

И.Е. Шохин,

к.фарм.н., ассистент кафедры фармацевтической и токсикологической химии Первого МГМУ им. И.М. Сеченова

Г.В. Раменская,

д.фарм.н., профессор, заведующая кафедрой фармацевтической и токсикологической химии, директор НИИ фармации Первого МГМУ им. И.М. Сеченова

Ю.И. Кулинич,

аспирантка кафедры фармацевтической и токсикологической химии Первого МГМУ им. И.М. Сеченова

А.Ю. Савченко,

к.м.н., заместитель директора по инновационному развитию НИИ фармации Первого МГМУ им. И.М. Сеченова

I.E. Shokhin,

PhD, assistant of the chair of pharmaceutical and toxicological chemistry of the First MSMU named after I.M. Sechenov

G.V. Ramenskaya,

Doctor of pharmacy, prof., head of the chair of pharmaceutical and toxicological chemistry, director of the Research institute of pharmacy of the First MSMU named after I.M. Sechenov

Yu.I. Kulinich,

post-graduate student of the chair of pharmaceutical and toxicological chemistry of the First MSMU named after I.M. Sechenov

A.Yu. Savchenko,

PhD, deputy director of innovative development of the Research institute of pharmacy of the First MSMU named after I.M. Sechenov

ИЗУЧЕНИЕ КИШЕЧНОЙ ПРОНИЦАЕМОСТИ В УСЛОВИЯХ IN VITRO НА МОНОСЛОЕ ЭПИТЕЛИАЛЬНЫХ КЛЕТОК CACO-2

(ОБЗОР)

THE STUDY OF INTESTINAL PERMEABILITY IN VITRO ON A MONOLAYER OF EPITHELIAL CACO-2 CELLS

(REVIEW)

КОНТАКТНАЯ ИНФОРМАЦИЯ:

Галина Владиславовна Раменская, заведующая кафедрой фармацевтической и токсикологической химии, директор НИИ фармации

Адрес: 119019, г. Москва, ул. Никитский бульвар, д. 13

Телефон: 8 (495) 691–13–92

E-mail: ramenskaia@mail.ru

Статья принята к печати: 28.11.2012

Аннотация. Статья посвящена применению монокультуры клеток аденокарциномы толстого кишечника Caco-2 для оценки проницаемости лекарственных веществ *in vitro*. Описаны основные преимущества использования данной биологической модели. Приведены общие принципы, подходы и методология определения проницаемости на культуре клеток Caco-2. Показана корреляция между значениями кишечной проницаемости, определенной в условиях *in vivo*, и результатами *in vitro*.

Annotation. This paper is devoted to the application of epithelial monolayer of human colon adenocarcinoma cells — Caco-2 for *in vitro* permeability evaluation of drugs. Main advantages of this biological model are described. General principles, approaches and methodology of Caco-2 permeability assay are defined. Correlation between human intestinal permeability *in vitro* and apparent permeability coefficient *in vitro* is indicated.

Ключевые слова. Клетки Caco-2, проницаемость, абсорбция.

Key words. Caco-2 cells, permeability, absorption.

Одной из ключевых задач современной фармации и биомедицины является понимание процесса доставки лекарственного вещества (ЛВ) до органа или клеток-мишеней. Для этого необходимо объективно оценить поведение лекарственной формы в желудочно-кишечном тракте (ЖКТ). Для того, чтобы действующее вещество достигло системного кровотока, оно должно пройти через следующие стадии: высвобождение из лекарственной формы, растворение в физиологических средах ЖКТ, абсорбция через кишечную (или желудочную) мембрану [1]. Степень проницаемости ЛВ через стенку кишечника можно достоверно определить в исследованиях *in vivo*, например, определением абсолютной биодоступности, анализом массового баланса, исследованиями методом кишечной перфузии [2]. Подобные данные являются наиболее достоверными, однако такие исследования являются достаточно трудоемкими и дорогостоящими, а также вовлекают в испытание здоровых добровольцев, что вызывает дополнительные этические сложности. Поэтому на протяжении последних 15 лет для исследователей в области биомедицины и биофармации стояла задача разработать метод, позволяющей косвенно, но с достаточной степенью достоверности, надежности и воспроизводимости оценить кишечную проницаемость [3, 4, 5].

МЕТОДЫ ОЦЕНКИ КИШЕЧНОЙ ПРОНИЦАЕМОСТИ

Среди методов, позволяющих косвенно оценить степень абсорбции субстанций, можно выделить 3 основные группы: исследования *in situ* (например, на тонком кишечнике крыс) [4], исследования на моделях *in vitro* (например, на монокультурах различных линий клеток) [5], а также исследования на моделях *in silico* (например, путем расчета коэффициентов распределения $\log P$ или $C \log P$) [3]. Также была выявлена корреляция между интенсивностью метаболизма и проницаемостью ЛВ, однако она все еще находится в стадии обсуждения [6]. Данные, полученные *in situ*, обладают высокой достоверностью (для всех 20 изученных модельных субстанций данные *in situ*, полученные на кишечнике крыс и данные *in vivo* качественно совпали), однако эти испытания являются достаточно дорогостоящими, что не позволяет использовать их для рутинных или скрининговых исследований [4]. Математическая оценка проницаемости является наиболее простым способом, но ее надежность недостаточно высока, поскольку не учитывает многие реальные физиологические факторы (например, роль белков-транспортёров). Например, только для 19 модельных ЛВ из 29 качественно совпали данные по проницаемости *in vivo*, определенной методом кишечной перфузии, и косвенно на основании показателей $\log P$ и $C \log P$ (то есть достоверность составила около 70%) [3].

Начиная с 90-х годов, когда впервые была установлена возможность оценить проницаемость, используя клеточные модели *in vitro*, данное направление стало активно развиваться. При анализе активности публикаций в данном направлении было выявлено, что их общее количество в ведущих рецензируемых журналах выросло до 120–140 в год [7]. Среди клеточных моделей (Caco-2, MDCK, HT29-MTX, TC-7) наиболее широко применяемой для данной цели стала культура клеток аденокарциномы толстого кишечника — Caco-2 [8].

ОБЩИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ КУЛЬТУРЫ КЛЕТОК CACO-2

Данная культура клеток была получена из аденокарциномы толстого кишечника человека. При культивировании клетки Caco-2 начинают дифференцироваться в поляризованные клетки кишечного эпителия с покрытой микроворсинками апикальной частью, мембраной на базолатеральной части и плотными межклеточными контактами [8]. Несмотря на то, что клетки Caco-2 имеют происхождение из толстого кишечника, они проявляют большинство морфологических и функциональных характеристик энтероцитов тонкого кишечника, в том числе выработку ферментов I и II фазы, а также мембранных транспортеров, включая гликопротеин P и белок MRP. В то же время данная культура клеток имеет и ряд отличий от клеток эпителия тонкого кишечника. Клетки Caco-2 обладают более высоким значением трансэпителиального электрического сопротивления по сравнению с энтероцитами (обычно от 3 до 30 раз), они неспособны вырабатывать слизь (которая в тонком кишечнике вырабатывается бокаловидными клетками), у них различается содержание ионов кальция в межклеточном пространстве. Кроме того, уровень экспрессии гликопротеина P у клеток Caco-2 превышает таковой в толстом кишечнике приблизительно на порядок. Все вышеуказанные факторы не могут не вносить свой вклад в проницаемость ЛВ через монослой клеток Caco-2 [7, 9].

МОДЕЛИРОВАНИЕ ТРАНСПОРТА ЛВ ЧЕРЕЗ МОНОСЛОЙ КЛЕТОК CACO-2

Транспорт ЛВ через мембрану тонкого кишечника может протекать одним или несколькими из четырех механизмов: пассивная диффузия, пассивный параклеточный транспорт (через плотные контакты), активный транспорт с участием переносчиков и трансцитоз. Исследования проницаемости на культуре клеток Caco-2 проводились для ЛВ со всеми механизмами транспорта [9].

Lennernas с соавт. провели исследование проницаемости ряда ЛВ, всасывающихся пассивной диф-

фузией и параклеточным транспортом на монослое клеток Сасо-2, и сравнили полученные данные с известными коэффициентами кишечной проницаемости, полученными методом кишечной перфузии. Было установлено, что для ЛВ, механизм транспорта которых является простая диффузия, значение коэффициента кишечной проницаемости (P_{eff} *in vivo*) и кажущегося коэффициента проницаемости (apparent permeability, P_{app} *in vitro*) на клетках Сасо-2 различаются не более чем в 2–4 раза, в то время как для субстанций с параклеточным транспортом проницаемость через монослой клеток была в 20–80 раз ниже. Данное явление имеет два основных объяснения: разным количеством пор в плотных контактах и разной площадью абсорбирующей поверхности у клеток Сасо-2 и энтероцитов. Кроме того, такие отличия могут быть связаны с отсутствием центральной иннервации клеток Сасо-2 и отсутствием в них системного кровотока [10].

В то же время, было показано, что подобные различия носят только количественный, но не качественный характер. В исследовании проницаемости полиэтиленгликолей (гидрофильное вещество с параклеточным транспортом) было показано, что она возрастает с молекулярной массой так же, как и кишечная проницаемость *in vivo*, несмотря на различия коэффициентов P_{eff} *in vivo* и P_{app} *in vitro* более чем в 100 раз. Таким образом, моделирование параклеточного транспорта ЛВ на культуре клеток Сасо-2 может быть оценено качественно [7, 9].

Субстанции, абсорбирующиеся через стенку кишечника активным транспортом, также имеют более низкие значения кажущейся кишечной проницаемости, что связано с более низкой степенью экспрессии у клеток Сасо-2 ряда транспортеров, в том числе ионных и пептидных транспортеров. В то же время, гликопротеин Р вырабатывается у них в меньшей степени, чем у энтероцитов, что приводит к занижению результатов [9].

КОРРЕЛЯЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ ОПРЕДЕЛЕНИЯ ПРОНИЦАЕМОСТИ IN VIVO И IN VITRO

Несмотря на значительные различия (до двух порядков) степени проницаемости *in vivo* и *in vitro*, исследователями неоднократно делались попытки выявить корреляцию между абсорбцией в тонком кишечнике и на культуре клеток Сасо-2. Такая корреляция была впервые установлена Artursson с соавт. на 20 модельных субстанциях, кроме того, ими были рекомендованы качественные критерии проницаемости на монослое клеток Сасо-2: для ЛВ, которые полностью абсорбируются в ЖКТ, P_{app} *in vitro* принимает значения свыше 1×10^{-6} см/с; для ЛВ, степень абсорбции которых лежит в интервале от 1% до 100% P_{app} *in vitro* принимает значения от 1×10^{-7}

см/с до 1×10^{-6} см/с; для ЛВ, абсорбирующихся менее чем на 1%, P_{app} *in vitro* принимает значения ниже 1×10^{-7} см/с [11]. Было проведено большое количество исследований проницаемости на культуре клеток Сасо-2, при этом данные по хорошей корреляции с кишечной абсорбцией были установлены неоднократно. В то же время данные, полученные в разных лабораториях, имели значительные (в несколько раз) количественные различия при их близком качественном сходстве [9]. Например, рекомендуемые разными исследователями критерии «высокой» (т.е. более 90%) проницаемости, установленной на клеточном монослое, находятся в интервале от 1×10^{-6} см/с до 1×10^{-5} см/с [12]. Низкая лабораторная воспроизводимость в первую очередь связана с гетерогенностью культуры клеток Сасо-2. Кроме того, свойства монослоя зависят от времени культивирования, числа пассажей, питательной среды [7, 9]. Однако поскольку основной областью применения культуры клеток Сасо-2 является именно качественная оценка кишечной проницаемости, решением проблемы воспроизводимости является использование внутренних стандартов. В качестве внутренних стандартов рекомендуется использовать модельные маркеры проницаемости из перечня, предложенного FDA [13]. В перечне приведены стандарты «низкой» (менее 90%) и «высокой» (90% и более) кишечной проницаемости, а также стандарт для оценки проницаемости ЛВ, транспортируемых гликопротеином Р, и маркер нулевой проницаемости (табл. 1).

Таблица 1.

Модельный перечень субстанций для оценки проницаемости

Субстанция	Проницаемость
антипирин	«высокая» ¹
кофеин	«высокая»
карбамазепин	«высокая»
флувастатин	«высокая»
кетопрофен	«высокая»
метопролол	«высокая» ¹
напроксен	«высокая»
пропранолол	«высокая»
теофиллин	«высокая»
верапамил	«высокая» ²
амоксацилин	«низкая»
атенолол	«низкая»
фуросемид	«низкая»
гидрохлоротиазид	«низкая»
маннитол	«низкая» ¹
α-метилдопа	«низкая»
ПЭГ-400	«низкая»
ПЭГ-1000	«низкая»
ПЭГ-4000	«низкая» ³
ранитидин	«низкая»

Примечания.

- 1 — рекомендуемые внутренние стандарты
- 2 — стандарт для оценки проницаемости ЛВ, транспортируемых гликопротеином Р
- 3 — маркер нулевой проницаемости

В качественно спланированные исследования проницаемости обычно включают несколько (до 10) внутренних стандартов. Такие исследования могут даже позволить количественно оценить проницаемость ЛВ при обработке данных с помощью моделирующих компьютерных программ, например, GastroPlus™ (Simulation Plus Inc) [14].

Именно большое количество данных по надежной корреляции данных, полученных в хорошо валидированных исследованиях по изучению проницаемости *in vitro* на значительном количестве ЛВ с различными свойствами и механизмами транспорта, позволили рекомендовать монослой эпителиальных клеток Caco-2 в качестве «золотого стандарта» для моделирования кишечной абсорбции, оценке биодоступности и биоэквивалентности [14].

МЕТОДИКА ОПРЕДЕЛЕНИЯ ПРЕНИЦАЕМОСТИ *IN VITRO* НА КУЛЬТУРЕ КЛЕТОК CACO-2

Процедура определения проницаемости на культуре клеток Caco-2 состоит из следующих этапов [8]:

1. Культивирование клеток.
2. Инкубирование клеток на микропористом фильтре.
3. Тест пригодности системы (измерение трансэпителиального электрического сопротивления или тест с маркерами проницаемости).
4. Определение проницаемости испытуемой субстанции (с внутренним стандартом).
5. Количественное определение.

Культивирование клеток проводят на питательной среде (например, DMEM), в состав которой входят заменимые аминокислоты (1%), глюкоза (25 мм), глутамин (2 мм) с прибавлением сыворотки крови эмбриональной телячьей (15–20%) и антибиотика (например, 100 мкг/мл гентамицина). Клетки культивируют в инкубаторе при 37°C в атмосфере с содержанием 5–10% CO₂ и 90–95% O₂ и относительной влажности 95%, среду заменяют каждые 2–3 дня. Для проведения исследований



Рис. Схематическое изображение монослоя клеток Caco-2 на микропористом фильтре

проницаемости используют клетки после 25–100 пассажей [8, 9, 14].

Клетки Caco-2 переносят на микропористые фильтры в количестве приблизительно от 25 000 до 40 000 клеток/см² (см. рис.) и инкубируют в течение около 20 дней при вышеуказанных условиях с заменой питательной среды каждые 2–3 дня [8, 9, 14].

Определение проницаемости на культуре клеток Caco-2 недопустимо проводить до тех пор, пока не будет установлена целостность и функциональность монослоя. Для определения пригодности системы проводят одно из нижеописанных испытаний: определение трансэпителиального электрического сопротивления или тест с маркерами низкой проницаемости (например, люциферовым желтым, родамином, маннитолом или ПЭГ-400). Монослой клеток Caco-2 считается пригодным для определения проницаемости, если значение трансэпителиального электрического сопротивления выходит на плато и принимает значения от 260 Ом/см² до 400 Ом/см², либо степень проницаемости маркеров не превышает предельного допустимого значения. Рекомендуется проводить оба испытания, однако одно из них будет достаточно [7, 8, 9].

Проницаемость ЛВ изучают в двух направлениях: от апикальной стороны к базолатеральной, и наоборот. Значение pH в донорном (апикальном) и акцепторном (базолатеральном) отсеке обычно составляет 7,4. После внесения пробы и внутренних стандартов в донорный отсек их отбирают спустя установленные интервалы времени из акцепторного отсека и проводят количественное определение методом ВЭЖХ с УФ или МС-детектором. Коэффициент кажущейся кишечной проницаемости рассчитывают по следующей формуле [8]:

$$P_{app \text{ in vitro}} = \frac{dC}{dT} \times \frac{V}{A \times C_0}, \text{ где}$$

$P_{app \text{ in vitro}}$ — кажущийся коэффициент кишечной проницаемости, см/с

V — объем пробы, мл;

A — площадь поверхности клеточного монослоя, см²;

C_0 — исходная концентрация исследуемого ЛВ в донорном отсеке, М;

dC/dT — скорость изменения концентрации исследуемого ЛВ в акцепторном отсеке, М/с.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Несмотря на некоторые недостатки, которые присущи каждому биологическим моделям, культура клеток Caco-2 была признана надежным и относительно несложным инструментом для прогнозирования кишечной проницаемости ЛВ (табл. 2). Данная модель в настоящее время широко применяется для скрининговых целей при изучении транспорта

и абсорбции ЛВ, влияния вспомогательных веществ и лекарственного взаимодействия на процессы всасывания, а также при оценке взаимозаменяемости воспроизведенных ЛВ *in vitro* (процедура «биовейвер») [9, 12]. В связи с вышеуказанным, следует начать развивать данное направление и в России.

Таблица 2.

Основные достоинства и недостатки моделирования кишечной проницаемости на культуре клеток Caco-2

Достоинства	Недостатки
Высокий уровень корреляции с данными <i>in vivo</i> , полученный в значительном количестве исследований	Не учитываются некоторые физиологические факторы (слизь, желчные кислоты, площадь поверхности всасывания)
Быстрый и относительно несложный метод	Клетки имеют опухолевое происхождение
Моделирование проводится на клетках человека	Применим преимущественно для качественной оценки проницаемости, поскольку метод обладает невысокой межлабораторной воспроизводимостью

Список литературы

1. Amidon G.L., Lennerlas H., Shah V.P., Crison J.R. A theoretical basis for a biopharmaceutic drug classification: The correlation of in vitro drug product dissolution and in vivo bioavailability // *Pharmaceutical Research*. — 1995. — № 12. — P. 413–420.
2. Proposal to waive in vivo bioequivalence requirements for WHO Model List of Essential Medicines immediate-release, solid oral dosage forms. Technical Report Series, № 937, 40th Report, Annex 8 of WHO Expert Committee on Specifications for Pharmaceutical Preparations. — World Health Organization (WHO), 2006.
3. Kasim N.A., Whitehouse M., Ramachandran C. et al. Molecular properties of WHO essential drugs and provisional biopharmaceutical classification // *Molecular Pharmaceutics*. — 2004. — Vol. 1. — № 1. — P. 85–96.
4. Kim J.-S., Mitchell S., Kijek P. et al. The suitability of an in situ perfusion model for permeability determinations: utility for BCS Class I biowaiver requests // *Molecular Pharmaceutics*. — 2004. — Vol. 1. — № 1. — P. 85–96.
5. Yee S. In vitro permeability across Caco-2 cells (colonic) can predict in vivo (small intestinal) absorption in man — Fact or myth // *Pharmaceutical Research*. — 1997. — Vol. 14. — № 6. — P. 763–766.
6. Wu C.-Y., Benet L. Predicting drug disposition via application of BCS: Transport / absorption / elimination interplay and development of a biopharmaceutics drug disposition classification system // *Pharmaceutical Research*. — 2005. — Vol. 22. — № 1. — P. 11–23.
7. Artursson P., Palm K., Luthman K. Caco-2 monolayers in experimental and theoretical predictions of drug transport // *Advanced Drug Delivery Reviews*. — 2001. — Vol. 46. — P. 27–43.
8. Le Ferrec E., Chesne C., Artursson P. et al. *In vitro* models of the intestinal barrier. The report and recommendations of ECVAM workshop 46 // *ATLA*. — 2001. — Vol. 29. — P. 649–668.
9. Shah P., Jogani V., Bagchi T., Misra A. Role of Caco-2 cell monolayers in prediction of intestinal drug absorption // *Biotechnology Progress*. — 2006. — Vol. 22. — № 1. — P. 186–198.
10. Lennernas H., Palm K., Fagerholm U., Artursson P. Comparison between active and passive drug transport in human intestinal epithelial (Caco-2) cells: In vitro and human jejunum in vivo // *International Journal of Pharmaceutics*. — 1996. — Vol. 127. — № 1. — P. 103–107.
11. Artursson P., Karlsson J. Correlation between oral drug absorption in humans and apparent drug permeability coefficients in human intestinal epithelial (Caco-2) cells // *Biochemical and Biophysical Research Communications*. — 1991. — Vol. 175. — № 3. — P. 880–885.
12. Dahan A., Miller J.M., Amidon G.L. Prediction of solubility and permeability class membership: Provisional BCS classification of the world's top oral drugs // *AAPS J.* — 2009. — Vol. 11. — № 6. — P. 740–746.
13. Guidance for industry: Waiver of in vivo bioavailability and bioequivalence studies for immediate-release solid oral dosage forms based on a Biopharmaceutics Classification System. — U.S., Department of Health and Human Services, Food and Drug Administration (HHS-FDA), Center for Drug Evaluation and Research (CDER), 2000.
14. Соловьев А.И., Резников А.Г., Тарасенко Л.В., Маргутич В.М. Первый в Украине успешный опыт применения биовейвера для экспертной оценки лекарственного средства (Летромара) // *Журнал АМН Украины*. — 2006. — Т. 12. — № 4. — С. 781–794.