

УДК 615.357.015.45



ВЭЖХ-МЕТОДИКА КОЛИЧЕСТВЕННОГО АНАЛИЗА ФЕКСОФЕНАДИНА В ПЕЧЕНИ КРОЛИКОВ

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

Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования
«Рязанский государственный медицинский университет имени академика И.П. Павлова»
Министерства здравоохранения Российской Федерации
390026, Россия, Рязань, Высоковольная, 9

E-mail: p34-66@yandex.ru

Получено 19.11.2019

Рецензия (1) 02.12.2019

Рецензия (2) 20.12.2019

Принята к печати 30.12.2019

Исследование фармакокинетики маркерных субстратов белка-транспортера гликопротеина-P (Pgp, ABCB1-белка), к которым относится фексофенадин, является одним из способов оценки его функциональной активности.

Цель. Разработка ВЭЖХ-методики количественного определения фексофенадина в печени кроликов.

Материалы и методы. Количественное определение фексофенадина осуществляли с использованием хроматографической системы Stayer («Аквилон», Россия) с УФ детектором UVV 104. Применяли обращенно-фазную хроматографическую колонку Luna C18 100Å (250*4,6) с зернением 5 мкм при температуре 45°C. Определение концентрации фексофенадина проводили методом абсолютной калибровки по площади пиков.

Результаты. Исследование проводили в изократическом режиме. Состав подвижной фазы: вода деионизированная, ацетонитрил и ледяная уксусная кислота в соотношении 267,4:120:4,33, доведенные триэтиламино до pH=6,7. Пробоподготовка заключалась в гомогенизации 500 мг измельченной печени в 500 мкл воды очищенной с последующим центрифугированием (1750 g) и отбором надосадочной жидкости. Осаждение белка осуществлялось ацетонитрилом (2,5 мл), подкисленным 375 мкл кислоты хлористоводородной путем встряхивания на приборе Shaker (500 об./мин). Надосадочный слой переносили в отдельную пробирку, добавляли по 2 мл метилена хлористого, эфира диэтилового и этилацетата и повторно встряхивали 10 мин (при 500 об./мин). Затем центрифугировали (1750 g) и упаривали супернатант на роторно-вакуумном испарителе при 50°C. К сухому остатку добавляли 300 мкл подвижной фазы и 100 мкл инжигировали в хроматограф. Метод был валидирован в линейном диапазоне от 3 до 60 мкг/г фексофенадина с приемлемой внутри- и межцикловой точностью, прецизионностью и стабильностью. Методика была апробирована на кроликах после внутривенного введения им фексофенадина в дозе 11 мг/кг массы.

Заключение. Разработана ВЭЖХ-методика количественного определения фексофенадина в ткани печени кроликов, которая может использоваться для оценки функциональной активности Pgp в доклинических исследованиях.

Ключевые слова: гликопротеин-P, ABCB1-белок, фексофенадин, хроматография, фармакокинетика, кролики, печень

Список сокращений: Pgp – гликопротеин-P, ВЭЖХ – высокоэффективная жидкостная хроматография, об./мин – оборотов в минуту

HPLC METHODS OF FEXOFENADINE QUANTITATIVE ANALYSIS IN RABBITS' LIVER

P.Yu. Mylnikov, I.V. Chernykh, A.V. Shchulkin, N.M. Popova, E.N. Yakusheva

Ryazan State Medical University n. a. Acad. Pavlov
9, Vysokovoltynaya St., Ryazan, Russia, 390026

E-mail: p34-66@yandex.ru

Received 19 November 2019

Review (1) 2 December 2019

Review (2) 20 December 2019

Accepted 30 December 2019

Для цитирования: П.Ю. Мыльников, И.В. Черных, А.В. Шулькин, Н.М. Попова, Е.Н. Якушева. ВЭЖХ-методика количественного анализа фексофенадина в печени кроликов. *Фармация и фармакология*. 2020;8(1): 40-47. DOI: 10.19163/2307-9266-2020-8-1-40-47

© П.Ю. Мыльников, И.В. Черных, А.В. Шулькин, Н.М. Попова, Е.Н. Якушева, 2020

For citation: P.Yu. Mylnikov, I.V. Chernykh, A.V. Shchulkin, N.M. Popova, E.N. Yakusheva. HPLC methods of fexofenadine quantitative analysis in rabbits' liver. *Pharmacy & Pharmacology*. 2020;8(1): 40-47. DOI: 10.19163/2307-9266-2020-8-1-40-47

The investigation of pharmacokinetics of marker substrates of carrier protein P-glycoprotein (Pgp, ABCB1-protein) including fexofenadine, is one of the methods of its functional activity evaluation.

The aim of the study was to work out the HPLC methods of the quantitative determination of fexofenadine in rabbits' liver.

Materials and methods. The quantitative determination of fexofenadine was performed using Stayer chromatographic system (Akvilon, Russia) with UVV 104 ultraviolet detector. Reverse-phased chromatographic column Luna C18 100Å (250*4.6) was used with 5 µm granulation at 45°C. The concentration of fexofenadine was determined by methods of absolute peak area calibration.

Results. The work was conducted in the isocratic mode. The composition of the mobile phase consisted of deionized water, acetonitrile and glacial acetic acid at the ratio of 267.4:120:4.33 brought to pH=6.7 with triethylamine.

The sample processing was in the form of homogenization of 500 mg of ground liver in 500 µl of purified water with the subsequent centrifugation (1750 g) and selection of the supernatant. The proteins were precipitated by acetonitrile (2.5 ml) acidified with 375 µl of hydrochloric acid by shaking at 500 rev/min.

The supernatant was transported into a separate test tube, where methylene chloride, diethyl ether and ethyl acetate were added (2 ml each). Then the solution was again shaken for 10 minutes (500 rev/min). After that, the solution was centrifuged (1750 g) and the supernatant was evaporated on a rotor-vacuum evaporator at 50°C. 300 µl of the mobile phase was added to the dry residue, and 100 µl was injected into the chromatograph.

The method was validated in the linear range from 3 to 60 µg/g of fexofenadine with the acceptable intra- and intercycle accuracy, precision and stability. The method was tested on rabbits after the intravenous administration of fexofenadine at the dose of 11 mg/kg.

Conclusion. The HPLC methods of fexofenadine quantitative determination in the hepatic tissue of rabbits has been worked out. It can be used for the evaluation of the functional activity of Pgp in preclinical studies.

Keywords: P-glycoprotein, ABCB1-protein, fexofenadine, chromatography, pharmacokinetics, rabbits, liver

Abbreviations: Pgp – P-glycoprotein, HPLC – high performance liquid chromatography, rev/min – revolutions per minute

ВВЕДЕНИЕ

Гликопротеин-P (Pgp, ABCB1-белок) – эффлюксный АТФ-зависимый мембранный белок-транспортёр, осуществляющий удаление из клеток во внеклеточное пространство экзогенных и эндогенных веществ липофильной природы [1, 2]. Pgp обладает широкой субстратной специфичностью и транспортирует ряд лекарственных средств: сердечные гликозиды, гипотензивные, антиаритмические, противосудорожные, антибактериальные средства, антикоагулянты, цитостатики и другие группы препаратов [3].

Локализуясь на апикальной поверхности энтероцитов тонкого и толстого кишечника, данный транспортёр препятствует всасыванию субстратов, в эндотелиальных клетках гистогематических барьеров, предотвращает их проникновение в забарьерные органы, на билиарной поверхности гепатоцитов и апикальной поверхности эпителиоцитов почечных канальцев – способствует выведению субстратов в желчь и мочу соответственно [1, 4]. Таким образом, Pgp играет важную роль в фармакокинетике лекарственных веществ, являющихся его субстратами, участвуя в их всасывании, распределении и выведении.

Функционирование Pgp изменяется под влиянием множества факторов (гипоксические воздействия, гормональный фон, прием лекарственных средств), что может явиться причиной развития нежелательных лекарственных реакций при ингибировании транспортёра или снижения эффективности проводимой фармакотерапии при повышении его активности [5, 6].

Изучение функциональной активности Pgp позволит оптимизировать лекарственное лечение, в том числе прогнозировать развитие фармакокинетических межлекарственных взаимодействий [7]. Одним из способов оценки функционирования Pgp

in vivo является исследование фармакокинетики его маркерных субстратов в динамике [6, 8]. Маркерный субстрат – вещество, фармакокинетику которого (всасывание, распределение и выведение) определяет данный белок-транспортёр [6]. В качестве маркерного субстрата Pgp часто применяется H_1 -гистаминолитик III поколения – фексофенадин.

ВЭЖХ с УФ-детектированием является универсальным и доступным для большинства лабораторий методом количественного анализа в отличие от масс-спектрофотометрической детекции. Известны ВЭЖХ-методики определения концентраций фексофенадина в плазме крови и гомогенате головного мозга, которые используются для тестирования функциональной активности Pgp на уровне целостного организма и гематоэнцефалическом барьере [9–13]. Однако ВЭЖХ-методики количественного анализа фексофенадина в печени, которая позволит оценить активность белка-транспортёра данной локализации и его роль в возникновении межлекарственных взаимодействий на этапе выведения, в изученной нами литературе обнаружено не было.

ЦЕЛЬ ИССЛЕДОВАНИЯ – разработка ВЭЖХ-методики количественного определения маркерного субстрата Pgp – фексофенадина в печени кроликов.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Животные

В исследовании использовались кролики-самки породы Шиншилла массой 3200–3500 г. Животные были получены из питомника «Касимов-миагро» (г. Касимов, Рязанская область) и имели необходимые ветеринарные свидетельства. После доставки из питомника кролики были осмотрены ветеринарным врачом, проходили карантин в течение 14 суток, по-

сле чего содержались в конвекционном виварии ФГБОУ ВО РязГМУ Минздрава России [14].

Каждый кролик содержался в индивидуальной клетке на подстилке для лабораторных животных при искусственном освещении и продолжительности светового дня 12 ч. Температура в помещении поддерживалась на уровне $22\pm 1^\circ\text{C}$, относительная влажность воздуха – 45–65% [14]. Рацион питания кроликов соответствовал ГОСТ Р 50258-92. Все эксперименты с животными выполнялись в соответствии с международными правилами (Директива 86/609/ЕЕС) и правилами надлежащей лабораторной практики (приказ МЗ РФ № 199н от 01.04.16).

Протокол исследования был рассмотрен и утвержден на заседании Комиссии по контролю за содержанием и использованием лабораторных животных №11 от 28.01.2018.

Животных выводили из эксперимента передозировкой золетила («Золетил 100», «Virbac С.А.», Франция) в дозе 30 мг/кг массы и забирали образец печени. В качестве биологической матрицы использовался гомогенат печени интактных кроликов, полученной от 6 разных животных.

Для апробации методики печень извлекали через 5, 10, 15, 30, 60 мин после введения кроликам ($n=3$ на каждую временную точку) раствора фексофенадина (10 мг/мл) в ушную краевую вену в объеме 1,1 мл/кг. Приготовление раствора фексофенадина подробно описано в предыдущем исследовании [11]. Образцы печени хранили в морозильной камере при -29°C .

Оборудование

Количественное определение фексофенадина в гомогенате печени осуществляли с использованием хроматографической системы Stayer («Аквилон», Россия) с УФ-спектрофотометрическим детектором UVV 104, оснащенный петлевым краном-дозатором РЕЕК с петлей ввода на 100 мкл, автосемплером 7725i («Rheodyne», США), при длине волны 220 нм. Применяли обращенно-фазную хроматографическую колонку Luna C18 100Å (250*4,6) с зернением 5 мкм при температуре 45°C . Ввод проб в петлю хроматографа осуществляли шприцом «Microsyringes» (Германия).

В работе использовалось следующее вспомогательное оборудование: гомогенизатор Diax 9000 («Heidolph», Германия), центрифуга «Elmi CM 6M» (Elmi, Латвия), деионизатор «Водолей Д301» («Аквилон», Россия), роторно-вакуумный испаритель «VV – Micro» («Heidolph», Германия), встряхиватель пробирок «Shaker S 3.01» («Elmi», Латвия), встряхиватель лабораторный медицинский «Vortex» («Elmi», Латвия).

Материалы

В качестве стандарта применяли субстанцию фексофенадина гидрохлорида («Sigma», Lot: R032H0,

США; сертификат качества, количественное содержание фексофенадина гидрохлорида 99,2%).

Для экстракции фексофенадина из гомогената печени и приготовления подвижной фазы использовались реактивы: ацетонитрил «для ВЭЖХ» («Merck», Германия), кислота хлористоводородная ХЧ («Экос-1», Россия), кислота уксусная ледяная ХЧ («Экос-1», Россия), триэтиламин «для ВЭЖХ» («Lab-Skan», Польша), метилен хлористый «для ВЭЖХ» («Lab-Skan», Польша), этилацетат («Lab-Skan», Польша), эфир диэтиловый («Lab-Skan», Польша), вода деионизированная, полученная с помощью деионизатора «Водолей Д301» («Аквилон», Россия)

Валидация хроматографической методики

Валидацию биоаналитической методики выполняли согласно Руководству по экспертизе лекарственных средств, правилам проведения исследований биоэквивалентности лекарственных препаратов в рамках Евразийского экономического союза, руководствам EMA *Guideline on bioanalytical method validation*, 2011 и FDA *Guidance for Industry: Bioanalytical method validation (draft guidance)*. U.S. Department of Health and Human Services, Food and Drug Administration, Center for Drug Evaluation and Research (CDER). U.S. Government Printing Office: Washington, DC, 2013 по следующим параметрам: селективность, калибровочная кривая (линейность), точность, прецизионность, нижний предел количественного определения, перенос пробы, стабильность фексофенадина в гомогенате печени [15–17].

Определение содержания фексофенадина в гомогенате печени кроликов проводили методом абсолютной калибровки по площади пиков. Калибровочные растворы готовили путем добавления к смеси 400 мкл воды и 500 мкг (до гомогенизации) измельченного органа раствора стандарта вещества (100 мкл) в концентрациях 15, 60, 120, 180, 240 и 300 мкг/мл для получения соответственно проб с конечными концентрациями 3, 12, 24, 36, 48 и 60 мкг/г органа.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Условия хроматографии

Исследование проводили в изократическом режиме. Состав подвижной фазы: смесь воды деионизированной, ацетонитрила и ледяной уксусной кислоты в соотношении 267,4:120:4,33, доведенная триэтиламино до $\text{pH}=6,7$. Скорость потока – 1,0 мл/мин. Время удерживания фексофенадина в указанных условиях составило $17,14\pm 0,79$ мин.

Пробоподготовка

При разработке ВЭЖХ-методик количественного определения веществ в органах весьма проблематично достигнуть высокой степени их экстракции из клеток и чистоты пробы, что является немаловажным, поскольку высокое содержание в пробе балластных

соединений может привести к загрязнению хроматографической колонки и значительному уменьшению срока службы фильтра предколонки.

В данной работе мы изначально проводили пробоподготовку, используемую для извлечения фексофенадина из ткани головного мозга крыс [11], основанную на осаждении биоорганических молекул в гомогенате органа добавлением ацетонитрила. Несмотря на то, что удалось добиться высокой степени извлечения фексофенадина из клеток печени, при визуальной оценке готовой пробы обнаруживалась значительная мутность раствора, что свидетельствовало о наличии в нем соединений высокомолекулярной структуры.

При использовании методики экстракции фексофенадина, применяемой для плазмы крови [10], которая заключалась в добавлении к подкисленной плазме смеси равных объемов эфира диэтилового, метилена хлористого и этилацетата, полученная проба также оказывалась сильно загрязненной. Поэтому после попыток ее очистки центрифугированием, перед экстракцией была добавлена стадия осаждения белков при помощи ацетонитрила.

В ходе работы проверялась степень извлечения фексофенадина из гомогената печени в условиях кислой, нейтральной и щелочной реакций среды. Наиболее воспроизводимые данные получились при использовании смеси из эфира диэтилового, этилацетата и метилена хлористого при экстрагировании фексофенадина из подкисленной водно-ацетонитрильной вытяжки.

В дальнейшем проверяли экстрагируемость фексофенадина из водно-ацетонитрильной вытяжки при органической эфирной фазе различных объемов. Повышение ее объема до 6 мл приводило к незначительному увеличению степени экстракции фексофенадина, поэтому дальнейшее увеличение количества экстрагентов являлось нерациональным. В результате оптимальными оказались следующие условия пробоподготовки. Проводилась гомогенизация 500 мг измельченной ножницами печени в 500 мкл воды очищенной при 16000 об./мин на гомогенизаторе *Diax* 9000 в течение 1 мин с последующим центрифугированием при 1750 g и отбором надосадочной жидкости. Осаждение белков осуществлялось ацетонитрилом (2,5 мл), подкисленным 375 мкл кислоты хлористоводородной путем встряхивания на приборе *Shaker* при 500 об./мин в течение 10 мин. Надосадочный слой переносили в отдельную пробирку, добавляли по 2 мл метилена хлористого, эфира диэтилового и этилацетата и повторно встряхивали при 500 об./мин 10 мин. Затем центрифугировали при 1750 g 10 мин и упаривали супернатант на роторно-вакуумном испарителе при 50°C. Коэффициент экстракции фексофенадина составил 42,4%. К сухому остатку добавляли 300 мкл подвижной фазы и 100 мкл инжигировали в хроматограф.

Данные условия пробоподготовки позволили достичь воспроизводимого коэффициента экстракции фексофенадина, достаточного для построения калибровочных графиков и расчета основных валидационных характеристик методики.

Параметры пригодности хроматографической системы

Число теоретических тарелок составило более 3100, коэффициент асимметрии пика – не более 1,2.

Селективность хроматографической методики

При последовательном анализе пробы с концентрацией фексофенадина 60 мкг/г и образца чистого гомогената печени после пробоподготовки на хроматограмме интактного гомогената отсутствовали пики, соответствующие по времени удерживания пикам целевого вещества. Образцы полученных хроматограмм представлены на рисунке 1. Коэффициент разделения (разрешения) пика фексофенадина и ближайшего пика соэкстрактивных веществ вычислялся как разность времен удерживания указанных пиков, разделенных на сумму их широт на половине высот. Параметр составил более 2.

Калибровочная кривая

Для построения калибровочных графиков готовили 6 стандартных растворов фексофенадина в гомогенате печени кроликов следующих концентраций: 3, 12, 24, 36, 48 и 60 мкг/г, которые анализировались с построением калибровочного графика зависимости концентрации вещества от площади его хроматографического пика (рис. 2). Подобная процедура проводилась трижды – перед каждым последующим этапом хроматографирования, что необходимо в соответствии с рекомендациями [15–17]. Были получены следующие уравнения регрессии: $y = 0,0086 + 1,425x$, $R^2 = 0,9981$; $y = 0,0095 + 1,3598x$, $R^2 = 0,9989$; $y = 0,0092 + 1,1568x$, $R^2 = 0,9995$. Калибровочные графики и соответствующие им уравнения регрессии применялись для расчета межцикловых точности и прецизионности методики.

Коэффициенты корреляции составляли более 0,99. Отклонения концентраций калибровочных образцов, рассчитанные по трем уравнениям линейной зависимости, от номинальных значений, приведены в таблице 1.

Точность и прецизионность

Для анализа точности и прецизионности проводился анализ образцов интактного гомогената печени кроликов с добавлением стандартных растворов фексофенадина до получения концентраций 3, 12, 24 и 48 мкг/г.

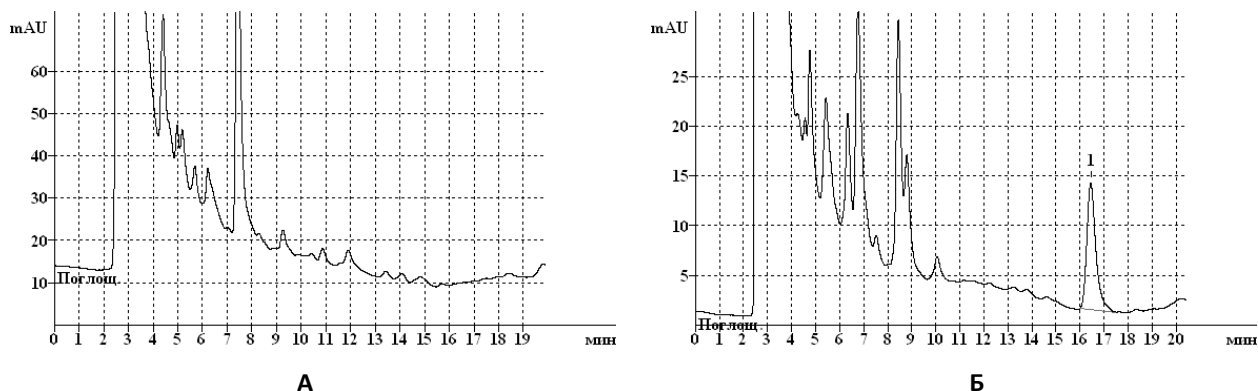


Рисунок 1 – Хроматограмма пробы гомогената печени
 Примечание: А – intactные; Б – с добавлением стандарта фексофенадина до концентрации 3 мкг/г

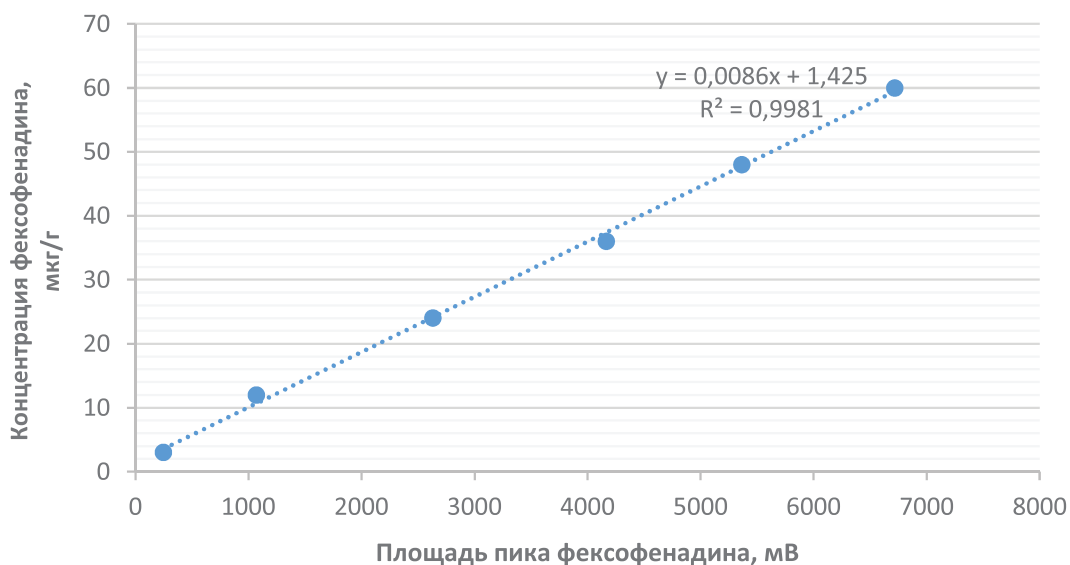


Рисунок 2 – Калибровочный график зависимости концентрации фексофенадина в гомогенате печени от площади его хроматографического пика

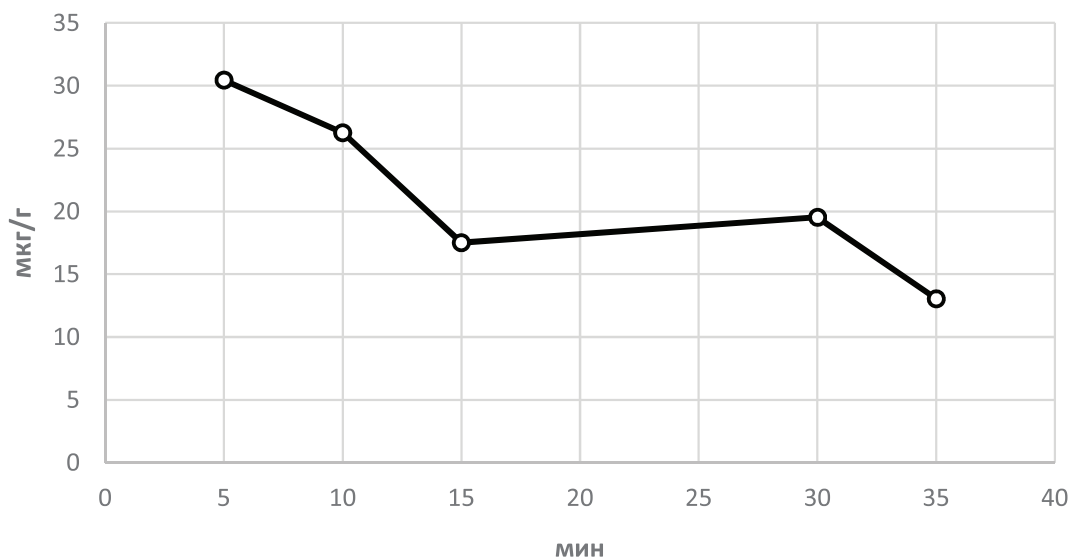


Рисунок 3 – Концентрация фексофенадина в печени после его внутривенного введения в дозе 11 мг/кг массы (n=3 на каждую временную точку, M±SD)

Таблица 1 – Отклонения концентраций калибровочных образцов фексофенадина, рассчитанные по уравнениям линейных зависимостей, от номинальных значений

Концентрация номинальная, мкг/г	График 1		График 2		График 3	
	Концентрация рассчитанная, мкг/г	Точность, %	Концентрация рассчитанная, мкг/г	Точность, %	Концентрация рассчитанная, мкг/г	Точность, %
3	3,56	18,57	3,53	17,53	3,41	13,65
12	10,63	11,46	11,50	4,13	11,28	6,03
24	24,06	0,26	23,23	3,20	24,53	2,20
36	37,25	3,48	36,51	1,42	36,02	0,07
48	47,57	0,90	48,86	1,79	48,68	1,41
60	59,21	1,31	59,27	1,22	60,02	0,03

Таблица 2 – Точность и прецизионность методики количественного определения фексофенадина в гомогенате печени кроликов внутри и между циклами

Концентрация номинальная, мкг/г	Концентрация средняя, мкг/г	Средняя точность, %	SD	Прецизионность, %
Внутри цикла				
3	3,52	17,20	0,053	1,52
12	10,85	9,60	0,23	2,16
24	23,80	5,35	1,45	6,09
48	44,92	6,42	0,94	2,10
Между циклами				
3	3,37	12,35	0,14	4,02
12	10,82	9,81	0,44	4,07
24	25,29	5,38	1,16	4,57
48	48,99	4,17	2,35	4,79

Величины прецизионности (относительного стандартного отклонения) и точности (относительной погрешности) соответствовали принятым нормам, не более 20% для нижнего предела количественного определения и не более 15% – для остальных точек [15–17] (табл. 2).

Нижний предел количественного определения

Нижний предел количественного определения методики оценивали на основании линейности, точности и прецизионности. За нижний предел количественного определения принималась минимальная концентрация фексофенадина в гомогенате печени в диапазоне линейной зависимости, для которой возможно определение вещества со значениями точности и прецизионности не более 20%. Нижний предел количественного определения методики составил 3 мкг/г для фексофенадина.

Отношение сигнал/шум по пикам фексофенадина на уровне нижнего предела количественного определения было не ниже 10. Предел обнаружения (детектирования) фексофенадина для данной методики составил около 1,6 мкг/г. Соотношение сигнал/шум составило около 3 [18].

Стабильность

Стабильность стандартных растворов фексофе-

надина оценивали путем их трехкратного хроматографирования после трех циклов замораживания/размораживания и разведения до концентраций 10 мкг/мл. Каждый цикл замораживания длился 24 часа в морозильной камере при -29°C и размораживании при комнатной температуре в течение двух часов. Достоверных различий между концентрациями фексофенадина до и после описанных манипуляций выявлено не было.

Для оценки стабильности фексофенадина в составе гомогената печени кроликов при хранении в замороженном состоянии готовили образцы в концентрации 48 мкг/г. Половину образцов анализировали сразу после приготовления, а остальные – после хранения в замороженном состоянии в течение 60 дней. Исследовали по 3 независимых образца. Средняя концентрация составила 46,44 мкг/г, средняя точность – 3,26%.

Перенос пробы

При последовательном анализе образца с концентрацией фексофенадина 48 мкг/г и образца холодного гомогената печени на хроматограмме образца чистого (интактного) гомогената печени отсутствовали пики, соответствующие по времени удерживания пику фексофенадина, что свидетельствует об отсутствии переноса пробы.

Апробация методики

Исследование фармакокинетики маркерных субстратов Pgp является ведущим методом изучения функционирования белка-транспортера *in vivo* [14]. Определение концентрации маркерного субстрата в крови после его однократного перорального введения характеризует функциональную активность Pgp на уровне целостного организма [6]. Однако, для более полной и тканеспецифичной оценки функционирования Pgp необходима разработка способов, позволяющих изучить функциональную активность транспортера локально в органах, ответственных за всасывание, распределение и выведение веществ. Для осуществления этого выполняется количественное определение концентрации маркерных субстратов в различных органах и тканях [11, 19].

Фексофенадин как маркерный субстрат обладает рядом преимуществ: не подвергается биотрансформации, не кумулирует в организме, обладает большой широтой терапевтического действия, не влияет на гемодинамику в печени, редко вызывает побочные реакции, доступную стоимость и безрецептурный отпуск из аптек [6, 9, 10]. Данный препарат выводится преимущественно с желчью (80%) [20], поэтому разработка методики его количественного определения в печени позволяет оценить функциональную активность транспортера в данном органе. Повышение концентрации фексофенадина в печени показывает ингибирование функциональной активности Pgp, снижение его уровня характеризует индукцию активности данного транспортера.

ФИНАНСОВАЯ ПОДДЕРЖКА

Работа поддержана грантом Российского фонда фундаментальных исследований № А 18-015-00259.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы декларируют отсутствие явных и потенциальных конфликтов интересов, о которых необходимо сообщить в связи с публикацией данной статьи.

АВТОРСКИЙ ВКЛАД

Все авторы в равной степени внесли свой вклад в исследовательскую работу.

БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЙ СПИСОК

1. Sharom F.J. The P-glycoprotein multidrug transporter // Essays. Biochem. 2011. V. 50. P. 161–178. DOI: 0.1042/bse0500161
2. Mollazadeh S., Sahebkar A., Hadizadeh F., Behravan J., Arabzadeh S. Structural and functional aspects of P-glycoprotein and its inhibitors [Text] // Life Sci. 2018. Vol. 214. P. 118–123. DOI: 10.1016/j.lfs.2018.10.048
3. Кукес В.Г., Грачев С.В., Сычев Д.А., Раменская Г.В. Метаболизм лекарственных средств. Научные основы персонализированной медицины: руководство для врачей. М.: ГЭОТАР-МЕДиа, 2008. 304 с.
4. Chufan E.E., Sim H.M., Ambudkar S.V. Molecular basis of the polyspecificity of P-glycoprotein (ABCB1): recent biochemical and structural studies // Adv. Cancer Res. 2015. Vol. 125. P. 71–96. DOI: 10.1016/bs.acr.2014.10.003
5. Черных И.В., Шулькин А.В., Гацаного М.В., Попова Н.М., Есенина А.С., Градинарь М.М., Якушева Е.Н. Функциональная активность гликопротеина-P на фоне ишемии головного мозга // Наука молодых - Eruditio Juvenium. 2019. Т. 7. № 1. С. 46–52. DOI: 10.23888/hmj20197146-52
6. Якушева Е.Н., Сычев Д.А., Шулькин А.В., Черных И.В., Мария Валериевна Гацаного М.В. Оценка принадлежности лекарственных препаратов к ингибиторам и индукторам белка-транспортера гликопротеина-P в эксперименте *in vivo* // Экспер.и клин. фармакол. 2018. Т. 81. № 1. С. 17–23.
7. Методические рекомендации по изучению биотрансформации и транспортеров новых лекарственных средств: дизайн исследований, анализ данных. Руководство по экспертизе лекарственных средств. Том III. М.: Гриф и К, 2014. 343 с.
8. U.S. Food and Drug Administration, Center for Drug Evaluation and Research. Guidance for industry: drug interaction studies study design, data analysis, implications for dosing, and labeling recommendations. URL: <http://www.fda.gov/downloads/Drugs/GuidanceComplianceRegulatoryInformation/Guidances/ucm292362.pdf> (дата обращения: 15.01.2018)

9. Раменская Г.В., Скуридина Е.А., Красных Л.М. Разработка методики количественного определения маркера активности Р-гликопротеина фексофенадина в плазме крови // Хим.-фарм. журн. 2006. Т. 40. № 12. С. 47–50.
10. Якушева Е.Н., Черных И.В., Щулькин А.В., Гацаного М.В. Разработка ВЭЖХ-методики количественного анализа фексофенадина в плазме крови // Фармакокинетика и фармакодинамика. 2017. № 2. С. 35–38.
11. Черных И.В., Щулькин А.В., Мыльников П.Ю., Гацаного М.В., Попова Н.М., Якушева Е.Н. Метод анализа функциональной активности гликопротеина-Р в гематоэнцефалическом барьере // Нейрохимия. 2019. Т. 36. № 1. С. 84–88. DOI: 10.1134/S1027813319010060
12. Bosilkovska M., Samer C.F., Déglon J., Rebsamen M., Staub C., Dayer P., Walder B., Desmeules J.A., Daali Y. Geneva cocktail for cytochrome P450 and P-glycoprotein activity assessment using dried blood spots // Clin. Pharmacol. Ther. 2014. Vol. 96. No 3. P. 349–359. DOI: 10.1038/clpt.2014.83
13. Mupparavaru R., Guttikar S., Rajappan M., Kamarajan K., Mullangi R. Sensitive LC-MS/MS-ESI method for simultaneous determination of montelukast and fexofenadine in human plasma: application to a bioequivalence study // Biomed. Chromatogr. 2014. Vol. 28. No 8. P. 1048–1056. DOI: 10.1002/bmc.3114
14. Руководство по содержанию и использованию лабораторных животных. Восьмое издание / пер. с англ. под ред. И.В. Белозерцевой, Д.В. Блинова, М.С. Красильщиковой. М.: ИРБИС, 2017. 336 с.
15. Изучение биоэквивалентности воспроизведенных лекарственных средств. Руководство по экспертизе лекарственных средств. Том I. М.: Гриф и К, 2013. 328 с.
16. Guidance for Industry: Bioanalytical method validation (draft guidance). U.S. Department of Health and Human Services, Food and Drug Administration, Center for Drug Evaluation and Research (CDER). U.S. Government Printing Office: Washington, DC, 2013. URL: <https://www.fda.gov/files/drugs/published/Bioanalytical-Method-Validation-Guidance-for-Industry.pdf> (дата обращения: 15.01.2018)
17. Guideline on bioanalytical method validation. European Medicines Agency. Committee for medicinal products for human use. London, 2011. URL: https://www.ema.europa.eu/en/documents/scientific-guideline/guideline-bioanalytical-method-validation_en.pdf (дата обращения: 15.01.2018)
18. Эпштейн Н.А. Оценка пригодности (валидация) ВЭЖХ методик в фармацевтическом анализе (обзор) // Хим.-фарм. журн. 2004. Т. 38. № 4. С. 40–56.
19. Якушева Е.Н., Черных И.В., Щулькин А.В., Гацаного М.В. Методика определения принадлежности лекарственных средств к числу субстратов гликопротеина-Р // Росс. мед.-биол. вестн. им. акад. И.П. Павлова. 2015. Т. 23. № 3. С. 49–53.
20. Molimard M., Diquet B., Benedetti M.S. Comparison of pharmacokinetics and metabolism of desloratadine, fexofenadine, levocetirizine and mizolastine in humans // Fund. & Clin. Pharmacol. 2004. Vol. 18. No 4. P. 399–411. DOI: 10.1111/j.1472-8206.2004.00254.x
21. Ballent M., Wilkens M.R., Mate L., Muscher A.S., Virkel G., Sallovitz J., Schröder B., Lanusse C., Lifschitz A. P-glycoprotein in sheep liver and small intestine: gene expression and transport efflux activity // J. Vet. Pharmacol. Ther. 2013. Vol. 36. No 6. P. 576–582. DOI: 10.1111/jvp.12040
22. Hagenbuch B., Gao B., Meier P.J. Transport of Xenobiotics Across the Blood-Brain Barrier // News Physiol. Sci. 2002. No 17. P. 231–234. DOI: 10.1152/nips.01402.2002
23. van Veen H.W., Margolles A., Muller M., Higgins C.F., Konings W.N. The homodimeric ATP-binding cassette transporter LmrA mediates multidrug transport by an alternating two-site (two-cylinder engine) mechanism // EMBO J. 2000. Vol. 19. P. 2503–2514.
24. Le Cluyse E.L. Pregnane X receptor: molecular basis for special differences in CYP3A induction by xenobiotics // Chem. Biol. Interact. 2001. Vol. 134. No 3. P. 283–289.
25. Moore L.B., Maglich J.M., McKee D.D., Wisely B., Willson T.M., Kliewer S.A., Lambert M.H., Moore J.T. Pregnane X receptor (PXR), constitutive androstane receptor (CAR), and benzoate X receptor (BXR) define three pharmacologically distinct classes of nuclear receptors // Mol. Endocrine. 2002. Vol. 16. No 5. P. 977–986. DOI: 10.1210/mend.16.5.0828

АВТОРЫ

Мыльников Павел Юрьевич – ассистент кафедры фармакологии с курсом фармации факультета дополнительного профессионального образования, ФГБОУ ВО Рязанский государственный медицинский университет им. акад. И.П. Павлова Минздрава России. ORCID: 0000-0001-7829-2494. E-mail: pavelmylnikov@mail.ru

Черных Иван Владимирович – кандидат биологических наук, заведующий кафедрой фармацевтической химии ФГБОУ ВО Рязанский государственный медицинский университет им. акад. И.П. Павлова Минздрава России. ORCID: 0000-0002-5618-7607. E-mail: ivchernykh88@mail.ru

Щулькин Алексей Владимирович – кандидат медицинских наук, доцент кафедры фармакологии с курсом фармации факультета дополнительного профессионального образования, ФГБОУ ВО Рязанский го-

сударственный медицинский университет им. акад. И.П. Павлова Минздрава России. ORCID: 0000-0003-1688-0017. E-mail: alekseyshulkin@rambler.ru

Попова Наталья Михайловна – кандидат медицинских наук, доцент кафедры фармакологии с курсом фармации факультета дополнительного профессионального образования, ФГБОУ ВО Рязанский государственный медицинский университет им. акад. И.П. Павлова Минздрава России. ORCID: 0000-0002-5166-8372. E-mail: p34-66@yandex.ru

Якушева Елена Николаевна – доктор медицинских наук, профессор, заведующая кафедрой фармакологии с курсом фармации факультета дополнительного профессионального образования ФГБОУ ВО Рязанский государственный медицинский университет им. акад. И.П. Павлова Минздрава России. ORCID: 0000-0001-6887-4888. E-mail: e.yakusheva@rzgmu.ru