



Клетки линии Сасо-2 как модель для изучения абсорбции лекарственных веществ

Щулькин А. В., Транова Ю. С., Абаленихина Ю. В., Есенина А. С., Слепнев А. А., Якушева Е. Н.

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

Для цитирования: Щулькин А. В., Транова Ю. С., Абаленихина Ю. В., Есенина А. С., Слепнев А. А., Якушева Е. Н. Клетки линии Сасо-2 как модель для изучения абсорбции лекарственных веществ. Экспериментальная и клиническая гастроэнтерология. 2022;206(10): 63–69. DOI: 10.31146/1682-8658-ecg-206-10-63-69

✉ Для переписки:

Щулькин

Алексей

Владимирович

alekseyshulkin@

rambler.ru

Щулькин Алексей Владимирович, д.м.н., доцент, профессор кафедры фармакологии с курсом фармации ФДПО

Транова Юлия Сергеевна, очный аспирант кафедры фармакологии с курсом фармации ФДПО

Абаленихина Юлия Владимировна, к.б.н., доцент, доцент кафедры биологической химии с курсом КЛД ФДПО

Есенина Анна Сергеевна, ассистент кафедры фармакологии с курсом фармации ФДПО

Слепнев Александр Александрович, к.б.н., доцент, доцент кафедры фармакологии с курсом фармации ФДПО

Якушева Елена Николаевна, д.м.н., профессор, зав. кафедрой фармакологии с курсом фармации ФДПО

Резюме

Клетки линии Сасо-2 обладают основными свойствами энтероцитов тонкого кишечника, а, следовательно, могут быть использованы для исследования абсорбции лекарственных веществ.

Цель. Охарактеризовать и подтвердить свойства линии клеток Сасо-2 из Института цитологии РАН и оценить с ее помощью механизм абсорбции оригинального отечественного лекарственного препарата — этилметилгидроксипиридина сукцината (ЭМГПС).

Материалы и методы. Исследование выполнено на клетках Сасо-2, которые культивировали в течение 21 сут, так как при этом сроке происходит их спонтанная дифференцировка в поляризованные клетки, подобные энтероцитам тонкого кишечника. Плотность клеточного монослоя оценивали по величине трансэпителиального сопротивления. Количество основных эффлюксных белков транспортеров гликопротеина-P (Pgp) и белка резистентности рака молочной железы (BCRP) в клетках Сасо-2 анализировали с помощью иммуоферментного анализа. В специализированных трансвелл-системах изучали транспорт субстрата Pgp фексофенадина (40, 150 и 300 мкМ), субстрата BCRP — метотрексата (5, 10, 50 мкМ) и ЭМГПС (10, 100 и 250 мкМ) через клеточный монослой.

Результаты исследования. К 21 сут культивирования клетки линии Сасо-2 формировали сливающийся монослой с плотными контактами. Количество Pgp и BCRP составило $110,8 \pm 14,1$ нг/мг и $4,39 \pm 0,12$ нг/мг соответственно, что соотносится с количеством данных белков в тонком кишечнике человека. Транспорт фексофенадина (40, 150 и 300 мкМ) и метотрексата (5 мкМ) из базолатеральной камеры в апикальную (соответствует транспорту из энтероцитов в просвет кишечника) преобладал над транспортом в противоположном направлении, что связано с функционированием Pgp и BCRP и подтверждает адекватность тест-системы. Транспорт ЭМГПС существенно превосходил по интенсивности транспорт фексофенадина и метотрексата и был симметричен по отношению к клеточному монослою.

Заключение. Таким образом, клетки линии Сасо-2, коммерчески доступные в Российской Федерации, обладают основными свойствами энтероцитов тонкого кишечника, и могут быть использованы для исследования абсорбции лекарственных веществ *in vitro*. ЭМГПС быстро проходит через клеточный монослой, а механизмом его абсорбции является пассивная диффузия, без участия специфических транспортеров — Pgp и BCRP.

Ключевые слова: клетки линии Сасо-2, абсорбция, гликопротеин-P, белок резистентности рака молочной железы, этилметилгидроксипиридина сукцинат

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

EDN: ILNPYQ



<https://doi.org/10.31146/1682-8658-ecg-206-10-63-69>

Cells of the Caco-2 line as a model for studying the absorption of medicinal substances

A.V. Shchulkin, Yu.S. Tranova, Yu.V. Abalenikhina, A.S. Esenina, A.A. Slepnev, E.N. Yakusheva

Ryazan State Medical University, build. 9, Vysokovoltnaia str., Ryazan, 390026, Russia

For citation: Shchulkin A.V., Tranova Yu.S., Abalenikhina Yu.V., Esenina A.S., Slepnev A.A., Yakusheva E.N. Cells of the Caco-2 line as a model for studying the absorption of medicinal substances. *Experimental and Clinical Gastroenterology*. 2022;206(10): 63–69. (In Russ.) DOI: 10.31146/1682-8658-ecg-206-10-63-69

✉ **Corresponding author:**

Alexey V. Shchulkin

alekseyshulkin@

rambler.ru

Alexey V. Shchulkin, MD, PhD, Assistant Professor of the Department of Pharmacology with a Course of Pharmacy of Continuing Professional Education Faculty; ORCID: 0000–0003–1688–0017, Researcher ID: N-9143–2016, Scopus Author ID: 55700396200

Yulia S. Tranova, full-time postgraduate student of the Department of Pharmacology of Continuing Professional Education Faculty; ORCID: 0000–0001–5068–1201

Yulia V. Abalenikhina, PhD in Biological Sciences, Assistant Professor of the Department of Biological Chemistry; ORCID: 0000–0003–0427–0967, Researcher ID: L-8965–2018, Scopus Author ID: 57195266939

Anna S. Esenina, assistant of the Department of Pharmacology with a Course of Pharmacy of Continuing Professional Education Faculty; ORCID: 0000–0002–3984–8979, Research ID: K-3849–2018, Scopus Author ID: 57215774528

Alexander A. Slepnev, PhD in Biological Sciences, Assistant Professor of Department of Pharmacology of Continuing Professional Education Faculty; ORCID: 0000–0003–0696–6554

Elena N. Yakusheva, MD, PhD, Professor, Head of the Department of Pharmacology with a Course of Pharmacy of Continuing Professional Education Faculty; ORCID: 0000–0001–6887–4888, Researcher ID: T-6343–2017, Scopus Author ID 6602966794

Summary

Cells of the Caco-2 line have the basic properties of enterocytes of the small intestine, and therefore can be used to study the absorption of medicinal substances.

Aim. To characterize the properties of the Caco-2 cell line from the Institute of Cytology of the Russian Academy of Sciences and to evaluate with its help the mechanism of absorption of the original domestic drug — ethylmethylhydroxypyridine succinate (EMGPS).

Materials and methods. The study was performed on Caco2 cells that were cultured for 21 days, since at this time their spontaneous differentiation into polarized cells similar to enterocytes of the small intestine occurs. The density of the cell monolayer was estimated by the value of transepithelial resistance. The number of major efflux proteins of glycoprotein-P transporters (Pgp) and breast cancer resistance protein (BCRP) in Caco-2 cells was analyzed using enzyme immunoassay. In specialized transwell systems, the transport of the Pgp substrate fexofenadine (40, 150 and 300 microns), the BCRP substrate methotrexate (5, 10, 50 microns) and EMGPS (10, 100 and 250 microns) through the cell monolayer was studied.

The results of the study. By day 21 of cultivation, cells of the Caco2 line formed a merging monolayer with pronounced dense contacts. The amount of Pgp and BCRP was 110.8 ± 14.1 ng/mg and 4.39 ± 0.12 ng/mg, respectively, which correlates with the amount of these proteins in the human small intestine. Transport of fexofenadine (40, 150 and 300 microns) and methotrexate (5 microns) from the basolateral chamber to the apical chamber (corresponding to transport from enterocytes to the intestinal lumen) prevailed over transport in the opposite direction, which is associated with the work of Pgp and BCRP. The transport of EMGPS significantly exceeded the transport of fexofenadine and methotrexate and was symmetrical with respect to the cellular monolayer.

Conclusion. Thus, the cells of the Caco-2 line, commercially available in the Russian Federation, have the basic properties of enterocytes of the small intestine, and can be used to study the absorption of medicinal substances *in vitro*. EMGPS quickly passes through the cellular monolayer, and the mechanism of its absorption is passive diffusion, without the participation of specific transporters.

Keywords: Caco-2 cells, absorption, glycoprotein-P, BCRP, ethylmethylhydroxypyridine succinate

Conflict of interest. Authors declare no conflict of interest.

Введение

Клетки линии Caco-2 (colorectal adenocarcinoma cells – клетки аденокарциномы ободочной кишки человека) были выделены из человеческой коло-ректальной аденокарциномы [1]. Однако, в ходе дальнейших исследований было показано, что при культивировании в виде монослоя на планшетах или полупроницаемой мембране они спонтанно дифференцируются в клетки, структурно и функционально сходные с энтероцитами тонкого кишечника человека [2].

Большинство кишечных транспортеров и ферментов экспрессируются в монослое клеток Caco-2: гликопротеин-P (Pgp), белок устойчивости рака молочной железы (BCRP), транспортер H^+ /ди-трипептида (PEPT1), полипептид, транспортирующий органические анионы 2B1 (OATP-B), глутатион S-трансфераза (GST), UDP-глюкуронозилтрансфераза (UGT) и ряд других. Цитохром P450 3A4 (CYP3A4) конститутивно отсутствует или плохо экспрессируется в клетках Caco-2, но его уровни можно индуцировать инкубацией с $1\alpha,25$ -дигидроксивитамином D₃, активным метаболитом витамина D, или повышать путем трансфекции клеток [3].

В клетках линии Caco-2 также экспрессируются ядерные рецепторы, характерные для энтероцитов: рецептор витамина D (VDR), глюкокортикоидный рецептор (GR), рецептор, активируемый пероксисомным пролифератором (PPAR), фарнезоидный X-рецептор (FXR) и ряд других [3].

Материалы и методы

Исследование выполнено на линии клеток аденокарциномы ободочной кишки человека (Caco-2) (ЦКП «Коллекция культур клеток позвоночных», Санкт-Петербург, Россия). Клетки культивировали при 37°C и 5% содержании CO₂ в инкубаторе WS-189C («World Science», Корея) в Дульбекко модифицированной среде Игла (DMEM) с высоким содержанием глюкозы (4500 мг/л), с добавлением L-глутамин (4 мМ), 15% эмбриональной бычьей сыворотки, 100 ЕД/мл и 100 мкг/мл пенициллина и стрептомицина (все составляющие производства «Sigma-Aldrich», Германия) соответственно [10].

Визуализацию клеток выполняли с помощью инвертированного микроскопа Olympus CKX-53 («Olympus», Япония).

Для количественной оценки транспортных белков Pgp и BCRP, клетки линии Caco-2 культивировали в 6-луночных планшетах (Corning, США) 21 сут. После завершения культивирования клетки снимали с лунок раствором трипсин-ЭДТА (0,25% трипсина и 0,2% ЭДТА, «Sigma-Aldrich», США) и лизировали трехкратным циклом заморозка-разморозка. В полученном лизате клеток с помощью коммерческого набора для гетерогенного иммуноферментного анализа оценивали количество Pgp и BCRP («Blue gene», Китай).

Для оценки абсорбции лекарственных веществ с помощью клеток линии Caco-2 их культивировали в специальных трансвелл-системах (12 mm

В тоже время, радиус пор плотных контактов в Caco-2 ($\sim 4,5$ Å) [4] почти в два раза меньше, чем в кишечнике человека ($\sim 8-13$ Å) [5].

Несмотря на это, линия клеток Caco-2 является наиболее распространенной моделью для прогнозирования пероральной биодоступности и исследования механизмов абсорбции веществ [6, 7].

Также согласно рекомендациям FDA (Food and Drug Administration) и EMA (European medicines agency) клетки линии Caco-2 являются адекватной тест-системой для оценки принадлежности лекарственных веществ к субстратам белков-транспортеров Pgp и BCRP [8].

Pgp и BCRP – это эффлюксные АТФ-зависимые белки, обеспечивающие выведение веществ-субстратов из энтероцитов в просвет кишечника, и таким образом ограничивающие их абсорбцию [9].

В Российской Федерации коммерчески доступны клетки линии Caco-2 из ЦКП «Коллекция культур клеток позвоночных», Института цитологии РАН, (Санкт-Петербург, Россия).

При работе с клеточными линиями следует учитывать, что их свойства могут изменяться в зависимости от количества пассажей, срока и условий культивирования.

Поэтому целью настоящего исследования было охарактеризовать и подтвердить свойства линии клеток Caco-2 из Института цитологии РАН, а также оценить с ее помощью механизм абсорбции оригинального отечественного лекарственного препарата – этилметилгидроксипиридина сукцината (ЭМГПС).

Transwell' with 0,4 μ m Pore Polycarbonate Membrane Insert, Sterile, «Corning», США), состоящих из двух камер: апикальной и базолатеральной (рис. 1). Дно апикальной камеры представлено полупроницаемой мембраной, на которую высевали клетки Caco-2.

Через 21 сут при формировании монослоя с плотными клеточными контактами трансвелл-систему, содержащую клетки линии Caco-2, использовали для проведения транспортных экспериментов.

Целостность клеточного монослоя оценивали по величине трансэпителиального сопротивления, которое определяли с помощью вольтметра Millicell ERS-2 («Millipore», США). При его значении выше 500 мОм $\times$ см² выполняли транспортные эксперименты. Для этого питательную среду заменяли на транспортную среду, представляющую собой раствор Хэнкса («Sigma-Aldrich», Германия) с 25 мМ Хепес («Sigma-Aldrich», Германия) и 1% диметилсульфоксида («ПанЭко», Россия).

Оценивали транспорт следующих веществ: фексофенадин (40, 150 и 300 мкМ) – субстрат Pgp, метотрексат (5, 10, 50 мкМ) – субстрат BCRP и ЭМГПС (10, 100 и 250 мкМ).

Вначале данные вещества добавляли в базолатеральную камеру и через 1, 2 и 3 часа забирали образцы из апикальной камеры-реципиента для определения концентрации субстрата (*a-b* транспорт, характеризующий абсорбцию веществ или

Таблица 1.
Транспорт различных лекарственных веществ через монослой клеток линии Сасо-2 (M±SD).
Примечание:
* – p<0,05 по сравнению с показателями при минимальных концентрациях (дисперсионный анализ).

Тестируемое вещество	Рapp b-a, ×10 ⁻⁶ см/сек	Рapp a-b, ×10 ⁻⁶ см/сек	Рapp b-a / Рapp a-b
Фексофенадин	40 мкМ	2,54 ±0,60	1,29±0,51
	150 мкМ	3,19 ±1,20	1,09±0,61
	300 мкМ	2,91 ±3,79	0,68 ±0,19
Метотрекат	5 мкМ	1,46±0,58	0,44±0,18
	10 мкМ	0,14±0,04*	0,46±0,06
	50 мкМ	0,13±0,05*	0,33±0,01
Этилметилгидроксипиридина сукцинат	10 мкМ	7,56 ±2,98	7,66±1,71
	100 мкМ	6,63 ±2,15	7,05±2,15
	250 мкМ	16,5±4,16*	22,3±1,99*

Рисунок 1.

Структура трансвелл-системы.

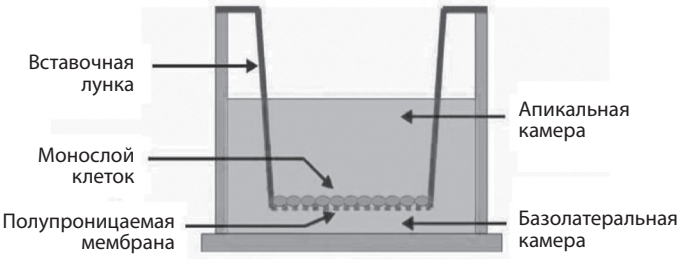


Рисунок 2.

Этапы формирования клеточного монослая клеток линии Сасо-2, ×200. Фазово-контрастная микроскопия.

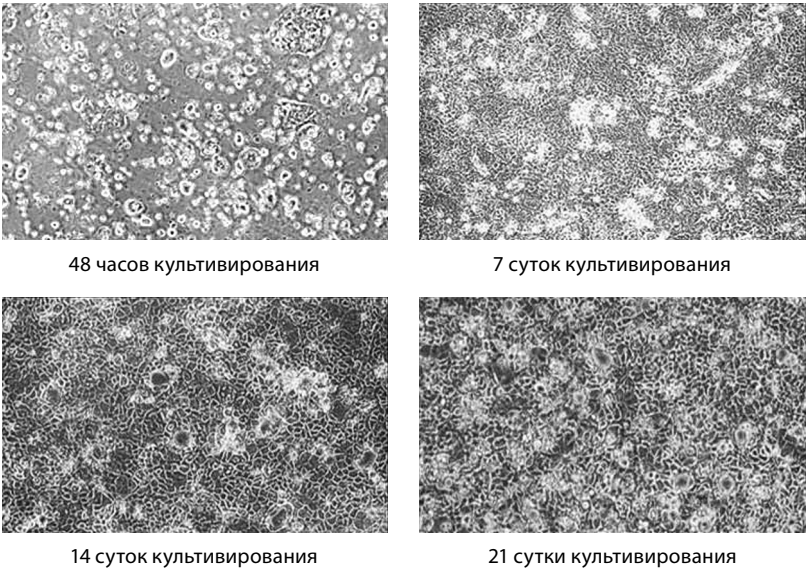
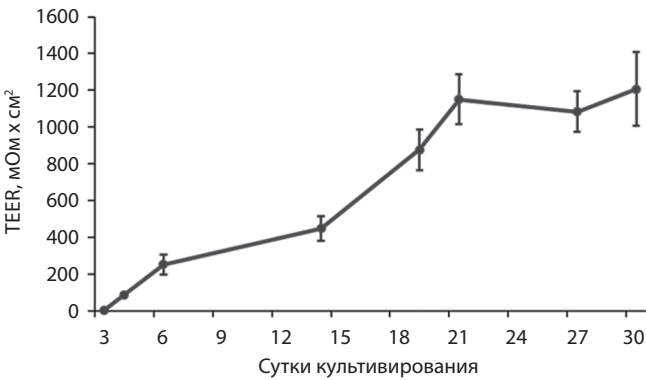


Рисунок 3.

Динамика роста трансэпителиального сопротивления (TEER) монослая клеток линии Сасо-2 при культивировании в течение 30 суток, МОм×см2 (M±SD).



транспорт по направлению из просвета кишки в сосуд).

На следующем этапе аналогичным образом оценивали транспорт веществ из базолатеральной камеры в апикальную (*b-a* транспорт). Этот транспорт характеризует работу эффлюксных транспортеров (Pgp, BCRP), препятствующих всасыванию лекарственных веществ.

Транспорт субстратов как из камеры *a* в камеру *b*, так и обратно оценивали по формуле [11]:

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

где P_{app} – коэффициент кажущейся проницаемости (apparent permeability coefficient), dQ/dt – изменение концентрации субстрата в камере реципиента за время инкубации,

A – площадь полупроницаемой мембраны лунки в трансвелл-системе, на которой культивировали клетки,

C_0 – начальная концентрация субстрата в камере-доноре.

Затем рассчитывали отношение коэффициентов кажущейся проницаемости: *b-a* к *a-b*.

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

Результаты

При засеивании клеток линии Сасо-2 на культуральные планшеты их размножение начиналось примерно через 48 ч, а к 5–7 суткам клетки формировали монослой (рис. 2).

Целостность монослоя и плотность межклеточных контактов оценивали по величине трансэпителиального сопротивления (TEER). Было показано, что с момента достижения 100% конfluence TEER постепенно увеличивалось, достигая максимальных значений к 21 сут, после чего выходило на плато (рис. 3).

Содержание Pgp в клетках линии Сасо-2 к 21 суткам культивирования, оцененное методом ИФА, составило $110,8 \pm 14,1$ нг/мг белка ($23,5 \pm 2,3$ нг/ 10^6 клеток), а уровень BCRP равнялся $4,39 \pm 0,12$ нг/мг белка ($0,93 \pm 0,05$ нг/ 10^6 клеток).

При оценке транспорта веществ через монослой клеток линии Сасо-2 были получены следующие результаты (табл. 1).

При изучении транспорта фексофенадина в концентрации 40 мкМ коэффициент кажущейся проницаемости $P_{app} b-a$ составил $2,54 \pm 0,60 \times 10^{-6}$ см/сек, $P_{app} a-b$, $1,29 \pm 0,51 \times 10^{-6}$ см/сек, а отношение $P_{app} b-a/P_{app} a-b = 2,19 \pm 1,16$. Соотношение коэффициентов больше «2» свидетельствует об активном транспорте фексофенадина в направлении из базолатеральной камеры в апикальную, что соответствует транспорту из клеток в просвет кишечника [16].

Повышение концентрации фексофенадина до 150 и 300 мкМ достоверно не влияло на изучаемые показатели: коэффициенты кажущейся проницаемости $P_{app} b-a$, $P_{app} a-b$ и их отношение $P_{app} b-a/P_{app} a-b$ статистически значимо не отличались от

Данный параметр является интегральным и оценивает асимметрию транспорта тестируемых веществ, если он больше «2», то это указывает на участие эффлюксных (выводящих вещества из клеток обратно в просвет кишки) транспортеров, если меньше 0,5 – то инфлюксных (транспортирующих вещества в клетки из просвета кишки) белков-переносчиков.

Концентрацию фексофенадина и этилметилгидроксипиридина в камерах реципиента оценивали методом ВЭЖХ-УФ на хроматографе «Стайер» (Россия) [12, 13], метотрексата – методом ВЭЖХ-МС/МС на хроматографе “Ultimate 3000” (“ThermoFisher”, США) и масс-спектрометре TSQ Fortis (“ThermoFisher”, США) [14].

Биоаналитические методики были валидированы по следующим параметрам [15]: селективность; калибровочная кривая (линейность); нижний предел количественного определения; точность (на уровнях внутри цикла, между циклами); прецизионность (на уровнях внутри цикла, между циклами); перенос пробы; стабильность образцов; матричный эффект.

Полученные результаты анализировали с помощью программы “StatSoft Statistica 13.0”, дисперсионным анализом (ANOVA) и критерием множественного сравнения Фишера. Результаты представлены в виде $M \pm SD$. Статистически значимыми считали различия при $p < 0,05$.

значений при концентрации 40 мкМ, отмечалась лишь тенденция к увеличению отношения $P_{app} b-a/P_{app} a-b$ с увеличением концентрации тестируемого вещества.

При концентрации метотрексата 5 мкМ коэффициент кажущейся проницаемости $P_{app} b-a$ составил $1,46 \pm 0,58 \times 10^{-6}$, $P_{app} a-b$, $0,44 \pm 0,18 \times 10^{-6}$, а отношение $P_{app} b-a/P_{app} a-b$ $3,38 \pm 0,08$. Отношение коэффициентов кажущейся проницаемости больше «2», что характеризует активный транспорт метотрексата в направлении из базолатеральной камеры в апикальную.

Увеличение концентрации метотрексата до 10 и 50 мкМ приводило к снижению коэффициента кажущейся проницаемости $P_{app} b-a$ на 90,4% ($p = 0,001$) и 91,1% ($p = 0,001$) соответственно.

Коэффициент кажущейся проницаемости $P_{app} a-b$ при добавлении метотрексата в концентрации 10 и 50 мкМ достоверно не отличался от значений данного показателя при концентрации 5 мкМ. В то же время происходило снижение отношения $P_{app} b-a/P_{app} a-b$ при концентрации 10 мкМ на – на 91,1% ($p < 0,001$), при концентрации 50 мкМ – на 87,6% ($p < 0,001$), что свидетельствует о преобладании процессов инфлюкса (транспорта по направлению из просвета кишечника в энтероциты) над процессами эффлюкса (транспорта из энтероцитов в просвет кишечника) в данных концентрациях.

Коэффициент кажущейся проницаемости $P_{app} b-a$ этилметилгидроксипиридина в концентрации 10 мкМ составил $7,56 \pm 2,98 \times 10^{-6}$ см/сек, в концентрации 100 мкМ статистически значимо от данного значения не отличался, а в концентрации 250 мкМ превышал его на 118,3% ($p < 0,05$). Коэффициент

кажущейся проницаемости Рарр *a-b* этилметилгидроксипиридина в концентрации 10 мкМ составил $7,66 \pm 1,71 \times 10^{-6}$ см/сек, в концентрации 100 мкМ статистически значимо от данного показателя не отличался, а в концентрации 250 мкМ превышал его на 191,1% ($p < 0,05$). Отношение коэффициентов кажущейся проницаемости Рарр *b-a*/ Рарр *a-b*

в концентрациях 10 мкМ, 100 мкМ и 250 мкМ между собой статистически значимо не различалось, а их значения были близки к «1». При этом обращало на себя внимание существенное превышение коэффициентов кажущейся проницаемости этилметилгидроксипиридина по сравнению с аналогичными показателями фексофенадина и метотрексата.

Обсуждение

В ходе настоящего исследования были охарактеризованы и подтверждены с использованием тест-субстратов свойства линии клеток Сасо-2 из Института цитологии РАН, и с ее помощью оценены механизмы абсорбции оригинального отечественного лекарственного препарата, обладающего антиоксидантной и антигипоксантами активностью, ЭМГПС.

При засевании в планшеты клетки линии Сасо-2 быстро начинали делиться и достигали 100% конfluence к 7 суткам, а к 21 суткам формировали клеточный монослой с плотными межклеточными контактами, о чем свидетельствуют стабильно высокие уровни TEER. Полученные результаты согласуются с данными литературы [17].

На следующем этапе исследования в клеточной линии Сасо-2 был оценен уровень эффлюксных белков-транспортеров – Pgp и BCRP. Данные белки-транспортеры играют важную роль в фармакокинетике лекарственных веществ, а клетки Сасо-2 являются тест-системой, рекомендованной для оценки их участия в абсорбции лекарственных веществ [18].

Согласно данным литературы содержание Pgp – 1 пмоль/мг [19], а BCRP в тонкой кишке человека 0,5 пмоль/мг белка, а что примерно соответствует уровням белков, полученным в нашем исследовании.

В ходе эксперимента была проведена оценка транспорта субстрата Pgp – фексофенадина, субстрата BCRP – метотрексата и отечественного лекарственного препарата – ЭМГПС (Мексидол) через монослой клеток линии Сасо-2.

При изучении транспорта фексофенадина в концентрациях 40, 150 и 300 мкМ было показано, что коэффициент кажущейся проницаемости Рарр *b-a* превышал коэффициент кажущейся проницаемости Рарр *a-b*, что свидетельствует о том, что транспорт данного вещества в направлении из энтероцитов в просвет кишечника превышает транспорт в обратном направлении. Данная асимметрия обусловлена функционированием эффлюксного белка-транспортера Pgp, который препятствует абсорбции субстратов из кишечника [16].

При концентрации метотрексата 5 мкМ его транспорт в направлении из энтероцитов в просвет кишечника превышал транспорт в обратном направлении, что обусловлено работой эффлюксного белка-транспортера BCRP, который препятствует абсорбции субстратов из кишечника. При увеличении концентрации метотрексата до 10 и 50 мкМ, наоборот, транспорт вещества в направлении из просвета кишки в энтероциты превышал транспорт в противоположном направлении. Скорее всего это связано с насыщением белка-транспортера BCRP с одной стороны, с другой – с конкуренцией BCRP с другим транспортным белком – RFC1, который обеспечивает всасывание метотрексата и также присутствует в клетках линии Сасо-2 [20, 21].

При изучении транспорта этилметилгидроксипиридина через монослой клеток Сасо-2 было показано, что его коэффициенты кажущейся проницаемости Рарр *b-a* и Рарр *a-b* существенно превышают аналогичные показатели фексофенадина и метотрексата. При этом их соотношение примерно равно «1», что свидетельствует о том, что проникновение этилметилгидроксипиридина в направлении из просвета кишки в энтероциты соответствует его транспорту в противоположном направлении. Полученные данные, свидетельствуют о том, что ЭМГПС не является субстратом транспортных белков Pgp и BCRP, а механизмом его абсорбции является пассивная диффузия.

Характеристика проникновения тестируемых веществ через монослой клеток линии Сасо-2 совпадает с их абсорбцией *in vivo*. При пероральном приеме фексофенадина Смакс у пациентов достигается в среднем через 2 ч [22]. Показано, что межиндивидуальная фармакокинетика метотрексата очень вариабельна и может достигать от 40 до 100%, а абсорбция снижается с увеличением дозы, что объясняется насыщением RFC1 [20]. ЭМГПС (Мексидол) быстро всасывается при внутривенном введении крысам wistar, достигая максимальной концентрации уже через 30 мин [23].

Заключение

Таким образом, клетки линии Сасо-2, коммерчески доступные в Российской Федерации, обладают основными свойствами энтероцитов тонкого кишечника, формируют плотный клеточный монослой, экспрессируют эффлюксные белки-транспортеры Pgp и BCRP и могут быть использованы для исследования абсорбции лекарствен-

ных веществ *in vitro*. Исследование абсорбции ЭМГПС с помощью клеточной линии Сасо-2 показало, что вещество быстро проходит через монослой клеток, а механизмом его всасывания, вероятнее всего, является пассивная диффузия, без участия специфических транспортеров, – Pgp и BCRP.

Литература | References

1. Fogh J., Fogh J.M., Orfeo T. One hundred and twenty-seven cultured human tumor cell lines producing tumors in nude mice. *J Nat Cancer Inst.* 1977; 59(1):221–226. doi: 10.1093/jnci/59.1.221.
2. Chantret I., Barbat A., Dusaulx E. et al. Epithelial polarity, vlin expresion, and enterocytic differentiation of cultured human colon carcinoma cels: A survey of twenty cell lines. *Cancer Res.* 1988;48:1936.
3. Sun H., Chow E. C., Liu S., et al. The Caco-2 cell monolayer: Usefulness and limitations. *Expert Opin. Drug Metab. Toxicol.* 2008;4(4): 395–411. doi: 10.1517/17425255.4.4.395.
4. Vachon P.H., Beaulieu J.F. Transient mosaic patterns of morphological and functional differentiation in the Caco-2 cell line. *Gastroenterology.* 1992; 103:414–423. doi: 10.1016/0016-5085(92)90829-n.
5. Watson C.J., Rowland M., Warhurst G. Functional modeling of tight junctions in intestinal cell monolayers using polyethylene glycol oligomers. *Am J Physiol Cell Physiol.* 2001;281:388–397. doi: 10.1152/ajpcell.2001.281.2.C388.
6. Thambavita D., Galappatthy P., Mannapperuma U., et al. Biowaiver Monograph for Immediate-Release Solid Oral Dosage Forms: Amoxicillin Trihydrate. *J Pharm Sci.* 2017;106(10):2930–2945. doi: 10.1016/j.xphs.2017.04.068.
7. Tampal N., Mandula H., Zhang H., et al. Biopharmaceutics classification system-based biowaivers for generic oncology drug products: case studies. *AAPS PharmSciTech.* 2015;16(1):5–9. doi: 10.1208/s12249-014-0195-7.
8. U.S. Department of Health and Human Services Food and Drug Administration, Center for Drug Evaluation and Research (CDER). In Vitro Drug Interaction Studies – Cytochrome P450 Enzyme- and Transporter Mediated Drug Interactions Guidance for Industry, 2020, 43 P.
9. Liu X., Pan G. Drug Transporters in Drug Disposition, Effects and Toxicity. *Advances in Experimental Medicine and Biology.* 2019; 1141:580 P.
10. Natoli M., Leoni B. D., D'Agnano I., Zucco F., Felsani A. Good Caco-2 cell culture practices. *Toxicol In Vitro.* 2012. 26(8):1243–6. doi:10.1016/j.tiv.2012.03.009.
11. Elsby R., Surry D.D., Smith V.N., Gray A. J. 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. *Xenobiotic.* 2008;(38):1140–1164. doi:10.1080/00498250802050880.
12. Erokhina P.D., Abalenikhina Yu.V., Shchulkin A. V., Chernykh I. V. et al. A study of influence of progesterone on activity of glycoprotein-P in vitro. *I. P. Pavlov Russian Medical Biological Herald.* 2020;28(2):135–42. (in Russ.) doi:10.23888/PAVLOVJ2020282135–142.
Ерохина П. Д., Абаленихина Ю. В., Шулькин А. В., Черных И. В. и др. Изучение влияния прогестерона на активность гликопротеина-P in vitro. Российский медико-биологический вестник имени академика И. П. Павлова. 2020; 28(2): 135–142. doi:10.23888/PAVLOVJ2020282135–142.
13. Chernykh I.V., Shchul'kin A.V., Gacanoga M. V., Mylnikov P.YU. [Development of an HPLC method for the quantitative determination of ethylmethylhydroxypyridine succinate in the blood plasma of rats and rabbits]. *I. P. Pavlov Russian Medical Biological Herald.* 2015;23(1):62–66. (In Russ.)
Черных И. В., Шулькин А. В., Гацаного М. В., Мыльников П. Ю. Разработка ВЭЖХ методики количественного определения этилметилгидроксипиридина сукцината в плазме крови крыс и кроликов. Российский медико-биологический вестник имени академика И. П. Павлова. 2015;(23):62–66.
14. Mylnikov P. Yu., Tranova Yu., Shchulkin A. V., Yakusheva E. N. Development and validation of the method for the quantitative determination of methotrexate in a transport medium by HPLC–MS/MS. *Pharmacokinetics and Pharmacodynamics.* 2021;(1):45–51. (In Russ.) doi:10.37489/2587-7836-2021-1-45-51.
Мыльников П. Ю., Транова Ю., Шулькин А. В., Якушева Е. Н. Разработка и валидация методики количественного определения метотрексата в транспортной среде методом ВЭЖХ–МС/МС. Фармакокинетика и фармакодинамика. 2021;(1):45–51. doi:10.37489/2587-7836-2021-1-45-51.
15. Department of Health and Human Services, Food and Drug Administration, Center for Drug Evaluation and Research (CDER). Bioanalytical method validation. U. S. Government Printing Office: Washington, DC, 2018, 41 P.
16. Kim K.A., Park J. Y. Effect of metronidazole on the pharmacokinetics of fexofenadine, a P-glycoprotein substrate, in healthy male volunteers. *Eur J Clin Pharmacol.* 2010; 66(7):721–5. doi: 10.1007/s00228-010-0797-2.
17. Hilgers A.R., Conradi R. A., Burton P. S. Caco-2 cell monolayers as a model for drug transport across the intestinal mucosa. *Pharm Res.* 1990;(7):902–910. doi:10.1023/a:1015937605100
18. Fine K.D., Santa Ana C. A., Porter J. L., Fordtran J. S. Effect of changing intestinal flow rate on a measurement of intestinal permeability. *Gastroenterology.* 1995;108:983–989. doi: 10.1016/0016-5085(95)90193-0.
19. Al-Majdoub Z.M., Achour B., Couto N., Howard M., Elmorsi Y. et al. Mass spectrometry-based abundance atlas of ABC transporters in human liver, gut, kidney, brain and skin. *FEBS Lett.* 2020;594(23):4134–4150. doi: 10.1002/1873-3468.13982.
20. Maksimovic V., Pavlovic-Popovic Z., Vukmirovic S., Cvejic J. et al Molecular mechanism of action and pharmacokinetic properties of methotrexate. *Mol Biol Rep.* 2020;47(6):4699–4708. doi: 10.1007/s11033-020-05481-9
21. Narawa T., Tsuda Ya., Itoh T. Chiral Recognition of Amethopterin Enantiomers by the Reduced Folate Carrier in Caco-2 Cells. *Drug Metab. Pharmacokin.* 2007;22(1):33–40. doi: 10.2133/dmpk.22.33.
22. Shchul'kin A.V., Chernykh I.V., Gacanoga M. V., Yakusheva E. N. Vliyanie afobazola na aktivnost' ABCB1-belka u pacientov s nizkoj trevozhnost'yu. [Effect of afobazole on ABCB1 protein activity in patients with low anxiety]. *Pharmacogenetics and Pharmacogenomics.* 2019;(2):35–37. (In Russ.) doi: 10.24411/2588-0527-2019-10060.
Шулькин А. В., Черных И. В., Гацаного М. В., Якушева Е. Н. Влияние афобазола на активность ABCB1-белка у пациентов с низкой тревожностью. Фармакогенетика и фармакогеномика. 2019;2:35–37. doi: 10.24411/2588-0527-2019-10060. (In Russ.)
23. Shchulkin A.V., Yakusheva E. N., Chernykh I. V. The distribution of mexidol in the rat's brain and its subcellular fractions. *Zhurnal Nevrologii i Psikiatrii imeni S. S. Korsakova.* 2014;114(8):70–73. (In Russ.)
Шулькин А. В., Якушева Е. Н., Черных И. В. Распределение мексидола в структурах головного мозга, его клеточных элементах и субклеточных фракциях. Журнал неврологии и психиатрии им. С. С. Корсакова. 2014;114(8):70–73.