

ответствует международному стандарту ISO 10993-5, применяемому к медицинским изделиям, и может в дальнейшем применяться в клинической практике для лечения ран.

#### Список литературы

1. ГОСТ Р ИСО 10993-5-2009. Изделия медицинские. Оценка биологического действия медицинских изделий. Часть 5. Исследования на цитотоксичность: методы *in vitro*. – М.: Стандартиформ. 2010. 17 с.

2. Патент (RU) № 2397781 от 27.08.2010 г. «Нетканый материал медицинского назначения, обладающий

ранозаживляющей, антибактериальной и противовирусной активностью и перевязочное средство на его основе» / *Дыгай А.М., Лернер М.И., Новицкий В.В., Огородова Л.М., Псахье С.Г., Чурин А.А.*

3. ISO 10993-5. Biological evaluation of medical devices, Part 5: Tests for cytotoxicity, *in vitro* methods. International Standardization Organisation, Geneva. 1992.

4. *Mosmann T.R.* Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays // *J. Immunol. Methods.* 1983. N 5. P. 55-63.

## Assessment of toxicity *in vitro* of a new bandaging material

A.A. Churin, G.M. Danilets, A.M. Dygai

Article presents results of the study of new bandaging material's direct contact and indirect cytotoxicity assays in comparison with cotton gauze. It has been found that in direct contact of nonwoven polymeric fibrous bandaging material (BM) with cells for 24 hours of cultivation no changes in cell morphology take place, nor does the amount of dead cells increase. These conclusions have been made by means of both a visual examination and an MTT assay. The BM extract did not have any cytotoxic effect on the tested cells either. The obtained results allow us to make a conclusion that the BM complies with the international standard ISO 10993-5, which is applied to medical goods, and can be applied in the treatment of infected wounds in clinical practice.

**Key words:** cytotoxicity, bandaging materials, development of biocompatible biomaterials.

## Применение биологической модели для оценки кишечной проницаемости *in vitro* – монослоя эпителиальных клеток Caco-2

И.Е. Шохин<sup>1,2</sup>, Ю.И. Кулинич<sup>1,2</sup>, Г.В. Раменская<sup>1,2,3</sup>, В.Г. Кукес<sup>1,2,3</sup>

<sup>1</sup> – ГОУ ВПО Первый МГМУ им. И.М. Сеченова, Минздравсоцразвития РФ, Москва

<sup>2</sup> – ФГБУ «НЦ ЭСМП», Минздравсоцразвития РФ, Москва

<sup>3</sup> – Филиал «Клиническая Фармакология» НЦБМТ РАМН, Москва

Контактная информация: Кукес Владимир Григорьевич [elmed@yandex.ru](mailto:elmed@yandex.ru)

Статья посвящена применению монокультуры клеток аденокарциномы толстого кишечника – Caco-2 для оценки проницаемости лекарственных веществ (ЛВ) *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 проницаемостью, определенной в условиях *in vivo* и кажущимися коэффициентами кишечной проницаемости *in vitro*.

**Ключевые слова:** клетки Caco-2, проницаемость, абсорбция.

#### Введение

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 дан-

ные являются наиболее достоверными, однако такие исследования достаточно трудоемкие и дорогостоящие, 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, позволяющий косвенно, но с достаточной степенью достоверности, надежности и воспроизводимости оценить кишечную проницаемость [3-5].

#### 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-транспортеров). 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 гг., 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].

Lennepras с соавт. провели исследование проницаемости ряда ЛВ, всасывающихся пассивной диффузией и параклеточным транспортом на монослой клеток Caco-2, и сравнили полученные данные с известными коэффициентами кишечной проницаемости, полученными методом кишечной перфузии. Было установлено, что для ЛВ, механизмом транспорта которых является простая диффузия, значение коэффициента кишечной проницаемости ( $P_{\text{eff in vivo}}$ ) и кажущегося коэффициента проницаемости (apparent permeability,  $P_{\text{app in vitro}}$ ) на клетках Caco-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 Caco-2 и энтероцитов. Кроме того, такие отличия могут быть связаны с отсутствием центральной иннервации клеток Caco-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 также как и кишечная проницаемость *in vivo*, несмотря на различия коэффициентов  $P_{\text{eff in vivo}}$  и  $P_{\text{app in vitro}}$  более чем в 100 раз. Таким образом, моделирование параклеточного транспорта ЛВ на культуре клеток Caco-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 Caco-2 ряда транспортеров, в том числе ионных и пептидных транспортеров. В то же время гликопротеин P 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 Caco-2. Такая корреляция была впервые установлена Artursson с соавт. на 20 модельных субстанциях, кроме того, ими были рекомендованы качественные критерии проницаемости на монослой клеток Caco-2: для ЛВ, которые полностью абсорбируются в ЖКТ,  $P_{\text{app in vitro}}$  принимает значения свыше  $1 \times 10^{-6}$  см/с; для ЛВ, степень абсорбции которых лежит в интервале от 1% до 100%  $P_{\text{app in vitro}}$  принимает значения от  $1 \times 10^{-7}$  см/с до  $1 \times 10^{-6}$  см/с; для ЛВ, абсорбирующихся менее чем на 1%,  $P_{\text{app in vitro}}$  принимает значения ниже  $1 \times 10^{-7}$  см/с [11]. Было проведено большое количество исследований проницаемости на культуре клеток Caco-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  $1 \times 10^{-6}$  см/с до  $1 \times 10^{-5}$  см/с [12]. Низкая лабораторная воспроизводимость в первую очередь связана с гетерогенностью культуры клеток Caco-2. Кроме того, свойства монослоя зависят от времени культивирования, числа пассажей, питательной среды [7-9]. Однако поскольку основной областью применения культуры клеток Caco-2 служит 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).

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 результатов, 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 проницаемости *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 ис-

Таблица 1

Модельный перечень субстанций для оценки проницаемости

| Субстанция      | Проницаемость          |
|-----------------|------------------------|
| антипирин       | «высокая» <sup>1</sup> |
| кофеин          | «высокая»              |
| карбамазепин    | «высокая»              |
| флувастатин     | «высокая»              |
| кетопрофен      | «высокая»              |
| метопролол      | «высокая» <sup>1</sup> |
| напроксен       | «высокая»              |
| пропранолол     | «высокая»              |
| теофиллин       | «высокая»              |
| верапамил       | «высокая» <sup>2</sup> |
| амоксцилин      | «низкая»               |
| атенолол        | «низкая»               |
| фуросемид       | «низкая»               |
| гидрохлортиазид | «низкая»               |
| маннитол        | «низкая» <sup>1</sup>  |
| α-метилдопа     | «низкая»               |
| ПЭГ-400         | «низкая»               |
| ПЭГ-1000        | «низкая»               |
| ПЭГ-4000        | «низкая» <sup>3</sup>  |
| ранитидин       | «низкая»               |

Примечание: <sup>1</sup> – рекомендуемые внутренние стандарты; <sup>2</sup> – стандарт для оценки проницаемости ЛВ, транспортируемых гликопротеином Р; <sup>3</sup> – маркер нулевой проницаемости.

пытываемой субстанции (с внутренним стандартом).

### 5. Количественное определение.

Культивирование клеток проводят на питательной среде (например, ДМЕМ), 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% CO<sub>2</sub> и 90-95% O<sub>2</sub> и относительной влажности 95%, среду заменяют каждые 2-3 дня. Для проведения исследований 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/см<sup>2</sup> (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 установ-

лена 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/см<sup>2</sup> до 400 Ом/см<sup>2</sup>, либо степень проницаемости маркеров не превышает предельного допустимого значения. Рекомендуется проводить оба испытания, однако одного из них будет достаточно [7, 8, 9].

Проницаемость ЛВ изучают в двух направлениях: от апикальной стороны к базолатеральной, и наоборот. Значение рН 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 от-

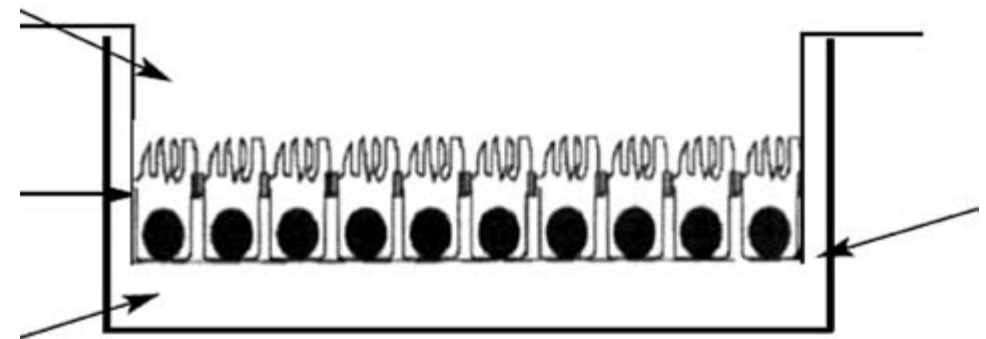


Рис. Схематическое изображение монослоя клеток Caco-2 на микропористом фильтре.

- 1 – апикальная сторона;
- 2 – клеточный монослой;
- 3 – базолатеральная сторона;
- 4 – микропористый фильтр.

сека и проводят количественное определение методом ВЭЖХ с УФ или МС-детектором. Коэффициент кажущейся кишечной проницаемости рассчитывают по следующей формуле [8]:

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

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

$V$  – объем пробы, мл;

$A$  – площадь поверхности клеточного монослоя, см<sup>2</sup>;

$C_0$  – 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, No 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., Bermejo M., Lennernäs H., Hussain A.S., Junginger H.E., Stavchansky S.A., Midha K.K., Shah V.P., Amidon G.L.** Molecular properties of WHO essential drugs and provisional biopharmaceutic classification // *Molecular Pharmaceutics*. 2004. Vol. 1. № 1. P. 85-96.

4. **Kim J.-S., Mitchell S., Kijek P., Tsume Y., Hilfinger J., Amidon G.L.** 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.

## Application of biological model for assessment of intestinal permeability of *in vitro* – a monolayer of epithelial Caco-2 cells

I.E. Shohin, J.I. Kulinich, G.V. Ramenskaya, V.G. Kukes

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.

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