоих веществ на активность белка-транспортера Pgp.

Результаты исследования транспорта фексофенадина приведены в таблице. Значение отношения коэффициентов $b-a$ и $a-b$ составляет 4.37 (3.50, 4.52), что превышает 2 и подтверждает принадлежность фексофенадина к субстратам Pgp, то есть изменение скорости его трансмембранного переноса может характеризовать активность данного белка-транспортера [15].

Классический ингибитор Pgp – хинидин, в концентрациях 1 и 10 мкМ, достоверно не влиял на коэффициенты кажущейся проницаемости фексофенадина $b-a$ и $a-b$ и их отношение по сравнению с контрольными значениями, а в концентрации 100 мкМ снижал коэффициент $b-a$ в 2.24 раза ($p < 0.05$), при этом коэффициент $a-b$ статистически значимо не изменялся, а отношение коэффициентов снижалось в 3.5 раза ($p < 0.05$) относительно значений серии изолированного транспорта фексофенадина (табл.). Полученные результаты свидетельствуют об угнетении транспорта фексофенадина из базолатеральной камеры в апикальную вследствие снижения активности Pgp, что подтверждает способность хинидина ингибировать данный белок-транспортер.

Полисахарид, выделенный из цветков пижмы обыкновенной, в концентрации 1 мкМ не влиял на коэффициенты кажущейся проницаемости фексофенадина $b-a$ и $a-b$ и их отношение по сравнению со значениями серии контроля. В концентрации 10 мкМ данный полисахаридный комплекс снижал коэффициент $b-a$ в 1.34 раза ($p < 0.05$), повышал коэффициент $a-b$ в 1,21 раза ($p < 0.05$) и снижал отношение коэффициентов $b-a/a-b$ в 1.81 раза ($p < 0.05$) по сравнению с серией изолированного транспорта фексофенадина. В концентрации 100 мкМ тестируемое вещество снижало коэффициент кажущейся проницаемости $b-a$ в 2.02 раза ($p < 0.05$), повышало коэффициент $a-b$ в 1.22 раза ($p < 0.05$), а отношение коэффициентов $b-a/a-b$ было ниже контроля в 2.65 раза ($p < 0.05$). Полученные результаты свидетельствуют о снижении функциональной активности Pgp под влиянием полисахаридного комплекса цветков пижмы обыкновенной.

Полисахаридный комплекс травы донника лекарственного не проявлял ингибирующей активности по отношению к Pgp ни в одной из исследуемых концентраций: коэффициенты кажущейся проницаемости фексофенадина $b-a$ и $a-b$ и их отношение достоверно не изменялись по сравнению с контролем.

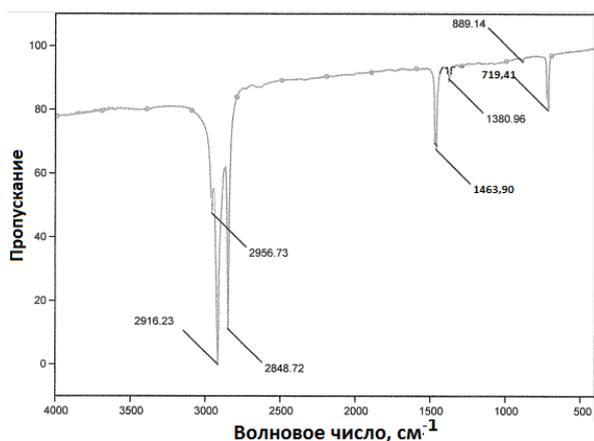


Рис. 2. ИК-спектр гидролизата полисахаридного комплекса цветков пижмы обыкновенной

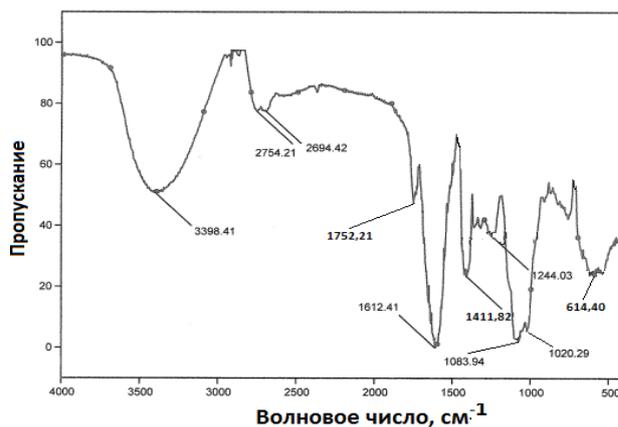


Рис. 3. ИК-спектр полисахаридного комплекса травы донника лекарственного

Транспорт фексофенадина (150 мкМ) через мембрану клеток линии Сасо-2 (данные представлены в виде медианы, нижнего и верхнего квартилей), $n = 3$

Серия эксперимента	Рapp $b-a$ ($\cdot 10^{-6}$), см/сек	Рapp $a-b$ ($\cdot 10^{-6}$), см/сек	Рapp $b-a$ /Рapp $a-b$
Контроль	3.59 (3.42, 3.60)	0.92 (0.44, 1.03)	4.37 (3.50, 4.52)
Хинидин 1 мкМ	3.93 (3.80, 4.11)	0.83 (0.82, 1.3)	4.78 (2.92, 4.95)
Хинидин 10мкМ	3.12 (2.99, 3.44)	0.91 (0.68, 1.28)	3.42 (3.69, 4.40)
Хинидин 100мкМ	1.6 (1.55, 1.77)*	1.3 (0.69, 1.43)	1.23 (1.08, 2.55)*
Полисахарид пижмы, 1 мкМ	4.8 (2.00, 5.19)	0.5 (0.44, 0.80)	6.49 (4.51, 9.58)
Полисахарид пижмы, 10 мкМ	2.67 (2.01, 3.26)*	1.11 (1.04, 1.21)*	2.42 (1.93, 2.69)*
Полисахарид пижмы, 100 мкМ	1.78 (1.29, 2.76)*	1.12 (1.08, 1.14)*	1.65 (1.13, 2.46)*
Полисахарид донника, 1 мкМ	3.43 (2.99, 3.43)	0.96 (0.13, 0.80)	3.58 (2.67, 3.76)
Полисахарид донника, 10 мкМ	4.25 (3.37, 4.50)	0.75 (0.75, 0.76)	5.66 (4.52, 5.96)
Полисахарид донника, 100 мкМ	3.62 (3.56, 4.29)	1.14 (0.86, 1.39)	3.74 (2.61, 4.13)

Примечание: * – $p < 0.05$ – достоверные различия по сравнению с показателями контроля.

При сравнении коэффициентов кажущейся проницаемости фексофенадина $b-a$ и $a-b$ и их отношения на фоне добавления хинидина и полисахаридных комплексов цветков пижмы и травы донника лекарственного обыкновенной достоверных различий не выявлено ($p > 0.05$).

Наиболее перспективными растительными лекарственными препаратами являются индивидуальные вещества из различных классов химических соединений: алкалоиды (атропин, кодеин, пилокарпин), гликозиды (дигоксин, ланатозид Ц), флавоноиды (рутин, кверцетин) и др. В клинической практике полисахариды применяются, как правило, в виде галеновых препаратов, однако в настоящее время проводится изучение некрахмальных полисахаридов высших растений и водорослей для получения эффективных лекарственных средств на основе индивидуальных веществ [17, 18].

В ряде работ показана принадлежность некоторых поли- и олигосахаридов к модуляторам активности Рgr. Так, гепарин – отрицательно заряженный сульфатированный полисахарид – может повышать проникновение в клетки химиопрепаратов, являющихся субстратами Рgr за счет ингибирования функциональной активности транспортера [19]. Олигомеры гиалуроновой кислоты повышали накопление субстрата Рgr доксорубина в культуре опухолевых клеток, а также увеличивали цитотоксичность химиопрепарата *in vivo* [20]. Обработка культуры клеток модифицированным циклодекстрином повышала проницаемость клеточных мембран в обоих направлениях и снижала активность Рgr, вероятно, за счет изменения микроокружения транспортера в мембране (в первую очередь, уровня холестерина) [21]. Также установлено, что некоторые смолистые гликозиды из семян ипомеи белой (*Ipomoea alba*) увеличивали восприимчивость культуры клеток рака груди человека к субстрату Рgr винбластину [22].

Среди растений, являющихся источниками полисахаридов, нами были выбраны пижма обыкновенная (*Tanacetum vulgare* L., сем. *Asteraceae*) и донник лекарственный (*Melilotus officinalis* L., сем. *Fabaceae*), широко представленные в средней полосе Российской Федерации. Данные растения являются официальными, входят в раздел «Лекарственное растительное сырье» (Государственная фармакопея XIV издания, том IV: ФС.2.5.0031.15 «Пижмы обыкновенной цветки», ФС.2.5.0011.15 «Донника трава»).

Пижма обыкновенная – многолетнее дикорастущее травянистое растение, используемое в клинической практике как желчегонное и антигельминтное средство. В России в качестве лекарственных препаратов применяют сухой экстракт цветков пижмы обыкновенной (Танацехол) и желчегонный сбор №3, а также настой из цветков пижмы. В состав цветков пижмы обыкновенной входят такие биологически активные вещества, как флавоноиды, эфирные масла, гидроксикоричные кислоты, дубильные вещества, полисахариды. Желчегонное действие растения обусловлено присутствием флавоноидов [23]. Полисахаридный комплекс цветков пижмы обыкновенной является малотоксичным соединением (III класс токсичности). В эксперименте установлено его гастропротекторное, противовоспалительное, гепатопротекторное и антиоксидантное действие [24].

Донник лекарственный – это двулетнее или многолетнее травянистое растение, широко распространенное на европейской части России, в Западной и Восточной Сибири и на Дальнем Востоке. На сегодняшний день трава донника входит в государственный реестр лекарственных средств в состав успокоительного сбора №3, настойки Седофлор (седативное средство растительного происхождения) и геля Гербион Эскулюс (венотонизирующее средство растительного происхождения). Трава донника содержит комплекс биологически активных веществ фенольной природы (кумарины, флавоноиды и производные фенолкарбоновых кислот) [25], жироподобные вещества и полисахариды [26].

Несмотря на значительное содержание и потенциально высокую биологическую активность, ни в одном из изученных нами растений полисахариды не считаются основными биологически активными веществами. Поэтому учитывая безопасность изучаемого класса соединений, с большой вероятностью можно утверждать, что они не приведут к развитию нежелательных лекарственных реакций. Более того, комбинирование противоопухолевых средств с растительными полисахаридами, обладающими антиоксидантными, гастропротекторными и гепатопротекторными свойствами, возможно, будет способствовать снижению органотоксичности химиопрепаратов.

В нашей работе обнаружено, что полисахаридный комплекс пижмы обыкновенной снижал активность Pgp *in vitro*, а у полисахаридного комплекса, выделенного из донника лекарственного, подобной активности выявлено не было.

Научные исследования показали, что большинство ингибиторов Pgp являются липофильными соединениями с атомом азота и ароматическими, карбо- или гетероциклическими фрагментами в составе молекулы [9]. Также они способны формировать водородные связи и являются донорами высокоэлектроотрицательных атомов для образования водородных связей с молекулой транспортера [27]. Полисахариды цветков пижмы обыкновенной принадлежат к числу пектиновых веществ и по химической структуре более чем на 60% состоят из моносахаридных звеньев уроновых кислот [28], а значит, обладают потенциальной возможностью формировать водородные связи и ингибировать Pgp. Содержание уроновых кислот в составе полисахарида донника лекарственного по литературным данным составляет порядка 0.37% в пересчете на массу лекарственного растительного сырья с максимальным содержанием арабинозы и галактозы [29], что объясняет отсутствие ингибирующего влияния полисахаридного комплекса травы донника лекарственного на Pgp.

В полученных нами ИК-спектрах полисахаридных комплексов травы донника лекарственного и цветков пижмы обыкновенной наблюдаются широкие интенсивные асимметричные полосы в районе 3400 см^{-1} , свидетельствующие о валентных (симметричных и несимметричных) колебаниях гидроксильной группы, в том числе о наличии связанных молекул воды и водородных связей. Причем у полисахарида пижмы эта полоса явно превалирует, что дает ему возможность формировать большее число водородных связей, обуславливающих, возможно, ингибирующую активность по отношению к Pgp. Интенсивные полосы в обоих спектрах в районе $1600\text{--}1750\text{ см}^{-1}$ подтверждают наличие большого количества свободных карбоксильных групп, а в области 1240 см^{-1} – колебания C-O связи в сложноэфирных группах. Полосы при $1010\text{--}1020\text{ см}^{-1}$ и $1084\text{--}1105\text{ см}^{-1}$ в представленных спектрах говорят о наличии пиранозных циклов. В ИК-спектре полисахарида пижмы обыкновенной проявляется также полоса при 2930 см^{-1} , подтверждающая наличие метоксильных группировок. Интенсивная полоса при 1412 см^{-1} в спектре полисахарида донника и отсутствующая в спектре вещества пижмы свидетельствует об ионизированном карбоксиле. Полученные нами ИК-спектры несмотря на кажущееся сходство подтверждают большую гидрофильность полисахаридного комплекса травы донника лекарственного по сравнению с полисахаридом цветков пижмы обыкновенной, что, видимо, снижает его способность взаимодействовать с молекулой Pgp и ингибировать активность транспортера.

Таким образом, целесообразно продолжить исследование полисахаридного комплекса цветков пижмы обыкновенной (*Tanacetum vulgare* L., сем. *Asteraceae*) в качестве ингибитора белка-транспортера Pgp с целью возможного применения в клинической практике для лечения фармакорезистентных форм онкологических заболеваний за счет преодоления феномена множественной лекарственной устойчивости клеток.

Список литературы

1. Криштанова Н.А., Сафонова М.Ю., Болотова В.Ц., Павлова Е.Д., Саканян Е.И. Перспективы использования растительных полисахаридов в качестве лечебных и лечебно-профилактических средств // Вестник ВГУ. Серия: Химия. Биология. Фармация. 2005. №1. С. 212–221.
2. Черных И.В., Кириченко Е.Е., Шулькин А.В., Попова Н.М., Котлярова А.А., Якушева Е.Н. Возможности применения некрахмальных полисахаридов растительного происхождения в клинической практике // Росс. мед.-биол. вестн. им. акад. И.П. Павлова. 2018. Т. 26. №2. С. 305–316.
3. Chen Y., Zhang K., Li Y., Guo R., Zhang K., Zhong G., He Q. Oestrogen-related receptor alpha mediates chemotherapy resistance of osteosarcoma cells via regulation of ABCB1 // J. Cell Mol. Med. 2019. Vol. 23(3). Pp. 2115–2124. DOI: 10.1111/jcmm.14123.
4. Mollazadeh S., Sahebkar A., Hadizadeh F., Behravan J., Arabzadeh S. Structural and functional aspects of P-glycoprotein and its inhibitors // Life Sci. 2018. Vol. 214. Pp. 118–123. DOI: 10.1016/j.lfs.2018.10.048.
5. O'Connor R., Ooi M.G., Meiller J., Jakubikova J., Klippel S., Delmore J., Richardson P., Anderson K., Clynes M., Mitsiades C.S., O'Gorman P. The interaction of bortezomib with multidrug transporters: implications for therapeutic applications in advanced multiple myeloma and other neoplasias // Cancer Chemother. Pharmacol. 2013. Vol. 71. N5. Pp. 1357–1368.
6. Dalton W.S., Grogan T.M., Meltzer P.S., Scheper R.J., Durie B.G., Taylor C.W., Miller T.P., Salmon S.E. Drug-resistance in multiple myeloma and non-Hodgkin's lymphoma: detection of P-glycoprotein and potential circumvention by addition of verapamil to chemotherapy // J. of clinical oncology. 1989. N7(4). Pp. 415–424. DOI: 10.1200/JCO.1989.7.4.415.
7. Luk F., Bebawy M., Callaghan R. Inhibition of the multidrug resistance P-Glycoprotein: time for a change of strategy? // Drug Metabolism and Disposition. 2014. N42(4). Pp. 623–631. DOI: 10.1124/dmd.113.056176.
8. Черных И.В., Шулькин А.В., Якушева Е.Н., Кириченко Е.Е., Попова Н.М., Есенина А.С., Градинарь М.М. Влияние гидролизата полисахаридного комплекса цветков пижмы обыкновенной (*Tanacetum vulgare*) на активность ABCBL-белка *in vivo* // Наука молодых (Eruditio Juvenium). 2019. Т. 7. №3. С. 349–357.
9. Bocci G., Moreau A., Vayer P., Denizot C., Fardel O., Parmentier Y. New insights in the *in vitro* characterisation and molecular modelling of the P-glycoprotein inhibitory promiscuity // Europ. J. Pharmac. Sci. 2018. Vol. 121. Pp. 85–94. DOI: 10.1016/j.ejps.2018.04.039.
10. Енгальчева Е.Е., Якушева Е.Н., Сычев И.А., Шулькин А.В. Изучение гепатопротекторной активности полисахаридного комплекса цветков пижмы обыкновенной // Росс. мед.-биол. вестн. им. акад. И.П. Павлова. 2015. №2. С. 50–55.
11. Васина Т.М., Мыкоц Л.П., Степанова Н.Н., Зяблицева Н.С., Белоусова А.Л., Компанцев В.А. Определение молекулярной массы пектина, полученного кислотным экстрагированием из кожуры семян люпина // Сибирский мед. журнал. 2012. Т. 3. С. 126–128.
12. Никулин А.В., Ямщикова С.А., Потанина О.Г., Абрамович Р.А. Определение суммы восстанавливающих сахаров и водорастворимых полисахаридов в субстанциях растительного происхождения // Биофармацевтический журнал. 2018. №10(5). С. 42–59.
13. Якушева Е.Н., Шулькин А.В., Черных И.В., Попова Н.М., Котлярова А.А., Слепнев А.А. Метод анализа принадлежности лекарственных веществ к субстратам и ингибиторам белка-транспортера гликопротеина-P *in vitro* // Обзоры по клинической фармакологии и лекарственной терапии. 2019. Т. 17. №1. С. 71–78.
14. Petri N., Tannergren C., Rungstad D., Lennernäs H. Transport characteristics of fexofenadine in the Caco-2 cell model // Pharmac. Res. 2004. Vol. 21(8). Pp. 1398–1404. DOI: 10.1023/B:PHAM.0000036913.90332.b1.
15. Elsbey R., Surry D.D., Smith V.N., Gray A.J. 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 // Xenobiotica. 2008. Vol. 38(7–8). Pp. 1140–1164. DOI: 10.1080/00498250802050880.
16. Garrigos M., Mir L.M., Orlowski S. Competitive and non-competitive inhibition of the multidrug-resistance-associated P-glycoprotein ATPase // Eur. J. Biochem. 1997. Vol. 244(2). Pp. 664–673. DOI: 10.1111/j.1432-1033.1997.00664.x.
17. Крыжановский С.П., Богданович Л.Н., Беседнова Н.Н. Иванушко Л.А., Головачева В.Д. Гиполипидемические и противовоспалительные эффекты полисахаридов морских бурых водорослей у пациентов с дислипидемией // Фундаментальные исследования. 2014. №10. С. 93–100.
18. Злобин А.А., Мартинсон Е.А., Овечкина И.А., Дурнев Е.А., Оводова Р.Г., Литвинцев С.Г. Состав и свойства пектиновых полисахаридов зверобоя продырявленного *Hypericum perforatum* L. // Химия растительного сырья. 2011. №1. С. 33–38.
19. Cheng J.W., Zhang L.J., Hou Y.Q., Zhao Q., Zhang X.-J., Chen Z.-F., Bai Y. Association between MDR1 C3435T polymorphism and refractory epilepsy in the Chinese population: A systematic review and meta-analysis // Epilepsy Behavior. 2014. N36. Pp. 173–179. DOI: 10.1016/j.yebeh.2014.05.007.
20. Slomiany M.G., Grass G.D., Robertson A.D., Yang X.Y., Maria B.L., Beeson C., Toole B.P. Hyaluronan, CD44, and emmprin regulate lactate efflux and membrane localization of monocarboxylate transporters in human breast carcinoma cells // Cell, Tumor, and Stem Cell Biology. 2009. Vol. 69(4). Pp. 1293–1301. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-08-2491.
21. Fenyvesi F., Fenyvesi É., Szente L., Goda K., Bacso Z., Bácskay I., Váradi J., Kiss T., Molnár É., Janáky T., Szabó G.Jr, Vecsernyés M. P-glycoprotein inhibition by membrane cholesterol modulation // European Journal of Pharmaceutical Sciences. 2008. Vol. 34(4–5). Pp. 236–242. DOI: 10.1016/j.ejps.2008.04.005.
22. Cruz-Morales S., Castaneda-Gomez J., Rosas-Ramirez D., Fragoso-Serrano M., Figueroa-González G., Lorence A., Pereda-Miranda R. Resin glycosides from *Ipomoea alba* seeds as potential chemosensitizers in breast carcinoma cells // J. of Nat. Prod. 2016. Vol. 79(12). Pp. 3093–3104. DOI: 10.1021/acs.jnatprod.6b00782.

23. Куркина А.В. Исследование флавоноидного состава цветков пижмы обыкновенной (*Eanacetum vulgare* L.) // Химия растительного сырья. 2011. №4. С. 209–212.
24. Якушева Е.Н., Сычев И.А., Кириченко Е.Е., Щулькин А.В. Изучение фармакологической активности полисахаридного комплекса цветков пижмы обыкновенной // Фундаментальные исследования. 2014. №7. С. 1070–1074.
25. Бубенчикова В.Н., Дроздова И.Л. Изучение состава фенольных соединений донника лекарственного методом ВЭЖХ // Химико-фармацевтический журнал. 2004. Т. 38. №4. С. 24–25.
26. Федосеева Л.М., Харлампович Т.А. Изучение некоторых водорастворимых соединений донника лекарственного травы (*Melilotus officinalis* L.) // Химия растительного сырья. 2013. №2. С. 153–157.
27. Seelig A., Landwojtowicz E. Structure–activity relationship of P-glycoprotein substrates and modifiers // European Journal of Pharmaceutical Sciences. 2000. Vol. 12(1). Pp. 31–40. DOI: 10.1016/S0928-0987(00)00177-9.
28. Полле А.Я., Оводова Р.Г., Попов С.В. Выделение и общая характеристика полисахаридов из пижмы обыкновенной, мать-и-мачехи и лопуха войлочного // Химия растительного сырья. 1999. №1. С. 33–38.
29. Федосеева Л.М., Харлампович Т.А. Динамика накоплений биологически активных соединений донника лекарственного травы (*Melilotus officinalis* L.), произрастающего на территории алтайского края // Новые достижения в химии и химической технологии растительного сырья: материалы VI Всероссийской конференции с международным участием. Барнаул: Изд-во Алт. ун-та, 2014. С. 275–277.

Поступила в редакцию 5 марта 2020 г.

После переработки 12 августа 2020 г.

Принята к публикации 12 октября 2020 г.

Для цитирования: Черных И.В., Щулькин А.В., Кириченко Е.Е., Правкин С.К., Якушева Е.Н. Влияние полисахаридных комплексов растений средней полосы России на активность белка-транспортера гликопротеина-P *in vitro* // Химия растительного сырья. 2020. №4. С. 73–81. DOI: 10.14258/jcprm.2020047444.

*Chernykh I.V.**, *Shchul'kin A.V.*, *Kirichenko Ye.Ye.*, *Pravkin S.K.*, *Yakusheva Ye.N.* INFLUENCE OF POLYSACCHARIDE COMPLEXES OF PLANTS OF CENTRAL RUSSIA ON THE P-GLYCOPROTEIN ACTIVITY *IN VITRO*

Ryazan State Medical University, ul. Vysokovol'tnaya, 9, Ryazan, 390026 (Russia), e-mail: ivchernykh88@mail.ru

The purpose of this work was to study the effect of polysaccharide complexes isolated from tansy flowers (*Tanacetum vulgare* L., fam. *Asteraceae*) and melilotus herb (*Melilotus officinalis* L., fam. *Fabaceae*) on P-glycoprotein (Pgp, ABCB1 protein) activity *in vitro*.

On Caco-2 cell line the effect of polysaccharide complex isolated from tansy flowers and melilotus herb on Pgp activity was studied. *In vitro* Pgp activity was assessed by the transport of fexofenadine in the transwell system. High performance liquid chromatography with UV detection at wavelength 220 nm was used to determine fexofenadine concentration in the transport medium.

It was revealed that when polysaccharide isolated from tansy flowers was added to the transport medium in concentrations 10 and 100 μM the ratio of the apparent permeability coefficients of fexofenadine *b-a/a-b* decreased by 1.81 and 2.65 times, respectively, compared with the series of isolated transport of fexofenadine, which indicated decreased Pgp functional activity under the polysaccharide action. The polysaccharide complex of the melilotus herb did not change the *b-a/a-b* ratio in any of the applied concentrations, thus it did not affect the activity of this transporter. It is advisable to continue the study of tansy flower polysaccharide complex as an inhibitor of Pgp transporter protein in order to assess the possibility of its clinical use for the treatment of pharmacoresistant forms of cancer by overcoming the phenomenon of multidrug resistance of cells.

Keywords: P-glycoprotein, ABCB1-protein, inhibitors, plant-derived polysaccharides, *Tanacetum vulgare*, *Melilotus officinalis*, Caco-2 cell line.

* Corresponding author.

References

- Krishtanova N.A., Safonova M.Yu., Bolotova V.Ts., Pavlova E.D., Sakanyan E.I. *Vestnik VGU. Seriya: Khimiya. Biologiya. Farmatsiya*, 2005, no. 1, pp. 212–221. (in Russ.).
- Chernykh I.V., Kirichenko Ye.Ye., Shchul'kin A.V., Popova N.M., Kotlyarova A.A., Yakusheva Ye.N. *Ross. med.-biol. vestn. im. akad. I.P. Pavlova*, 2018, vol. 26, no. 2, pp. 305–316. (in Russ.).
- Chen Y., Zhang K., Li Y., Guo R., Zhang K., Zhong G., He Q. *J. Cell Mol. Med.*, 2019, vol. 23(3), pp. 2115–2124. DOI: 10.1111/jcmm.14123.
- Mollazadeh S., Sahebkar A., Hadizadeh F., Behravan J., Arabzadeh S. *Life Sci.*, 2018, vol. 214, pp. 118–123. DOI: 10.1016/j.lfs.2018.10.048.
- O'Connor R., Ooi M.G., Meiller J., Jakubikova J., Klippel S., Delmore J., Richardson P., Anderson K., Clynes M., Mitsiades C.S., O'Gorman P. *Cancer Chemother. Pharmacol.*, 2013, vol. 71, no. 5, pp. 1357–1368.
- Dalton W.S., Grogan T.M., Meltzer P.S., Scheper R.J., Durie B.G., Taylor C.W., Miller T.P., Salmon S.E. *J. of clinical oncology*, 1989, no. 7(4), pp. 415–424. DOI: 10.1200/JCO.1989.7.4.415.
- Luk F., Bebawy M., Callaghan R. *Drug Metabolism and Disposition*, 2014, no. 42(4), pp. 623–631. DOI: 10.1124/dmd.113.056176.
- Chernykh I.V., Shchul'kin A.V., Yakusheva Ye.N., Kirichenko Ye.Ye., Popova N.M., Yesenina A.S., Gradinar' M.M. *Eruditio Juvenium*, 2019, vol. 7, no. 3, pp. 349–357. (in Russ.).
- Bocci G., Moreau A., Vayer P., Denizot C., Fardel O., Parmentier Y. *Europ. J. Pharmac. Sci.*, 2018, vol. 121, pp. 85–94. DOI: 10.1016/j.ejps.2018.04.039.
- Yengalycheva Ye.Ye., Yakusheva Ye.N., Sychev I.A., Shchul'kin A.V. *Ross. med.-biol. vestn. im. akad. I.P. Pavlova*, 2015, no. 2, pp. 50–55. (in Russ.).
- Vasina T.M., Mykots L.P., Stepanova N.N., Zyablitseva N.S., Belousova A.L., Kompantsev V.A. *Sibirskiy med. Zhurnal*, 2012, vol. 3, pp. 126–128. (in Russ.).
- Nikulin A.V., Yamshchikova S.A., Potanina O.G., Abramovich R.A. *Biofarmatsevticheskiy zhurnal*, 2018, no. 10(5), pp. 42–59. (in Russ.).
- Yakusheva Ye.N., Shchul'kin A.V., Chernykh I.V., Popova N.M., Kotlyarova A.A., Slepnev A.A. *Obzory po klinicheskoy farmakologii i lekarstvennoy terapii*, 2019, vol. 17, no. 1, pp. 71–78. (in Russ.).
- Petri N., Tannergren C., Rungstad D., Lennernäs H. *Pharmac. Res.*, 2004, vol. 21(8), pp. 1398–1404. DOI: 10.1023/B:PHAM.0000036913.90332.b1.
- Elsby R., Surry D.D., Smith V.N., Gray A.J. *Xenobiotica*, 2008, vol. 38(7–8), pp. 1140–1164. DOI: 10.1080/00498250802050880.
- Garrigos M., Mir L.M., Orłowski S. *Eur. J. Biochem.*, 1997, vol. 244(2), pp. 664–673. DOI: 10.1111/j.1432-1033.1997.00664.x.
- Kryzhanovskiy S.P., Bogdanovich L.N., Besednova N.N. Ivanushko L.A., Golovacheva V.D. *Fundamental'nyye issledovaniya*, 2014, no. 10, pp. 93–100. (in Russ.).
- Zlobin A.A., Martinson Ye.A., Ovechkina I.A., Durnev Ye.A., Ovodova R.G., Litvinets S.G. *Khimiya Rastitel'nogo Syr'ya*, 2011, no. 1, pp. 33–38. (in Russ.).
- Cheng J.W., Zhang L.J., Hou Y.Q., Zhao Q., Zhang X.-J., Chen Z.-F., Bai Y. *Epilepsy Behavior*, 2014, no. 36, pp. 173–179. DOI: 10.1016/j.yebeh.2014.05.007.
- Slomiany M.G., Grass G.D., Robertson A.D., Yang X.Y., Maria B.L., Beeson C., Toole B.P. *Cell, Tumor, and Stem Cell Biology*, 2009, vol. 69(4), pp. 1293–1301. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-08-2491.
- Fenyvesi F., Fenyvesi É., Szente L., Goda K., Bacsó Z., Bácskay I., Váradi J., Kiss T., Molnár É., Janáky T., Szabó G.Jr, Vecsernyés M. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 2008. Vol. 34(4–5), pp. 236–242. DOI: 10.1016/j.ejps.2008.04.005.
- Cruz-Morales S., Castaneda-Gomez J., Rosas-Ramirez D., Fragoso-Serrano M., Figueroa-González G., Lorence A., Pereda-Miranda R. *J. of Nat. Prod.*, 2016, vol. 79(12), pp. 3093–3104. DOI: 10.1021/acs.jnatprod.6b00782.
- Kurkina A.V. *Khimiya Rastitel'nogo Syr'ya*, 2011, no. 4, pp. 209–212. (in Russ.).
- Yakusheva Ye.N., Sychev I.A., Kirichenko Ye.Ye., Shchul'kin A.V. *Fundamental'nyye issledovaniya*, 2014, no. 7, pp. 1070–1074. (in Russ.).
- Bubenchikova V.N., Drozdova I.L. *Khimiko-farmatsevticheskiy zhurnal*, 2004, vol. 38, no. 4, pp. 24–25. (in Russ.).
- Fedoseyeva L.M., Kharlampovich T.A. *Khimiya Rastitel'nogo Syr'ya*, 2013, no. 2, pp. 153–157. (in Russ.).
- Seelig A., Landwojtowicz E. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 2000, vol. 12(1), pp. 31–40. DOI: 10.1016/S0928-0987(00)00177-9.
- Polle A.YA., Ovodova R.G., Popov S.V. *Khimiya Rastitel'nogo Syr'ya*, 1999, no. 1, pp. 33–38. (in Russ.).
- Fedoseyeva L.M., Kharlampovich T.A. *Novyye dostizheniya v khimii i khimicheskoy tekhnologii rastitel'nogo syr'ya: materialy VI Vserossiyskoy konferentsii s mezhdunarodnym uchastiyem*. [New achievements in the chemistry and chemical technology of plant raw materials: materials of the VI All-Russian conference with international participation]. Barnaul, 2014, pp. 275–277. (in Russ.).

Received March 5, 2020

Revised August 12, 2020

Accepted October 12, 2020

For citing: Chernykh I.V., Shchul'kin A.V., Kirichenko Ye.Ye., Pravkin S.K., Yakusheva Ye.N. *Khimiya Rastitel'nogo Syr'ya*, 2020, no. 4, pp. 73–81. (in Russ.). DOI: 10.14258/jcprm.2020047444.

