

<https://doi.org/10.31146/1682-8658-ecg-206-10-70-76>

Линия клеток HepG2 как модель для изучения проникновения статинов в гепатоциты

Ерохина П. Д., Слепнев А. А., Мыльников П. Ю., Ганина С. О., Коняхин Е. А., Шулькин А. В., Якушева Е. Н.

Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования Рязанский государственный медицинский университет имени академика И. П. Павлова Министерства здравоохранения Российской Федерации, ул. Высоковольтная, д. 9, г. Рязань, 390026, Россия

Для цитирования: Ерохина П. Д., Слепнев А. А., Мыльников П. Ю., Ганина С. О., Коняхин Е. А., Шулькин А. В., Якушева Е. Н. Линия клеток HepG2 как модель для изучения проникновения статинов в гепатоциты. Экспериментальная и клиническая гастроэнтерология. 2022;206(10): 70–76. DOI: 10.31146/1682-8658-ecg-206-10-70-76

✉ Для переписки:

Шулькин

Алексей

Владимирович

alekseyshulkin@

rambler.ru

Ерохина Пелагея Дмитриевна, ассистент кафедры фармакологии с курсом фармации ФДПО

Слепнев Александр Александрович, к.б.н., доцент, доцент кафедры фармакологии с курсом фармации ФДПО

Мыльников Павел Юрьевич, кандидат биологических наук, ассистент кафедры фармакологии с курсом фармации ФДПО

Ганина Светлана Олеговна, студент 6 курса лечебного факультета

Коняхин Егор Андреевич, студент 5 курса фармацевтического факультета

Шулькин Алексей Владимирович, д.м.н., доцент, профессор кафедры фармакологии с курсом фармации ФДПО

Якушева Елена Николаевна, д.м.н., профессор, зав. кафедрой фармакологии с курсом фармации ФДПО

Резюме

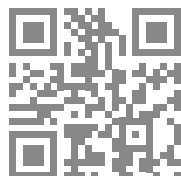
Статины (ингибиторы β -гидрокси- β -метил-глутарил-КоА редуктазы) — основной класс препаратов для лечения дислипидемий. Для повышения безопасности терапии при их использовании необходима тест-система для оценки их проникновения в гепатоциты с помощью белков-транспортёров OATP1B1/OATP1B3.

Цель исследования разработать метод оценки проникновения статинов внутрь гепатоцитов на клетках линии HepG2 (гепатоцеллюлярная карцинома человека).

Материалы и методы. Клетки культивировали в 6- и 24 луночных планшетах. Наличие OATP1B1 в клетках линии HepG2 оценивали с помощью метода вестерн-блот. Проникновение статинов в клетки анализировали на примере аторвастатина. Его добавляли к монослою клеток в концентрациях 1 и 10 мкМ и инкубировали в течение 30 минут. Затем клетки снимали с лунок, лизировали различными способами и определяли количество аторвастатина методом высокоэффективной жидкостной хроматографии с tandemным масс-селективным детектированием (ВЭЖХ–МС/МС).

Результаты исследования. Методом вестерн-блот было показано наличие OATP1B1 в клетках линии HepG2, основного белка, транспортирующего статины внутрь гепатоцитов. Наилучшим способом лизиса клеток оказался трехкратный цикл «заморозка-разморозка» при -80°C . Аналитический диапазон методики количественного определения аторвастатина в лизате клеток HepG2 методом ВЭЖХ–МС/МС составил 0,5–200 нмоль/л, что позволило выполнять транспортные эксперименты при добавлении аторвастатина в концентрации 1 мкМ и инкубации в течение до 30 мин. Применение ингибитора OATP1B1/OATP1B3 — рифампицина (100 мкМ) снижало проникновение аторвастатина внутрь клеток HepG2, что подтверждает адекватность предложенного метода.

EDN: MPLHQZ



Выводы. Разработана методика оценки проникновения статинов в гепатоциты на клетках линии HepG2.

Ключевые слова: аторвастатин, HepG2, белки-транспортёры OATP1B1 /OATP1B3

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.



HepG2 cell line as a model for studying of the statins' hepatic uptake

P.D. Erokhina, A.A. Slepnev, P.Yu. Mylnikov, S.O. Ganina, E.A. Konyakhin, A.V. Shchulkin, E.N. Yakusheva
Ryazan State Medical University, build. 9, Vysokovoltnaia str., Ryazan, 390026, Russia

For citation: Erokhina P.D., Slepnev A.A., Mylnikov P.Yu., Ganina S.O., Konyakhin E.A., Shchulkin A.V., Yakusheva E.N. HepG2 cell line as a model for studying of the statins' hepatic uptake. *Experimental and Clinical Gastroenterology*. 2022;206(10): 70–76. (In Russ.) DOI: 10.31146/1682-8658-ecg-206-10-70-76

✉ **Corresponding author:**

Alexey V. Shchulkin
alekseyshulkin@rambler.ru

Pelageya D. Erokhina, assistant of the Department of Pharmacology with a Course of Pharmacy of Continuing Professional Education Faculty; ORCID: 0000-0003-4802-5656, SPIN: 1480-6854

Alexander A. Slepnev, PhD in Biological Sciences, Assistant Professor of Department of Pharmacology of Continuing Professional Education Faculty; ORCID: 0000-0003-0696-6554

Pavel Yu. Mylnikov, PhD in Biological Sciences, assistant of the Department of Pharmacology with a Course of Pharmacy of Continuing Professional Education Faculty; ORCID: 0000-0001-7829-2494, SPIN: 8503-3082

Svetlana O. Ganina, 6th year student of the Faculty of Medicine; ORCID: 0000-0002-4408-6454

Egor A. Konyakhin, 5th year student of the Faculty of Pharmacy; ORCID: 0000-0002-9025-130X

Alexey V. Shchulkin, MD, PhD, Assistant Professor of the Department of Pharmacology with a Course of Pharmacy of Continuing Professional Education Faculty; ORCID: 0000-0003-1688-0017, SPIN: 2754-1702

Elena N. Yakusheva, MD, PhD, Professor, Head of the Department of Pharmacology with a Course of Pharmacy of Continuing Professional Education Faculty; ORCID: 0000-0001-6887-4888, SPIN: 2865-3080

Summary

Statins (β -hydroxy- β -methyl-glutaryl-CoA reductase inhibitors) are the main class of drugs for the treatment of dyslipidemia. To improve the safety of therapy with their use, a test system is needed to assess their penetration into hepatocytes using OATP1B1/OATP1B3 transporter proteins.

The aim of the study was to develop a method for assessing the penetration of statins into hepatocytes on HepG2 cells (human hepatocellular carcinoma).

Materials and methods. Cells were cultured in 6- and 24-well plates. The presence of OATP1B1 in HepG2 cells was assessed using the Western blot method. Penetration of statins into cells was analyzed using atorvastatin as an example. It was added to the cell monolayer at concentrations of 1 and 10 μ M and incubated for 30 minutes. The cells were then removed from the wells, lysed in various ways, and the amount of atorvastatin was determined by high performance liquid chromatography with tandem mass selective detection (HPLC-MS/MS).

Results. Western blot showed the presence of OATP1B1 in HepG2 cells, the main protein that transports statins into hepatocytes. The best way to lyse the cells was a three-cycle freeze-thaw cycle at -80°C . The analytical range of the method for the quantitative determination of atorvastatin in the lysate of HepG2 cells by HPLC-MS/MS was 0.5–200 nmol/l, which made it possible to perform transport experiments with the addition of atorvastatin at a concentration of 1 μ M and incubation for up to 30 min. The use of the OATP1B1/OATP1B3 inhibitor rifampicin (100 μ M) reduced the penetration of atorvastatin into HepG2 cells, which confirms the adequacy of the proposed method.

Conclusions. A technique for assessing the penetration of statins into hepatocytes on HepG2 cells has been developed.

Keywords: atorvastatin, HepG2, OATP1B1/OATP1B3 transporter proteins

Conflict of interest. Authors declare no conflict of interest.

Введение

Статины (ингибиторы β -гидрокси- β -метил-глутарил-КоА редуктазы) являются основным классом препаратов для лечения различных дислипидемий [1]. Кроме того, в ряде работ было показано, что они обладают дополнительными плеiotропными

эффектами: антиоксидантным, антипролиферативным, противовоспалительным, стимулируют неоангиогенез и улучшают эндотелиальную функцию [3–4], что расширяет возможности их клинического применения. Например, многочисленными исследова-

дованиями доказано, что статины снижают риск сердечно-сосудистых катастроф и улучшают прогноз у кардиологических больных [2]. Исследование, проведенное в Великобритании и включившее 7,027 млн пациентов, показало, что частота назначения статинов в первичном звене с 1995 по 2013 гг. возросла с 2,36 на 1000 человеко-лет до 128,03 на 1000 человеко-лет [5].

Однако несмотря на то, что статины играют важную роль в первичной и вторичной профилактике сердечно-сосудистых заболеваний, их длительное применение ограничивается рядом побочных эффектов, наиболее опасными среди которых являются: миопатия, рабдомиолиз, гепатотоксичность, гипергликемия [6]. Механизм их развития продолжает активно изучаться. Последние данные продемонстрировали важную роль печеночных белков-транспортёров OATP1B1 и OATP1B3 в данном процессе [7–8]. Показано, что от активности данных белков зависит проникновение статинов в клетки печени, где происходит биотрансформация и реализуется как основное, так и побочное их действие.

Ряд лекарственных препаратов, таких, как макролиды (кларитромицин, телитромицин, эритромицин, рокситромицин), циклоспорин А, рифампицин, некоторые пероральные сахароснижающие препараты (репаглинид и росиглитазон в высоких концентрациях), гемфиброзил [9–10, 23], нистатин, спиронолактон, резерпин, сульфасалазин, а также

полиморфизмы в генах, кодирующих OATP1B1 / OATP1B3 [24–26, 30], могут снижать активность данных белков-транспортёров, что приводит к уменьшению проникновения статинов в гепатоциты, к повышению их концентрации в плазме крови и развитию нежелательных лекарственных реакций.

Так, было описано, что совместный приём макролидов (кларитромицина и эритромицина) и симvastатина вызвал миопатию у пациентов с ишемической болезнью сердца [27], а также показано, что однократный приём рифампицина повышал плазменную концентрацию atorvastатина [29].

Таким образом, для повышения безопасности проводимой статинами терапии важно знать, как влияют лекарственные препараты, назначаемые с ними в комбинации, на их проникновение в гепатоциты, в частности на их транспорт с помощью OATP1B1 / OATP1B3, а для этого необходима адекватная тест-система. Обычно для этих целей используют линии клеток, гиперэкспрессирующие белки-транспортёры [10–15]. В России коммерчески доступными являются клетки линии HepG2 (гепатоцеллюлярная карцинома человека, ЦКП «Коллекция культур клеток позвоночных», Института цитологии РАН, Санкт-Петербург, Россия).

Поэтому целью настоящего исследования являлась разработка метода оценки проникновения статинов внутрь гепатоцитов на клетках линии HepG2.

Материалы и методы

Клетки линии HepG2 культивировали при 37° С и 5% содержании CO₂ в Дульбекко модифицированной среде Игла (DMEM) с высоким содержанием глюкозы (4500 мг/л) (“Sigma-Aldrich”, Германия), содержащей L-глутамин (4 мМ) (“Sigma-Aldrich”, Германия), 10% фетальной бычьей сыворотки (“Sigma-Aldrich”, Германия), 100 ЕД/мл пенициллина и 100 мкг/мл стрептомицина (“Sigma-Aldrich”, Германия) [16, 35–36]. Смена питательной среды производилась каждые 48 ч.

После достижения 70–90% конfluентности клетки снимали с культурального фласка площадью 75 см² (“Corning”, США) с помощью раствора трипсин-ЭДТА (0,25% трипсина и 0,2% ЭДТА, “Sigma-Aldrich”, Германия) и высевали в плоскодонные 6 и 24-луночные планшеты (“Corning”, США) плотностью 2.0–3.0 × 10⁴ клеток/см². Клетки культивировали в планшетах до достижения монослоя, после чего включали в эксперимент.

Наличие OATP1B1 в клетках линии HepG2 определяли методом вестерн-блот. Для этого клетки снимали с лунок 6-луночных планшетов с использованием раствора трипсин-ЭДТА (0,25% трипсина и 0,2% ЭДТА, “Sigma-Aldrich”, Германия), трижды промывали фосфатно-солевым буфером Дульбекко (DPBS) и лизировали с помощью NP-40 буфера (Thermo-Fisher, США) с добавлением ингибиторов протеаз (“Sigma-Aldrich”, Германия) в течение 30 минут при 4 °С. Полученный лизат центрифугировали 10 минут при 4 °С и 13000 об/мин. Супернатант переносили в эппендорфы и до проведения анализа хранили при –80 °С в ультранизкотемпературной морозильной камере UniFreez U80 (DAIHAN Scientific, Корея).

Белки супернатанта (30 мкг) подвергали электрофорезу с использованием TGX Stain-Free FastCast Acrylamide Kit (Bio-Rad, США) в буферной системе Laemmli (BioRad, США). Перед загрузкой образцы обрабатывали в соответствии с протоколом Bio-Rad, их смешивали с буфером для образцов Laemmli (Bio-Rad, США), содержащем 2,5% β-меркаптоэтанол (Bio-Rad, США) в соотношении 1:3 (v: v), инкубировали 10 мин при температуре 70 °С. Электрофорез осуществлялся при 100 В в течение 90 мин.

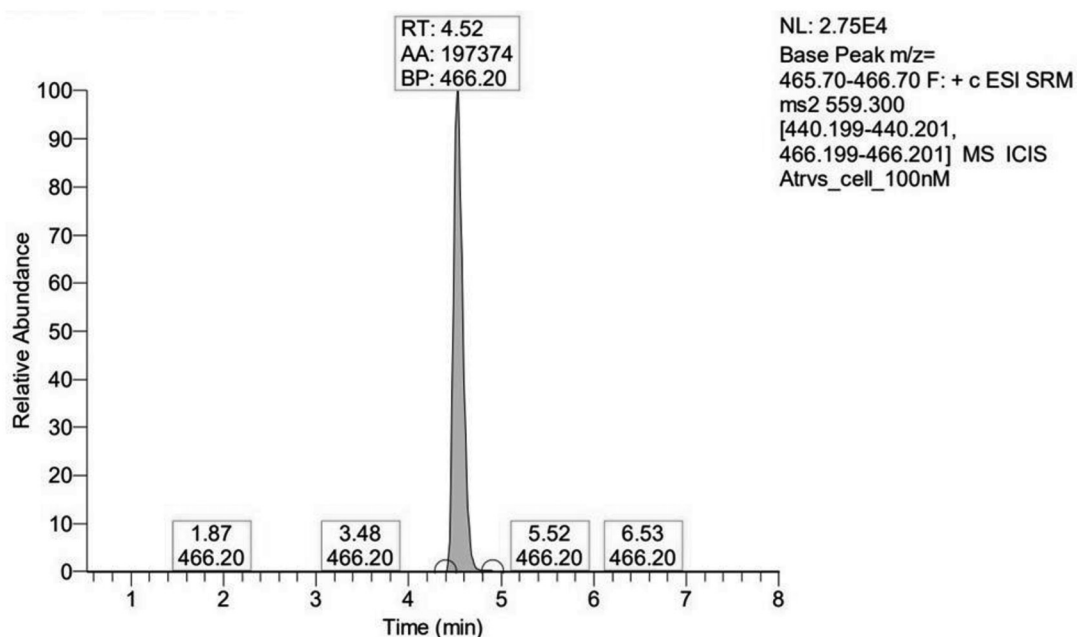
Для определения относительного количества OATP1B1 использовали первичные поликлональные кроличьи антитела (OATP2 Polyclonal Antibody, Invitrogen, США) в концентрации 1:2000. Визуализацию первичных антител осуществляли с использованием вторичных кроличьих антител (Rabbit anti-Mouse IgG (H+L) Secondary Antibody, HRP, Invitrogen) в разведении 1:4000. Белки визуализировали с помощью Chemi Doc XRS+ (Bio-Rad, США).

Проникновение статинов в клетки линии HepG2 анализировали на примере atorvastатина (“Sigma-Aldrich”, Германия). Для этого клетки культивировали на 24-луночных планшетах.

Перед началом транспортного эксперимента клетки однократно промывали подогретым до 37 °С раствором Хэнкса (“Sigma-Aldrich”, Германия). Затем в лунки добавляли транспортную среду (состоит из раствора Хэнкса (“Sigma-Aldrich”, Германия), забуференного 25 мМ Хепес при pH 7,4 (“Sigma-Aldrich”, Германия) с содержанием 1% диметилсульфоксида («ПанЭко», Россия)), содержащую atorvastатин в концентрациях 1 и 10 мкМ и инкубировали в течение 5, 15 и 30 мин. На каждую временную

Рисунок 1.

Пик аторвастатина на хроматограмме
Figure 1.
Atorvastatin peak on the chromatogram



точку приходилось по 3 повторения. Для остановки транспорта клетки трижды промывались 500 мкл ледяного фосфатного буфера («ПанЭко», Россия). Третьей порцией DPBS клетки снимали с лунки, переносили в пробирки типа эппендорф и ресуспендировали. До проведения процедуры лизиса все образцы убирали в холодильник [17–19].

Для выбора оптимального способа лизиса клеток были протестированы следующие методики:

1. 150 мкл 0,1% муравьиной кислоты добавляли к осадку клеток, затем обрабатывали ультразвуком в течение 15 минут. К 150 мкл лизата добавляли 150 мкл ацетонитрила, центрифугировали образцы 15 мин при 13000g и 4 °C [20], после чего супернатант инжестировали в хроматограф;
2. К осадку клеток добавляли 150 мкл буфера NP-40 (ThermoFisher, США) с ингибиторами протеаз («Sigma-Aldrich», Германия) и инкубировали образцы в течение 30 минут, каждые 10 минут встряхивали на перемешивателе Vortex. По окончании инкубации к образцам добавляли 150 мкл ацетонитрила, после чего центрифугировали пробы в течение 10 мин при 13000g и 4 °C на высокоскоростной центрифуге Avanti JXN-3 Beckman Coulter (Beckman Coulter, США). Супернатант инжестировали в хроматограф.
3. К осадку клеток добавляли 150 мкл фосфатного буфера. Эппендорф погружали в жидкий азот на 1 минуту и затем размораживали. Цикл повторяли 3 раза. К образцам добавляли 150 мкл ацетонитрила, затем лизат центрифугировали 5 мин при 21000g и 4 °C. Супернатант инжестировали в хроматограф [21–22];

Концентрацию аторвастатина в лизате клеток определяли методом высокоэффективной жидкостной хроматографии с tandemным масс-селективным детектированием (ВЭЖХ–МС/МС).

Исследование было выполнено на высокоэффективном жидкостном хроматографе «Ultimate 3000» (ThermoFisher, США) с tandemным масс-селективным детектором TSQ Fortis (ThermoFisher, США), градиентным насосом, дегазатором и автосемплером. Полученные результаты обрабатывались с помощью программы «Thermo Scientific Xcalibur» (ver. 4.2.47).

В работе использовалась предколонка Selectra C18 Guard Cartridges SLC-18GDC46–5UM, хроматографическая колонка UCT Selectra C18 4,6 mm × 100 mm 5 um.

В исследовании использовали градиентный режим элюирования: соотношение 0,1% раствора муравьиной кислоты: ацетонитрил: 0 мин – 35%/65%; 0,3 мин – 35% / 65%; 0,6 мин – 5%/ 95%; 5 мин – 5%/ 95%; 5,05 мин – 35% / 65%; 8 мин – 35% / 65%.

Молекулы ионизировали в режиме положительной ионизации на электроспрее при атмосферном давлении, напряжение спрея 3500 В.

Условия детектирования вещества: оболочечный газ (sheath gas) – 50 л/мин, вспомогательный газ (aux gas) – 10 л/мин, продувочный газ (sweep gas) – 1 л/мин, температурный режим трубки для переноса ионов 300 °C, температура испарителя составляла 350 °C.

Детектирование вещества осуществлялось по нижеприведенным условиям: аторвастатин – положительный режим ионизации, 559,30 m/z → 466,20 m/z, энергия столкновения – 17 В, фрагментация источника – 0, CID gas (collision-induced dissociation gas) – 2 мТорр; 559,30 m/z → 440,20 m/z, энергия столкновения 32 В, фрагментация источника – 0, CID gas – 2 мТорр.

Скорость потока – 0,3 мл/мин, пробы вводились в хроматограф в объеме 2 мкл. Время анализа образцов составило 10 мин.

При данных условиях время удерживания аторвастатина составило 4,53 мин (рис. 1).

Рисунок 2. OATP1B1 в лизате клеток линии HepG2

Примечания: 1 – лизат клеток HepG2, 2 – лизат клеток HEK293, не экспрессирующие OATP1B1.

Figure 2. OATP1B1 in HepG2 cell line lysate

Notes: 1 – lysate of HepG2 cells, 2 – lysate of HEK293 cells not expressing OATP1B1

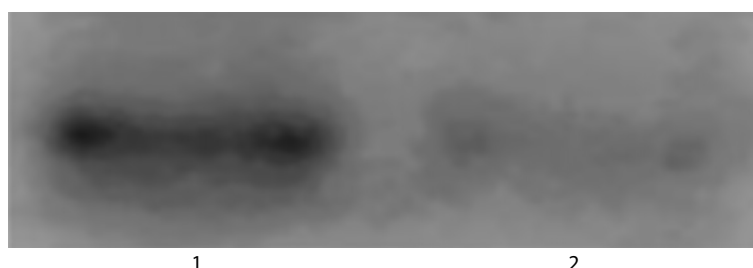
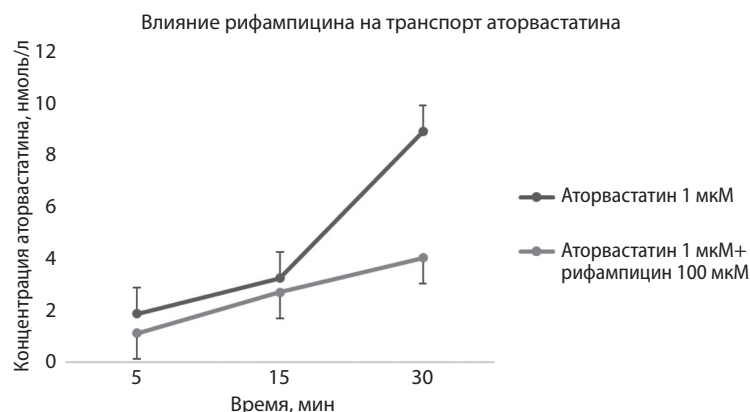


Рисунок 3. Динамика концентраций atorvastatin в лизате клеток HepG2 ($M \pm SD$)

Figure 3. Dynamics of atorvastatin concentrations in HepG2 cell lysate ($M \pm SD$)



Для подтверждения адекватности разработанного метода были выполнены эксперименты с классическим ингибитором OATP1B1 /OATP1B3 рифампицином ("Sigma-Aldrich", Германия).

Для этого из лунок удаляли культуральную среду и запускали 15-минутную преинкубацию с 100 мкМ раствором рифампицина в транспортной среде. По истечении преинкубации раствор рифампицина удаляли, а в лунки добавлялась смесь

1 мкМ раствора аторвастатина и 100 мкМ раствора рифампицина. Клетки инкубировали 5, 15 и 30 минут триплетами.

Полученные результаты анализировали с помощью программы "StatSoft Statistica 13.0", дисперсионным анализом (ANOVA) и критерием множественного сравнения Фишера. Результаты представлены в виде $M \pm SD$. Статистически значимыми считали различия при $p < 0.05$.

Результаты

Методом вестерн-блот было показано наличие белка-транспортера OATP1B1 в клетках линии HepG2 (рис. 2), основного белка-транспортера, принимающего участие в транспорте статинов внутрь гепатоцитов. Таким образом, данная клеточная линия может быть использована для исследования проникновения аторвастатина внутрь клеток.

Линия клеток HEK293 использовалась как отрицательный контроль (в норме данные клетки не экспрессируют OATP1B1, их культивировали в аналогичных планшетах, в стандартных условиях).

При выборе способа лизиса клеток было показано, что наибольшая концентрация аторвастатина наблюдается при разрушении клеток трехкратным циклом «заморозка-разморозка» при -80°C . Поэтому в дальнейших экспериментах использовался именно данный способ пробоподготовки.

Аналитический диапазон методики количественного определения аторвастатина в лизате клеток HepG2 методом ВЭЖХ–МС/МС составил 0,5–200 нмоль/л, что позволило выполнять транспортные эксперименты при добавлении аторвастатина к монослою клеток в концентрации 1 мкМ и инкубации в течение 5, 15 и 30 мин.

Концентрация аторвастатина в лизате клеток постепенно возрастала с увеличением срока инкубации и достигала максимальных значений к 30 мин (рис. 3).

Добавление ингибитора OATP1B1/OATP1B3 – рифампицина снижало транспорт аторвастатина в клетки линии HepG2, о чем свидетельствует достоверное снижение его концентрации в лизате клеток на 54,6% ($p=0,0$) на 30 мин эксперимента по сравнению с транспортом гиполипидемического препарата без ингибитора.

Обсуждение

Эффективность аторвастатина подтверждена в многочисленных клинических исследованиях, что де-

лает его препаратом первой линии при терапии атеросклероза и других гиперхолестеринемий [31–32].

Аторвастатин применяется перорально, быстро всасывается из желудочно-кишечного тракта, но при этом обладает низкой биодоступностью (около 12%) [31]. Он проникает в гепатоциты через синусоидальную мембрану, где и оказывает своё фармакологическое действие, с помощью специфических транспортёров OATP1B1 / OATP1B3, от активности которых зависит выраженность гиполипидемического эффекта и риск развития побочных эффектов. В гепатоцитах аторвастатин подвергается биотрансформации с образованием активных метаболитов (2-гидрокси-аторвастатин и 4-гидрокси-аторвастатин), которые также являются субстратами OATP1B1 / OATP1B3. Аторвастатин и его метаболиты выводятся через билиарную мембрану гепатоцитов в желчь, почками выводится лишь около 1% препарата [34]. $T_{1/2}$ составляет около 14 часов.

В настоящем исследовании оценка проникновения аторвастатина внутрь гепатоцитов выполнялась на клетках линии HepG2.

В ряде руководств и рекомендаций рассматривается возможность использования и других клеточных линий, например линии НЕК293, трансфицированных генами, кодирующими OATP1B1 /

OATP1B3 [13–14]. Преимуществами линии HepG2 является экспрессия сразу двух транспортеров, схожие с человеческими гепатоцитами механизмы регуляции и метаболизм [30–31].

Как было показано в настоящем исследовании, оптимальными условиями проведения эксперимента являются добавление аторвастатина к клеткам HepG2 в концентрации 1 мкМ, забор образцов клеток через 5, 15 и 30 мин, лизис клеток трехкратным циклом «заморозка/разморозка», определение концентрации аторвастатина методом ВЭЖХ–МС/МС.

Применение классического ингибитора OATP1B1 и OATP1B3 – рифампицина [32–33] в концентрации 100 мкМ ингибировало проникновение аторвастатина внутрь клеток HepG2, что подтверждает адекватность предложенного метода (рис. 2).

Разработанная методика исследования проникновения статинов в клетки линии HepG2 может быть использована для оценки влияния лекарственных веществ на этот процесс, с целью прогнозирования развития межлекарственных взаимодействий и повышения безопасности терапии статинами.

Заключение

Таким образом, разработана методика оценки проникновения статинов в гепатоциты на клетках линии HepG2.

Литература | References

1. Facciorusso A., Abd El Aziz M. A., Singh S., Pusceddu S., Milione M., Giacomelli L., Sacco R. Statin Use Decreases the Incidence of Hepatocellular Carcinoma: An Updated Meta-Analysis. *Cancers (Basel)*. 2020 Apr 3;12(4):874. doi: 10.3390/cancers12040874.
2. Imprialos, K. P., Stavropoulos, K., Doumas, M., Skalkou A., Zografou, I., & Athyros, V. G. (2018). The potential role of statins in treating liver disease. *Expert Review of Gastroenterology & Hepatology*, 12(4), 331–339. doi: 10.1080/17474124.2018.1439379.
3. Pose E., Trebicka J., Mookerjee R. P., Angeli P., Ginès P. Statins: Old drugs as new therapy for liver diseases? *J Hepatol*. 2019 Jan;70(1):194–202. doi: 10.1016/j.jhep.2018.07.019.
4. Liao J.K., Laufs U. Pleiotropic effects of statins. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*. 2005;45:89–118. doi: 10.1146/annurev.pharmtox.45.120403.095748.
5. O’Keeffe A.G., Nazareth I., Petersen I. Time trends in the prescription of statins for the primary prevention of cardiovascular disease in the United Kingdom: a cohort study using The Health Improvement Network primary care data. *Clin Epidemiol*. 2016 May 27; 8:123–32. doi: 10.2147/CLEP.S104258.
6. Sultan S., D’Souza A., Zabetakis I., Lordan R., Tsoupras A., Kavanagh E. P., Hynes N. Statins: Rationale, Mode of Action, and Side Effects. *The Impact of Nutrition and Statins on Cardiovascular Diseases*. 2019; 171–200. doi: 10.1016/b978-0-12-813792-5.00006-9.
7. Hirota T., Fujita Y., Ieiri I. An updated review of pharmacokinetic drug interactions and pharmacogenetics of statins. *Expert Opin Drug Metab Toxicol*. 2020 Sep;16(9):809–822. doi: 10.1080/17425255.2020.1801634.
8. Zhang Y., Panfen E., Fancher M., Sinz M., Marathe P., Shen H. Dissecting the Contribution of OATP1B1 to Hepatic Uptake of Statins Using the OATP1B1 Selective Inhibitor Estropipate. *Mol Pharm*. 2019 Jun 3;16(6):2342–2353. doi: 10.1021/acs.molpharmaceut.8b01226.
9. Roth M., Obaidat A., Hagenbuch B. OATPs, OATs and OCTs: the organic anion and cation transporters of the SLCO and SLC22A gene superfamilies. *Br J Pharmacol*. 2012 Mar;165(5):1260–87. doi: 10.1111/j.1476–5381.2011.01724.x.
10. [Study of the bioequivalence of generic drugs. Guidelines for the examination of medicines]. Moscow. Grif and K. 2013. 328 p. (In Russ.)
Изучение биоэквивалентности воспроизведенных лекарственных средств. Руководство по экспертизе лекарственных средств. Том I. – М.: Гриф и К; 2013. – 328 с.
11. U.S. Department of Health and Human Services Food and Drug Administration, Center for Drug Evaluation and Research (CDER). In Vitro Drug Interaction Studies – Cytochrome P450 Enzyme- and Transporter Mediated Drug Interactions Guidance for Industry. 2020. 43 P.
12. U.S. Department of Health and Human Services, Food and Drug Administration, Center for Drug Evaluation and Research (CDER). Guidance for Industry Drug Interaction Studies – Study Design, Data Analysis, Implications for Dosing, and Labeling Recommendations. 2012. 75 P.
13. U.S. Department of Health and Human Services, Food and Drug Administration, Center for Drug Evaluation and Research (CDER). Bioanalytical method valida-

- tion. U.S. Government Printing Office: Washington, DC. 2018, 41 P.
14. EMA Guideline on bioanalytical method validation. European Medicines Agency. Committee for medicinal products for human use: London. 2011, 23 P.
 15. [Guidelines for the examination of medicinal products Volume I, rules for conducting bioequivalence studies of medicinal products within the framework of the Eurasian Economic Union, Council of the Eurasian Economic Commission, decision of November 3, 2016 No. 85]. (In Russ.)
Руководство по экспертизе лекарственных средств Том I, правил проведения исследований биоэквивалентности лекарственных препаратов в рамках Евразийского экономического союза, Совет Евразийской экономической комиссии, решение от 3 ноября 2016 № 85.
 16. Kunze A., Huwyler J., Camenisch G., Poller B. Prediction of organic anion-transporting polypeptide 1B1- and 1B3-mediated hepatic uptake of statins based on transporter protein expression and activity data. *Drug Metab Dispos.* 2014 Sep;42(9):1514–21. doi: 10.1124/dmd.114.058412.
 17. Vildhede A., Karlgren M., Svedberg E. K., Wisniewski J. R., Lai Y., Norén A., Artursson P. Hepatic uptake of atorvastatin: influence of variability in transporter expression on uptake clearance and drug-drug interactions. *Drug Metab Dispos.* 2014 Jul;42(7):1210–8. doi: 10.1124/dmd.113.056309.
 18. Lau Y.Y., Okochi H., Huang Y., Benet L. Z. Multiple transporters affect the disposition of atorvastatin and its two active hydroxy metabolites: application of in vitro and ex situ systems. *J Pharmacol Exp Ther.* 2006 Feb;316(2):762–71. doi: 10.1124/jpet.105.093088.
 19. Mandery K., Balk B., Bujok K., Schmidt I., Fromm M. F., Glaeser H. Inhibition of hepatic uptake transporters by flavonoids. *Eur J Pharm Sci.* 2012 May 12;46(1–2):79–85. doi: 10.1016/j.ejps.2012.02.014.
 20. Schlatt L., Costa A. C. C., Barz V., Ciarimboli G., Karst U. Fast simultaneous quantification of gabapentin and cetirizine in cell lysates by means of HPLC–MS/MS. *J Pharm Biomed Anal.* 2020 May 30;184:113172. doi: 10.1016/j.jpba.2020.113172.
 21. Wang S., Ni X. J., Wen Y. G., Xie H. S., Chen J. R., Luo Y. L., Li P. L. A simple and sensitive HPLC–MS/MS assay for the quantitation of montelukast in cell-based systems in vitro pulmonary drug permeability study. *J Pharm Biomed Anal.* 2021 Jan 5;192:113657. doi: 10.1016/j.jpba.2020.113657.
 22. Proctor A., Wang Q., Lawrence D. S., Allbritton N. L. Metabolism of peptide reporters in cell lysates and single cells. *Analyst.* 2012 Jul 7;137(13):3028–38. doi: 10.1039/c2an16162a.
 23. Kindla J., Fromm M. F., König J. In vitro evidence for the role of OATP and OCT uptake transporters in drug-drug interactions. *Expert Opin Drug Metab Toxicol.* 2009 May;5(5):489–500. doi: 10.1517/17425250902911463.
 24. Romaine S. P., Bailey K. M., Hall A. S., Balmforth A. J. The influence of SLCO1B1 (OATP1B1) gene polymorphisms on response to statin therapy. *Pharmacogenomics J.* 2010 Feb;10(1):1–11. doi: 10.1038/tpj.2009.54.
 25. Chung J. Y., Cho J. Y., Yu K. S., Kim J. R., Oh D. S., Jung H. R., Lim K. S., Moon K. H., Shin S. G., Jang I. J. Effect of OATP1B1 (SLCO1B1) variant alleles on the pharmacokinetics of pitavastatin in healthy volunteers. *Clin Pharmacol Ther.* 2005 Oct;78(4):342–50. doi: 10.1016/j.clpt.2005.07.003.
 26. Mori D., Kashiara Y., Yoshikado T., et al. Effect of OATP1B1 genotypes on plasma concentrations of endogenous OATP1B1 substrates and drugs, and their association in healthy volunteers. *Drug Metab Pharmacokinet.* 2019 Feb;34(1):78–86. doi: 10.1016/j.dmpk.2018.09.003.
 27. Molden E., Andersson K. S. Simvastatin-associated rhabdomyolysis after coadministration of macrolide antibiotics in two patients. *Pharmacotherapy.* 2007 Apr;27(4):603–7. doi: 10.1592/phco.27.4.603.
 28. Lea A. P., McTavish D. Atorvastatin. A review of its pharmacology and therapeutic potential in the management of hyperlipidaemias. *Drugs.* 1997 May;53(5):828–47. doi: 10.2165/00003495-199753050-00011.
 29. Schachter M. Chemical, pharmacokinetic and pharmacodynamic properties of statins: an update. *Fundam Clin Pharmacol.* 2005 Feb;19(1):117–25. doi: 10.1111/j.1472-8206.2004.00299.x.
 30. Donato M. T., Tolosa L., Gómez-Lechón M. J. Culture and Functional Characterization of Human Hepatoma HepG2 Cells. *Methods Mol Biol.* 2015;1250:77–93. doi: 10.1007/978-1-4939-2074-7_5.
 31. Louisa M., Suyatna F. D., Wanandi S. I., Asih P. B., Syafruddin D. Differential expression of several drug transporter genes in HepG2 and Huh-7 cell lines. *Adv Biomed Res.* 2016 Jun 8;5:104. doi: 10.4103/2277-9175.183664.
 32. Shitara Y. Clinical importance of OATP1B1 and OATP1B3 in drug-drug interactions. *Drug Metab Pharmacokinet.* 2011 Jun;26(3):220–7. doi: 10.2133/dmpk.DMPK-10-RV-094.
 33. Pahwa S., Alam K., Crowe A., Farasyn T., Neuhoof S., Hatley O., Ding K., Yue W. Pretreatment With Rifampicin and Tyrosine Kinase Inhibitor Dasatinib Potentiates the Inhibitory Effects Toward OATP1B1- and OATP1B3-Mediated Transport. *J Pharm Sci.* 2017 Aug;106(8):2123–2135. doi: 10.1016/j.xphs.2017.03.022.
 34. Lau Y. Y., Huang Y., Frassetto L., Benet L. Z. effect of OATP1B transporter inhibition on the pharmacokinetics of atorvastatin in healthy volunteers. *Clin Pharmacol Ther.* 2007 Feb;81(2):194–204. doi: 10.1038/sj.clpt.6100038.
 35. Erokhina P. D., Abalenikhina Yu. V., Shchulkin A. V., Chernykh I. V., Kotlyarova A. A., Pravkin S. K., Slepnev A. A., Yakusheva E. N. Study of influence of estradiol on the activity of P-glycoprotein in vitro. *Science of the young (Eruditio Juvenium).* 2020;8(3):329–36. (in Russ.) doi:10.23888/HMJ202083329–336.
 - Ерохина П. Д., Абаленихина Ю. В., Шулькин А. В., Черных И. В., Котлярова А. А., Правкин С. К., Сlepnev А. А., Якушева Е. Н. Изучение влияния эстрадиола на активность гликопротеина-P in vitro // *Наука молодых (Eruditio Juvenium).* 2020. Т. 8, № 3. С. 329–336. doi:10.23888/HMJ202083329–336
 36. Erokhina P. D., Abalenikhina Yu. V., Shchulkin A. V., Chernykh I. V., Popova N. M., Slepnev A. A., Yakusheva E. N. A study of influence of progesterone on activity of glycoprotein-P in vitro. *I. P. Pavlov Russian Medical Biological Herald.* 2020;28(2):135–42. (in Russ.) doi:10.23888/PAVLOVJ2020282135–142.
 - Ерохина П. Д., Абаленихина Ю. В., Шулькин А. В., и др. Изучение влияния прогестерона на активность Гликопротеина-P in vitro // *Российский медико-биологический вестник им. академика И. П. Павлова.* – 2020. – Т. 28. – № 2. – С. 135–142. doi: 10.23888/PAVLOVJ2020282135–142.