

<https://doi.org/10.33380/2305-2066-2022-11-3-195-201>
УДК 615.011; 576.08



Оригинальная статья / Research article

Изучение кишечной проницаемости на модели Caco-2 производного фенилтетрагидрохинолиндина с TRPA₁-антагонистической активностью

Н. В. Пятигорская, А. Д. Кравченко ✉

ФГАОУ ВО Первый МГМУ им. И. М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский университет), 119991, Россия, г. Москва, ул. Трубецкая, д. 8, стр. 2

✉ Контактное лицо: Кравченко Алексей Дмитриевич. E-mail: aleksej_kravchenko97@mail.ru

ORCID: Н. В. Пятигорская – <http://orcid.org/0000-0003-4901-4625>; А. Д. Кравченко – <http://orcid.org/0000-0001-6476-0138>.

Статья поступила: 15.11.2021

Статья принята в печать: 11.04.2022

Статья опубликована: 25.08.2022

Резюме

Введение. Данная работа посвящена изучению кишечной проницаемости инновационного биологически активного вещества – 7-(2-хлорфенил)-4-(4-метил-1,3-тиазол-5-ил)-4,6,7,8-тетрагидрохинолин-2,5(1H,3H)-диона с TRPA₁-антагонистической активностью. Данное производное фенилтетрагидрохинолиндина может стать перспективным анальгетическим и противовоспалительным средством, для разработки лекарственной формы которого необходимо обладать информацией о механизмах и степени его абсорбции в желудочно-кишечном тракте.

Цель. Целью данного исследования являлось изучение кишечной проницаемости производного фенилтетрагидрохинолиндина на культуре клеток Caco-2 и сопоставление полученных результатов с рассчитанными значениями коэффициентов распределения октанол/вода.

Материалы и методы. Исследование проницаемости проводилось со стороны апикальной мембраны к базолатеральной (А-В) и в обратном направлении (В-А). В качестве контрольных соединений выступали: ранитидин (низкая проницаемость), пропранолол (высокая проницаемость) и родамин 123 (субстрат Pgp-транспортера). Определение концентрации исследуемого соединения проводили с помощью УЭЖХ-МС/МС системы, состоящей из жидкостного хроматографа и tandemного масс-спектрометра с тройным квадруполом и электрораспылительным ионным источником. Расчет LogP проводился с помощью следующих ресурсов: ChemDraw Professional 16.0, Molinspiration, ALOGPS 2.1.

Результаты и обсуждение. Для исследуемого и контрольных соединений были получены значения коэффициента кажущейся проницаемости (P_{app}) и коэффициента эффлюкса, на основании которых были сделаны следующие выводы: исследуемое соединение обладает высокой кишечной проницаемостью как в прямом направлении от апикальной к базолатеральной мембране клеток, так и в обратном направлении (P_{app} больше 10×10^{-6} см/с); асимметрии транспорта, характерной для субстратов Pgp (P-гликопротеина) и других активных транспортеров, не наблюдается (коэффициент эффлюкса менее 2 единиц); зависимости проницаемости от концентрации исследуемого соединения не наблюдается. Рассчитанные экспериментальные значения P_{app} согласуются с полученными *in silico* значениями коэффициентов распределения октанол/вода, наилучшая корреляционная зависимость была установлена для miLogP (Molinspiration) и CLogP (ChemDraw).

Заключение. Таким образом, полученные *in vitro* и *in silico* данные говорят о пассивной диффузии – как об основном механизме всасывания производного фенилтетрагидрохинолиндина в желудочно-кишечном тракте.

Ключевые слова: кишечная проницаемость, Caco-2, TRPA₁

Конфликт интересов. Авторы декларируют отсутствие явных и потенциальных конфликтов интересов, связанных с публикацией настоящей статьи.

Вклад авторов. Н.В. Пятигорская спланировала эксперимент и отредактировала текста статьи. А.Д. Кравченко выполнил экспериментальную часть и написал текст статьи.

Для цитирования: Пятигорская Н. В., Кравченко А. Д. Изучение кишечной проницаемости на модели Caco-2 производного фенилтетрагидрохинолиндина с TRPA₁-антагонистической активностью. *Разработка и регистрация лекарственных средств*. 2022;11(3):195–201. <https://doi.org/10.33380/2305-2066-2022-11-3-195-201>

Caco-2 Intestinal Permeability Study of Phenyltetrahydroquinolinedione Derivative – TRPA₁ Antagonist

Natalya V. Pyatigorskaya, Aleksey D. Kravchenko ✉

I. M. Sechenov First MSMU of the Ministry of Health of the Russian Federation (Sechenov University), 8/2, Trubetskaya str., Moscow, 119991, Russia

✉ Corresponding author: Aleksey D. Kravchenko. E-mail: aleksej_kravchenko97@mail.ru

ORCID: Natalya V. Pyatigorskaya – <http://orcid.org/0000-0003-4901-4625>; Aleksey D. Kravchenko – <http://orcid.org/0000-0001-6476-0138>.

Received: 15.11.2021

Revised: 11.04.2022

Published: 25.08.2022

Abstract

Introduction. This work is devoted to the intestinal permeability study of 7-(2-chlorophenyl)-4-(4-methyl-1,3-thiazol-5-yl)-4,6,7,8-tetrahydroquinoline-2,5(1H,3H)-dione – innovative biologically active substance with TRPA₁ antagonist activity. The phenyltetrahydroquinolinedione derivative is a promising analgesic and anti-inflammatory drug. To develop a dosage form of this new substance, it is necessary to study the mechanism and degree of its absorption.

© Пятигорская Н. В., Кравченко А. Д., 2022

© Pyatigorskaya N. V., Kravchenko A. D., 2022

Aim. The aim of this work was to investigate the intestinal permeability of the phenyltetrahydroquinolinedione derivative using Caco-2 cell model and to compare experimental results with the *in silico* obtained values of the octanol/water partition coefficients.

Materials and methods. The study of permeability was carried out from the apical membrane to the basolateral (A-B) and in the opposite direction (B-A). Ranitidine (low permeability), propranolol (high permeability) and rhodamine 123 (P-glycoprotein substrate) were used as control compounds. The concentration of the test compound was determined by UHPLC-MS/MS system consisting of a liquid chromatograph and a tandem mass spectrometer with a triple quadrupole and an electrospray ion source. The LogP was calculated using the following resources: ChemDraw Professional 16.0, Molinspiration, ALOGPS 2.1.

Results and discussion. The values of the apparent permeability (P_{app}) and efflux ratios of the test and control compounds were obtained. According to the results of the study, the following conclusions were made: the test compound has high permeability both in the forward direction from the apical to the basolateral cell membrane, and in the opposite direction ($P_{app} > 10 \times 10^{-6}$ cm/s). P-glycoprotein-mediated efflux activity was not observed (the efflux ratio was less than 2 units). The permeability did not depend on the test compound input concentration. The obtained experimental P_{app} values were correlated with the *in silico* obtained values of partition coefficients. The best correlation was obtained for mLogP (Molinspiration) and CLogP (ChemDraw).

Conclusion. Thus, the *in vitro* and *in silico* obtained data indicate that passive diffusion is the main mechanism of absorption of the test compound in the gastrointestinal tract.

Keywords: intestinal permeability, Caco-2, TRPA₁

Conflict of interest. The authors declare that they have no obvious and potential conflicts of interest related to the publication of this article.

Contribution of the authors. Natalya V. Pyatigorskaya planned the experiment and edited the text of the article. Aleksey D. Kravchenko set up the experiment and wrote the text of the article.

For citation: Pyatigorskaya N. V., Kravchenko A. D. Caco-2 intestinal permeability study of phenyltetrahydroquinolinedione derivative – TRPA₁ antagonist. *Drug development & registration*. 2022;11(3):195–201. (In Russ.) <https://doi.org/10.33380/2305-2066-2022-11-3-195-201>

ВВЕДЕНИЕ

В настоящее время для оценки степени проницаемости через кишечную мембрану применяются три основных подхода: *in vivo* (на живых организмах), *ex vivo* (на изолированных тканях) и *in vitro* (на биомиметических мембранах или культурах клеток). На ранних этапах разработки лекарственных средств часто применяется способ *in vitro* благодаря его относительной простоте и экономичности. Среди методов *in vitro* наиболее широкое распространение получила культура клеток аденокарциномы толстого кишечника – Caco-2 [1]. Исследование проницаемости на культуре клеток Caco-2 является методом, способным с достаточной достоверностью прогнозировать абсорбцию *in vivo* [2–4]. К недостаткам данного метода можно отнести то, что при изучении проницаемости *in vitro*, в отличие от исследований на живых организмах и изолированных тканях, не учитывается влияние физиологических факторов: желудочно-кишечного сока, кинетики желудочно-кишечного тракта, различие в экспрессии транспортеров, значении трансэпителиального электрического сопротивления и др. [1]. Из-за гетерогенности культуры клеток и условий их культивирования для данного теста также характерна невысокая межлабораторная воспроизводимость, в связи с чем получаемые в исследовании на культуре клеток Caco-2 данные не интерпретируются количественно [5]. Однако в качественной оценке проницаемости биологически ак-

тивных веществ данные недостатки считаются незначительными и нивелируются за счет применения контрольных веществ с известной биодоступностью [6]. В качестве внутренних стандартов, рекомендованных FDA для оценки проницаемости, в данной работе применялись: ранитидин (Р), обладающий низкой кишечной абсорбцией, пропранолол (П), для которого характерна высокая проницаемость и родамин 123 (Р123) – субстрат транспортера Р-гликопротеина (Pgp) [7], в качестве ингибитора которого выступал циклоспорин А (ЦА).

Изучаемое соединение (ИС) – 7-(2-хлорфенил)-4-(4-метил-1,3-тиазол-5-ил)-4,6,7,8-тетрагидрохинолин-2,5(1H,3H)-дион в доклинических исследованиях продемонстрировало перспективные результаты с точки зрения анальгетической и противовоспалительной активности [8], что послужило причиной дальнейшего изучения свойств данного соединения с целью разработки его лекарственной формы. Для обоснования способа введения лекарственного вещества, выбора лекарственной формы и технологии получения лекарственного средства широко применяется подход, основанный на биофармацевтической классификационной системе (БКС) [9]. Для установления класса БКС, от которого будет зависеть дальнейший подход к разработке лекарственного средства, содержащего ИС, необходимо обладать информацией о проницаемости данного соединения, которая согласно руководству FDA, в частности, может быть получена на культуре клеток Caco-2.

Таким образом, **целью данной работы** являлось изучение кишечной проницаемости производного фенилтетрагидрохинолиндиона *in vitro* на культуре клеток Caco-2, а также сопоставление полученных данных с рассчитанными с помощью разных ресурсов значениями коэффициентов распределения октанол/вода LogP.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В процессе исследования были использованы материалы и оборудование: линия клеток Caco-2 (American Type Culture Collection – ATCC, кат. № HTB-37, США), 96-луночный планшет для автосэмплера 0,5 мл (Agilent, кат. № 5042-1386, США); Millicell-96 планшет с фильтром и резервуаром для изучения транспорта через клеточный монослой 0,4 мкм PCF (Millipore, кат. № PSHT00455, США); OptiPlate-384, White Opaque 384-луночный планшет (Perkin Elmer, кат. № 6007299, США), хроматограф для ультраэффективной жидкостной хроматографии Agilent 1290 Infinity (Agilent Technologies, США); масс-спектрометр QTRAP 5500 (Sciex Corp, США); измеритель сопротивления Millicell-ERS (Millipore, кат. № MERS00001, США); углекислотные инкубаторы (Sanyo; Sheldon Mfg. Inc., Япония); центрифуга для пробирок 5810R (Eppendorf, Германия).

Выбор концентрации изучаемого соединения

Исходные концентрации исследуемого соединения были выбраны с учетом рекомендаций руководства FDA по изучению проницаемости веществ *in vitro* [7], согласно которому считается, что вещество обладает пассивной диффузией, если его проницаемость не зависит от исходной концентрации вещества в диапазоне 0,01-, 0,1-, 1-кратной максимальной дозы, растворенной в 250 мл воды, а также не зависит от направления (коэффициент эффлюкса составляет от 0,5 до 2). Ориентировочная однократная терапевтическая доза изучаемого соединения составляет 10 мг, поэтому изначально для исследования были выбраны концентрации: 0,4, 4 и 40 мкг/мл, находящиеся в пределах требуемого диапазона. Однако первоначальные результаты показали нерастворимость вещества в концентрациях 4 мкг/мл и выше, в связи с чем было проведено повторное исследование проницаемости в концентрациях: 0,001, 0,01 и 0,1 мкг/мл.

Культивирование Caco-2 клеток

Линия клеток Caco-2 была получена из коммерчески доступного набора ATCC (кат. № HTB-37) и культивировалась согласно рекомендациям ATCC и Millipore [10] во флаконах на 75 см² при 37 °C и среде 5 % CO₂. Клетки пересеивали 2 раза в неделю в соотношении 1:6. Среда для культивирования Caco-2 клеток содержала: Dulbecco's Modified Eagle's Medium (Thermo Fisher Scientific, кат. № 11965084, США), 0,584 г/л L-глутамин (ООО «ПанЭко», кат. № Ф032,

Россия), 10 % бычьей сыворотки (HyClone, кат. № SH30070.03), 100 Ед/мл пенициллина и 0,1 мг/мл стрептомицина (ООО «ПанЭко», кат. № А065, Россия), 2 % незаменимых аминокислот (ООО «ПанЭко», кат. № Ф116, Россия).

Посадка и инкубация клеток

Для проведения эксперимента Caco-2 клетки 10–50 пассажа в состоянии 80–90 % покрытия флакона помещали в планшеты с двухкомпонентными ячейками Millicell-96 в количестве 10 000 на 0,11 см² лунку, что соответствует 90 909 клеток/см². Дно внутренней части ячейки состояло из полупроницаемого фильтра, на котором образовывался клеточный монослой. Культуру клеток инкубировали в течение 21 дня со сменой среды 2 раза в неделю в первые 2 недели и 3 раза в последнюю. С помощью прибора Millicell-ERS измеряли трансэпителиальное электрическое сопротивление, которое должно было составлять не менее 3 кОм/лунку в случае целостности монослоя клеток.

Методика эксперимента

Готовили буферные растворы исследуемого и контрольных веществ с добавлением или без добавления циклоспорина А.

Для определения проницаемости из апикальной (А) в базолатеральную (В) область добавляли по 90 мкл буферных растворов тестируемых веществ в верхние лунки с фильтрами и по 250 мкл буферного раствора, не содержащего веществ, в лунки нижнего транспортного планшета. При определении проницаемости из базолатеральной (В) области в апикальную (А) добавляли по 250 мкл буферных растворов тестируемых соединений в нижние лунки и по 90 мкл буферных растворов без веществ в верхние лунки планшета. Эксперимент проводили в трех повторностях.

Инкубировали собранную Millicell-96 Caco-2 систему в течение 2 ч при 37 °C на шейкере при 300 об/мин. Разъединяли верхнюю и нижнюю части планшета.

Отбирали по 70 мкл растворов из верхней и нижней частей планшета в отдельные пробирки в штативе, затем в каждую добавляли по 210 мкл охлажденного до +4 °C раствора, содержащего ацетонитрил и воду очищенную (1:1) и 200 нг/мл внутреннего стандарта толбутамида (IS). Образцы хранили при температуре не выше –70 °C до УЭЖХ-МС/МС анализа.

Характеристика биоаналитического метода

Определение концентрации анализируемых веществ проводили с помощью УЭЖХ-МС/МС системы, состоящей из жидкостного хроматографа Agilent 1290 Infinity UHPLC и масс-спектрометра QTRAP 5500 с тройным квадруполом и электрораспылительным модулем TurbolonSpray.

Оптимизированные УЭЖХ-МС/МС параметры определения вещества приведены в таблице 1.

Таблица 1. Параметры УЭЖХ-МС/МС метода

Table 1. UHPLC-MS/MS system parameters

Подвижная фаза А Mobile phase A	0,1%-й раствор муравьиной кислоты в воде 0.1 % formic acid in water				
Подвижная фаза В Mobile phase B	0,1%-й раствор муравьиной кислоты в ацетонитриле 0.1 % formic acid in acetonitrile				
Хроматографическая колонка Chromatography column	YMC-Triart C8, 50 × 2 мм, 1,9 мкм YMC-Triart C8, 50 × 2 mm, 1.9 μm				
Градиентная программа Gradient program	Время, мин Time, min	Скорость потока, мл/мин Flow rate, ml/min	A, %	B, %	
	0,0	0,5	50	50	
	1,0	0,5	5	95	
	1,6	0,5	5	95	
	1,7	0,5	50	50	
2,9	0,5	50	50		
Температура колонки Column temperature	40 °C				
Температура в автосэмплере Autosampler temperature	8 °C				
Объем ввода Input volume	0,3 мкл 0.3 μl				
Общее время анализа Total analysis time	2,9 мин 2.9 min				
Время удерживания Retention time	Исследуемое соединение Test compound (TC)	0,48 мин 0.48 min			
	Толбутамид (IS) Tolbutamide (IS)	0,62 мин 0.62 min			
Тип источника ионов Ion source type				Turbo Spray	
Режим ионизации Ionization mode				Положительный Positive	
Температура источника Source temperature				450 °C	
Напряжение в источнике (IS), В Ion spray voltage (IS), V				5500	
Газ-завеса (CUR), psi Curtain (CUR) gas, psi				30	
Газ-небулайзер (GS1), psi Nebulizer gas (GS1), psi				55	
Газ-нагреватель (GS2), psi Heater gas (GS2), psi				25	
Потенциал на входе в ячейку соударений (EP), В Entrance Potential (EP), V				10	
Аналит Analyte	Q1/Q3 переход Q1/Q3 transition	Время измерения, мсек Dwell time, ms	DP ¹ , В DP ¹ , V	CE ² , эВ CE ² , eV	CXP ³ , В CXP ³ , V
ИС* ТС*	373,1/312	50	50	36	10
ИС ТС	373,1/339,1	50	50	39	10
IS*	271,1/91	40	136	41	10
IS	271/74	40	136	17	12

Примечание. * Использовался для количественного расчета; ¹ DP – декластеризующий потенциал; ² CE – энергия соударений; ³ CXP – потенциал на выходе из ячейки соударений.

Note. * Substance was used for quantitative analysis; ¹ DP – declustering potential; ² CE – collision energy; ³ CXP – collision cell exit potential.

Обработка данных и расчеты

Площади под хроматографическими пиками анализов, нормированные на сигнал внутреннего стандарта (AUC/IS), использовали для нижеприведенных расчетов.

Коэффициент кажущейся проницаемости (P_{app} , см/с) рассчитывали по формуле (1):

$$P_{app} = \left(\frac{V_A}{\text{Area} \times \text{Time}} \right) \times \left(\frac{C_A(t)}{C_D(0)} \right), \quad (1)$$

где V_A – объем в акцепторной лунке, который равен 0,25 мл для проницаемости [A-B] и 0,09 мл для проницаемости [B-A]. Area – площадь поверхности, которая составляет 0,11 см² для Millicell-96 плашки. Time – время транспорта (7200 с). $C_A(t)$ – AUC/IS вещества в акцепторной лунке после эксперимента; $C_D(0)$ – AUC/IS исходного раствора вещества в донорной лунке.

Рассчитывали коэффициент кажущейся проницаемости (P_{app}) веществ в обоих направлениях в присутствии и без добавления циклоспорина А, а также коэффициент эффлюкса (КЭ), то есть отношение $P_{app} \text{ (B-A)} / P_{app} \text{ (A-B)}$, показывающее разницу в проницаемости, возникающую за счет активного транспорта. Если данное отношение находится в диапазоне от 0,5 до 2,0, то вещество не подвергается активному транспорту [7]. Для субстратов Pgp и других активных транспортеров значение коэффициента эффлюкса приближается к 1 в присутствии циклоспорина А.

Массовый баланс по окончании эксперимента рассчитывали по формуле (2):

$$\text{Извлечение (\%)} = 100 \times \left(\frac{C_A(t) \times V_a + C_D(t) \times V_d}{C_D(0) \times V_d} \right), \quad (2)$$

где $C_A(t)$ – AUC/IS вещества в акцепторной лунке после эксперимента; $C_D(t)$ – AUC/IS вещества в донорной лунке после эксперимента; V_a – объем в акцепторной лунке, мл; V_d – объем в донорной лунке, мл.

Коэффициенты распределения октанол/вода: CLogP, miLogP, ALogP были получены с помощью следующих программ и ресурсов: ChemDraw Professional 16.0, Molinspiration, ALOGPS 2.1 соответственно.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В таблице 2 приведены результаты определения проницаемости исследуемого соединения и контрольных веществ. Растворы изучаемого соединения с концентрациями 4 мкг/мл и 40 мкг/мл характеризуются низким процентом извлечения, указывающим на неполный переход вещества в растворимое состояние, что подтверждается наблюдаемой опалесценцией растворов, поэтому результаты, полученные при данных концентрациях, не учитывались при оценке проницаемости исследуемого соединения.

Сравнение значений коэффициентов кажущейся проницаемости исследуемого соединения в диапазоне концентраций от 0,001 мкг/мл до 0,4 мкг/мл с коэффициентами P_{app} пропранолола ($23,3 \times 10^{-6}$ см/с) и P_{app} ранитидина ($1,4 \times 10^{-6}$ см/с), полученными в аналогичных условиях, позволяет достоверно отнести исследуемое соединение к группе веществ с высокой кишечной проницаемостью. При этом производное фенилтетрагидрохинолиндиона демонстрирует высокую проницаемость как в прямом направлении от апикальной к базолатеральной мембране A-B, так и в обратном направлении B-A ($P_{app} > 23,3 \times 10^{-6}$ см/с). Асимметрии транспорта, характерной для типичного Pgp-субстрата – родамина 123, для которого коэффициент эффлюкса >2 (фактическое значение 2,10) в отсутствие циклоспорина А и приближается к 1 (фактическое значение 0,98) в эксперименте с циклоспорином А, для исследуемого соединения не наблюдается (коэффициент эффлюкса 1,30). Зависимости коэффициентов проницаемости от концентрации для исследуемого соединения также не отмечено (R^2 для линейной зависимости = 0,183).

Таким образом, согласно руководству [7] исследуемое вещество обладает высокой кишечной проницаемостью, а также всеми признаками, характерными для веществ, способных посредством пассивной диффузии проникать через клеточные мембраны.

Полученные средние значения коэффициентов кажущейся проницаемости исследуемого и контрольных веществ были сопоставлены с соответствующими рассчитанными величинами коэффициентов распределения октанол/вода (таблица 3).

Полученные экспериментальные результаты согласуются с рассчитанными значениями LogP, при этом коэффициенты распределения октанол/вода исследуемого соединения для всех программ превышают значения, разделяющие вещества с высокой и низкой проницаемостью: согласно исследованию [11] значение CLogP должно превышать 1,35, согласно работе [12] – CLogP должен быть больше 1,49, ALogP – больше 1,61. Подобных данных для miLogP не было найдено в открытом доступе, поэтому с учетом того, что в указанных исследованиях разделяющим стандартом выступал метопролол, можно считать, что miLogP исследуемого соединения, превышающий таковой для метопролола (1,97), также согласуется с полученными экспериментальными данными. В рамках данного исследования наиболее крепкая корреляция была установлена для ресурсов Molinspiration и ChemDraw, низкое значение коэффициента детерминации, установленное для ALOGPS 2.1, и разброс полученных значений LogP (RSD для изучаемого соединения составляет 24,7%) могут быть объяснены разными подходами к расчету и базами данных экспериментальных значений LogP, используемыми данными ресурсами для установления зависимости «структура – свойство».

Таблица 2. Проницаемость и асимметрия транспорта веществ на модели клеток Caco-2

Table 2. Permeability and asymmetry of substance transport on the model of Caco-2 cells

№ опыта Experiment No.	Соединение, концентрация Compound, concentration	$P_{app}^{A-B}, \times 10^{-6} \text{ cm/s}$ $P_{app}^{A-B}, \times 10^{-6} \text{ cm/s}$	RSD A-B, %	$P_{app}^{B-A}, \times 10^{-6} \text{ cm/s}$ $P_{app}^{B-A}, \times 10^{-6} \text{ cm/s}$	RSD B-A, %	КЭ EC	Извлечение AB/BA, % Recovery AB/BA, %
1	ИС, 40 мкг/мл ТС, 40 µg/ml	13,50	2,1	13,80	1,5	1,02	28,0/29,8
1	ИС, 4 мкг/мл ТС, 4 µg/ml	5,09	33,8	3,99	12,3	0,78	19,0/22,6
1	ИС, 0,4 мкг/мл ТС, 0,4 µg/ml	43,10	10,4	26,20	4,2	0,61	99,4/109,0
2	ИС, 0,1 мкг/мл ТС, 0,1 µg/ml	56,90	15,7	43,80	3,6	0,77	125,0/114,0
2	ИС, 0,01 мкг/мл ТС, 0,01 µg/ml	28,20	11,0	55,60	1,6	1,97	79,0/92,8
2	ИС, 0,001 мкг/мл ТС, 0,001 µg/ml	27,40	6,7	50,50	3,0	1,84	68,7/67,4
1	P123 R123	2,49	31,7	6,05	8,3	2,43	75,7/81,5
1	P123 + ЦА R123 + CA	0,60	10,0	0,41	9,8	0,68	74,3/74,5
1	Ранитидин Ranitidine	0,87	10,3	–	–	–	112,0
1	Пропранолол Propranolol	22,70	7,5	–	–	–	69,2
2	P123 R123	2,60	7,7	4,59	8,5	1,77	64,6/72,4
2	P123 + ЦА R123 + CA	0,29	3,4	0,37	5,4	1,28	79,4/85,5
2	Ранитидин Ranitidine	1,94	27,8	–	–	–	105,0
2	Пропранолол Propranolol	23,8	6,3	–	–	–	63,5

Примечание. – Не проводилось исследование.

Note. – No research has been carried out.

Таблица 3. Корреляционная зависимость между коэффициентами кажущейся проницаемости и рассчитанными коэффициентами распределения

Table 3. Correlation between the apparent permeability coefficient and the calculated partition coefficients

Соединение Compound	$P_{app}^{A-B}, \times 10^{-6} \text{ cm/s}$ $P_{app}^{A-B}, \times 10^{-6} \text{ cm/s}$	CLogP ChemDraw	mLogP Molinspiration	ALogP ALOGPS 2.1
ИС ТС	38,9	2,17	2,90	1,79
Ранитидин Ranitidine	1,4	0,67	0,33	0,79
Пропранолол Propranolol	23,3	2,75	2,97	3,03
R ² для линейной зависимости R ² for linear regression model		0,585	0,811	0,281

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

На основании результатов, полученных при изучении проницаемости производного фенилтетрагидрохинолиндона на культуре клеток Caco-2, можно сделать выводы, что для исследуемого вещества характерна высокая степень кишечной абсорбции, превосходящая таковую для пропранолола – стандарта с высокой проницаемостью по БКС – и не зависящая от концентрации изучаемого соединения. Также для производного фенилтетрагидрохинолиндона было показано отсутствие сродства к эффлюкс транспортеру Pgp и, следовательно, согласно руководству [7] изучаемое соединение удовлетворяет всем требованиям, предъявляемым к веществам, способным к пассивной диффузии через клеточные мембраны. Полученные экспериментальные результаты подтверждаются рассчитанными значениями коэффициентов распределения октанол/вода, которые для всех программ превышают согласно литературным данным значения LogP, разделяющие вещества с высокой и низкой проницаемостью. Однако не

для всех использованных ресурсов удалось установить корреляционную зависимость между коэффициентами кажущейся проницаемости и полученными *in silico* значениями LogP.

ЛИТЕРАТУРА

- Xu Y., Shrestha N., Pr at V., Belouqui A. An overview of in vitro, ex vivo and in vivo models for studying the transport of drugs across intestinal barriers. *Advanced Drug Delivery Reviews*. 2021;175:113795. DOI: 10.1016/j.addr.2021.05.005.
- Skolnik S., Lin X., Wang J., Chen X.-H., He T., Zhang B. Towards Prediction of In Vivo Intestinal Absorption Using a 96-Well Caco-2 Assay. *Journal of Pharmaceutical Sciences*. 2010;99(7):3246–3265. DOI: 10.1002/jps.22080.
- Volpe D. A., Faustino P. J., Ciavarella A. B., Asafu-Adjaye E. B., Ellison C. D., Yu L. X., Hussain A. S. Classification of Drug Permeability with a Caco-2 Cell Monolayer Assay. *Clinical Research and Regulatory Affairs*. 2007;24(1):39–47. DOI: 10.1080/10601330701273669.
- 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;14(6):763–766. DOI: 10.1023/a:1012102522787.
- Lee J. B., Zgair A., Taha D. A., Zang X., Kagan L., Kim T. H., Kim M. G., Yun H.-Y., Fischer P. M., Gershkovich P. Quantitative analysis of lab-to-lab variability in Caco-2 permeability assays. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*. 2017;114:38–42. DOI: 10.1016/j.ejpb.2016.12.027.
- Volpe D. A. Variability in Caco-2 and MDCK cell-based intestinal permeability assays. *Journal of Pharmaceutical Sciences*. 2008;97(2):712–725. DOI: 10.1002/jps.21010. DOI: 10.1002/jps.21010.
- Waiver of in vivo bioavailability and bioequivalence studies for immediate-release solid oral dosage forms based on a biopharmaceutics classification system, Guidance for industry. U.S. Department of Health and Human Services Food and Drug Administration. Center for Drug Evaluation and Research. Dec. 2017. Available at: <https://www.gmp-compliance.org/files/guidemgr/UCM070246.pdf>. Accessed: 27.01.2022.
- Бесхмельницкая Е. А., Покровский М. В., Должиков А. А., Автина Т. В., Жернакова Н. И., Пересыпкина А. А. Исследование анальгетической и противовоспалительной активности нового неопиоидного анальгетика на основе селективного ингибитора ионных каналов TRPA1. *Кубанский научный медицинский вестник*. 2019;26(1):77–87.
- Демина Н. Б. Биофармацевтическая классификационная система как инструмент разработки дизайна и технологии лекарственной формы. *Разработка и регистрация лекарственных средств*. 2017;(2):56–60.
- Phillips J., Arena A. Optimization of Caco-2 cell growth and differentiation for drug transport studies. *Millipore Corporation Protocol Note*. PC1060EN00. 2003.
- Kasim N. A., Whitehouse M., Ramachandran C., Bermejo M., Lennern s 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 Biopharmaceutical Classification. *Molecular Pharmaceutics*. 2004;1(1):85–96. DOI: 10.1021/mp034006h.
- Dahan A., Wolk O., Agbaria R. Provisional in-silico biopharmaceutics classification (BCS) to guide oral drug product development. *Drug Design, Development and Therapy*. 2014;24(8):1563–1575. DOI: 10.2147/DDDT.S68909.
- Volpe D. A., Faustino P. J., Ciavarella A. B., Asafu-Adjaye E. B., Ellison C. D., Yu L. X., Hussain A. S. Classification of Drug Permeability with a Caco-2 Cell Monolayer Assay. *Clinical Research and Regulatory Affairs*. 2007;24(1):39–47. DOI: 10.1080/10601330701273669.
- 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;14(6):763–766. DOI: 10.1023/a:1012102522787.
- Lee J. B., Zgair A., Taha D. A., Zang X., Kagan L., Kim T. H., Kim M. G., Yun H.-Y., Fischer P. M., Gershkovich P. Quantitative analysis of lab-to-lab variability in Caco-2 permeability assays. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*. 2017;114:38–42. DOI: 10.1016/j.ejpb.2016.12.027.
- Volpe D. A. Variability in Caco-2 and MDCK cell-based intestinal permeability assays. *Journal of Pharmaceutical Sciences*. 2008;97(2):712–725. DOI: 10.1002/jps.21010. DOI: 10.1002/jps.21010.
- Waiver of in vivo bioavailability and bioequivalence studies for immediate-release solid oral dosage forms based on a biopharmaceutics classification system, Guidance for industry. U.S. Department of Health and Human Services Food and Drug Administration. Center for Drug Evaluation and Research. Dec. 2017. Available at: <https://www.gmp-compliance.org/files/guidemgr/UCM070246.pdf>. Accessed: 27.01.2022.
- Бесхмельницкая Е. А., Покровский М. В., Должиков А. А., Автина Т. В., Жернакова Н. И., Пересыпкина А. А. Исследование анальгетической и противовоспалительной активности нового неопиоидного анальгетика на основе селективного ингибитора ионных каналов TRPA1. *Кубанский научный медицинский вестник*. 2019;26(1):77–87.
- Демина Н. Б. Биофармацевтическая классификационная система как инструмент разработки дизайна и технологии лекарственной формы. *Разработка и регистрация лекарственных средств*. 2017;(2):56–60.
- Phillips J., Arena A. Optimization of Caco-2 cell growth and differentiation for drug transport studies. *Millipore Corporation Protocol Note*. PC1060EN00. 2003.
- Kasim N. A., Whitehouse M., Ramachandran C., Bermejo M., Lennern s 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 Biopharmaceutical Classification. *Molecular Pharmaceutics*. 2004;1(1):85–96. DOI: 10.1021/mp034006h.
- Dahan A., Wolk O., Agbaria R. Provisional in-silico biopharmaceutics classification (BCS) to guide oral drug product development. *Drug Design, Development and Therapy*. 2014;24(8):1563–1575. DOI: 10.2147/DDDT.S68909.

REFERENCES

- Xu Y., Shrestha N., Pr at V., Belouqui A. An overview of in vitro, ex vivo and in vivo models for studying the transport of drugs across intestinal barriers. *Advanced Drug Delivery Reviews*. 2021;175:113795. DOI: 10.1016/j.addr.2021.05.005.
- Skolnik S., Lin X., Wang J., Chen X.-H., He T., Zhang B. Towards Prediction of In Vivo Intestinal Absorption Using a 96-Well Caco-2 Assay. *Journal of Pharmaceutical Sciences*. 2010;99(7):3246–3265. DOI: 10.1002/jps.22080.