

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.

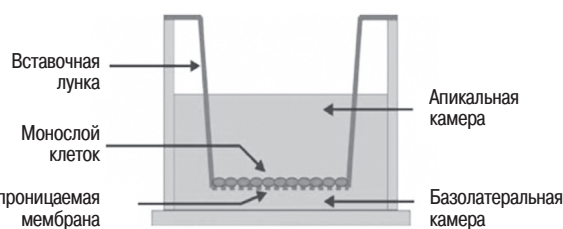


Рис. 1. Схематическое изображение трансвелл-системы

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 · см³), A — площадь полупроницаемой мембраны лунки в трансвелл-системе, на которой культивируются клетки (см²), 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-

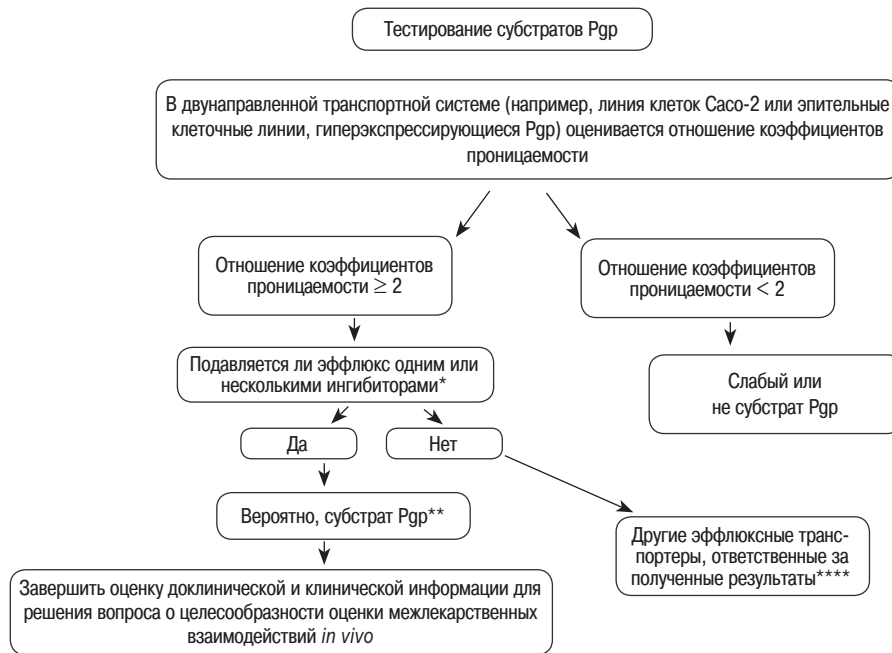


Рис. 2. Схема тестирования веществ на принадлежность к субстратам Pgp по Giacomini K.M. et al., 2010 [6].
Примечание. * снижение эффлюкса на 50 % и более; ** дополнительные данные и роли Pgp в общем клиренсе препарата; *** исследования с селективными ингибиторами Pgp (например, верапамилом, итраконазолом); **** 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) ≥ 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

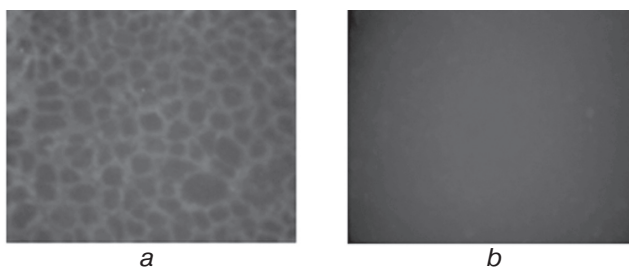


Рис. 4. Иммуноцитохимическое окрашивание Pgp-позитивных мембран клеток линии Сасо-2 на 22-е сутки культивирования, увеличение 400 раз: *a* — с использованием первичных антител; *b* — негатив, без первичных антител. *Примечание.* Pgp — P-glycoprotein, гликопротеин-P

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 μm 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-

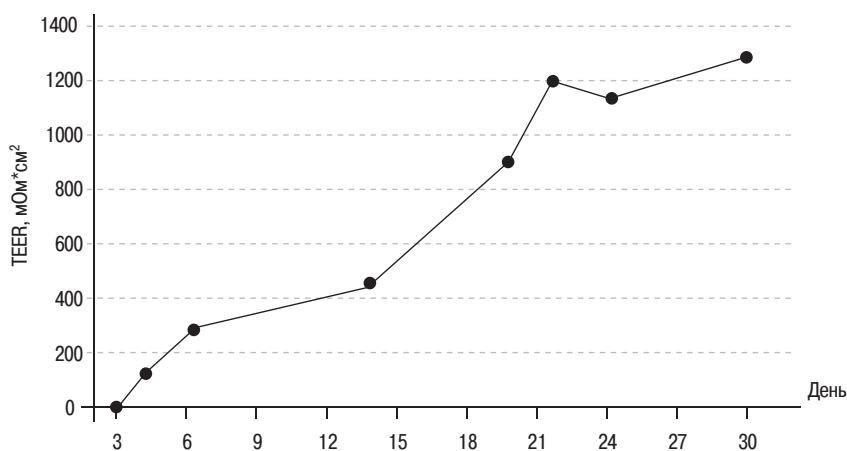


Рис. 5. Изменение трансэпителиального сопротивления (trans epithelial electrical resistance, TEER) монослоя клеток линии Caco-2, мОм · см²

■ 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.
 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.