

# МЕТОД АНАЛИЗА ПРИНАДЛЕЖНОСТИ ЛЕКАРСТВЕННЫХ ВЕЩЕСТВ К СУБСТРАТАМ И ИНГИБИТОРАМ БЕЛКА-ТРАНСПОРТЕРА ГЛИКОПРОТЕИНА-P *IN VITRO*

УДК 615.32

<https://doi.org/10.7816/RCF17171-78>© **Е.Н. Якушева, А.В. Шулькин, И.В. Черных, Н.М. Попова, А.А. Котлярова, А.А. Слепнев**

ФГБНУ ВО «Рязанский государственный медицинский университет им. акад. И.П. Павлова» Минздрава России, Рязань

Для цитирования: Якушева Е.Н., Шулькин А.В., Черных И.В., и др. 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. <https://doi.org/10.7816/RCF17171-78>

Поступила: 15.01.2019

Одобрена: 18.02.2019

Принята: 19.03.2019

В статье описаны современные подходы к тестированию лекарственных веществ на принадлежность к субстратам и ингибиторам белка-транспортера гликопротеина-P (Pgp, ABCB1-белок, MDR1-белок) согласно рекомендациям Управления по санитарному надзору за качеством пищевых продуктов и медикаментов (США) и Европейского агентства лекарственных средств. Представлены методики исследований *in vitro*

на клеточных линиях, гиперэкспрессирующих транспортер. Апробирована методика подобного исследования на линии клеток аденокарциномы ободочной кишки человека (Caco-2).

◆ **Ключевые слова:** гликопротеин-P; ABCB1-белок; субстраты; ингибиторы; тестирование *in vitro*; клеточная линия Caco-2.

## ASSESSMENT OF DRUGS BELONGING TO INHIBITORS AND INDUCTORS OF P-GLYCOPROTEIN *IN VITRO*

© **E.N. Yakusheva, A.V. Shchulkin, I.V. Chernykh, N.M. Popova, A.A. Kotlyarova, A.A. Slepnev**

Ryazan State Medical University, Ryazan, Russia

For citation: Yakusheva EN, Shchulkin AV, Chernykh IV, et al. Assessment of drugs belonging to inhibitors and inductors of p-glycoprotein *in vitro*. *Reviews on Clinical Pharmacology and Drug Therapy*. 2019;17(1):71-78. <https://doi.org/10.7816/RCF17171-78>

Received: 15.01.2019

Revised: 18.02.2019

Accepted: 19.03.2019

The article describes modern approaches for testing of drugs belonging to substrates and inhibitors of P-glycoprotein (Pgp, ABCB1-protein, MDR1-protein) according to the recommendations of Food and Drug Administration (United States) and European Medicines Agency.

*In vitro* methods on cell lines with hyperexpression of the transporter are presented. The same analysis was done on human colon adenocarcinoma cell line (Caco-2).

◆ **Keywords:** P-glycoprotein; ABCB1 protein; substrates; inhibitors; *in vitro* testing; Caco-2 cell line.

Нежелательные лекарственные реакции являются одной из основных причин госпитализаций, особенно у пожилых пациентов и лиц с полипрагмазией. По данным систематического обзора 45 исследований, в 2000–2013 гг., госпитализация в результате нежелательных лекарственных реакций встречалась в 7 % (2,4–14,9 %) случаев [7]. В развитии нежелательных лекарственных реакций важную роль играют межлекарственные взаимодействия на этапе фармакокинетики, в частности на уровне цитохромов P450 и белков-транспортеров.

Учитывая данные обстоятельства, с 1997 г. Управление по санитарному надзору за качеством пищевых продуктов и медикаментов (Food and Drug

Administration, FDA (США)) рекомендует все новые лекарственные средства тестировать на принадлежность к субстратам и ингибиторам семейств цитохромов P450, а с 2006 г. — к субстратам и ингибиторам белков-транспортеров [12]. Аналогичные рекомендации в Европейском агентстве лекарственных средств (European Medicines Agency, EMA) появились в 2013 г. [5].

Гликопротеин-P (P-glycoprotein, Pgp, ABCB1-белок, MDR1-белок) — АТФ-зависимый мембранный белок-транспортер, удаляющий из клеток широкий спектр лекарственных веществ — его субстратов [1]. По данным FDA, Pgp участвует в фармакокинетики около 50 % современных лекарственных средств [12], препятствуя их энтеральной абсорбции

и проникновению в органы, защищенные гистогематическими барьерами, а также способствуя их экскреции [2].

Согласно современным подходам [12], тестирование лекарственных средств на принадлежность к субстратам и ингибиторам Pgp осуществляется следующим образом. Первоначально исследование проводится *in vitro* на клеточных линиях, гиперэкспрессирующих Pgp [12]. Если в опытах *in vitro* устанавливают, что новое лекарственное средство является ингибитором белка-транспортера, то в дальнейшем его изучают в исследованиях *in vivo*. Если в опытах *in vitro* выявляют, что тестируемое вещество не влияет на активность Pgp, то дальнейшие исследования *in vivo* не требуются [12].

В настоящей статье описаны подходы для оценки принадлежности лекарственных средств к субстратам и ингибиторам Pgp *in vitro*.

## ОБЩИЕ ПОДХОДЫ К ТЕСТИРОВАНИЮ ЛЕКАРСТВЕННЫХ СРЕДСТВ НА ПРИНАДЛЕЖНОСТЬ К СУБСТРАТАМ ГЛИКОПРОТЕИНА-P *IN VITRO*

Исследования *in vitro* проводятся на клеточных линиях, гиперэкспрессирующих Pgp [12].

Клетки высеивают в специальную трансвелл-систему (transwell), состоящую из двух камер: апикальной и базолатеральной (рис. 1). Дно апикальной камеры представлено полупроницаемой мембраной, на которую высеивают используемые клетки. В дальнейшем клетки культивируют до образования монослоя. В ходе культивирования клетки полярно дифференцируются: на их апикальной мембране синтезируется Pgp, а базальная мембрана, контактирующая с мембраной трансвелл-системы, транспортер не содержит.

При оценке принадлежности тестируемого вещества к субстратам Pgp сначала оценивается его транспорт из апикальной камеры (камера — донор) в базолатеральную (камера — реципиент) — *a-b* транспорт. Для этого его добавляют в апикальную камеру, а затем через определенные временные интервалы забирают образцы из базолатеральной камеры для определения концентрации вещества. Этот транспорт происходит с помощью пассивной диффузии против работы Pgp.

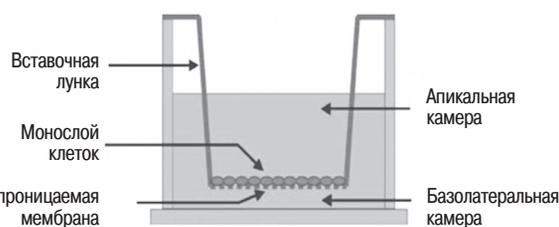


Рис. 1. Схематичное изображение трансвелл-системы

Затем оценивают транспорт тестируемого вещества из базолатеральной камеры в апикальную (*b-a* транспорт). Для этого его добавляют в базолатеральную камеру (камера — донор), а затем через определенные временные интервалы забирают образцы из апикальной камеры (камера-реципиент) для определения концентрации субстрата. Данный транспорт происходит как путем пассивной диффузии, так и с помощью белка-транспортера [4].

Транспорт вещества как из камеры *a* в камеру *b*, так и обратно оценивают по формуле [4]

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

где  $P_{app}$  — коэффициент кажущейся проницаемости (apparent permeability coefficient),  $dQ/dt$  — изменение концентрации вещества в камере реципиенте за время инкубации (мкмоль/л · с · см<sup>3</sup>),  $A$  — площадь полупроницаемой мембраны лунки в трансвелл-системе, на которой культивируются клетки (см<sup>2</sup>),  $C_0$  — начальная концентрация субстрата в камере-доноре (мкмоль/л).

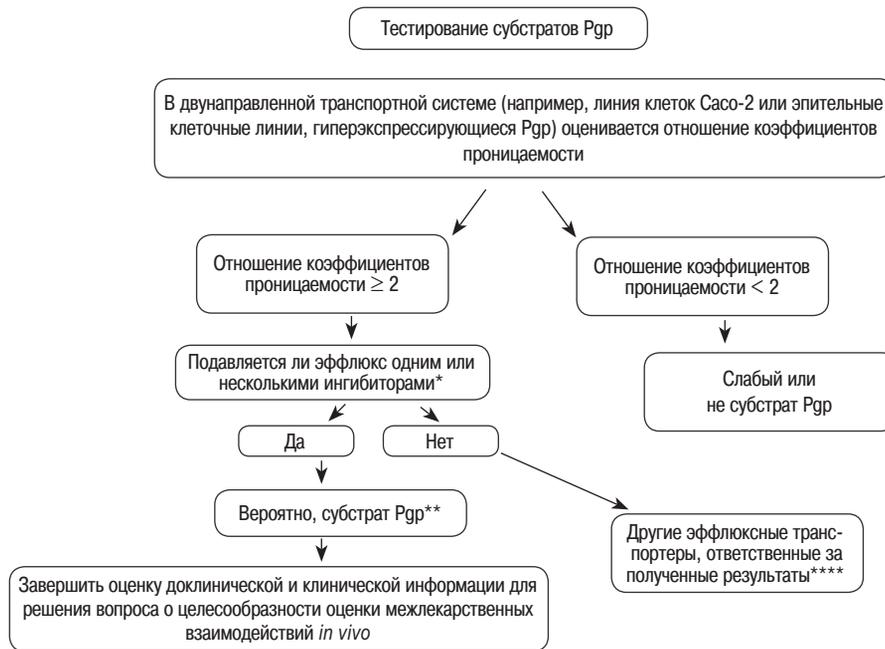
Далее рассчитывается отношение коэффициентов кажущейся проницаемости:  $P_{app} b-a$  к  $P_{app} a-b$ .

$$\text{Отношение коэффициентов} = \frac{P_{app} b-a}{P_{app} a-b}$$

Данный параметр является интегральным и оценивает общий вклад Pgp в транспорт веществ через билипидную мембрану (т. к. используется клеточная линия, гиперэкспрессирующая именно данный белок-транспортер).

При отношении коэффициентов более 2 можно говорить об участии Pgp в транспорте. В противном случае транспорт вещества происходит преимущественно путем пассивной диффузии (рис. 2).

Для окончательного подтверждения роли Pgp в транспорте изучаемого вещества (при значении отношения коэффициентов кажущейся проницаемости, превышающем 2), выполняют транспортные эксперименты с добавлением специфического ингибитора транспортера с расчетом коэффициентов кажущейся проницаемости  $P_{app} b-a$ ,  $P_{app} a-b$  и их отношения. Если на фоне добавления известного ингибитора Pgp происходит снижение коэффициентов кажущейся проницаемости  $P_{app} b-a$  и отношение коэффициентов  $P_{app} b-a$  к  $P_{app} a-b$ , делают заключение о принадлежности тестируемого вещества к субстратам транспортера. Если на фоне добавления ингибитора Pgp эти показатели не изменяются, данный белок-транспортер не играет существенной роли в транспорте тестируемого вещества, а его перемещение осуществляется други-



**Рис. 2.** Схема тестирования веществ на принадлежность к субстратам Pgp по Giacomini K.M. et al., 2010 [6]. *Примечание.* \* снижение эффлюкса на 50 % и более; \*\* дополнительные данные и роли Pgp в общем клиренсе препарата; \*\*\* исследования с селективными ингибиторами Pgp (например, верапамилом, итраконазолом); \*\*\*\* BCRP — Breast Cancer Resistance Protein; Pgp — P-glycoprotein, гликопротеин-P

ми транспортерами, например белок устойчивости к раку молочной железы (BCRP, ABCG2) (рис. 2).

## ОБЩИЕ ПОДХОДЫ К ТЕСТИРОВАНИЮ ЛЕКАРСТВЕННЫХ СРЕДСТВ НА ПРИНАДЛЕЖНОСТЬ К ИНГИБИТОРАМ ГЛИКОПРОТЕИНА-P *IN VITRO*

В ходе тестирования лекарственных веществ на принадлежность к ингибиторам Pgp первоначально оценивается транспорт известного субстрата данного белка-транспортера из апикальной камеры в базолатеральную ( $a-b$  транспорт). Для этого субстрат добавляется в апикальную камеру, а затем через определенные временные интервалы образцы забираются из базолатеральной камеры для определения концентрации субстрата.

На следующем этапе оценивается транспорт субстрата Pgp из базолатеральной камеры в апикальную ( $b-a$  транспорт). Для этого субстрат добавляется в базолатеральную камеру, а затем через определенные временные интервалы образцы забираются из апикальной камеры для определения концентрации субстрата [4].

Коэффициенты кажущейся проницаемости  $Papp\ b-a$ ,  $Papp\ a-b$  и их отношение рассчитываются по представленным выше формулам [4].

В дальнейшем проводят аналогичные эксперименты с добавлением различных concentra-

ций тестируемого вещества в апикальную и базолатеральную камеры. Оценивают  $Papp\ b-a$ ,  $Papp\ a-b$  и отношение  $Papp\ b-a$  к  $Papp\ a-b$  для субстрата Pgp в присутствии тестируемого вещества.

На основе полученных данных рассчитывают  $IC_{50}$  (концентрацию полумаксимального ингибирования) или константу ингибирования ( $K_i$ ) для тестируемого вещества.

Для прогнозирования клинической значимости полученных значений  $IC_{50}$  и  $K_i$  используются следующие формулы [3]:

$$[I]_1/IC_{50} \text{ (или } K_i) \text{ или } [I]_2/IC_{50} \text{ (или } K_i),$$

где  $[I]_1$  — среднее арифметическое  $C_{max}$  (свободная и связанная фракция) после введения тестируемого вещества в максимальной разовой дозе,  $[I]_2$  — доза ингибитора в моль/250 мл (где 250 мл — стандартный объем воды, используемый в фармакокинетических исследованиях).

При этом первая формула применяется для прогнозирования ингибирования Pgp на уровне целостного организма (в печени, желудочно-кишечном тракте, почках, гистогематических барьерах), а вторая — для прогнозирования ингибирования транспортера локально в желудочно-кишечном тракте при пероральном приеме тестируемого вещества.

Значения  $[I]_1/IC_{50}$  (или  $K_i$ )  $\geq 0,1$  и  $[I]_2/IC_{50}$  (или  $K_i$ )  $\geq 10$  свидетельствуют о клинической значимости ингиби-



**Рис. 3.** Схема тестирования веществ на принадлежность к субстратам Pgp по Giacomini K.M. et al., 2010 [6]. *Примечание.* Pgp — гликопротеин-P,  $IC_{50}$  — концентрация полумаксимального ингибирования,  $K_i$  — константа ингибирования,  $[I]_1$  — среднее арифметическое  $C_{max}$  (свободная и связанная фракция) после введения тестируемого вещества в максимальной разовой дозе,  $[I]_2$  — доза ингибитора в моль/250 мл

рования активности Pgp и необходимости проведения исследований *in vivo* на людях (Рис. 3).

Значения  $[I]_1/IC_{50}$  (или  $K_i$ )  $< 0,1$  и  $[I]_2/IC_{50}$  (или  $K_i$ )  $< 10$  свидетельствуют об отсутствии клинической значимости ингибирования Pgp и не требуют дальнейших исследований *in vivo* (рис. 3) [9].

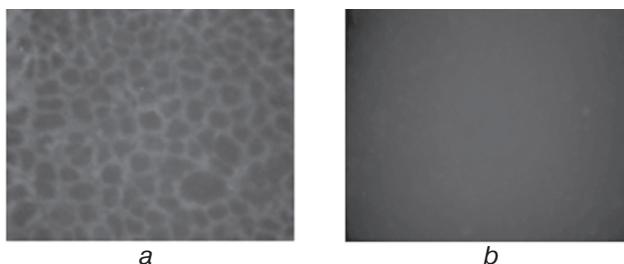
При этом стоит обратить внимание на тот факт, что в ходе тестирования *in vitro* можно обнаружить только прямые ингибиторы Pgp, т. е. вещества, снижающие активность белка-транспортера за счет непосредственного взаимодействия с его молекулой. В то же время если вещество воздействует на активность Pgp опосредованно (косвенно), например, изменяя гормональный фон человека или животного, то данное влияние можно обнаружить только в опытах *in vivo*, что в настоящее время не учитывается в международных рекомендациях (рис. 3).

Использование линии клеток Сасо-2 для тестирования лекарственных средств на принадлежность к субстратам и ингибиторам Pgp *in vitro*

В наших исследованиях для тестирования лекарственных веществ на принадлежность к субстратам и ингибиторам Pgp *in vitro* мы используем линию клеток Сасо-2 (клетки аденокарциномы ободочной кишки человека). Данная клеточная линия закуплена в ФГБУН «Институт цитологии» РАН (Санкт-Петербург) а им была получена из АТСС (American Type Culture Collection, США). Клетки линии Сасо-2 обладают высоким морфологическим и функциональным сходством с кишечными (абсорбирующими) энтероцитами человека [8].

Для подтверждения наличия Pgp в клетках линии Сасо-2 выполнено иммуноцитохимическое исследование с помощью первичных и вторичных антител. Выявлено иммунопозитивное окрашивание мембран клеток, что подтверждает наличие данного белка-транспортера в клетках используемой клеточной линии (рис. 4).

Клетки культивируются при 37 °С и 5 % содержания  $CO_2$  в Дульбекко модифицированной среде



**Рис. 4.** Иммуноцитохимическое окрашивание Pgp-позитивных мембран клеток линии Сасо-2 на 22-е сутки культивирования, увеличение 400 раз: *a* — с использованием первичных антител; *b* — негатив, без первичных антител. *Примечание.* Pgp — P-glycoprotein, гликопротеин-P

Игла (Dulbecco's Modified Eagle Medium, DMEM), содержащей глюкозу (4500 мг/л), L-глутамин (4 ммоль/л), 15 % бычьей сыворотки и по 100 ЕД/мл и 100 мкг/мл пенициллина и стрептомицина соответственно. По достижении 70–90 % конfluenceности клетки пересеиваются (обработка раствором трипсин-ЭДТА — 0,25 % трипсин и 0,2 % ЭДТА) на полупроницаемую мембрану лунок трансвелл-системы, состоящую из двух камер: апикальной и базолатеральной (рис. 1) с плотностью  $10^5/\text{см}^2$  (или 33 000 клеток/ячейка). Дно апикальной камеры представляет собой полупроницаемую мембрану, на которую высеиваются клетки. В работе использовался 24-луночный планшет с полупроницаемой мембраной диаметром 0,33 см и диаметром пор 0,4 мкм (24 mm Transwell®-COL Collagen-Coated 0.4  $\mu\text{m}$  Pore PTFE Membrane Insert, Sterile).

После засеивания клеток на полупроницаемую мембрану трансвелл-системы их культивируют в течение 21 суток, поскольку именно на данном сроке происходит их спонтанная дифференцировка в структуру, подобную кишечному эпителию [8]. Следует отметить, что клетки также приобретают полярную ориентацию: поверхность, обращенная в сторону апикальной камеры, соответствует апикальной поверхности энтероцитов, а поверхность, обращенная к базолатеральной камере, — базальной.

Через 21 сутки при формировании монослоя с плотными клеточными контактами трансвелл-система, содержащая клетки линии Caco-2, используется для проведения транспортных экспериментов.

Целостность монослоя и плотность межклеточных контактов оценивается по уровню трансэпителиального сопротивления (trans epithelial electrical resistance, TEER). По достижении трансэпителиального сопротивления выше  $500 \text{ мОм} \cdot \text{см}^2$  (рис. 5), которое происходит обычно через 21 день, на клетках можно выполнять транспортные эксперименты [11].

Для оценки адекватности используемой клеточной линии проведены транспортные эксперименты с классическим субстратом Pgp — фексофенадином и его ингибиторами — верапамилом и хинидином.

Для выполнения транспортных экспериментов питательная среда заменялась транспортной средой, представляющей собой раствор Хэнкса с добавлением 25 ммоль/л Хепес при pH 7,4 и 1 % диметилсульфоксида.

На первом этапе проведено контрольное исследование: оценивался транспорт классического субстрата Pgp — фексофенадина (Sigma, США) без добавления верапамила и хинидина на 22-е и 90-е сутки культивирования клеток.

Для этого фексофенадин добавлялся в апикальную камеру (камера-донор) в концентрации 150 мкмоль/л [10], затем через 1, 2 и 3 часа производился забор по 50 мкл образцов транспортной среды из базолатеральной камеры (камера-реципиент) с последующим определением концентрации маркерного субстрата (*a–b* транспорт).

Затем оценивался транспорт фексофенадина из базолатеральной в апикальную камеру (*b–a* транспорт). Для этого субстрат в аналогичной концентрации добавлялся в базолатеральную камеру, а через 1, 2 и 3 часа по 50 мкл образцов среды забирались из апикальной камеры.

На следующем этапе оценивалось влияние классических ингибиторов Pgp — верапамила (Sigma, США) и хинидина (Sigma, США) на транспорт фексофенадина. Для этого ингибиторы в различных концентрациях добавлялись за 30 мин до начала эксперимента в обе камеры (апикальную и базолатеральную) независимо от направления транспорта фексофенадина, который в дальнейшем анализировался.

Концентрации фексофенадина в транспортной среде определялись методом высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) с ультра-

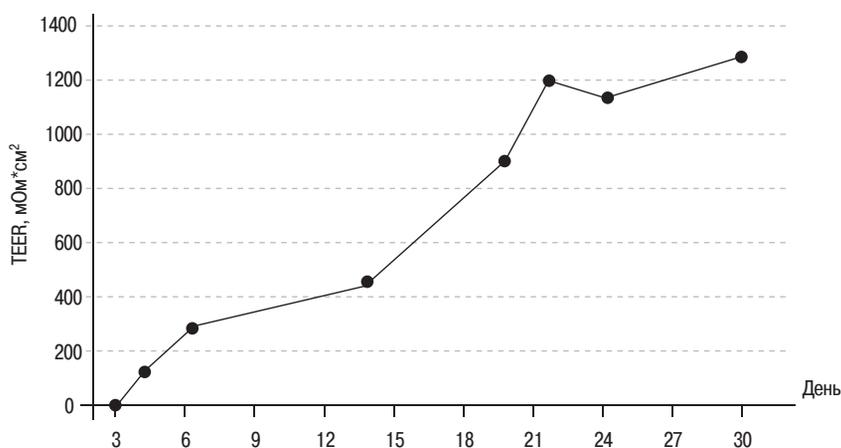


Рис. 5. Изменение трансэпителиального сопротивления (trans epithelial electrical resistance, TEER) монослоя клеток линии Caco-2,  $\text{мОм} \cdot \text{см}^2$

■ Таблица 1. Транспорт фексофенадина в концентрации 150 мкмоль/л через билипидную мембрану клеток линии Сасо-2 в норме и при добавлении хинидина 10 мкмоль/л и верапамила 10 мкмоль/л ( $M \pm SD$ , см/с)

	$P_{app} b-a$	$P_{app} a-b$	$P_{app} (b-a) / P_{app} (a-b)$
Контроль 22-е сутки ( $n = 3$ )	$3,79 \cdot 10^{-6} \pm 0,34 \cdot 10^{-6}$	$0,64 \cdot 10^{-6} \pm 0,21 \cdot 10^{-6}$	$6,27 \pm 1,70$
Контроль 90-е сутки ( $n = 3$ )	$4,99 \cdot 10^{-6} \pm 1,03 \cdot 10^{-6}$	$0,99 \cdot 10^{-6} \pm 0,19 \cdot 10^{-6}$	$5,03 \pm 0,36$
Хинидин ( $n = 3$ )	$3,18 \cdot 10^{-6} \pm 0,23 \cdot 10^{-6}$ *	$0,96 \cdot 10^{-6} \pm 0,03 \cdot 10^{-6}$	$3,51 \pm 0,86$ *
Верапамил ( $n = 3$ )	$3,86 \cdot 10^{-6} \pm 0,20 \cdot 10^{-6}$	$0,92 \cdot 10^{-6} \pm 0,14 \cdot 10^{-6}$	$4,26 \pm 0,44$ *

Примечание. \*  $p < 0,05$  – достоверные различия с показателями контроля на 22-е и 90-е сутки.

фиолетовым детектированием при длине волны 220 нм. Исследование выполнялось на ВЭЖХ хроматографе «Стайер» (Россия) по оригинальной методике.

Полученная проба транспортной среды (50 мкл), содержащая фексофенадин, разводилась в 150 мкл подвижной фазы, и 100 мкл полученного раствора вводились в хроматограф.

При анализе использовалась хроматографическая колонка Phenomenex Synergi 4u Polar-RP 80A (250 × 4,6) с зернением 4 мкм. Температура разделения — 45 °С. Скорость потока — 1 мл/мин. Состав подвижной фазы: ацетонитрил (128 мл), вода деионизированная (267,4 мл), кислота уксусная ледяная (6,33 мл), триэтиламин до pH = 6,7. Время удерживания фексофенадина в данных условиях составляло 12,8 мин. Количественное определение проводилось методом абсолютной калибровки по площади пиков. Аналитический диапазон методики составлял 1,2–57,4 мкмоль/л.

В ходе выполнения исследования были получены следующие результаты.

Коэффициент кажущейся проницаемости фексофенадина  $b-a$  на 22-е сутки культивирования составил  $3,79 \cdot 10^{-6} \pm 0,34 \cdot 10^{-6}$  см/с, коэффициент кажущейся проницаемости фексофенадина  $a-b$  равнялся  $0,64 \cdot 10^{-6} \pm 0,21 \cdot 10^{-6}$  см/с, а их отношение —  $6,27 \pm 1,70$  (табл. 1). Полученное отношение коэффициентов составило более 2, что свидетельствует об активном транспорте вещества с участием Pgp и согласуется с литературными данными.

На 90-е сутки культивирования клеток при выполнении транспортных экспериментов без добавления ингибиторов изучаемые показатели достоверно не отличались от значений на 22-е сутки, что свидетельствует об отсутствии изменений активности изучаемого белка-транспортера при данном сроке эксперимента и возможно-

сти использования клеточной линии Сасо-2 для транспортных экспериментов на протяжении всего срока.

Добавление в транспортную среду хинидина (ингибитор Pgp) в концентрации 10 мкмоль/л приводило к снижению коэффициента кажущейся проницаемости фексофенадина  $b-a$  на 27,6 % ( $p = 0,026$ ) и отношения коэффициентов  $b-a$  к  $a-b$  на 37,9 % ( $p = 0,025$ ) по сравнению с показателями контроля на 22-е и 90-е сутки (табл. 1).

Верапамил (ингибитор Pgp) в концентрации 10 мкмоль/л снижал отношение коэффициентов  $b-a$  к  $a-b$  на 24,6 % ( $p = 0,05$ ) по сравнению со значениями без добавления ингибитора (табл. 1).

Полученные результаты свидетельствуют о том, что хинидин и верапамил снижают активность Pgp, что согласуется с литературными данными.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, проанализированы зарубежные рекомендации по анализу принадлежности лекарственных веществ к субстратам и ингибиторам белка-транспортера — гликопротеина-P *in vitro* и апробирована методика подобного исследования на линии клеток Сасо-2, полученной из ФГБУН ИНЦ РАН (Санкт-Петербург) с использованием фексофенадина в качестве субстрата, хинидина и верапамила в качестве ингибитора и индуктора транспортера соответственно.

Работа поддержана грантами РФФИ № 18-315-00159 мол\_а и № 18-415-623001 р\_мол\_а.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Якушева Е.Н., Титов Д.С. Структура и функционирование белка множественной лекарственной

- устойчивости 1 // Биохимия. – 2018. – Т. 83. – № 8. – С. 1148–1172. [Yakusheva EN, Titov DS. Structure and Function of Multidrug Resistance Protein 1. *Biochemistry*. 2018;83(8):1148–1172. (In Russ.)] <https://doi.org/10.1134/S0320972518080043>.
2. Якушева Е.Н., Щулькин А.В., Попова Н.М., и др. Структура, функции гликопротеина-P и его значение для рациональной фармакотерапии // Обзоры по клинической фармакологии и лекарственной терапии. – 2014. – Т. 12. – № 2. – С. 3–11. [Yakusheva EN, Shulkin AV, Popova NM, et al. Structure, functions of P-glycoprotein and its role in rational pharmacotherapy. *Reviews on clinical pharmacology and drug therapy*. 2014;12(2):3-11. (In Russ.)]. <https://doi.org/10.17816/RCF1223-11>.
  3. Agarwal S, Arya V, Zhang L. Review of P-gp inhibition data in recently approved new drug applications: utility of the proposed [I(1)]/IC(50) and [I(2)]/IC(50) criteria in the P-gp decision tree. *J Clin Pharmacol*. 2013;53(2):228-233. <https://doi.org/10.1177/0091270011436344>.
  4. Elsby R, Surry DD, Smith VN, Gray AJ. Validation and application of Caco-2 assays for the in vitro evaluation of development candidate drugs as substrates or inhibitors of P-glycoprotein to support regulatory submissions. *Xenobiotica*. 2008;38(7-8):1140-1164. <https://doi.org/10.1080/00498250802050880>.
  5. European medicines agency. Guideline on the investigation of drug interactions [Internet]. 2012 [cited 2019 Mar 20]. Available from: [https://www.ema.europa.eu/documents/scientific-guideline/guideline-investigation-drug-interactions\\_en.pdf](https://www.ema.europa.eu/documents/scientific-guideline/guideline-investigation-drug-interactions_en.pdf).
  6. Giacomini KM, Huang SM, Tweedie DJ, et al. Membrane transporters in drug development. *Nat Rev Drug Discov*. 2010;9(3):215-236. <https://doi.org/10.1038/nrd3028>.
  7. Al Hamid A, Ghaleb M, Aljadhey H, Aslanpour Z. A systematic review of hospitalization resulting from medicine-related problems in adult patients. *Br J Clin Pharmacol*. 2014;78(2):202-217. <https://doi.org/10.1111/bcp.12293>.
  8. Hilgers AR, Conradi RA, Burton PS. Caco-2 Cell Monolayers as a Model for Drug Transport Across the Intestinal Mucosa. *Pharm Res*. 1990;7(9):902-910. <https://doi.org/10.1023/a:1015937605100>.
  9. Huang SM, Zhang L, Giacomini KM. The International Transporter Consortium: a collaborative group of scientists from academia, industry, and the FDA. *Clin Pharmacol Ther*. 2010;87(1):32-36. <https://doi.org/10.1038/clpt.2009.236>.
  10. Petri N, Tannergren C, Rungstad D, Lennernäs H. Transport Characteristics of Fexofenadine in the Caco-2 Cell Model. *Pharm Res*. 2004;21(8):1398-1404. <https://doi.org/10.1023/B:PHAM.0000036913.90332.b1>.
  11. Srinivasan B, Kolli AR, Esch MB, et al. TEER measurement techniques for in vitro barrier model systems. *J Lab Autom*. 2015;20(2):107-126. <https://doi.org/10.1177/2211068214561025>.
  12. U.S. Department of Health and Human Services, Food and Drug Administration, Center for Drug Evaluation and Research. In Vitro Metabolism and Transporter-Mediated Drug-Drug Interaction Studies Guidance for Industry [Internet]. 2017 [cited 2019 Mar 20]. Available from: <https://www.fda.gov/downloads/Drugs/Guidances/UCM581965.pdf>.

## ♦ Информация об авторах

Елена Николаевна Якушева — д-р мед. наук, профессор, заведующая кафедрой фармакологии с курсом фармации. ФГБНУ ВО «Рязанский государственный медицинский университет им. академика И.П. Павлова» Минздрава России, Рязань. E-mail: e.yakusheva@rzgmu.ru.

Алексей Владимирович Щулькин — канд. мед. наук, доцент кафедры фармакологии с курсом фармации ФДПО. ФГБНУ ВО «Рязанский государственный медицинский университет им. академика И.П. Павлова» Минздрава России, Рязань. E-mail: alekseyshulkin@rambler.ru.

Иван Владимирович Черных — канд. биол. наук, ассистент кафедры общей и фармацевтической химии. ФГБНУ ВО «Рязанский государственный медицинский университет им. академика И.П. Павлова» Минздрава России, Рязань. E-mail: ivchernykh88@mail.ru.

Наталья Михайловна Попова — канд. мед. наук, старший преподаватель кафедры фармакологии с курсом фармации ФДПО. ФГБНУ ВО «Рязанский государственный медицинский университет им. академика И.П. Павлова» Минздрава России, Рязань. E-mail: p34-66@yandex.ru.

## ♦ Information about the authors

Elena N. Yakusheva — MD, PhD, Professor, Head of Pharmacology Department with Course of Pharmacy of Continuing Professional Education Faculty. Ryazan State Medical University, Ryazan, Russia. E-mail: e.yakusheva@rzgmu.ru.

Aleksey V. Shchulkin — MD, PhD, Assistant Professor of Pharmacology Department with Course of Pharmacy of Continuing Professional Education Faculty. Ryazan State Medical University, Ryazan, Russia. E-mail: alekseyshulkin@rambler.ru.

Ivan V. Chernykh — PhD in Biological sciences, Assistant of the Department of General Chemistry and Pharmacology. Ryazan State Medical University, Ryazan, Russia. E-mail: ivchernykh88@mail.ru.

Natalia M. Popova — MD, PhD, Senior Teacher of Pharmacology Department with Course of Pharmacy of Continuing Professional Education Faculty. Ryazan State Medical University, Ryazan, Russia. E-mail: p34-66@yandex.ru.

♦ Информация об авторах

*Анна Анатольевна Котлярова* — ассистент кафедры фармакологии с курсом фармации ФДПО. ФГБНУ ВО «Рязанский государственный медицинский университет им. академика И.П. Павлова» Минздрава России, Рязань. E-mail: kaa.rz@yandex.ru.

*Александр Александрович Слепнев* — канд. биол. наук, доцент кафедры фармакологии с курсом фармации ФДПО. ФГБНУ ВО «Рязанский государственный медицинский университет им. академика И.П. Павлова» Минздрава России, Рязань. E-mail: a.slepnev@rzgmu.ru.

♦ Information about the authors

*Anna A. Kotlyarova* — Assistant of Pharmacology Department with Course of Pharmacy of Continuing Professional Education Faculty. Ryazan State Medical University, Ryazan, Russia. E-mail: kaa.rz@yandex.ru.

*Alexandr A. Slepnev* — PhD in Biological sciences, Assistant Professor of Pharmacology Department with Course of Pharmacy of Continuing Professional Education Faculty. Ryazan State Medical University, Ryazan, Russia. E-mail: a.slepnev@rzgmu.ru.