

EGYETEMI DOKTORI (Ph.D.) ÉRTEKEZÉS

**Új generációs β -ciklodextrinek sejtmembránra,
illetve a taxol, mint BCS IV. típusú farmakon
transzportjára gyakorolt hatásának
in vitro vizsgálata**

Kiss Tímea

Témavezető: Dr. Vecsernyés Miklós



DEBRECENI EGYETEM

GYÓGYSZERÉSZETI TUDOMÁNYOK DOKTORI ISKOLA

Debrecen, 2011

Tartalomjegyzék

1. Bevezetés	4
2. Irodalmi áttekintés	7
2.1. A ciklodextrinek	7
2.2. A taxol	11
2.3. A taxol és a CD-ek	14
2.4. A sejt kultúrák	15
2.4.1. A Caco-2 sejt vonal	15
2.4.2. A transzport modell	19
3. Célkitűzések	24
4. Anyagok és módszerek	25
4.1. A Ciklodextrinek	25
4.2. A sejt tenyésztés	26
4.2.1. A Hela sejt vonal	26
4.2.2. A Caco-2 sejt vonal	26
4.3. A koleszterinoldó képesség vizsgálata	27
4.4. Az MTT-teszt	27
4.4.1. A Hela sejt vonal	27
4.4.2. A Caco-2 sejt vonal	28
4.5. A hemolitikus aktivitás teszt	28
4.6. A Caco-2 transzport modell kialakítása, jellemzése	29
4.6.1. A transzport modell jellemzése transzsepitheliális elektromos ellenállás méréssel	29
4.6.2. A transzport modell jellemzése ismert permeabilitású vegyületek segítségével	29
4.7. A [³ H]-taxol permeabilitásának vizsgálata	30
4.8. Az immunhisztokémia	32
4.9. Statisztikai analízis	32
5. Eredmények	33
5.1. A monolayer kialakulása, transzport modell jellemzése	33
5.1.1 A transzport modell jellemzése TEER értékkel	33
5.1.2 A transzport modell jellemzése ismert permeabilitású vegyületek segítségével	33
5.2. A β-CD származékok koleszterinoldó képességének vizsgálata	34
5.3. A β-CD származékok citotoxicitásának vizsgálata	36
5.3.1. Az MTT-teszt eredménye Hela sejt vonalon	36
5.3.2. Az MTT teszt eredménye Caco-2 sejt vonalon	37
5.4. A hemolitikus aktivitás vizsgálata	39
5.5. A sejt membrán károsító és koleszterinoldó képesség közötti összefüggés vizsgálata ..	41
5.6. [³ H]-taxol transzportjának vizsgálata	42
5.6.1. A β-CD-előkezelés hatása a transzsepitheliális taxol permeabilitásra, Protokoll 1	43
5.6.2. A folyamatos β-CD-kezelés hatása a transzsepitheliális taxol permeabilitásra, Protokoll 2	45
5.6.3. A B-A/A-B hányados	48
5.6.4. A folyamatos β-CD kezelés paracelluláris permeabilitásra és transzsepitheliális ellenállásra gyakorolt hatásának vizsgálata	49
5.7. Az immunhisztokémia	50
6. Megbeszélés	52
6.1. A β-CD-ek szerkezete, citotoxicitása, hemolitikus aktivitása és koleszterinoldó képessége közötti összefüggések	52
6.2. A Caco-2 transzport modell és permeabilitási vizsgálatok	54
6.2.1. A Caco-2 transzport modell modell	54

6.2.2. A Rameb és származékainak hatása a taxol permeabilitására.....	55
6.2.3. A Rameb, MaRameb, illetve SuRameb taxol permeabilitására gyakorolt hatásának lehetséges mechanizmusai.....	57
7.1. Összefoglalás	60
7.2. Summary	61
8. Irodalomjegyzék	62
9.1. Tárgyszavak	75
9.2. Keywords	75
10. Köszönetnyilvánítás	76
11. Függelék	77

1. Bevezetés

A hatóanyagok szervezetbe történő juttatása több útvonalon is lehetséges, legnépszerűbb és legegyszerűbb formája a szájon át történő bejuttatás. A per os adagolás során a hatóanyag a gasztrointesztinális traktusból szívódik fel. A teljes abszorpcióhoz a hatóanyag és a gyógyszerforma számos tulajdonságának kell együttesen megfelelnie, melyek közül a hatóanyag oldékonysága és biológiai membránokon keresztül történő átjutása az a tényező, mely meghatározza, hogy milyen gyógyszerformát és ahhoz milyen segédanyagokat alkalmazunk.

A hatóanyagokat a gasztrointesztinális felszívódást meghatározó biofarmáciai tulajdonságok alapján rendszerbe foglalják [Amidon és mtsai. 1995.]. A Biofarmáciai Osztályozási Rendszer (BCS) szerint a hatóanyagok oldhatóságuk és membrán permeabilitásuk alapján négy csoportba sorolhatók (1. táblázat):

- I. osztály: Jó oldhatóságú, jó permeabilitású anyagok: A hatóanyag könnyen oldódik a bélnedvben, illetve a bélhámsejteken keresztül könnyedén a véráramba kerül.
- II. osztály: Rossz oldhatóságú, jó permeabilitású anyagok: Bár a hatóanyag könnyedén átjut a sejtmembránon, mégis alacsony biohasznosíthatósággal rendelkezik, hiszen a felszívódás alapfeltétele a hatóanyag oldatba kerülése.
- III. osztály: Jó oldhatóságú, de rossz permeabilitású anyagok: Ezen hatóanyag biohasznosíthatóságát döntően a membránon történő átjutás sebessége határozza meg.
- IV. osztály: Rossz oldhatóságú, rossz permeabilitású anyagok: Ezen anyagok orális adagolása csak speciális segédanyagok alkalmazásával lehetséges.

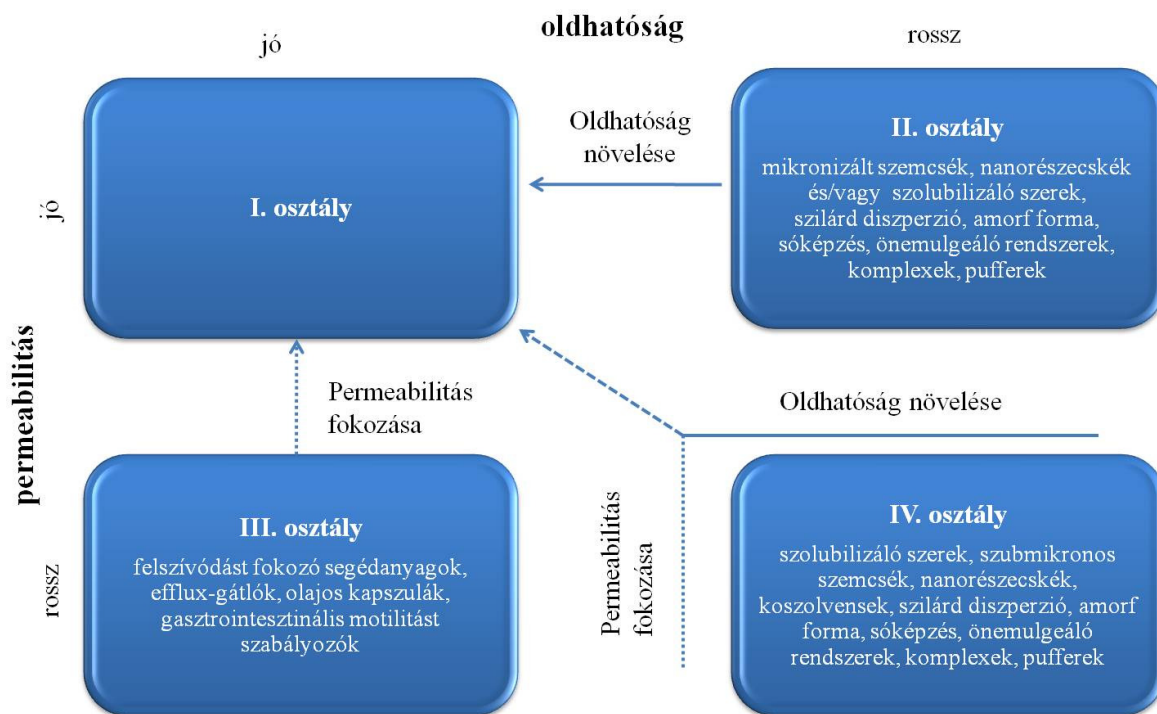
A II., III., IV. osztályba tartozó hatóanyagok biológiai hasznosíthatóságát oldhatóság, illetve permeabilitás fokozásával növelhetjük (1. ábra) [Antal és Dévay 2009.]. A megfelelő biológiai hasznosíthatóság és oldékonyság érdekében különböző kémiai, illetve fizikai-kémiai módosításokra kerülhet sor. Ezen felül speciális segédanyagok együttes alkalmazásával a biofarmáciai tulajdonságok jelentősen modulálhatók, például felszívódást fokozó segédanyagok, illetve efflux-gátlók alkalmazásával nagyobb mennyiségű hatóanyag képes áthatolni a bélhámsejtek membránján, a permeabilitás nő.

	Jó oldhatóság	Rossz oldhatóság
Jó permeabilitás	I. osztály	II. osztály
	buspiron diazepam efedrin glükóz ketoprofen lidokain prednisolon	digoxin diklofenak ibuprofen ketokonazol ofloxacin terfenadin warfarin
Rossz permeabilitás	III. osztály	IV. osztály
	amoxicillin atenolol cetirizin metformin paracetamol ranitidin trimetoprim	amfotericin B klortalidon klorotiazid furosemid mebendazol neomicin taxol

1. táblázat. A hatóanyagok csoportosítása a Biofarmáciai Osztályozási Rendszer (BCS) alapján [Yu és mtsai. 2002.; Kasim és mtsai. 2004.]

A legnagyobb kihívást a IV. osztályba tartozó farmakonok per os formulációja jelenti, pedig vannak olyan IV. osztályba gyógyszercsoportok, amelyek esetében a per os gyógyszerforma kialakítása jelentősen megkönnyítené a betegek kezelését. Olyan daganatellenes szerek is ide tartoznak, mint például a taxol, melynek per os formulációja a tudományos érdeklődés középpontjában áll [Bilensoy és mtsai. 2008.; Bhardwaj és mtsai. 2009.; Agüeros és mtsai. 2010.; Peltier és mtsai. 2006.; Varma és Panchagnula 2005.; Collnot és mtsai. 2006.].

Az oldékonyság növelés egyik formája molekuláris komplexek képzése. A ciklodextrinek (CD) ideális zárvány komplex képző segédanyagokként alkalmasak a kis vízdékonyságú hatóanyagok oldatban tartására „molekula komplexek” létrehozása által. Mindemellett ismert, hogy membránmoduláló hatással is rendelkeznek, mely elősegíti a hatóanyag permeabilitásának növekedését.



1. ábra. A biológiai hasznosíthatóság növelésére alkalmazható módszerek a Biofarmáciai Osztályozási Rendszer alapján [Antal és Dévay 2009.]

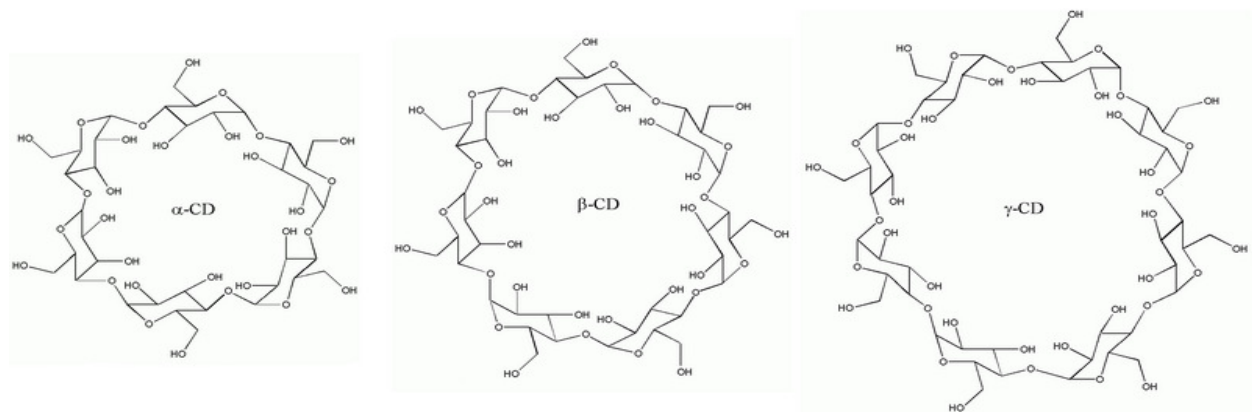
2. Irodalmi áttekintés

2.1. A ciklodextrinek

A szénhidrátok közé tartozó keményítő fontos alkotó eleme szinte minden élő szervezetnek. A keményítő építőelemei az amilóz és az amilopektin. Ezen két makromolekula glükopiranoz egységek százaiból épül fel. Az amilóz és az amilopektin részleges degradációja során vízdékony dextrin keletkezik. A részleges degradáció végbemehet magas hőmérséklet hatására, enzimatis hidrolízis, illetve kémiai lebontás során. A kémiai átalakulás folyamán, egy speciális enzim, a ciklodextrin-glükozil-transzferáz, nem csak dextrinekké bontja a keményítőt, hanem ezzel egy időben a szabad végeiket összekapcsolva ciklikus dextrint is létrehoz, mely termék neve ciklodextrin (CD).

A CD-eket először 1891-ben Villiers izolálta *Bacillus amylobacter* táptalajából, mely eredetileg keményítőt tartalmazott. 1903-1911 között Schardinger alapos kutatást végzett a CD-ekkel kapcsolatban, ezért sok helyen Schardinger-dextrin néven említik. Schardinger izolált egy hőre nem érzékeny, α -CD-t termelő mikroorganizmust, a *Bacillus macerans*-t [French 1957.]. Napjainkig igen sok egyéb baktérium törzset azonosítottak, amelyek képesek CD előállítására.

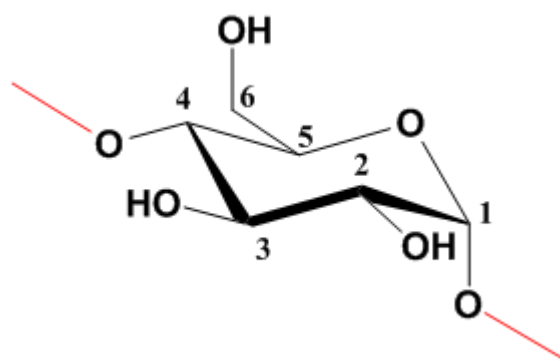
A CD-eknek többféle változata létezik. 3 alaptípus keletkezik a gyűrűvé záródás során a leggyakrabban (2. ábra). A legkisebb az α -CD, amely 6 glükopiranoz egységből áll. A β -CD 7, a γ -CD 8 glükopiranoz egységet tartalmaz. A gyűrűk axiális üreggel rendelkeznek, a térbeli szerkezet egy kúpos hengerre emlékeztet. A gyűrűk külső fele hidrofil, a belső fele hidrofób tulajdonságú. A kettős jelleget a gyűrűhöz kapcsolódó csoportok alakítják ki.



2. ábra. A ciklodextrinek szerkezete Az α -ciklodextrin 6, a β -ciklodextrin 7, a γ -ciklodextrin 8 glükopiranoz egységből áll.

A gyűrű által képzett üregek mérete eltérő. Mivel az α -CD áll a legkevesebb glükopiranoz egységből, 1 mol α -CD molekula belső üregének össztérfogata 104 ml. 1 mol β -CD által képzett üreg térfogat 157 ml, 1 mol γ -CD esetében pedig 256 ml [Szejtli 1998.].

A β -CD-t használják a legszélesebb körben. Ennek oka az üreg mérete, az elérhetőség, illetve az előállítási költsége. A β -CD nem rendelkezik megfelelően nagy vízdékonysággal, viszont a gyűrűt felépítő glükopiranoz egységeknek van 3-3 szabad hidroxil-csoportja, a 2-es, 3-as és a 6-os szénatomon (3. ábra).



3. ábra. A glükopiranoz egység, a ciklodextrinek alapegysége A 2-es, 3-as, 6-os szénatomon lévő szabad hidroxil-csoportok többek között alkil, hidroxialkil-, karboxialkil-, amino-, thio-, glükozil-csoportokkal szubsztituálható. A glükopiranoz egységek az 1-es, valamint a 4-es szénatomnál kapcsolódnak össze glikozid kötéssel.

A β -CD 21 hidroxil-csoportja változatos szubsztitúcióra ad lehetőséget. A hidrogén atomot, vagy a hidroxil-csoportot többek között a következő csoportokra lehet lecserélni: alkil-, hidroxialkil-, karboxialkil-, amino-, thio-, glükozil- és így tovább. Ezen módosítással növelhető a vízdékonyság a szubsztituálatlan molekulánál mérhető 18 g/l-ről akár 500g/l-re.

A CD-ek tulajdonképpen egy nyitott kúpos molekuláris méretű kapszulának tekinthetők. A gyűrű által képzett üreg alkalmas úgynevezett vendég („guest”) molekula befogadására. Mint hordozó („host”) molekula igen sokféle vendégmolekulát tud magába fogadni. Vizes oldatban az enyhén apoláros CD üreg vízzel nem telik meg. Ez az állapot energetikailag igen kedvezőtlen lenne az apoláros-poláros interakció miatt. Ha az oldat tartalmaz egy megfelelő vendégmolekulát, amely kevésbé poláros, mint a vízmolekula, akkor a komplexképződés azonnal végbe megy, a CD üregébe a kevésbé poláros molekula vagy egy oldallánca kerül. Egy, két esetleg három CD molekula és egy vagy több vendégmolekula alkotja a töltött zárványt. Az átlagos host:guest arány 1:1. Abban az esetben, mikor a vendégmolekula méreténél fogva a komplex kialakításához két vagy három CD molekula is

szükséges, egy CD a vendégmolekula csak egy részét, oldalláncát, csoportját foglalja magába. A vendégmolekula több lipofil csoportot, illetve oldalláncot is tartalmaz, és olyan méretű, hogy két vagy három CD is hozzá tud férni a lipofil csoportokhoz, molekularészekhez. Ez jelenti a molekula kapszulázás lényegét.

A zárványképzés lehetőségét a következő esetekben lehet megfontolni:

- A hatóanyag alig oldódik vízben, így a biohasznosíthatósága kicsi, lassan szívódik fel orális adagolás esetén
- A kevésbé vízdékony hatóanyagból nem lehet vizes injekciót készíteni.
- A hatóanyag kémiai, illetve fizikailag instabil.
- A hatóanyag keserű íze vagy rossz szaga miatt az orális adagolás nehéz.
- A hatóanyag folyékony, mégis tablettává kell formulálni.
- A hatóanyag inkompatibilis a gyógyszer másik komponensével.
- Súlyos mellékhatások mérséklésére van szükség.

A komplexképzés segítségével tehát csökkenthetőek a mellékhatások, növelhető a biohasznosíthatóság, a stabilitás, vízdékonyság.

A komplexképzés nem minden esetben valósítható meg. Például anorganikus vegyületek általában nem alkalmasak vendég molekulának. Ahhoz, hogy gyógyászati szempontból alkalmas komplexet hozzunk létre, a következő feltételeknek kell teljesülniük: a vendégmolekula váza legalább 5 atomból épüljön fel; a vízdékonysága kisebb legyen, mint 10 mg/ml; olvadási hőmérséklete 250 °C alatt legyen; maximum 5 kondenzált gyűrűből állhat és a molekulatömeg 100-400 Da között legyen [Szejtli 1994.]. Erősen hidrophil, túl kicsi vagy túl nagy molekulák, például a peptidek, proteinek, enzimek általában nem komplexálhatóak ciklodextrinokkal. Ha a molekula egyik oldallánca megfelel a kritériumoknak, a komplex létrejöhet.

A komplexképzés megkerülhetetlen limitáló tényezője a komplex dózisa. Tabletta esetén az alapkövetelmény az, hogy a tabletták tömege ne haladja meg az 500 mg-ot. Mivel a guest molekula megengedett tömege 100-400 Da között van, és a ciklodextrinok tömege 4-12-szer nagyobb, 100 mg komplexben csak 5-25 mg hatóanyag lehet. Ha egy dózishoz nagyobb mennyiségű hatóanyagra van szükség, pezsgőtabletták formájában lehet elkészíteni a gyógyszert [Szejtli 1994.].

A CD-ekkel képezett komplexek igen sok gyógyszerformában előfordulnak, például orális, parenterális, nazális, transzdermális, szemészeti, rektális, pulmonáris gyógyszerformában. Amellett, hogy igen sok területen alkalmazzák őket, nem szabad elfelejteni a toxikus hatásaikról sem, amelyek manapság is az érdeklődés középpontjában állnak. Egyik legfontosabb toxikus hatásuk a hemolízist kiváltó hatás, mely rendkívül eltérő mértékű lehet. A hemolitikus aktivitás leginkább a molekula zárványképző tulajdonságával függ össze. A legjelentősebb hemolitikus aktivitást a β -CD esetében figyelték meg, az α -CD kevésbé, a γ -CD pedig a legkevésbé hemolizál [Miyazawa és mtsai. 1995.]. Ez a különbség a membránkomponensekre gyakorolt eltérő mértékű szolubilizációs hatás következménye. A γ -CD-re nem jellemző a lipid szelektivitás. Az membránalkotó foszfolipidek acil- oldallánca a legkisebb, az α -CD üregébe pontosan beleillik, míg a koleszterin oldalláncai a β -CD üregébe illenek bele a legjobban. Emellett igazolták, hogy a β -CD-ek képesek proteineket is kivonni a vörösvértest membránjából [Ohtani és mtsai. 1989.]. A hemolitikus aktivitást befolyásolja még a lipofil üreg jellege is. A lipofil üregegen végzett kémiai változtatás jelentősen befolyásolja a membránkárosító hatást [Attioui és mtsai. 1994.].

A membránkomponensek kivonásának mechanizmusa CD-ek esetében eltér a felületaktív anyagok hatásától. Az eddigi megfigyelésekből azt a következtetést vonták le, hogy a felületaktív anyagokkal ellentétben a CD-ek nem épülnek be a sejtmembránba, hanem a vizes fázisba létrehoznak egy új, lipid tartalmú kompartmentet, amelybe a membránalkotókat extrahálják. Az extrakció reverzibilis folyamat, a sejtmembrán és a CD kompartment között egyensúly áll fent.

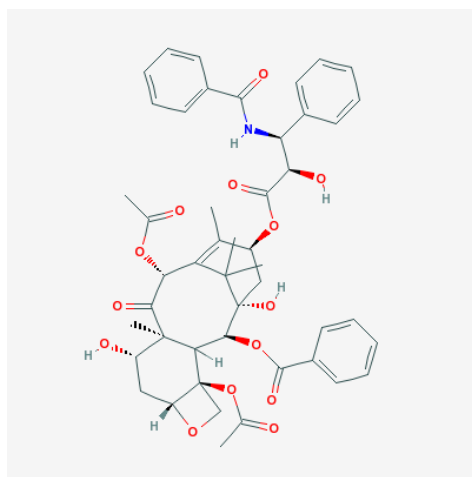
A lipid komponensek kivonása a vörösvértest membránjából jelentősen növelheti a sejtmembrán fluiditását, mely membrán-befűződésekhez vezethet. Ezáltal a vörösvértest kevésbé lesz ellenálló az olyan erőkkel szemben, amelyek megváltoztatják az alakját. A folyamat következménye a vörösvértest szétesése. A CD-ek főként koleszterint és foszfolipideket, így foszfatidilkolint és a szfingomielint vonnak ki a membrán külső részéből. Ezáltal a foszfolipid kettős réteg két fele között felborul az egyensúly, amely részben hozzájárul a sztomatociták alakváltozásához [Miyajima és mtsai. 1987.]. A biztonságosság tekintetében a CD-ek még egy hátrányos tulajdonsággal rendelkeznek: koncentrációfüggő szövetirritáló hatást mutatnak [Irie és mtsai. 1982.;1997.; Ohtani és mtsai. 1989.].

Az üres CD-ek sokkal reaktívabbak, mint a töltöttek. A vendég molekula jelenlétében a membránkárosító hatás jelentősen csökken, mivel a CD nem képes a foszfolipid kettős rétegeből kivonni a membránalkotókat.

Gyógyszertechnológiai szempontból a β -CD származékok a legjelentősebbek. Sokféle β -CD-t szintetizáltak annak érdekében, hogy tökéletesítsék a fizikai-kémiai paramétereiket, illetve csökkentsék a toxikus hatások számát és mértékét [Uekama és Otagiri 1987.; Loftsson és Brewster 1996.]. Bár ismert, hogy a különböző CD-ek hemolízis indukáló hatása jelentősen eltér, és adott sejttípustól függően eltérő citotoxicitást is mutatnak [Leroy-Lechat és mtsai. 1994.; Salem 2009.; Matilainen 2008.], az új típusú CD-ek a szervezetre gyakorolt hatásairól és toxicitásáról ismereteink még hiányosak.

2.2. A taxol

A paclitaxel, más néven taxol széles körben elterjedt daganatellenes szer. 1963-ban a *Taxus brevifolia* nevezetű Észak-Amerikában honos igen ritka örökzöld kérgéből készült kivonat a preklinikai vizsgálatok során effektívnek bizonyult a rosszindulatú daganatok kezelésében. 1971-ben azonosították az aktív hatóanyagot, a paclitaxelt (4. ábra) [Wani és mtsai. 1971.]. A taxol további vizsgálata az ezt követő években háttérbe szorult a nehézkes előállítás miatt. 1979-ben ismét a figyelem középpontjába került egyedi és különleges hatásmechanizmusa miatt [Schiff és mtsai. 1979.].



4. ábra. A taxol kémia szerkezete

A spirális szerkezetű mikrotubulusok tubulin heterodimerek polimerizációja révén jönnek létre. Bár egyik fő feladatuk a mitotikus orsó kialakítása, az interfázis több folyamatában is rész vesznek, mint például szignál transzmisszió, intracelluláris transzport. [Rowinsky és mtsai. 1990.]. Más mikrotubulus-gátló szerekkel például vinca alkaloidokkal ellentétben, amelyek a mikrotubulusok lebontását idézik elő, a taxol a polimerizációt segíti elő

és gátolja a lebontást. [Parness és mtsai. 1981.; Wilson és mtsai. 1985.]. Szubnanomoláris koncentrációban a taxol hatására a mikrotubulusok polimerizációjának fokozásával és bontásuk gátlásával rendkívül statikus, nagy mennyiségű diszfunkcionális mikrotubulus képződik [Jordan és mtsai. 1993.]. Az így keletkezett statikus mikrotubulusok vezetnek a sejt halálához, mivel sem az interfázis folyamatai, sem a sejtosztódás nem tud végbemenni. Mindemellett, hogy taxol fokozza a tumornekrózis faktor- α (TNF α) génexpresszióját, a hatás-szerkezet vizsgálatok arra utalnak, hogy ez a jelenség nem függ össze a mikrotubulusokra gyakorolt hatásával [Burkhart és mtsai. 1994.].

A kemoterápiás kezelés során gyakran kialakulhat a citosztatikummal szembeni rezisztencia jelensége. A tumor sejtek taxollal szembeni rezisztenciája két úton valósulhat meg. Néhány tumor sejtben az α - és β -tubulinok polimerizációs képessége igen alacsony. Így lassan épülnek fel a mikrotubulusok. A taxol polimerizációt fokozó hatására ezekben a tumor sejtekben normalizálja a mikrotubulusok felépülésének ütemét. A rezisztencia más oka a tumor sejtek membránjában végbemenő efflux mechanizmus létrejötte, melynek során a sejt a membránon keresztüli aktív transzport segítségével mintegy „megszabadul” a citotoxikus anyagtól.

Ez a jelenség nem csak a tumor sejtekre jellemző, hanem megtalálható más biológiai membrán rendszerekben is, ugyanezen mechanizmus felelős részben a taxol gasztrointesztinális traktusból történő elégtelen felszívódásért.

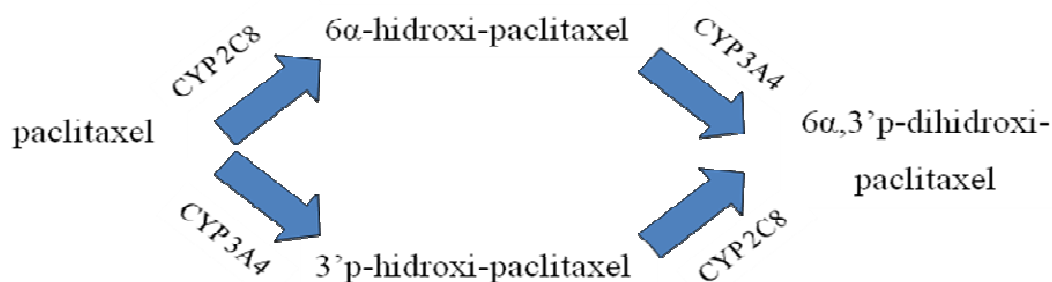
Röviden összefoglalva taxol orális adagolását három tényező nehezíti:

- A Biofarmáciai Osztályozási Rendszer (BCS) szerint a IV. kategóriába tartozó taxol oldékonysága vizes közegben igen rossz. A nem oldott formában lévő hatóanyag nem tud átjutni a sejtmembránon.
- A taxol ismert P-glikoprotein (Pgp) szubsztrát [Sparreboom és mtsai. 1997.; Horwitz és mtsai. 1993.]. Az MDR-ABC transzporterek (**m**ulti **d**rug **r**esistance – **A**TP **b**inding **c**assette) a prokariótáktól az emlősökig minden élő szervezetben megtalálhatóak. Ezek a transzporterek biztosítják a „kémiai immunitást” a sejtek, szövetek számára [Sarkadi és mtsai. 2006.], mivel folyamatosan meggátolják a xenobiotikumok, illetve bomlástermékek felhalmozódását a szövetekben. Hidrofób, illetve amfipatikus vegyületek könnyedén át tudnának jutni a sejtmembrán kettős lipid rétegén, ám ezek a transzporterfehérjék szelektíven szabályozzák a sejtbe, illetve a sejtől történő anyagforgalmat. Az

P-glikoprotein másnéven MDR1 (ABCB1) ezen kémiai immunitást biztosító transzporter-család jelentős tagja.

- A bélhámsejtek, illetve a máj citokróm P450 enzimeihez nagy affinitással kötődik a taxol, így még a szisztémás hatás elérése előtt jelentős mennyiségű (inaktív) hidroxil-, illetve dihidroxipaclitaxel képződik (5. ábra). [Shet és mtsai. 1993.; Harris és mtsai. 1994.].

Ezek ismeretében a következő utakon lehet javítani a taxol igen csekély, mindössze 1-2%-os orális biohasznosíthatóságán [Beijnen és mtsai. 1994.; Fujita 1994.; Eiseman és mtsai. 1994.]. Az alkalmazott segédanyag vagy hordozórendszer ideális esetben képes növelni az oldékonyságot, gátolja a Pgp működését és esetlegesen a CYP 450 enzimrendszert is. Ezen felül számításba vehető még a segédanyag membránlipidek összetételére gyakorolt hatása, vagy a szoros junkciók regulációjának modulálása, mely az első esetben a transzcelluláris, a második esetben a paracelluláris passzív transzport fokozódását eredményezheti.



5. ábra. A paclitaxel, másnéven taxol metabolizmusa

Az elmúlt időszakban több, a szer biohasznosíthatóságát növelő törekvésekről is jelentek meg tanulmányok. Alani és munkatársai felületaktív anyagok segítségével növelték az oldékonyságot, illetve a permeabilitást [Alani. és mtsai. 2010.]. Egyes kutatócsoportok kemoterapeutikummal töltött nanopartikulumok fejlesztésével alternatív injektábilis, illetve orális adagolásra alkalmas gyógyszerformák kialakításáról számoltak be [Bilensoy és mtsai. 2008.; Bhardwaj és mtsai 2009.]. A kutatások jelentős hányada a Pgp funkció gátlásában látja a taxol felszívódási insufficienciájának a megoldását. A Pgp gátlást Agüeros és mtsai [Agüeros és mtsai. 2010.], illetve Peltier és mtsai [Peltier és mtsai. 2006.] a CD-taxol komplexszel töltött nanopartikulum, illetve a taxollal töltött lipid nanokapszula, azaz a gyógyszerhordozó rendszer segítségével érték el. Varma és mtsai, illetve Collnot és mtsai nem a hordozórendszer segítségével, hanem D- α -tokoferil-polietilén-glikol származékok, mint ismert Pgp gátló

segédanyagoknak a farmakonnal történő együttes adásával érték el az efflux csökkenését [Varma és Panchagnula. 2005.; Collnot és mtsai. 2006.]. A ciklosporin A (CSA), mint igazolt Pgp inhibitor [Saeki és mtsai. 1993.] taxollal történő együttes orális adagolása is jelentős taxol szérumszint emelkedést okozott *in vivo* vizsgálatok során [van Asperen és mtsai. 1998.; Meerum Terwogt és mtsai. 1998.; 1999.]. A Pgp gátlás azonban kétélű fegyver lehet, hiszen a hatóanyag felszívódásának fokozása mellett a Pgp gátlás növeli a különböző, akár a szervezet számára káros xenobiotikumok bejutását a szervezetbe.

2.3. A taxol és a CD-ek

A taxol kapcsán többféle tanulmányról találunk beszámolókat a szakirodalomban, melyek során a taxol biohasznosíthatóságát változatos módon próbálták fokozni. Ideális hordozó rendszer, illetve segédanyag képes lenne egyszerre növelni az oldékonyságot, a felszívódást és gátolná az aktív efflux mechanizmusokat. A CD-ek alkalmasak a kis vízóldékonyságú molekulák oldékonyságának és ezzel együtt a biohasznosíthatóságának növelésére [Alcaro és mtsai. 2008.; Cserháti és Holló 1994.; Sharma és mtsai. 1995.]. Egy korábbi tanulmányban Bouquet és mtsai megvizsgálták az FDA engedéllyel is rendelkező hidroxipropil- β -CD (HPBCD) taxollal történő komplexálási tulajdonságait. A HPBCD alacsony, 2% hatásfokkal volt képes komplexálni a taxolt, ebből adódóan az oldékonyságot is csak kis mértékben növelte [Bouquet és mtsai. 2007.]. A taxollal történő komplexképzés terén leghatékonyabbnak a metil- β -CD-ek bizonyultak. A 2,6-di-O-metil- β -CD (Dimeb) és a random metil- β -CD (Rameb) 90%-os hatékonysággal képes komplexálni a taxolt. Tehát a metil- β -CD származékok a taxol oldékonyságát jobban tudják fokozni, mint a HPBCD [Sharma és mtsai. 1995.]. A β -CD-ek lipofil anyagok oldékonyságát növelő hatása [Ventura és mtsai. 2006.; Szejtli 1994.] mellett az irodalomban található a β -CD-ek Pgp működésére gyakorolt hatásáról is adatokat [Arima és mtsai. 2001.; 2004.; Fenyvesi és mtsai. 2008.], mely felveti alkalmazásuk lehetőségét kemoterapeutikumok orális gyógyszerkészítményként való formulálásában. Ebből adódóan több kutatócsoport is tanulmányozta komplexálási tulajdonságukon kívül a biztonságosságukat [Uekama és mtsai. 2008.; Albers és Müller 1995.; Maestrelli és mtsai. 2008.; Rajewski és Stella 1996.].

2.4. A sejt kultúrák

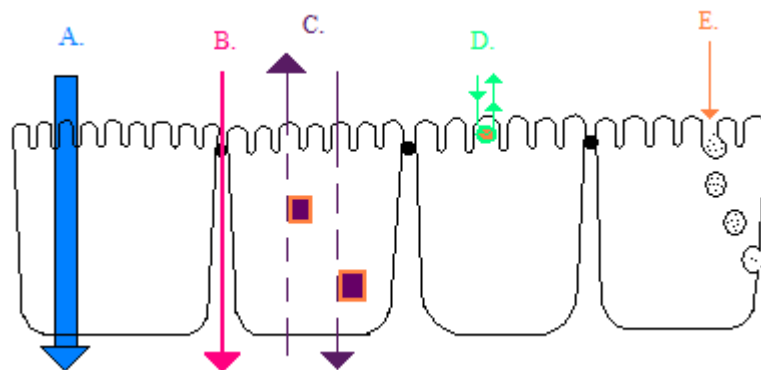
A gyógyszerfejlesztés során a preklinikai fázis fontos állomását képviseli a jelölt molekula sejtvonalakon történő tesztelése. Különböző sejtvonalak, illetve az általuk kialakított modell rendszerek segítségével megjósolható egyes farmakonok, segédanyagok toxicitásai, illetve farmakokinetikai tulajdonságai. Ilyen sejtvonal a Hela sejtvonal, mely humán cervix carcinoma eredetű. Mivel könnyen tenyészthető, alkalmas a farmakonok, segédanyagok előzetes tesztelésére. Az orális adagolású gyógyszerkészítmények felszívódásának, transzepitheliális transzportjának tesztelésére a Caco-2 sejtvonalat használják a leggyakrabban.

2.4.1. A Caco-2 sejtvonal

A Caco-2 sejtvonal humán colon adenocarcinoma eredetű. Ezt a sejtípust igen széles körben alkalmazzák a vékonybélből történő gyógyszerfelszívódás *in vitro* modellezésére. A Caco-2 sejtvonal rendelkezik mindazon tulajdonságokkal, amely feltétele lehet az *in vivo* intesztinális felszívódás modellezésének per os adagolt gyógyszerkészítmények esetében. Ez a sejtvonal egybefüggő sejtréteg, azaz monolayer kialakítására képes. A monolayer polarizált enterocitákból áll. A differenciálódott sejtek apikális felszínét mikrovillusok borítják, és a sejtmembránjukban megtalálhatóak ugyanazon aktív transzporterek, mint a humán jejunumban. A monolayer alkotó sejtek közötti szoros kapcsolatot a szoros junkciók biztosítják.

A Caco-2 sejtek által kialakított monolayer segítségével tanulmányozható az intesztinális epitheliumon keresztüli transzport-folyamatok szinte mindegyike, melyek szabályozzák a gyógyszerfelszívódást [Hunter és mtsai. 1997.].

A monolayeren és intesztinális epitheliumon keresztüli gyógyszertranszport lehet (6. ábra):



6. ábra. A farmakonok transzportjának lehetséges útvonalai

A.) Transzcelluláris passzív transzport; B.) Paracelluláris passzív transzport; C.) Transzcelluláris aktív transzport; D.) Aktív efflux; E.) Transzcitózis

A. Transzcelluláris passzív transzport

Azok a vegyületek, melyek lipofil tulajdonságúak, könnyedén át tudnak hatolni a sejtmembránon. Ahhoz azonban, hogy a citoplazmán is könnyedén át tudjon hatolni a vegyület, elengedhetetlen a megfelelő vízdékonyság is. Ezek a vegyületek teljes mértékben és gyorsan felszívódnak fel. Az a tény, mely szerint a kefe-szerű felszín több mint ezerszer nagyobb felszívó felületet jelent, mint a paracelluláris felszívó felület, feltételezhetjük, hogy az ilyen típusú anyagok transzcellulárisan, passzív transzporttal jutnak át a barrieren. [Pappenheimer és mtsai. 1987.].

B. Paracelluláris passzív transzport

A peptidek és a hidrofil kis molekulájú ($M_r < 350$) hatóanyagok, amelyek passzív úton lassan és nem teljesen szívódnak fel, csak nagyon kis mértékben, vagy egyáltalán nem tudnak áthatolni a sejtmembránon. Az elfogadott nézet szerint az ilyen vegyületek a paracellulárisan elhelyezkedő pórusokon keresztül jutnak át a monolayeren. Azonban még nem teljesen tisztázott, hogy az ilyen tulajdonságokkal rendelkező molekulák csak paracellulárisan transzportálódhatnak-e [Nellans 1991.]. Tegyük fel, hogy egy hidrofil molekula megoszlási hányadosa a sejtmembrán és az extracelluláris folyadék között 1×10^{-3} . Azok a molekulák, amelyek feltételezhetően paracelluláris úton transzportálódnak, mint például a mannitol, 10^{-3} nagyságrendű oktanol/víz megoszlási hányadossal rendelkeznek [Artursson és mtsai. 1991.]. Az oktanol/víz megoszlási hányadossal a passzív transzcelluláris, lipid membránon át történő diffúziót modellezhetjük a passzív paracelluláris útvonal figyelmen kívül hagyásával [Martin 1981.]. Ha figyelembe vesszük azt, hogy az intesztinális epithelium luminális sejtmembránja több mint ezerszer nagyobb, mint a paracelluláris pórus felszívó felülete, arra a következtetésre juthatunk, hogy ez a különbség kompenzálhatja a sejtmembrán s az extracelluláris tér közötti megoszlás különbségét. Tehát elméletileg a hidrofil anyagok hasonló mértékben transzportálódhatnak passzívan transzcelluláris úton, mint paracelluláris úton [Artursson és mtsai. 1996.]. Gyakorlatilag viszont a szoros junkciók, amelyek a paracelluláris útvonalon nehezítik a felszívódást, csökkentik a paracelluláris transzport hatékonyságát. A paracelluláris passzív felszívódás hatékonyságának növelésével kapcsolatban igen sokan végeznek kutatásokat. A kutatók nagy része a szoros junkciók regulációjának megváltoztatásában látja a megoldást [Hochman és mtsai. 1994.].

C. Transzcelluláris aktív transzport

A transzcelluláris aktív transzport carrier-fehérjék által történik. Ezek a carrier-fehérjék nagy specifitással rendelkeznek bizonyos anyagokra nézve. Vitaminok, epesavak és az aminosavak is ezen az úton szívódnak fel [Hidalgo és Li 1996.]. Ilyen úton transzportálódik a hidrofíl hatóanyagok egy része, például az L-dopa, a D cikloszerin, a cefalosporinok kis része az aminosav transzporter rendszer segítségével, míg az ACE-gátlók az oligopeptid transzporter rendszer segítségével. Gyakran elmondható, hogy a felszívódás során az aktív forma mellett megtalálható a passzív forma is, még ha kisebb mértékű is. A passzív felszívódás akkor kap szerepet, mikor az aktív transzport rendszer telítődött. Ilyenkor a passzív abszorpció mértéke nő. Olyan anyagok esetén, amelyeknek a passzív permeabilitása alacsony, az aktív út telítődése csökkent mértékű felszívódáshoz vezet [Lennernäs és mtsai. 1993.]. A telítődést okozhatja egy olyan tápanyag, amely ugyanazon carrier-fehérje segítségével szívódik fel, mint a gyógyszer, illetve okozhatja a magas gyógyszer szint is.

D. Aktív efflux

Az aktív efflux jelensége igen sok gyógyszer felszívódását akadályozza meg. Ez a mechanizmus meggátolja bizonyos szerek átjutását az epitheliális sejtrétegen. Az eddig felsorolt transzportokkal ellentétben ez a mechanizmus a béllumen, az apikális oldal felé transzportálja a vegyületeket. Mint az aktív transzport jelenségek esetén általában, itt is fehérjék révén valósul meg a transzport. Az enterocytákban a következő transzporterek találhatóak: a legjelentősebb a P-glikoprotein (Pgp), de emellett Multidrug Resistance 2 (MDR2), és a Breast Cancer Resistance Protein (BCRP) is megtalálható [Szakács és mtsai. 2008.]. Ezeket a transzportereket telítve pont az ellenkező hatást érhetjük el, mint az aktív transzcelluláris transzport esetében. A rendszer telítése a felszívódás fokozódását eredményezi [Hunter és mtsai. 1993.]. Sokszor ez nagy mennyiségű hatóanyag-bevitelt jelent, ami nem minden esetben oldható meg, például a citosztatikumok esetében. Ellenben, ha efflux transzporter szubsztrát hatóanyaggal együtt efflux transzporter gátló segédanyagot alkalmazunk, a hatóanyag membránon keresztüli átjutása jelentősen növekszik anélkül, hogy a hatóanyag mennyiségét megnövelnénk [Varma és Panchagnula 2005.; Collnot és mtsai. 2006.; van Asperen és mtsai. 1998.; Meerum Terwoegt és mtsai. 1998.; 1999.].

E. Transzcitózis

Eddigi ismereteink szerint a transzcitózis nem tölt be jelentős szerepet a gyógyszerek felszívódásában. Olyan anyagok transzportja történhet ilyen módon, amelyeket a molekulaméretük kizár a többi transzportból. A transzcitózis két részből áll. Először a sejt endocitózissal felveszi a transzportálódó molekulát, majd a képződött vezikulum a sejt távolabbi membránján keresztül exocitózissal ürül ki. A vezikulum a sejtmembrán befűződése révén jön létre, és nagy mennyiségben tartalmazhat proteolitikus enzimeket, így az exogén proteinek nagy része, amely endocitózissal szívódik fel, jelentős degradáción megy keresztül. A B₁₂-vitamin felszívódása a legjellemzőbb példa erre az útvonalra az intesztinális epithelium esetében [Dix és mtsai. 1990.]. Mindemellett a vékonybél epitheliumában elhelyezkedő limfoid szövetet borító M-sejtek antigén-felvétele ezen a transzport útvonalon valósul meg [Kraehenbuhl és Neutra 1992.].

Sok tanulmánynak az volt a célja, hogy felderítse a Caco-2 sejtek által kialakított monolayeren való abszorpció és az *in vivo* felszívódás közötti összefüggést. Artursson és mtsai. arra a következtetésre jutottak, hogy az az anyag, amely gyorsan és tökéletesen felszívódik *in vivo*, annak magas permeabilitási koefficiense van *in vitro*, illetve az az anyag, amely lassan és alig szívódik fel, annak a permeabilitási koefficiense *in vitro* igen alacsony. [Artursson és mtsai. 1991.]. Más tanulmányok arra irányulnak, hogy milyen mértékben lehet élethűen modellezni a felszívódást a Caco-2 sejtekkel. Lennernäs és mtsai. Caco-2 sejteken és *in situ* humán jejunumon végeztek vizsgálatokat. Olyan anyagok felszívódását vizsgálták, amelyek vagy gyorsan és teljes mértékben, azaz passzív transzcelluláris úton szívódnak fel, illetve olyanokat, amelyek lassan és kis mértékben, azaz passzív paracelluláris úton szívódnak fel. Vizsgálataik során azt tapasztalták, hogy az eltérés a két vizsgálati elrendezésben mért, passzív transzcelluláris úton felszívódó anyagok effektív permeabilitása között 2-4-szeres. Ezzel szemben a passzív paracelluláris úton transzportálódó anyagok effektív permeabilitása esetén az eltérés 30-80-szoros is lehet. Mindkét esetben a humán felszívódás mértéke volt a nagyobb [Lennernäs és mtsai. 1996.]. Erre az igen nagy eltérésre a két legvalószínűbb magyarázat a paracelluláris felszívódási útvonal közötti különbségek, illetve a felszívó felület közötti különbségek adhatják. A paracelluláris felszívódást jelentősen befolyásolják a szoros junkciók. Vizsgálatok igazolták, hogy a humán jejunumban lévő szoros junkciók nem minőségükben térnek el a Caco-2 monolayerben találhatóaktól, hanem a Caco-2 sejtek között lévő szoros junkciók kevésbé nyitottak, szorosabb kapcsolódást alakítanak ki [Artursson és mtsai. 1993.].

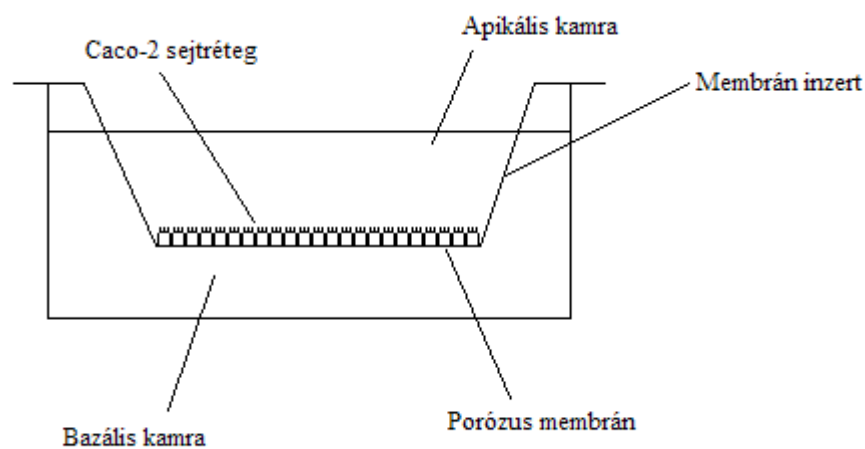
Mindezekből arra következtethetünk, hogy a Caco-2 sejtvonal alkalmas az intesztinális epitheliumon keresztüli gyógyszerfelszívódás minden útvonalának vizsgálatára, de az *in vivo* passzív transzpor modellezhető legjobban a Caco-2 monolayer hasonló mechanizmusával. Mivel a paracelluláris felszívódás mértéke jelentősen kisebb *in vitro*, így a Caco-2 sejtek segítségével, nagy hatékonysággal kiszűrhetők azok a hatóanyagok, amelyek felszívódása ilyen úton nem lenne megfelelő *in vivo*.

2.4.2. A transzport modell

A gyógyszerkészítmények fejlesztése során – mind az originális, mind a generikus gyógyszerkutatóban – végeznek egyenértékűségi vizsgálatokat. Ezek a vizsgálatok elsősorban *in vitro* hatóanyag-kioldódási tesztek, másrészt bioegyenértékűségi vizsgálatok. A cél mindkét esetben a biológiai hasznosíthatóság optimalizálása. A transzport modellek – bioegyenértékűségi vizsgálatok részeként – alkalmasak arra, hogy még a klinikai fázisok előtt kiküszöbölhetőek legyenek a felszívódással kapcsolatos problémák. Igen eltérő vizsgálati technikákat alkalmaznak az iparban és a tudományban [Braun és mtsai. 2000.; Hillgren és mtsai. 1995]. A legegyszerűbb rendszer az oktanol/víz megoszlási hányados vizsgálata. A kapott érték a szerves és vizes fázis közötti megoszlás mértékét adja meg, és így a molekula sejtmembránon keresztüli diffúziójára utal. Azonban ez a módszer csak a passzív felszívódás mértékének becslésére alkalmas, mivel alkalmazása során a farmakon csak passzív diffúzióval tud átjutni az egyik fázisból a másikba, *in vivo* pedig az aktív transzport is igen nagy szerepet tölt be a felszívódásban. Ha egy hasonló rendszert dolgozunk ki, mint a bélhám felszívó rendszere, igen megbízható és *in vivo*-hoz hasonló adatokat kaphatunk a felszívódás mértékére, mechanizmusára nézve [Wills és mtsai. 1994.]. Azt azonban nem szabad figyelmen kívül hagyni, hogy ha olyan farmakont vizsgálunk, amelynek akár a metabolizmusa, akár a clearance-e igen gyors és nagyfokú a kezelt élőlényben, az *in vitro* modellen elvégzett vizsgálatokból levont következtetések nem feltétlenül lesznek prediktívek az *in vivo* vizsgálatokra nézve. Ilyen esetekben az állatkísérletek lesznek a leginformatívabbak, mindazonáltal igen hasznos lehet összehasonlítani az *in vitro* transzport modelltől és az *in vivo* vizsgálatból származó farmakokinetikai adatokat. A szakirodalmi adatok [Bailey és mtsai. 1996.] azt mutatják, hogy általában igen szoros korreláció mutatkozik ezen adatok között. Tehát az *in vitro* transzport modellek igen jó kiindulási pontot adnak az *in vivo* állatkísérletek és a humán vizsgálatok tervezéséhez.

A Caco-2 sejteket igen széles körben alkalmazzák *in vitro* felszívódási vizsgálatokhoz, az első ilyen modellt Hidalgo és mtsai. jellemezték [Hidalgo és mtsai. 1989.]. A Caco-2 sejtvonal rendelkezik olyan különleges tulajdonságokkal, amelyek alkalmassá teszik élethű modell létrehozására. Ilyen tulajdonság például, hogy képes monolayer-t létrehozni, és felszívó bélhámként viselkedik *in vitro* körülmények között is.

A transzport modell kialakításához a Caco-2 sejteket patkány farkából származó I. típusú kollagénnel bevont polikarbonát membránra növesztik. Ez a membrán és a rajta kialakuló monolayer választja el egymástól a rendszer két folyadékterét (7. ábra).



7. ábra. A Caco-2 transzport modell vázlata Az apikális kamra felől a bazális kamra felé történik a farmakontranszport.

Az apikális és a bazális kamra tápoldatot tartalmaz. A kísérletek során ezt a tápoldatot pufferoldattal helyettesítik, mert a tápoldatban lévő anyagok megköthetik a vizsgálni kívánt farmakont. Az apikális kamra a bél lumenének felel meg, ennek megfelelően ide helyezik be a vizsgálati anyagot. A bazális kamra pedig a bélhám villusának kötőszövetes állományával egyenértékű. A vizsgálatok során azt az anyagmennyiséget, ami ebben a kamrában megjelent, felszívódottnak tekintik. A bazális kamrába átjutott anyagmennyiség meghatározására érzékeny módszereket alkalmaznak, hogy minél kisebb koncentrációban kelljen alkalmazni a vizsgált anyagot. Ilyen módszer lehet például az izotópos molekulajelzés.

A leggyakrabban alkalmazott, kb 200000 sejt/cm² kezdeti sejtsűrűség esetén a Caco-2 sejtek 15-21 nap alatt alakítják ki az összefüggő, intakt sejtréteget, a sejtek között kialakulnak a szoros junkciók, melyet a magas transzepitheliális elektromos ellenállás (TEER) érték is jelzi [Bailey és mtsai. 1996.]. A membránra helyezést követően a sejtréteg állapotát nyomon kell követni. Két technika is alkalmas a monolayer jellemzésére. Az egyik technika során olyan

anyagoknak átjutását nézik, amelyek kizárólag csak paracellulárisan tudnak áthatolni a sejtrétegen. Ilyen például a dextrans 70000, a PEG 4000, és a mannitol. Ezek különböző méretű molekulák, a legnagyobb a dextrans 70000, a legkisebb a mannitol. Bailey és mtsai. vizsgálták ennek a három anyagnak az átjutását Caco-2 sejtrétegen, ezzel bizonyítva a monolayer kialakulását, és integritását. Eredményeik azt mutatták, hogy az első napokban mindhárom anyag átjutása igen nagymértékű volt. A napok múlásával, ahogy a sejtek osztódtak és egyre inkább összefüggő réteget hoztak létre, az átjutás mértéke lecsökkent. A 21. nap után gyakorlatilag csak a kis molekulájú mannitol volt képes minimális mennyiségben átjutni a sejtrétegen. Óránként az össz mannitol mennyiségének kevesebb, mint 0,5%-a jutott át, 37°C-on pH 7,4-en. Leghamarabb a dextrans átjutása szűnt meg [Bailey és mtsai. 1996.]. Az idő előre haladtával a sejtek közötti szoros junctionok kialakulásával a sejtréteg barrier funkciója létrejött. Ezt az eredményt alátámasztják azok a sejtmorfológiai vizsgálatok, melyek az elektronmikroszkóppal készített felvételeken a jól definiálható mikrovillusokat, szoros junctionokat mutatnak és, melyek a monolayer teljes területén megtalálhatóak [Pinto és mtsai. 1983.; Rousset. és mtsai. 1986.; Hidalgo és mtsai. 1989.; Hilgers és mtsai. 1990.].

A másik technika a sejtréteg épségének vizsgálatára a TEER (transzepitheliális elektromos ellenállás) érték meghatározása. A TEER a bazális és az apikális kamra között kialakuló elektromos ellenállást jelenti. Mértékegysége $\text{Ohm} \times \text{cm}^2$. A TEER mérésére az apikális, illetve a bazális kamrába az ellenállásmérő egy-egy elektródját kell bemelegíteni. A mérés során fontos kísérleti körülmény a hőmérséklet, a pH, illetve a médium összetétele. Fontos, hogy a vizsgálat előtt az elektródot ekvilibráljuk olyan oldatban, amelyben a mérést végezni fogjuk. A membránra helyezést követő napokon a TEER érték növekszik. Ez jelzi a szoros junctionok kialakulását. A 4.-5. napon már kialakul egy konfluens sejtréteg, de a monolayernek nem csak ennek a kritériumnak kell megfelelnie a felszívódási vizsgálatok megvalósításához. Az exponenciális növekedés fázisában a TEER érték eltér a stabil, plató fázisban mért TEER értéktől. Ennek hátterében az áll, hogy a konfluens sejtek e két fázisában expresszálandó proteinjei között kvantitatív és kvalitatív különbség is adódik, különösen a transzport fehérjék tekintetében [Anderle és mtsai. 1998.; Rothen-Rutishauser és mtsai. 1998.]. A TEER érték elérheti az 1100-1800 $\text{Ohm} \times \text{cm}^2$ értéket. Miután elérte a maximumot, közel állandó értéken marad, majd mikor a sejtréteg elöregszik, a TEER érték ismét csökken. Bailey és mtsai. szerint ez a kihelyezést követő 30. nap után következik be. A vizsgálatokat a megfelelő TEER érték elérése után lehet elkezdni. Közleményekben erre vonatkozóan változó értékek találhatóak, pl. 300-540 $\text{Ohm} \times \text{cm}^2$ [Yau Yi Lau és mtsai 2004.], illetve 750-800 $\text{Ohm} \times \text{cm}^2$ [Braun és mtsai. 2000.].

A modell jellemzésének utolsó lépése az olyan anyagok P_{app} (látszólagos permeabilitási koefficiens) értékeinek meghatározása, melyek intesztinális felszívódása ismert az emberben. Mint például a mannitol, polietilén-glikolok, melyek paracelluláris úton transzportálódnak, a monolayer integritásának ellenőrzésére szolgálnak.; A metoprolol, a dexametazon transzcellulárisan transzportálódó, igen nagy permeabilitású vegyület; a szulfaszalazin szintén transzcellulárisan transzportálódik, de kis permeabilitású; a cimetidin, és az atenolol paracellulárisan transzportálódó, kis permeabilitású farmakonok [Marino és mtsai. 2005.].

A felsorolt anyagok P_{app} értékeinek meghatározásához megvizsgáljuk az átjutásukat a monolayeren keresztül. Az átjutott anyagmennyiségekből a következő képlettel számoljuk ki a P_{app} értékeket:

$$P_{app} = dQ/dt \times 1/(C_{null} \times A) \quad (1. \text{ egyenlet})$$

dQ/dt = időegység alatt átjutott anyagmennyiség (anyagmennyiség/s)

C_{null} = donor transzportoldal kiindulási koncentrációja (anyagmennyiség/ml)

A = effektív felszín (cm^2)

Ezen értékek tízes alapú logaritmusának függvényében ábrázolva az irodalomból ismert humán felszívódás százalékos értékeit, egy jellegzetes szigmoid görbét kapunk. Ez a görbe lehetőséget ad arra, hogy egy anyag általunk meghatározott P_{app} értékét a görbére helyezve következtetést vonjunk le a humán felszívódás mértékére nézve.

Az így kapott görbe csak az adott laboratóriumra érvényes. A görbét igen sok tényező befolyásolhatja, így például a kísérleti körülmények: Kim és mtsai. modell peptidek Caco-2 monolayeren és perfundált patkánybélben történő felszívódását hasonlították össze. Megállapították, hogy a felszívódás a Caco-2 monolayeren volt nagyobb mértékű [Kim és mtsai. 1993.]. Stewart és mtsai. vizsgálataik során pedig azt az eredményt kapták, hogy a Caco-2 monolayeren a peptidek felszívódása kisebb mértékű, mint a perfundált patkánybélben [1995.]. Kim és mtsai. a permeabilitásokat non-steady-state perfúzió után vizsgálták, és a mezenterikus cirkulációban mérték a megjelent peptidek mennyiségét, míg Stewart és mtsai. steady-state gyógyszerbevitelt alkalmaztak, és a béllumenből vett mintában lévő hatóanyag koncentrációját mérték, majd ebből az adatból következtettek vissza a felszívódott hatóanyag mennyiségére. A másik tényező, amely befolyásolja a felszívódást, így a görbét is, maga a sejtvonal. A Caco-2 sejtvonal minden laboratóriumban más és más szelekciós hatásnak lehet kitéve [Valchon és mtsai. 1992.]. Idővel még az egy laboratóriumon belüli populáció által kialakított monolayerek tulajdonságaiban is kialakulhatnak különbségek. Különbségek adódhatnak abból, hogy milyen

a passzázsszám [Walter és mtsai. 1995.], milyen idős a sejttenyészet [Wilson és mtsai. 1990.], és a tápoldat különbözősége is okozhat eltéréseket [Jumarie és mtsai. 1991.]. Tehát látható, hogy néha igen kockázatos lehet a permeabilitási értékeket összehasonlítani különböző laboratóriumok között, hiszen a sejtvonalból és a kísérleti körülményekből is adódhatnak eltérések. A különböző laboratóriumokban meghatározott permeabilitási értékek direkt összehasonlítása csak akkor lenne lehetséges, ha ugyanazon Caco-2 populációval és ugyanazon kísérleti körülmények között végezik a kísérleteket.

3. Célkitűzések

A gyógyszer bejutásának növelése, különösen a IV. osztályba tartozó hatóanyagok esetén, rendkívül fontos feladat. A farmakonok felszívódásának *in vitro* vizsgálatával meghatározható azok a tényezők, amelyek modulálásával a biofarmáciai tulajdonságok előnyösen megváltoztathatóak. Elengedhetetlen azoknak a folyamatoknak az ismerete és megértése, melyek hatására nagyobb mennyiségű hatóanyag képes áthatolni a bélhámsejtek membránján, vagyis a bélhám a hatóanyagra vonatkozó permeabilitása nő. A felhasznált segédanyag tulajdonságai is rendkívüli módon befolyásolják a hatóanyag bejuttatásának módját és a dozírozási forma kialakítását. Ezért fontos ismernünk a segédanyagoknak a felszívódásra gyakorolt hatását és az esetlegesen előforduló toxicitási tulajdonságaikat.

A vizsgálataink megtervezésekor ezeket a szempontokat figyelembe véve, a következő célokat tűztük ki:

1. Caco-2 sejtek segítségével kialakított *in vitro* transzport modell beállítása, jellemzése TEER méréssel, illetve ismert permeabilitású vegyületek segítségével.
2. Új generációs metil- β -CD-ek citotoxicitásának, hemolitikus aktivitásának jellemzése
3. Összefüggések feltérképezése a vizsgált CD-ek szerkezete, koleszterinoldó képessége, citotoxicitása, illetve hemolitikus aktivitása között
4. A citotoxicitási és koleszterinoldó képesség alapján legmegfelelőbbnek ítélt CD-ek taxol transzportjára gyakorolt hatásának tanulmányozása Caco-2 transzport modellen
5. A kiválasztott CD-ek a taxol aktív effluxára, illetve a barrier funkciókra gyakorolt hatásának tanulmányozása.

4. Anyagok és módszerek

4.1. A Ciklodextrinek

Vizsgált β -CD-ek és rövidítésük		Szubsztituensek száma/CD
Trimeb	Heptakis(2,3,6-tri-O-metil)- β -ciklodextrin	Metil: 21
Dimeb-50; Dimeb-80; Dimeb-95	Heptakis(2,6-di-O-metil)- β -ciklodextrin 50, 80 és 95% izomer tisztaságú	Metil: 14
SPDimeb-50	Szulfopropil-heptakis(2,6-di-O-metil)- β -ciklodextrin	Metil: 14 Szulfopropil: 3
CMDimeb-50	Karboximetil-heptakis(2,6-di-O-metil)- β -ciklodextrin nátrium sója	Metil: 14 Karboximetil: 2
CMHEDimeb	Karboximetil-hidroxietyl-heptakis(2,6-di-O-metil)- β -ciklodextrin	Metil: 14 Karboximetil: 2.5 hidroxietyl: 4.5
Rameb	Random metil- β -ciklodextrin	Metil: 12
SuRameb	Szukcinil-metil- β -ciklodextrin	Metil: 12 Szukcinil: 1-2
MaRameb	Metil-6-monodeoxi-6-monoamino- β -ciklodextrin	Metil: 12 Amino: 1
Parme	Részlegesen metilezett- β -ciklodextrin	Metil: 9
MaParme	Metil-6-monodeoxi-6-monoamino- β -ciklodextrin	Metil: 9 Amino: 1
Crysmeb	Metilezett- β -ciklodextrin	Metil: 3-4
HPBCD	Hidroxiopropil- β -ciklodextrin	Hidroxiopropil: 3
QABCD	Kvaterner amino- β -ciklodextrin	Trimetilamino: 4
CMBCD	Karboximetil- β -ciklodextrin	Karboximetil: 3

2. táblázat. A vizsgált β -ciklodextrin származékok

A kísérletek során számos β -CD származék hatását vizsgáltuk. A Rameb a Wacker Chemie-től (Németország), a Crysmeb a Roquette Frères-től (Franciaország) került

beszerzésre. Az egyéb β -CD származékokat, illetve a koleszterin/Dimeb-50 (4,63(m/m)% koleszterin-tartalom) és a koleszterin/Rameb (4,82(m/m)% koleszterin-tartalom) komplexeket a Cyclolab Kft. (Cyclolab Cyclodextrin R&D Laboratory Ltd., Magyarország) bocsátotta rendelkezésünkre.(2. táblázat)

4.2. A sejtenyésztés

4.2.1. A Hela sejtvonal

Az előkísérleteink során a β -CD-ek hatását Hela (European Collection of Cell Cultures, Egyesült Királyság) sejtvonalon vizsgáltuk. A tenyésztés során a sejteket standard körülmények között tartottuk [Dulbecco's modified Eagle's medium (Sigma-Aldrich, Magyarország), mely 10(v/v)% hővel inaktivált főtális szarvasmarha szérumot (Sigma-Aldrich, Magyarország), 2 mM L-glutamint, 100 mg/l gentamicint tartalmaz; 37°C-on, 5% CO₂ atmoszférában, 95% páratartalom mellett]. Passzálást 4-5 naponta végeztünk 0,05(m/v)% tripszin0,02(m/v)% EDTA-oldatot [0,5 g/l tripszin (Sigma-Aldrich, Magyarország); 0,2 g/l EDTA (Sigma-Aldrich, Magyarország)] alkalmazva a sejtek felválasztásához.

4.2.2. A Caco-2 sejtvonal

Vizsgálataink során a Hela sejtvonal mellett az ECACC-tól (European Collection of Cell Cultures, Egyesült Királyság) származó Caco-2 sejtvonalat alkalmaztuk. A sejteket 10(v/v)% inaktivált főtális szarvasmarha szérumot (FBS, Sigma-Aldrich; Magyarország), 1(v/v)% nem esszenciális aminosavat (Sigma-Aldrich, Magyarország) és 100 mg/ml gentamicint tartalmazó DMEM (Dulbecco's modified Eagle's medium) (Sigma-Aldrich, Magyarország) tenyésztő folyadékban növesztettük 37°C-on, 5% CO₂ atmoszférában, 95% páratartalom mellett. A sejteken minden 3-4 napon végeztünk tápoldat cserét. A passzáláshoz 0,05(m/v)% tripszin0,02(m/v)% EDTA-oldatot [0,5 g/l tripszin (Sigma-Aldrich, Magyarország); 0,2 g/l EDTA (Sigma-Aldrich, Magyarország)] használtunk. A vizsgálatokat 25-42 passzázsszám között végeztük.

4.3. A koleszterinoldó képesség vizsgálata

A koleszterinoldó képesség vizsgálatát a Cyclolab végezte el számunkra, mely során meghatározták, hogy 1 ml 0,04 M koncentrációjú β -CD oldat hány mg koleszterint tud oldatba tartani, azaz komplexálni. A vizsgálat protokollja a következő: 0,04 M β -CD desztillált vízzel készített oldatához nagy feleslegben koleszterint adtak. A szuszpenziót szobahőmérsékleten 12 órán át kevertették. Az inkubálás után a szuszpenziót megszűrték, majd a filtrátum koleszterin tartalmát HPLC segítségével határozták meg. Az oszlopban reverz fázisú Nucleosil 120-5, C₁₈ 4*100 mm (Macharey Nagel, Németország) töltetet alkalmaztak, a kromatográfiát 40°C-on végezték, Az elúcióhoz izokratikus acetonitril:2-propanol (3:1) elegyét használták.. Az UV abszorbancia detektálás 210 nm-en történt. A filtrátumban lévő oldott koleszterin tartalmat mg/ml-ben fejezték ki.

4.4. Az MTT-teszt

Az MTT assay-t a sejtípusoknak megfelelően két protokoll alapján végeztük:

4.4.1. A Hela sejt vonal

A sejteket 24 lyukú platbe helyeztük (8×10^4 sejt/lyuk). 2-3 napos inkubálás után a platet foszfát pufferes sóoldattal (PBS) mostuk, majd a vizsgált, PBS-sel készült különböző koncentrációjú ciklodextrin oldatokat a sejtekre helyeztük. 30 perces inkubáció után (37°C, 5% CO₂ atmoszféra, 95% páratartalom) a ciklodextrin oldatokat eltávolítottuk, PBS-sel történő kétszeri mosás után médiummal készült, 0,5 mg/ml koncentrációjú 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium-bromid (MTT; Sigma-Aldrich, Magyarország) oldattal inkubáltuk a sejteket további 4 órán keresztül. A képződött formazán kristályokról először eltávolítottuk az MTT-oldatot, majd 200 μ l dimetil-szulfoxid (DMSO) (Sigma-Aldrich, Magyarország) segítségével feloldottuk a formazán kristályokat. Az oldatok abszorbanciáját Shimadzu UV-1601 spektrofotométer (Shimadzu, Japán) segítségével mértük 570 nm-en. Csak a sejtörmelék tartalmazó szuszpenzió, mint háttér értékével korrigáltuk az eredményeket, mert annak a minimális mennyiségű redukálatlan MTT-nek, amely a kísérlet során nem alakult át formazánná és a sejtekhez tapadva a mintában maradt, a maximális UV elnyelése 380 nm és 235 nm hullámhosszon van. 570 nm-en nincs elnyelése a redukálatlan MTT-nek. A korrigálás során kivontuk az 570 nm-en mért abszorbancia értékekből a sejtörmelék szuszpenzió, mint háttér 690 nm-en mért abszorbancia értékeit. A korrigált

értékeket kezeletlen kontroll minták abszorbancia értékeihez viszonyítva százalékban fejeztük ki és a β -CD koncentráció függvényében ábrázoltuk.

4.4.2. A Caco-2 sejt vonal

A vizsgált β -CD-ek Caco-2 sejtekre gyakorolt hatását MTT teszttel vizsgáltuk [Mosmann 1983.]. A Caco-2 sejteket 96-lyukú tenyésztőedénybe helyeztük (10^4 sejt/ lyuk), majd 7 napig a fentebb leírt tenyésztési körülmények között tartottuk.

7 nap múlva különböző koncentrációjú, PBS-ben készült β -CD oldatot helyeztünk a sejtekre. 30 perces inkubálás után médiummal készült, 0,5 mg/ml koncentrációjú 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium-bromid (MTT) oldatra cseréltük a β -CD oldatot és további 3 órán keresztül 37°C -on inkubáltuk. Miután leszívtuk a felülúszót, a keletkezett, vízben oldhatatlan formában kristályokat 200 μl sósavas 2-propanollal (2-propanol:sósav = 25:1) oldottuk fel. Az oldatok abszorbanciáját FLUOstar Optima microplate olvasó (BMG LABTECH, Németország) segítségével 570 nm-en mértük. Az abszorbancia értékeket a Hela sejteken végzett MTT-teszt leírása szerint korrigáltuk. Az eredményeket a kezeletlen kontroll minták abszorbancia értékeihez viszonyítva százalékban fejeztük ki és a β -CD koncentráció függvényében ábrázoltuk. Az ábrák segítségével meghatároztuk az IC_{50} értékeket (50% mitokondriális enzim inaktiváció).

4.5. A hemolitikus aktivitás teszt

A β -CD-ek hemolitikus aktivitásának vizsgálatához egészséges humán donorok vérért használtuk. A citráttal antikoagulált mintákból a vér alakos elemeit centrifugálással szeparáltuk (2500 \times g, 10 perc), majd PBS-sel háromszor mostuk. A PBS-sel készült, különböző koncentrációjú β -CD oldatokhoz (pH 7,2) 5×10^7 számú erythrocytát adtunk. 10 perces, 37°C -on történő inkubálás után a mintákat 5000 \times g centrifugáltuk. A hemolízis következtében kiszabaduló hemoglobin abszorbanciáját mértük a felülúszóban 540 nm-en Hitachi 220 A spektrofotométer (Hitachi, USA), illetve FLUOstar OPTIMA microplate reader (BMG LABTECH, Németország) segítségével. A kontroll kísérlet során az erythrocytákat desztillált vízben inkubáltuk 10 percig, ezalatt végment a teljes hemolízis. Majd centrifugálást követően megmértük a felülúszóban lévő, kiszabadult hemoglobin abszorbanciáját 540 nm-en.

Az eredményeket a teljes hemolízis során mért abszorbancia értékhez viszonyítva, százalékosan fejeztük ki, majd a β -CD koncentráció függvényében ábrázoltuk. Az ábrák segítségével meghatároztuk a HC_{50} értékeket (50% hemolitikus aktivitás).

4.6. A Caco-2 transzport modell kialakítása, jellemzése

4.6.1. A transzport modell jellemzése transzepitheliális elektromos ellenállás méréssel

A β -CD-ek taxol transzportjára gyakorolt hatását Caco-2 sejtek által kialakított transzport modell segítségével vizsgáltuk. A vizsgálathoz a sejteket Transwell® (Corning Costar, USA) polikarbonát inzertra helyeztük (0,4 μ m pórusméret, 2×10^5 sejt/inzert). A sejtek tenyésztése a sejtenyésztés pontban említett körülmények közt történt. Az inzerteken a médiumot 2 naponta cseréltük. A kiültetés utáni 20-30 nap között használtuk az inzerteket a transzport kísérletekhez, mikor a Caco-2 sejtek stabil monolayeret alkottak. A monolayer kialakulását transzepitheliális elektromos ellenállás (TEER) méréssel követtük nyomon (Millicell-ERS voltóhmmeter, Millipore, USA). A mért TEER értéket a 2. számú egyenlet alapján korrigáltuk:

$$TEER (\text{Ohm} \times \text{cm}^2) = [\text{Mért érték (Ohm)} - \text{üres inzert ellenállása (Ohm)}] \times \text{effektív felület (cm}^2\text{)}$$

(2. egyenlet)

4.6.2. A transzport modell jellemzése ismert permeabilitású vegyületek segítségével

A transzport vizsgálatok során 1000 $\text{Ohm} \times \text{cm}^2$ feletti TEER értékű monolayereket használtunk, három párhuzamos mérést végeztünk. A jellemzés során ismert humán abszorpciójú, vegyületek átjutását vizsgáltuk a monolayeren keresztül. Az inzerteket HBSS-ben (Hanks' Balanced Salt Solution; Sigma-Aldrich, Magyarország) mostuk (37°C, 30 perc), majd a bazális kamrát megfelelő mennyiségű tiszta HBSS, azaz akceptor oldattal töltöttük meg. Az apikális kamrát megfelelő mennyiségű, 0,5 μ Ci/ml izotóp tartalmú HBSS, azaz donor oldattal töltöttük meg. A karakterizálás során mintát a bazális kamrából 10., 30., 60., és 120. percben, illetve gyorsan transzportálódó anyagok esetén az 5., 10., 15., és 90. percben vettünk. A minták radioaktivitását folyadék szcintillációs számláló készülékkel határoztuk meg (Tri-Carb, PerkinElmer, USA). A mért dpm értékekből a látszólagos permeabilitási koefficiens (P_{app}) a fentebb említett 1. egyenlet alapján határoztuk meg.

A P_{app} értékek tízes alapú logaritmusának függvényében ábrázoltuk a humán abszorpció értékeit. Az alkalmazott radiojelzett vegyületeket a 3. táblázat foglalja össze.

Alkalmazott radiojelzett vegyületek	Abszorpció jellege	Humán felszívódás mértéke [Wessel és mtsai 1998.]
¹⁴ C-mannitol (Amersham USA) (fajlagos aktivitás: 2,18 GBq/mmol)	Passzív paracelluláris transzport	15%
¹⁴ C – PEG-4000 (ARC USA) (fajlagos aktivitás: 35,15 MBq/gr)	Passzív paracelluláris transzport	0%
¹⁴ C-szacharóz (Amersham USA) (fajlagos aktivitás: 21,9 GBq/mmol)	Passzív transzcelluláris transzport	40%
³ H-etopozid (Moravek Biochemicals USA) (fajlagos aktivitás: 18,5 GBq/mmol)	Pgp szubsztrát	50%
³ H-tesztoszteron (Perkin-Elmer USA) (fajlagos aktivitás: 1,66 GBq/mmol)	Passzív transzcelluláris transzport	100%
³ H-kortikoszteron (Perkin-Elmer USA) (fajlagos aktivitás: 2,59 TBq/mmol)	Passzív transzcelluláris transzport	100%

3. táblázat. A transzport modell jellemzése során alkalmazott radiojelzett vegyületek

4.7. A [³H]-taxol permeabilitásának vizsgálata

A vizsgálatok előtt az inzerteket HBSS oldatban mostuk és inkubáltuk 37 °C-on 30 percig. A monolayer-ek integritásának ellenőrzése céljából a kísérletek előtt és után megmértük a TEER értékeket. A permeabilitási vizsgálatok a következőképpen történtek:

β-CD előkezelés, Protokoll 1.: A monolayereket az apikálisan elhelyezett 20 mM Rameb, SuRameb, MaRameb oldatokkal inkubáltuk 37 °C-on 30 percen keresztül. Ezután a sejteket kétszer HBSS-sel mostuk. A β-CD előkezelést követően külön kísérletben meghatároztuk az apikális kamrából a bazolaterális, illetve a bazolaterális kamrából az apikális felé a taxol permeabilitását. Apikális kamrából a bazolaterális kamrába irányuló (A-B) permeabilitási vizsgálat során az apikális kamra tartalmazta a donor oldatot: 0,5 μCi/ml [³H]taxol (Moravek Biochemicals USA), illetve 0,5 μCi/ml [¹⁴C]mannitol HBSS-ben. A taxol fajlagos aktivitása 36,0 Ci/mmol és koncentrációja a donor oldatban 11,9 ng/ml volt. Ebben a

kísérleti elrendezésben a bazolaterális kamra tartalmazta az akceptor oldatot, tiszta HBSS-t. A mintákat a bazolaterális kamrából vettük 15-30 perces időközönként a 90. percig. A kivett térfogatokban lévő hatóanyag radioaktivitását későbbi számítások során figyelembe vettünk, mely szerint a mintavételekkor kivett térfogatokban lévő taxol illetve mannitol radioaktivitást hozzáadtuk a 90, percben vett mintában lévő taxol/mannitol radioaktivitásához. A kivett térfogatókat HBSS-sel pótoltuk. Néhány vizsgálat során [¹⁴C]mannitol helyett [¹⁴C]PEG-4000-t alkalmaztunk, mint paracelluláris marker.

A bazolaterális kamrából az apikális felé (B-A) történő taxol transzport mérések során a donor oldatot a bazolaterális kamra tartalmazta: 0,5 µCi/ml [³H]taxol, illetve 0,5 µCi/ml [¹⁴C]mannit HBSS-ben. Az akceptor oldatot, tiszta HBSS-t az apikális kamra tartalmazta. A mintákat az apikális kamrából vettük 15-30 perces időközönként a 90. percig. A kivett térfogatókat HBSS-sel pótoltuk, amelyet a későbbi számítások során figyelembe vettünk a fentebb leírt módon.

Folyamatos β-CD kezelés Protokoll 2.: Az A-B irányú mérésekhez 0,5 µCi/ml [³H]taxol, illetve 0,5 µCi/ml [¹⁴C]mannitol 20 mM Rameb, 20 mM MaRameb, 20 mM SuRameb HBSS-sel készült oldatával összekevertünk és előinkubáltuk 37°C-on 30 percig.

A-B irányú permeabilitási mérések során az apikális kamra tartalmazta a donor, β-CD-taxol oldatot a vizsgálat végéig, a 90. percig. Így a β-CD kezelés a kísérlet teljes időtartama alatt zajlott. A mintákat az akceptor HBSS oldatot tartalmazó bazolaterális kamrából vettük 15-30 perces időközönként a 90. percig. A kivett térfogatokban lévő hatóanyag radioaktivitását későbbi számítások során figyelembe vettünk a Protokoll 1. A-B transzport vizsgálatnál leírt módon. A kivett térfogatókat HBSS-sel pótoltuk.

A B-A irányú permeabilitási vizsgálatok során az apikális kamra tartalmazta az akceptor oldatot: 20 mM Rameb, 20 mM MaRameb, 20 mM SuRameb HBSS-sel készült oldatát. A donor oldatot a bazolaterális kamra tartalmazta: 0,5 µCi/ml [³H]taxol, illetve 0,5 µCi/ml [¹⁴C]mannit HBSS-ben. A mintákat az apikális kamrából vettük 15-30 perces időközönként a 90. percig. A kivett térfogatokban lévő hatóanyag radioaktivitását későbbi számítások során figyelembe vettünk a Protokoll 1. A-B transzport vizsgálatnál leírt módon. A kivett térfogatókat 20 mM CD oldattal pótoltuk.

A Pgp gátlás vizsgálatánál a 10 µM ciklosporin A-t (CSA; Sigma-Aldrich, Magyarország), mint ismert Pgp inhibitort az apikális kamra tartalmazta A-B és B-A elrendezés esetén is.

Minden kísérlet során 3 párhuzamos mérést végeztünk. A minták radioaktivitását folyadék scintillációs számláló készülékkel határoztuk meg (Tri-Carb, PerkinElmer, USA).

A mért dpm értékekből a látszólagos permeabilitási koefficiens (P_{app}) az 1. egyenlet alapján határoztuk meg.

4.8. Az immunhisztokémia

A vizsgálathoz a sejteket Transwell[®] (Corning Costar, USA) poliészter filterre helyeztük (0,4 μ m pórusméret, 2×10^5 sejt/filter). A sejtek tenyésztése a sejttenyésztés pontban említett körülmények közt történt. Az inzerteken a médiumot 2 naponta cseréltük. A sejteket a monolayer kialakulása után 120 percig kezeltük 20 mM Rameb, MaRameb, vagy SuRameb HBSS-sel készült oldatával. A kontroll, azaz kezeletlen inzert tiszta HBSS-t tartalmazott a 120 perc alatt. Az inkubálás után az inzerteket PBS-sel (pH 7,3) mostuk, majd 3% paraformaldehid frissen depolimerizált, PBS-sel készített oldatával fixáltuk 30 percig. Majd a sejteket ZO-1 (Invitrogen USA), claudin-1 (Invitrogen USA), β -catenin (Sigma-Aldich, Magyarország) primer antitestek 5 μ g/ml koncentrációjú oldatával inkubáltuk 1 órán át a nem-specifikus antitestkötő helyeket blokkoló 3% szarvasmarha szérum albumin oldattal együtt. Háromszoros PBS-sel történő mosás után a Cy3-jelzett anti-rabbit IgG másodlagos antitesttel (Sigma-Adrich, Magyarország) (2 μ g/ml), illetve sejtmagfestésre alkalmas bis-benzimiddel (Sigma-Adrich, Magyarország) (10 μ M) inkubáltuk a sejteket további 1 órán keresztül. A festett sejtekkel együtt az inzertek membránját tárgylemezre rögzítettük Gel Mount-tal (Biomeda, USA), majd Nikon Eclipse TE2000 fluoreszcenciás mikroszkóppal tanulmányoztuk (Nikon Japán), Spot RT digitális kamerával fényképeztük (Diagnostic Instruments, USA).

4.9. Statisztikai analízis

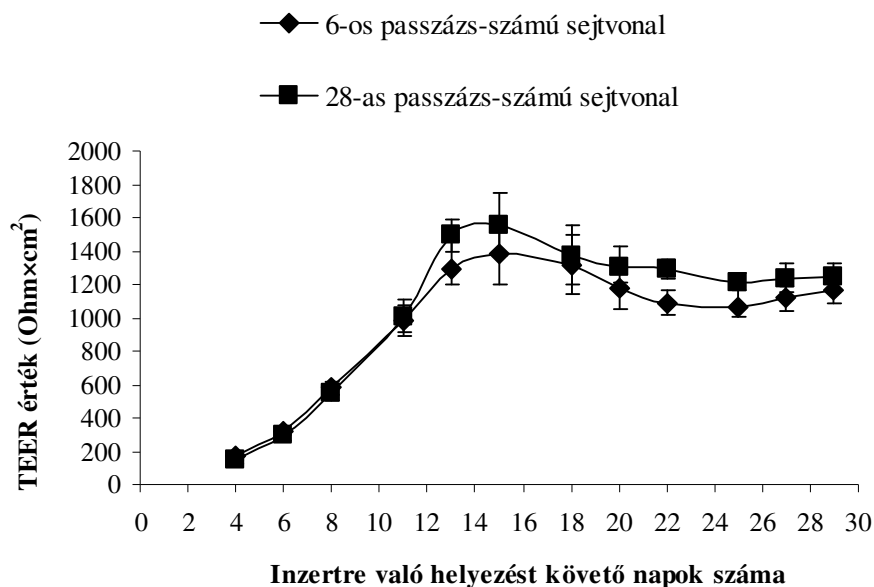
Az adatokat statisztikailag a SigmaStat (version 3.1. SPSS Inc.) program segítségével elemeztük, és az átlagukat ábráztuk \pm SD. A csoportok összehasonlítását one-way ANOVA-val végeztük, amelyet Holm-Sidak post hoc teszt követett. A különbségeket $p < 0,05$ esetén tekintettük szignifikánsnak.

5. Eredmények

5.1. A monolayer kialakulása, transzport modell jellemzése

5.1.1 A transzport modell jellemzése TEER értékkel

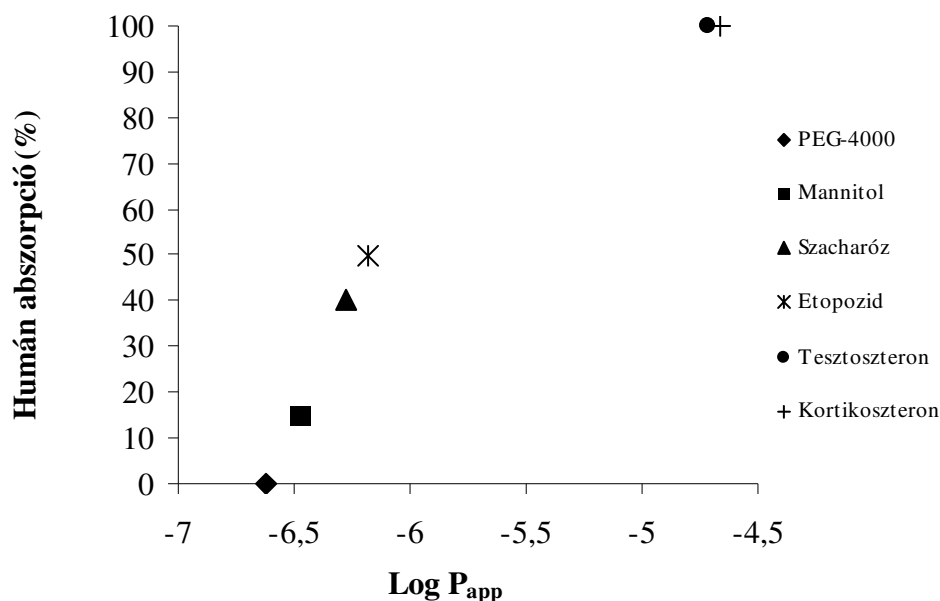
Megvizsgáltuk, hogy hogyan hat a passzázs-szám a Caco-2 monolayer kialakulására. 7-7 inzertet tanulmányoztunk. A 14. ábrán a 2. egyenlet szerint korrigált értékeket ábrázoltuk. Jelentős eltérést nem tapasztaltunk a különböző passzázs-számú sejtek monolayer kialakító képessége között, a két görbe lefutása között számottevő különbség nincs. A TEER érték 15 napig emelkedett. A maximális érték a 6-os passzázs-számú populáció esetén $1385 \text{ Ohm} \times \text{cm}^2$, a 28-as passzázs-számú populáció esetén $1557 \text{ Ohm} \times \text{cm}^2$. Az ezt követő plato fázisban, amelyben a transzportvizsgálatok végezhetőek, a TEER értékek megtartottak voltak a 30. napig.



14. ábra. A TEER-érték alakulása az idő függvényében A mért adatokat $\text{átlag} \pm \text{SD}$ formában ábrázoltuk (n=6).

5.1.2 A transzport modell jellemzése ismert permeabilitású vegyületek segítségével

A transzport modell további jellemzéséhez 6 radiojelzett anyagot alkalmaztunk. A vizsgálat eredményét a 15. ábra mutatja. Az általunk mért látszólagos permeabilitási koefficiens (P_{app}) értékek a következők: PEG 4000 = $1,25 \times 10^{-7} \pm 2,18 \times 10^{-8} \text{ cm/s}$; mannitol = $1,72 \times 10^{-7} \pm 5,45 \times 10^{-8} \text{ cm/s}$; szacharóz = $3,63 \times 10^{-7} \pm 1,28 \times 10^{-7} \text{ cm/s}$; kortikoszteron = $2,15 \times 10^{-5} \pm 4,43 \times 10^{-6} \text{ cm/s}$; tesztoszteron = $2,30 \times 10^{-5} \pm 4,21 \times 10^{-6} \text{ cm/s}$. Ezeknek az értékeknek a 10-es alapú logaritmusát ábrázoltuk.



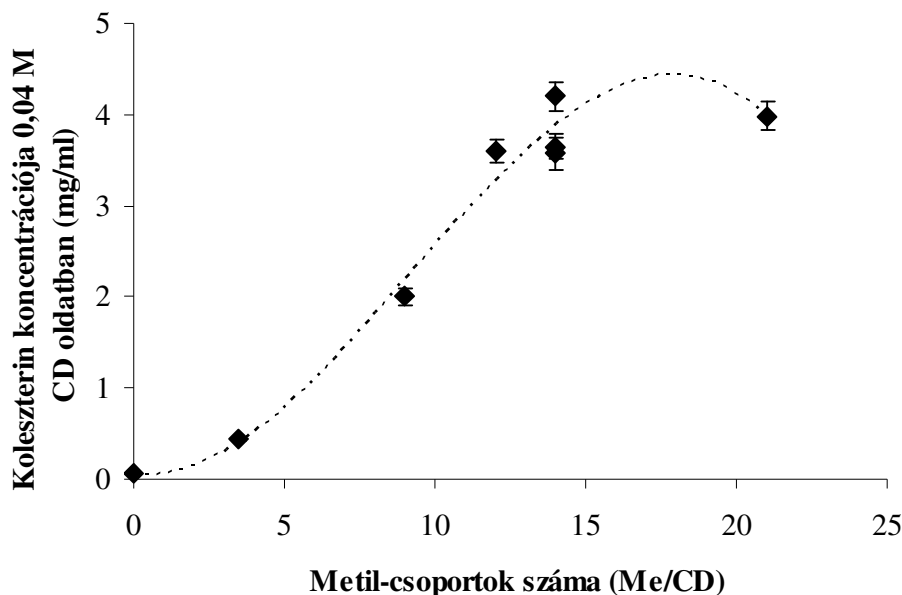
15. ábra. A transzport modell jellemzése ismert permeabilitású vegyületek segítségével A pontok által meghatározott szigmoid görbe lehetőséget ad arra, hogy egy anyag általunk meghatározott P_{app} értékét a görbére helyezve következtetést vonjunk le a humán felszívódás mértékére nézve (n=3).

Artusson és mtsai. összegyűjtöttek 4 kutatócsoport által mért P_{app} értékeket [Artusson és mtsai. 1996.]. A mannitol esetében a logP_{app} értékek -6,9 és -5,5 közötti tartományban vannak. Az általunk meghatározott logP_{app} mannitol esetén -6,76. A közleményekben a tesztoszteron és a kortikoszteron logP_{app} értéke -5 és -4 közzé esik. Ezek az általunk mért értékek - 4,67 és - 4,64.

5.2. A β-CD származékok koleszterinoldó képességének vizsgálata

Ismert tény, hogy a metil-β-CD-ek nagy affinitással komplexálják a koleszterint. Megvizsgáltuk a különböző metil-β-CD-ek koleszterinoldó képességét a szubsztituátság szemszögéből. A vizsgálathoz a CD-ek 0,04 M koncentrációjú oldatát alkalmaztuk. A glükóz gyűrű metil szubsztituenseinek száma 3 és 21 között mozgott. A legkevesebb metil-csoportot a Crysmeb (DS: 3-4), a legtöbbet a Trimeb (DS: 21) tartalmazza. A Crysmeb esetében a gyűrű alkotó, minden második glükóz molekulához 1 metil csoport kapcsolódik. A Rameb és a Parmeb minden glükóz molekulájához legalább egy metil-csoport kapcsolódik. Glükóz molekulánként a Dimeb kettő, a Trimeb három metil-csoportot tartalmaz. A vizsgálat során azt tapasztaltuk, hogy a metil-szubsztituensek számának növekedésével nő az oldatban lévő

koleszterin mennyisége, amely a koleszterin egyre nagyobb mértékű komplexálására utal. Az emelkedés a 14 db szubsztituenszt tartalmazó Dimeb-nél éri el a maximumot, a további metil-csoportok nem emelik a koleszterin koncentrációját (8. ábra).



8. ábra. A metil- β -ciklodextrinek koleszterinoldó képessége a metil-csoportok számának függvényében A mért adatokat átlag \pm SD formában ábrázoltuk. (n=3)

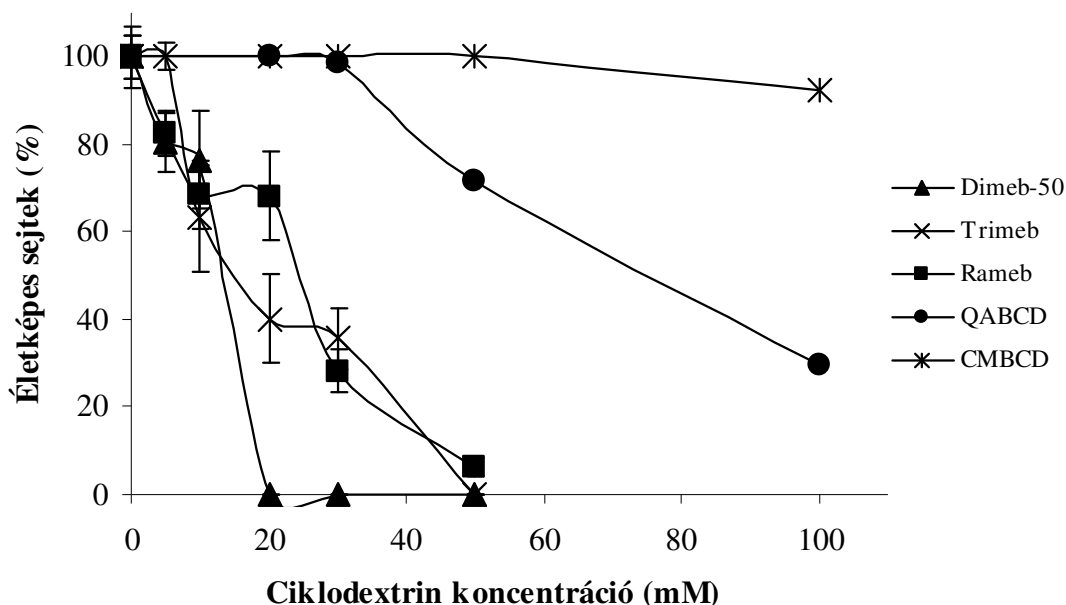
Az izomer tisztaság nem befolyásolta a koleszterinoldó képességet: $4,20 \pm 0,16$; $3,57 \pm 0,18$ és $3,65 \pm 0,14$ mg/ml koleszterin koncentrációt mértünk az 50%; 80%; 95% izomer tisztaságú 0,04 M Dimeb oldatok esetében.

A Dimeb, illetve a Rameb koleszterinhez való affinitásának csökkentése érdekében új, kationos (amino), illetve anionos (karboximetil, szukcinil, szulfopropil stb.) szubsztituensek kerültek a glükóz gyűrűre. Az új szubsztituensek következtében a Rameb esetében mért $3,60 \pm 0,12$ mg/ml koleszterin-koncentrációhoz viszonyítva, jelentősen lecsökkent a koleszterin komplexálásához való affinitás. A SuRameb esetében, mely szukcinil-csoportot tartalmaz, $2,40 \pm 0,09$ mg/ml-es, a MaRameb esetében, mely amino-csoportot tartalmaz, $0,50 \pm 0,07$ mg/ml-es koleszterin koncentrációt mértünk. A Dimeb módosítása révén még ennél is jelentősebb koleszterinoldó képesség csökkenést tapasztaltunk. Néhány ionos csoport bevitele a Dimeb 3 mg/ml feletti értékét lecsökkentette 0,10 mg/ml érték alá. Ilyen alacsony értékű koleszterinoldással rendelkezik a SPDimeb (szulfopropil-csoport), a CMDimeb (karboximetil-csoport) és a CMHE-Dimeb (karboximetil-, hidroxietil-csoport).

A vizsgált nem-metilézett β -CD-ek esetében, úgymint a HPBCD, QABCD, CMBCD, amelyek hidroxipropil, trimetilamino vagy karboximetil szubsztituenst tartalmaznak, jóval kisebb koleszterin-koncentrációt mértünk: $0,32 \pm 0,01$; $0,050 \pm 0,002$ és $0,055 \pm 0,005$ mg/ml.

5.3. A β -CD származékok citotoxicitásának vizsgálata

5.3.1. Az MTT-teszt eredménye HeLa sejtvonalon



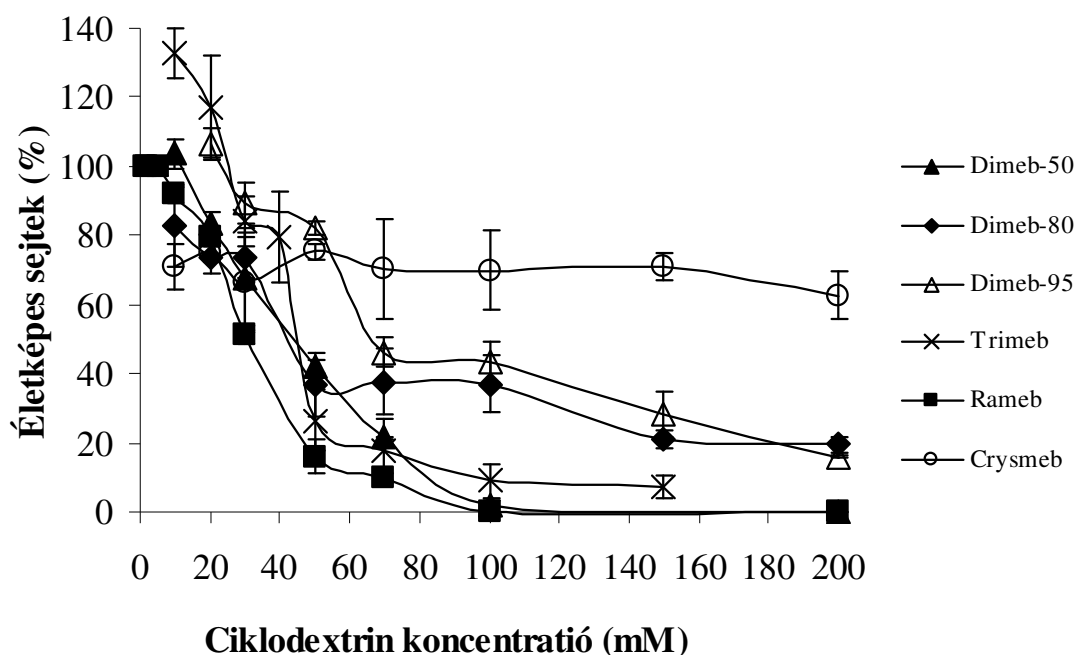
9. ábra. A β -ciklodextrin származékok citotoxicitása a vizsgált ciklodextrinek koncentrációjának függvényében HeLa sejtvonalon A citotoxicitás százalékos ábrázolása az életképes sejtek a kezeletlen kontrollhoz (100%) viszonyított arányát fejezi ki. A mért adatokat átlag \pm SD formában ábrázoltuk (n=3).

A HeLa sejteken végzett citotoxicitási teszt jelentős különbségeket mutatott a vizsgált β -CD származékok citotoxicitásában (9. ábra). Azt tapasztaltuk, hogy a legtoxikusabb a Dimeb-50. A Trimeb és a Rameb toxicitása kisebb volt, viszont az ionos származékok csak nagy koncentrációban fejtettek ki membránkárosító hatást.

5.3.2. Az MTT teszt eredménye Caco-2 sejtvonalon

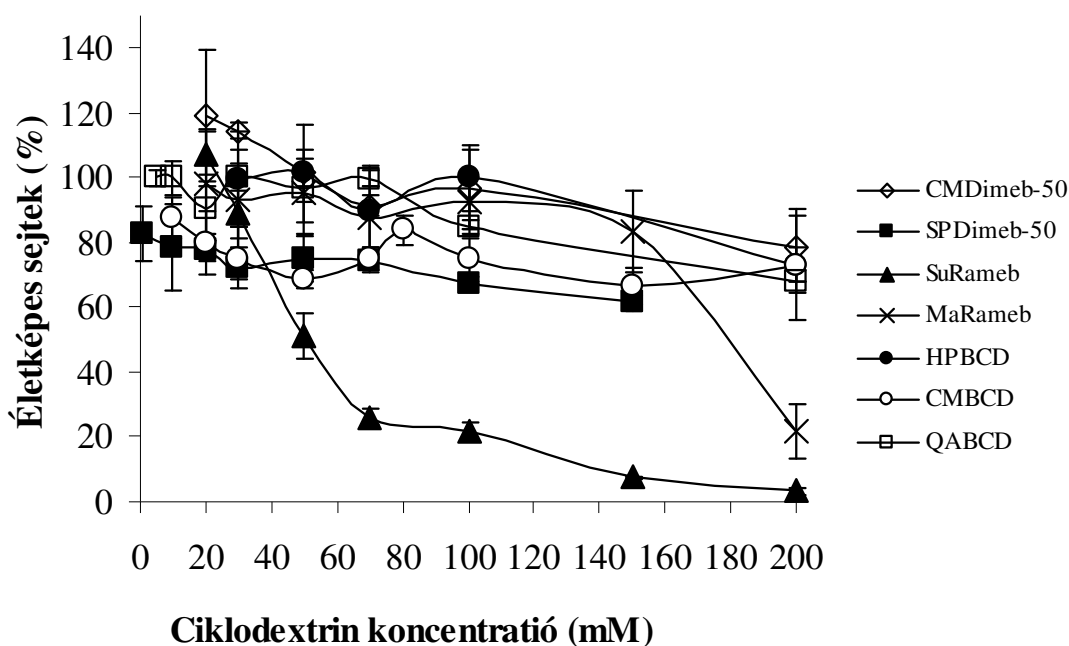
MTT-teszt segítségével meghatároztuk a vizsgált β -CD-származékok citotoxicitását, illetve a vonatkozó IC_{50} értékeket.

A metilezett β -CD-ek mutatták a legjelentősebb toxicitást, kivéve a Crysmeb. A citotoxicitás a következőképpen csökken: Rameb>Dimeb \geq Trimeb>>Crysmeb (10. ábra). A különböző izomer tisztaságú Dimeb-ek esetén az IC_{50} értékekben nem tapasztaltunk jelentős eltérést, amely a koleszterin-oldó képességgel összhangban van. Dimeb-50: $45,10\pm 2,43$ mM; Dimeb-80: $52,30\pm 4,16$ mM; Dimeb-95: $67,00\pm 3,46$ mM.



10. ábra. A metil- β -ciklodextrin származékok citotoxicitása a vizsgált ciklodextrinek koncentrációjának függvényében Caco-2 sejtvonalon. A citotoxicitás százalékos ábrázolása az életképes sejtek a kezeletlen kontrollhoz (100%) viszonyított arányát fejezi ki. A mért adatokat átlag \pm SD formában ábrázoltuk (n=3).

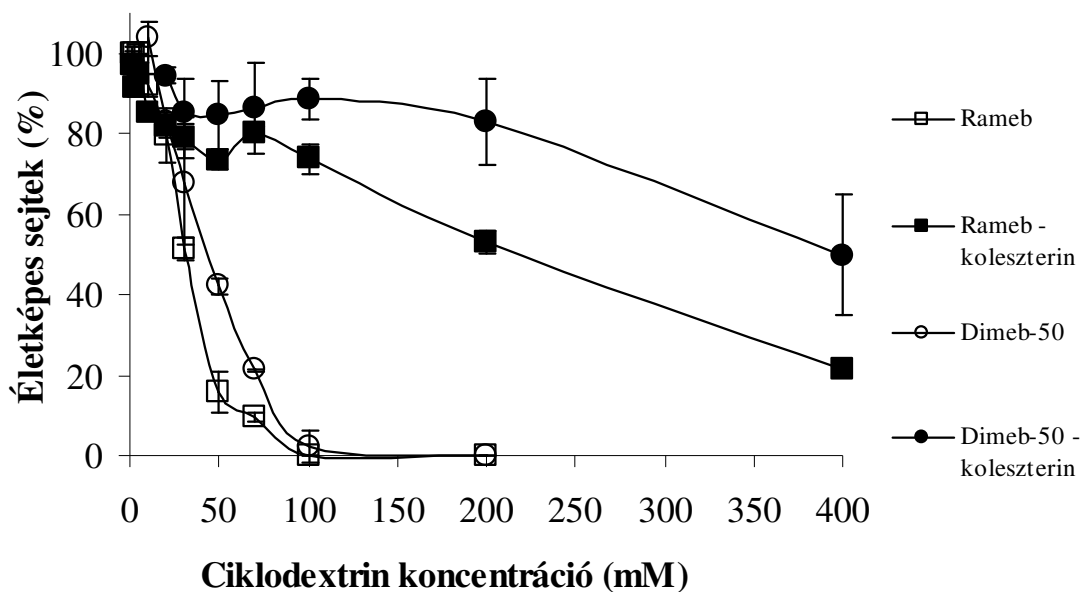
A második generációs β -CD-ek esetében, azaz az olyan β -CD-ek esetében, amelyek a metil csoport mellett tartalmaznak ionos csoportot, azt tapasztaltuk, hogy citotoxicitás jelentős mértékben lecsökkent az anyavegyületéhez képest (11. ábra). Ez alól kivételt képez a szukcinil-csoportot tartalmazó SuRameb, melynek magasabb az IC_{50} értéke ($55,30\pm 2,52$ mM), mint a Rameb IC_{50} értéke ($30,00\pm 2,78$ mM), de a citotoxicitás dóziszfüggése jelentős hasonlóságot mutat a metilezett β -CD-ek görbéivel.



11. ábra. Az új generációs metil- β -ciklodextrin származékok citotoxicitása a vizsgált ciklodextrinek koncentrációjának függvényében Caco-2 sejtvonalon. A SuRamebnek ugyan magasabb az IC_{50} értéke, mint a Rameb-é, az ábrán látható görbe lefutása jelentős hasonlóságot mutat a metilezett β -CD-ek görbéivel. A SuRameb jelentősen citotoxikusabb, mint a MaRameb. A mért adatokat $\bar{x} \pm SD$ formában ábráztuk ($p < 0,05$) ($n=3$).

Azok a β -CD-ek, melyek nem metilezettek (HPBCD), vagy ionos szubsztituent tartalmaznak (QABCD, CMBCD), jelentős citotoxicitást nem mutattak. Az IC_{50} értékük az általunk vizsgált legmagasabb, 200 mM koncentráció felett van.

A koleszterinoldó képesség és a citotoxicitás között kapcsolatot keresve megvizsgáltuk a Rameb illetve, a Dimeb koleszterinnel töltött komplexeinek citotoxicitását is (12. ábra). Szignifikáns különbséget tapasztaltunk a koleszterinnel töltött és a koleszterin-mentes β -CD között. ($p < 0,01$). A koleszterinnel töltött Dimeb, illetve Rameb alig mutat sejtkárosító hatást, még igen nagy koncentrációban is.



12. ábra. A Dimeb-50, Rameb, illetve koleszterinnel alkotott komplexeik citotoxicitása A koleszterinnel töltött ciklodextrinek sejtek életképességére gyakorolt hatása szignifikánsan kisebb, mint a töltetlen ciklodextrneké. A mért adatokat átlag \pm SD formában ábrázoltuk ($p < 0,01$) ($n=3$).

5.4. A hemolitikus aktivitás vizsgálata

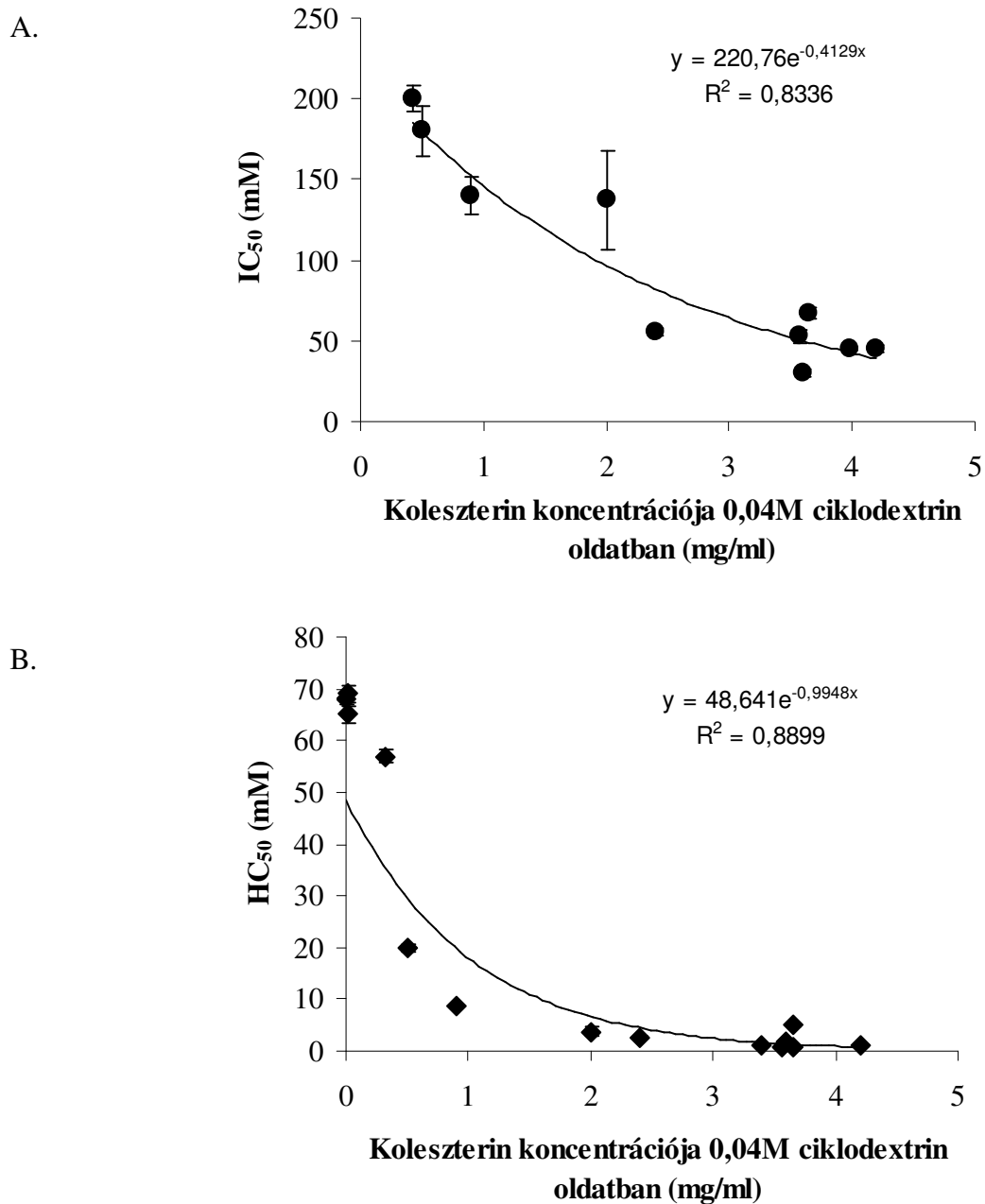
Az módosítás nélküli β -CD HC_{50} értéke 5,8 mM. Különböző szubsztituensek bevitelével ez az érték jelentősen megváltozott. Metil-csoport bevitele csökkentette, az ionos csoport bevitele növelte a HC_{50} értéket. (4. táblázat). A Dimeb izomer tisztasága a hemolitikus aktivitást sem befolyásolta: Dimeb-50 HC_{50} : $0,90 \pm 0,04$ mM; Dimeb-80 HC_{50} : $0,90 \pm 0,07$ mM; Dimeb-95 HC_{50} : $0,90 \pm 0,02$ mM. A Rameb molekulán végzett módosítások következtében a második generációs származékok HC_{50} értéke nőtt, de nem olyan jelentős mértékben, mint a Dimeb származékoké, amelyeknek lényegében megszűnt a hemolitikus aktivitása.

Ciklodextrin	IC₅₀ érték; MTT teszt (mM)	HC₅₀ érték; Hemolízis teszt (mM)
<u>Metilezett, nem ionos β-CD -ek</u>		
Trimeb	45,00 ± 1,53	5,0 ± 0,2
Dimeb-50	45,10 ± 2,43	0,90 ± 0,04
Dimeb-80	52,30 ± 4,16	0,90 ± 0,07
Dimeb-95	67,00 ± 3,46	0,90 ± 0,02
Rameb	30,00 ± 2,78	1,80 ± 0,09
Parme	137,40 ± 30,51	4,00 ± 0,98
<u>Metilezett, ionos β-CD -ek</u>		
SPDimeb-50	>150	68,0 ± 1,2
CMDimeb-50	>200	65,0 ± 1,7
CMHEDimeb	154,70 ± 9,07	63,0 ± 0,9
SuRameb	55,30 ± 2,52	2,70 ± 0,12
MaRameb	180,0 ± 5,0	9,00 ± 1,14
MaParme	180,20 ± 15,10	20,00 ± 0,77
<u>Nem metilezett β-CD -ek</u>		
HPBCD	>200	57,0 ± 1,4
QABCD	>200	67,0 ± 2,2
CMBCD	>200	69,0 ± 1,7

4. táblázat. A β-ciklodextrin származékok MTT-teszt (Caco-2), illetve hemolitikus aktivitás teszt (humán erythrocyta) segítségével meghatározott IC₅₀/HC₅₀ értékek átlagai±SD

5.5. A sejtmembrán károsító és koleszterinoldó képesség közötti összefüggés vizsgálata

Az adatok statisztikai elemzése során igen jelentős korrelációt találtunk egyrészt a citotoxicitás – koleszterinoldó képesség, másrészt a hemolitikus aktivitás – koleszterinoldó képesség között (13.A; 13.B ábra).



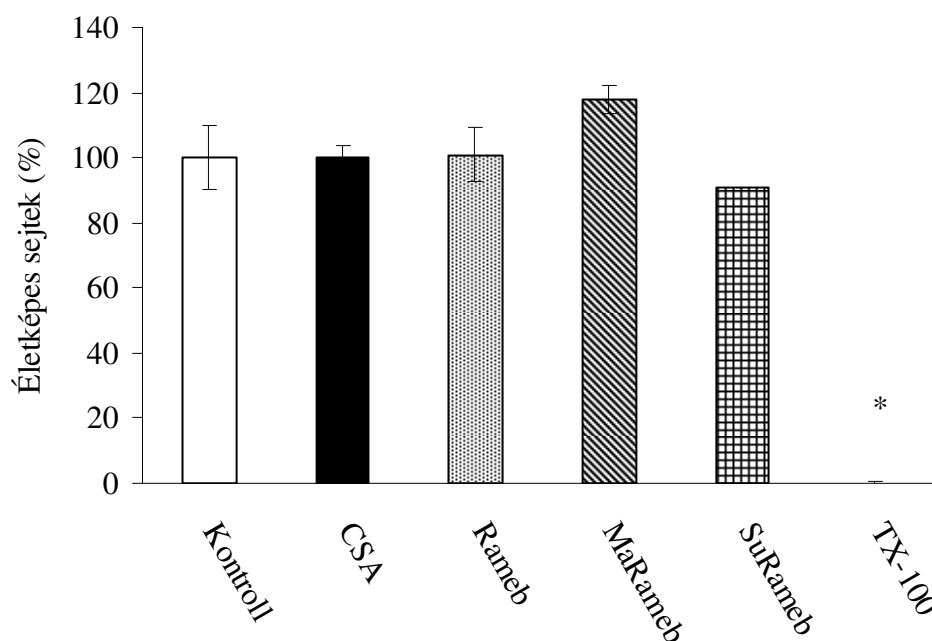
13. ábra A β -ciklodextrinek citotoxicitása (A), illetve hemolitikus aktivitása (B) és a koleszterinoldó képessége közötti összefüggés A mért adatokat átlag \pm SD formában ábrázoltuk (n=3).

Az MTT teszt segítségével meghatározott IC_{50} értékek és a koleszterinoldó képesség közötti összefüggés korrelációs együtthatója $R^2=0,8$ ($p<0,001$). A hemolitikus aktivitás vizsgálata során meghatározott HC_{50} értékek és a koleszterinoldó képesség között szintén szignifikáns korrelációt tapasztaltunk (korrelációs faktor $R^2=0,9$ $p=0,003$).

5.6. [3H]-taxol transzportjának vizsgálata

A toxicitási tulajdonságok és koleszterinoldási képességek illetve a fenti összefüggések ismeretében kiválasztottunk egy első generációs β -CD-t, a Rameb-et, amely ismertén jelentős citotoxicitással, koleszterinoldó képességgel bír és jól komplexálja a taxolt, illetve két második generációs származékát, a SuRameb-et és a MaRameb-et. 20 mM-os, szubtoxikus, koncentrációjú oldatokat alkalmaztunk. Ebben a koncentrációban az általunk vizsgált egyik ciklodextrin sem befolyásolta a sejtek életképességét (MTT teszt) (16. ábra).

A taxol béllumenből történő felszívódásának modellezésére megvizsgáltuk a Caco-2 transzport modellen történő átjutását. A P_{app} értéke A-B irányban a vártnak megfelelően igen alacsony $1,9 \pm 0,5 \times 10^{-6}$ cm/s, B-A irányban $22,5 \pm 4,6 \times 10^{-6}$ cm/s, melyért az aktív efflux pumpa működése tehető felelőssé.



16. ábra. 20 mM Rameb, MaRameb, SuRameb 10 μ M CSA és 1 v/v% TX-100 Caco-2 sejtekre gyakorolt citotoxicitása Hanks' pufferben A mért adatokat átlag \pm SD formában ábrázoltuk (n=6) ($p<0,05$).

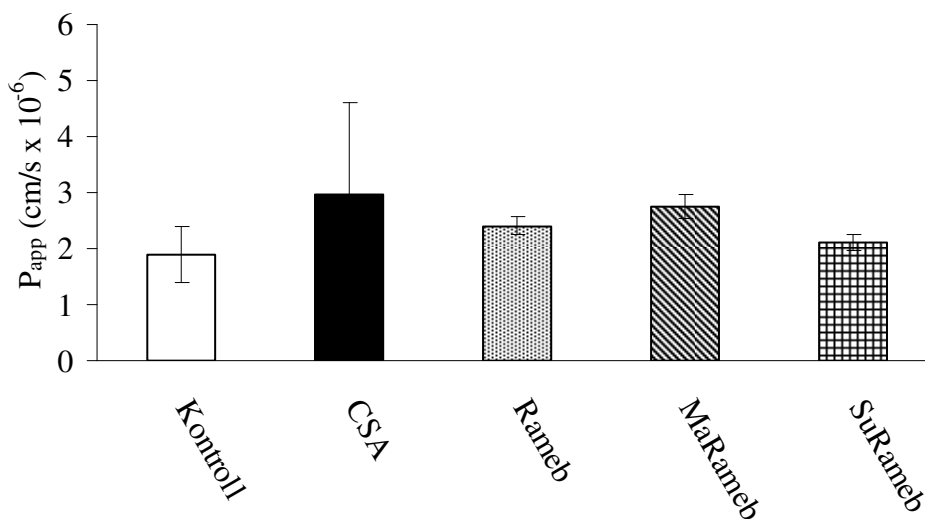
A három β -CD származék taxol transzportra gyakorolt hatását két különböző protokoll szerint végeztük. Mindkét protokoll esetén pozitív kontrollként $10\ \mu\text{M}$ CSA-t, mint ismert Pgp inhibitor alkalmaztunk. A CSA a kontrollhoz viszonyítva A-B elrendezésben $1,9 \pm 0,5 \times 10^{-6}\ \text{cm/s}$ -ról $2,9 \pm 1,7 \times 10^{-6}\ \text{cm/s}$ -ra növelte a taxol átjutásának sebességét. B-A elrendezésben szignifikánsan lecsökkentette a taxol átjutásának sebességét a Pgp gátlás révén, $22,5 \pm 4,6 \times 10^{-6}\ \text{cm/s}$ -ról $6,78 \pm 1,5 \times 10^{-6}\ \text{cm/s}$ -ra ($p < 0,0001$).

5.6.1. A β -CD-előkezelés hatása a transzepitheliális taxol permeabilitásra, Protokoll 1.

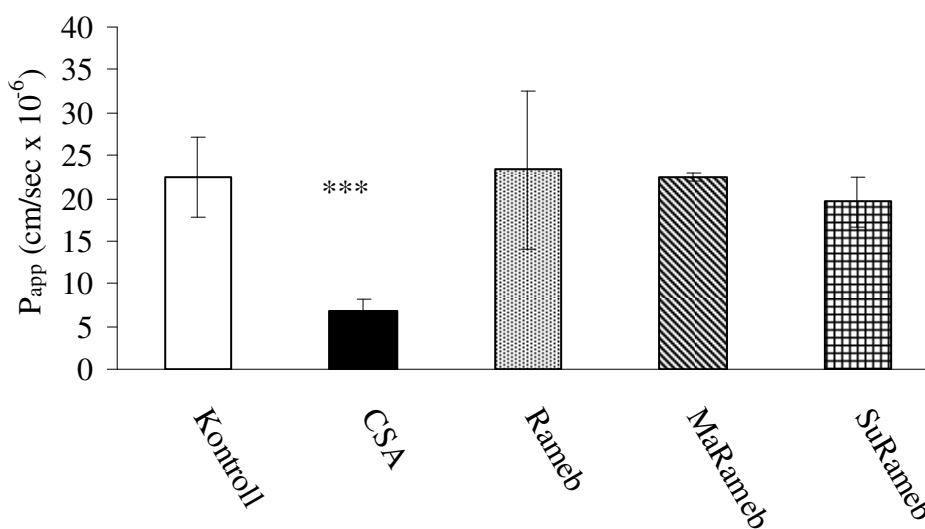
A β -CD származékok taxol permeabilitására gyakorolt hatását két protokoll szerint vizsgáltuk. Az első kísérleti elrendezésben 30 perces CD előkezelést alkalmaztunk, majd mindkét irányban (A-B; B-A) megvizsgáltuk a taxol átjutását, melyet P_{app} értékkel jellemeztünk. A kezeletlen kontrollhoz viszonyítva A-B irányban egyik Rameb származék sem változtatta szignifikánsan a P_{app} értékeket ($p > 0,05$). A CSA Pgp-gátlás révén az A-B transzportot $1,9 \pm 0,5 \times 10^{-6}\ \text{cm/s}$ -ról $2,9 \pm 1,7 \times 10^{-6}\ \text{cm/s}$ -ra növelte (17. ábra). Ezen adat összhangban van az $50\ \mu\text{M}$ verapamil, mint Pgp inhibitor által a taxol A-B irányú transzportjának fokozásával [Walle és Walle 1997.].

Taxol B-A transzport vizsgálata esetén a β -CD származékokkal történő előkezelés hatására nem tapasztaltunk változást a kezeletlen sejtek esetén mért taxol B-A transzport hoz viszonyítva. A taxol A-B irányhoz viszonyított emelkedett B-A irányú transzportja hátterében a Pgp aktív efflux fehérje áll (17. ábra).

CD előkezelés hatása a taxol A-B permeabilitására



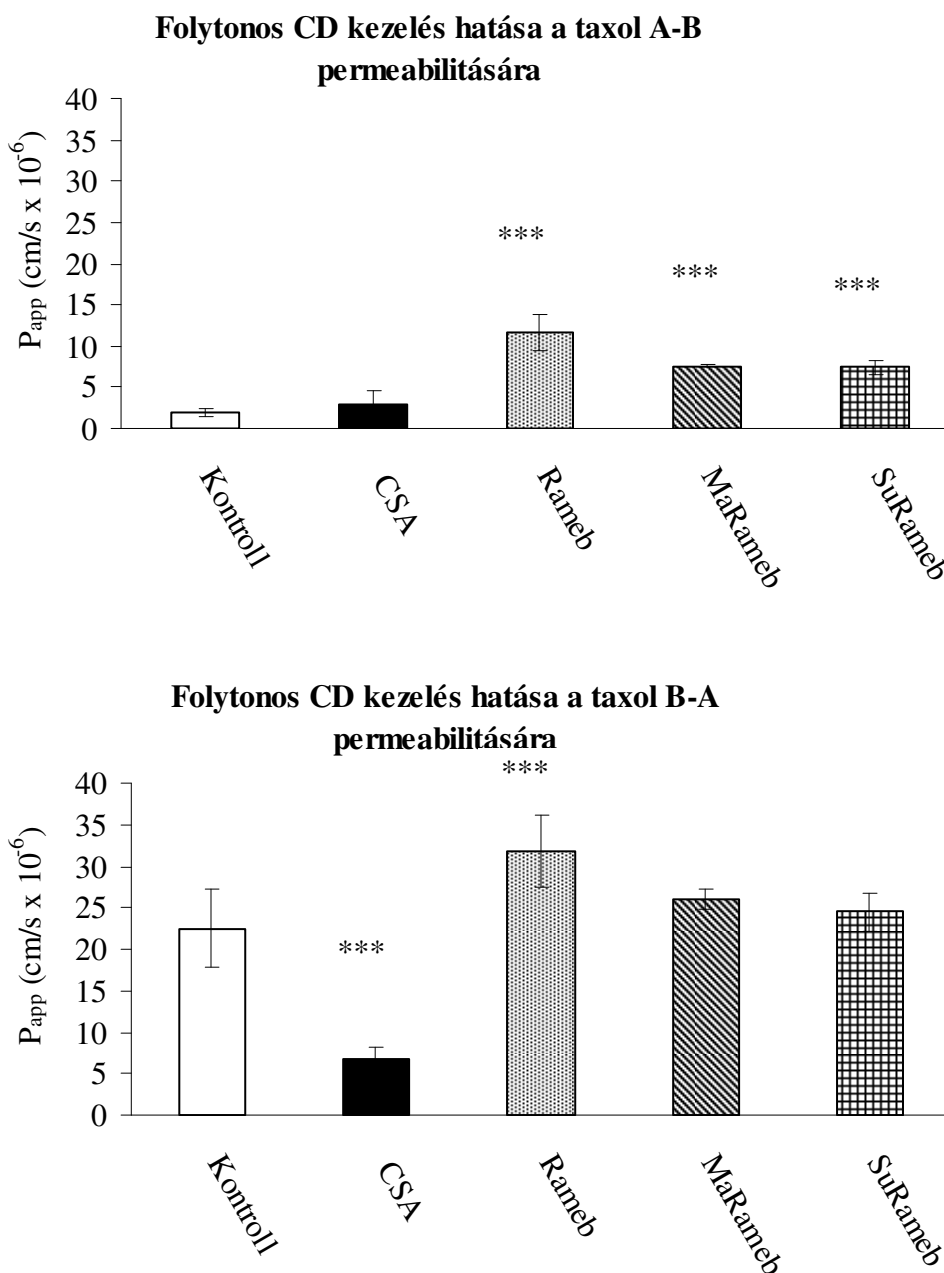
CD előkezelés hatása a taxol B-A permeabilitására



17. ábra. 10 μ M CSA, 20 mM Rameb, 20 mM MaRameb és 20 mM SuRameb 30 perces előkezelés hatása a taxol permeabilitására A-B: apikális kamra felől a bazolaterális kamra felé; B-A bazolaterális kamrából az apikális kamra felé. A mért adatokat $\text{átlag} \pm \text{SD}$ formában ábráztuk (n=6) ($p < 0,001$).

5.6.2. A folyamatos β -CD-kezelés hatása a transzepitheliális taxol permeabilitásra, Protokoll 2

Amikor az apikális kamrában lévő transzportolat a transzportkísérlet során végig tartalmazott β -CD-t, az A-B permeabilitás szignifikáns mértékben megnövekedett a kontrollhoz viszonyítva ($p < 0,01$) (18. ábra A-B).

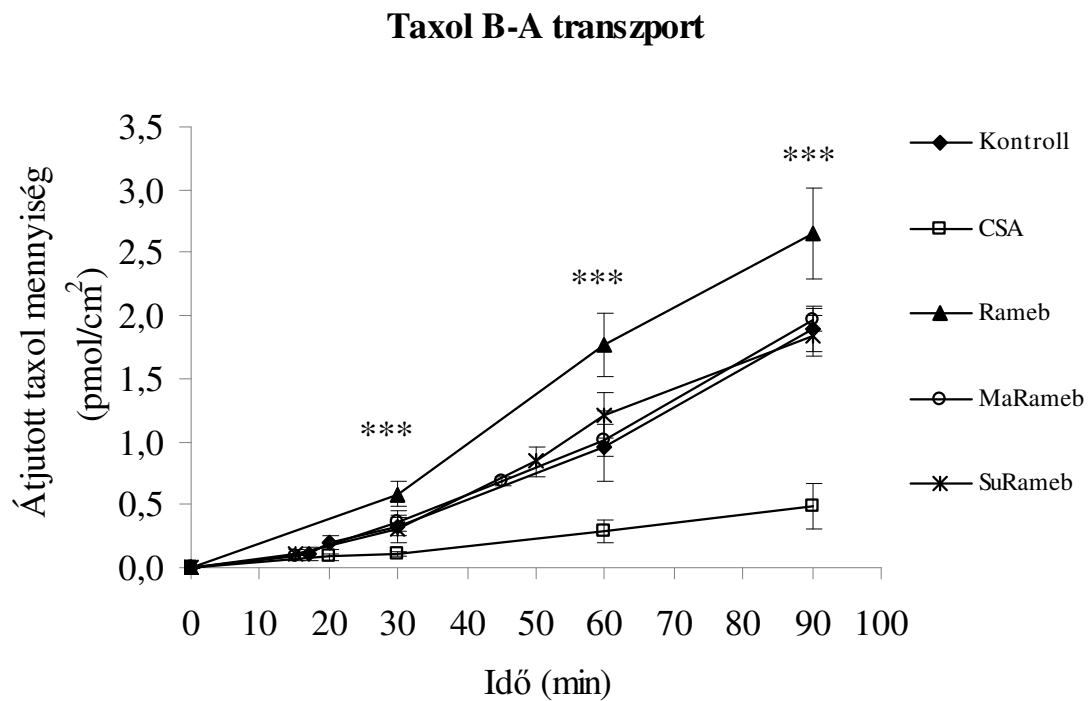
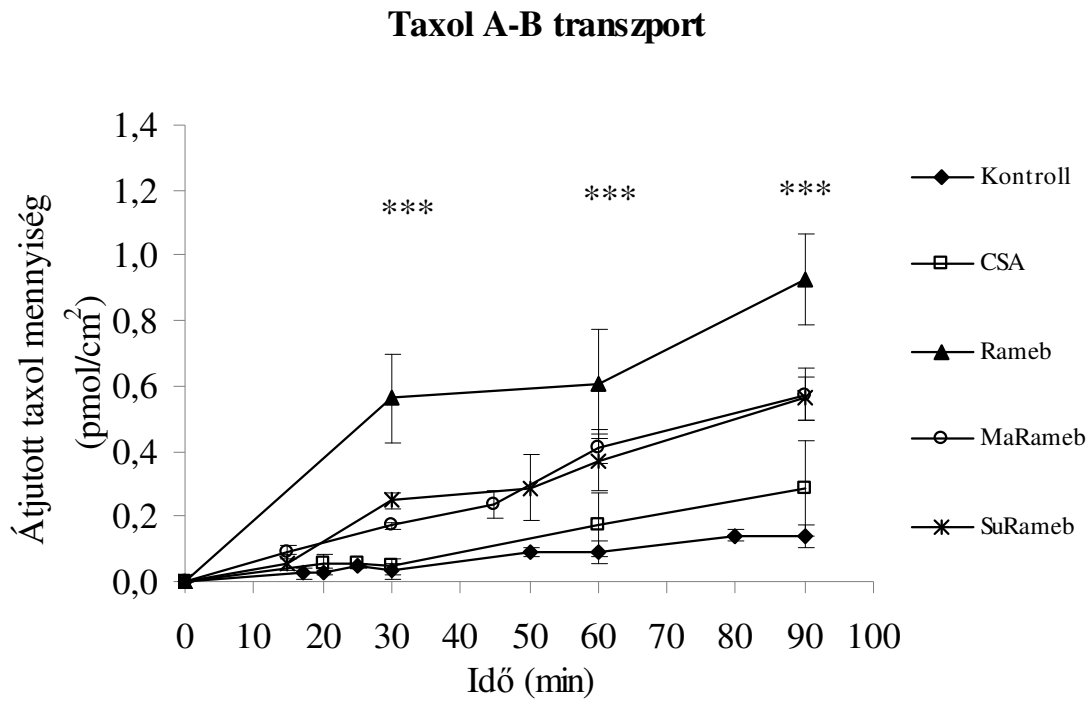


18. ábra. A folyamatos 10 μ M CSA, 20 mM Rameb, 20 mM MaRameb és 20 mM SuRameb kezelés hatása a taxol permeabilitására A-B: apikális kamra felől a bazolaterális kamra felé; B-A bazolaterális kamrából az apikális kamra felé. A mért adatokat átlag \pm SD formában ábrázoltuk (n=6) ($p < 0,001$).

A mért látszólagos permeabilitási koeficiensek értékei Rameb: $11,6 \pm 2,6 \times 10^{-6}$ cm/s; MaRameb: $7,6 \pm 0,1 \times 10^{-6}$ cm/s; SuRameb: $7,5 \pm 0,9 \times 10^{-6}$ cm/s; Kontroll: $1,9 \pm 0,5 \times 10^{-6}$ cm/s. A taxol A-B irányú permeabilitási vizsgálatai során jelentősen effektívebbeknek bizonyultak a β -CD-ek a jól ismert Pgp inhibitor CSA-nal, mely nem növelte meg szignifikánsan a taxol átjutási sebességét.

Hogy felderítsük a β -CD-ek taxol A-B transzportra gyakorolt hatásának mechanizmusát, megmértük a taxol B-A irányú permeabilitását is, mely során a bazális kamra tartalmazta a taxolt, ellenben az apikális kamrában helyeztük el a β -CD származékokat, illetve a CSA-t is. A kontroll esetén mért magas P_{app} érték ($22,5 \pm 4,6 \times 10^{-6}$ cm/s) a CSA kezelés hatására jelentősen lecsökkent ($6,8 \pm 1,5 \times 10^{-6}$ cm/s), ezzel igazolva, hogy a taxol transzportjában jelentős szerepet játszik a Pgp. Bár a CD-ek A-B irányú permeabilitás esetén nagy hatékonysággal növelték a taxol átjutásának sebességét, a B-A irányú mérések esetén nem tapasztaltuk a kontrollhoz viszonyítva a taxol átjutásának sebességcsökkenését. Az apikális kamra folytonos Rameb, MaRameb, SuRameb kezelése során mért látszólagos permeabilitási értékek: $31,9 \pm 3,3 \times 10^{-6}$ cm/s; $26,1 \pm 1,2 \times 10^{-6}$ cm/s; és $24,5 \pm 2,3 \times 10^{-6}$ cm/s voltak (18. ábra B-A).

A β -CD-ek az átjutott taxol mennyiségét is képesek befolyásolni. A folytonos Rameb, MaRameb, SuRameb kezelés szignifikánsan megnövelte a taxol transzportot A-B irányban. B-A irányban csak a CSA volt képes lecsökkenteni az apikális kamrába átjutott taxol mennyiségét, míg a Rameb kissé megnövelte. A vizsgált három β -CD közül a Rameb hatása bizonyult a legkifejezettebbnek mind A-B mind B-A irányban (19. ábra).

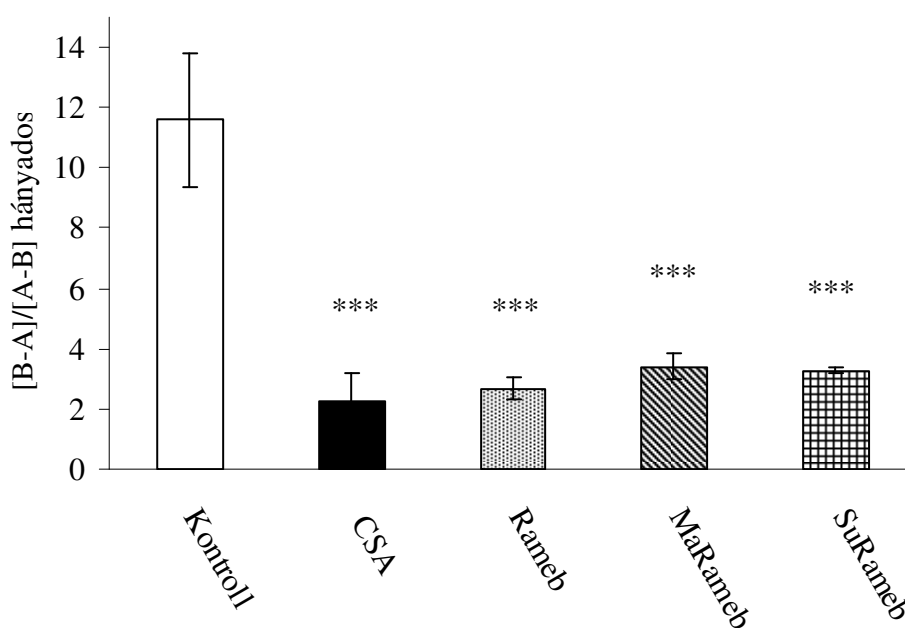


19. ábra. A folyamatos 10 μM CSA, 20 mM Rameb, 20 mM MaRameb és 20 mM SuRameb kezelés hatása Caco-2 monolayeren átjutott a taxol mennyiségére A-B: apikális kamra felől a bazolaterális kamra felé; B-A bazolaterális kamrából az apikális kamra felé. A mért adatokat $\text{átlag} \pm \text{SD}$ formában ábrázoltuk ($n=6$) ($p < 0,001$).

5.6.3. A B-A/A-B hányados

A P_{app} értékek B-A/A-B hányadosából következtethetünk azokra a folyamatokra, amelyek a taxol Caco-2 sejtrétegen történő áthaladásában szerepet játszanak [Szakács és mtsai. 2008.; Giacomini és mtsai. 2010.].

A taxol kezeletlen monolayeren keresztül történő transzportja a B-A irányba tolódik el a Pgp működése miatt, mely transzporter az apikális irányba transzportálja a taxolt. Ennek következtében a két érték hányadosa igen magas (11,84). Ezzel szemben a CSA hatására a taxol hányadosa alacsony marad Pgp gátlás folytán (2,29). Az alkalmazott β -CD-ek következtében a látszólagos permeabilitásioefficiensek hányadosa hasonló a taxol CSA mellett mért hányadosához, annak ellenére, hogy az efflux sebességét az alkalmazott β -CD-ek 20 mM koncentrációban vizsgálataink során nem csökkentették. SuRameb: 3,28; MaRameb: 3,48; Rameb: 2,75 (20. ábra).



20. ábra. A taxol kezeletlen, illetve folyamatosan kezelt (10 μ M CSA, 20 mM Rameb, 20 mM MaRameb és 20 mM SuRameb) Caco-2 monolayeren mért látszólagos permeabilitási értékeinek hányadosa A-B: apikális kamra felől a bazolaterális kamra felé; B-A bazolaterális kamrából az apikális kamra felé A mért adatokat $\bar{x} \pm SD$ formában ábrázoltuk (n=6) ($p < 0,001$).

5.6.4. A folyamatos β -CD kezelés paracelluláris permeabilitásra és transzepitheliális ellenállásra gyakorolt hatásának vizsgálata

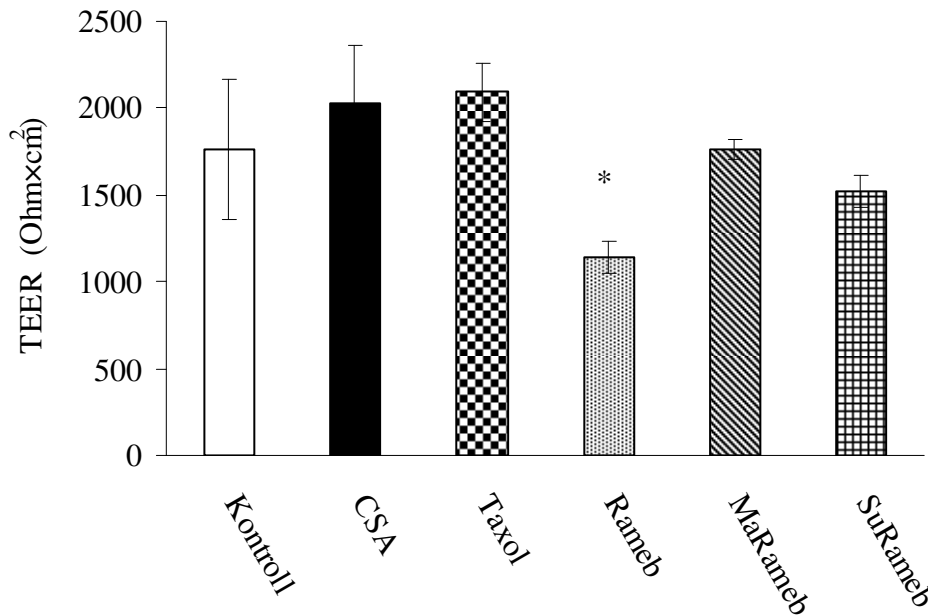
Bár az általunk vizsgált β -CD-ek 20 mM-os koncentrációban nem citotoxikusak (10.;11. ábra), a szoros junkciók működésében zavart okozhatnak, és megszakíthatják a monolayer integritását. A β -CD-ek szoros junkciókra gyakorolt hatásának vizsgálata során a taxol transzport vizsgálata mellett párhuzamosan tanulmányoztuk a paracelluláris transzport folyamatokat. Minden transzportkísérlet során paracelluláris transzport markereket alkalmaztunk, kis molekulásúlyú ^{14}C -mannitolt (MW:182), illetve nagy molekulásúlyú ^{14}C -PEG-4000-et (MW: 4000). Ezen vegyületek méretüknél fogva csak abban az esetben tudnak ájutni a sejtek között, ha a sejtek közötti szoros kapcsolat fellazul vagy megszűnik.

Az 5. táblázatban összefoglalva látható a kontroll monolayeren, illetve a kezelések alatt mért paracelluláris transzport markerek látszólagos permeabilitási koefficiense. A kontroll sejtrétegen mért A-B transzport értékek (^{14}C PEG-4000: $2,90 \pm 0,86 \times 10^{-7}$ cm/s és ^{14}C mannitol: $3,44 \pm 1,19 \times 10^{-7}$ cm/s) megfelelnek az intakt monolayer értékeinek [Artusson és mtsai. 1991.; Rubas és mtsai. 1993.; Makowska és mtsai. 2001.]. A-B irányban a CSA, illetve CD kezelés hatására sem változott a markerek átjutási sebessége szignifikánsan ($p > 0,052$). a B-A elrendezés esetén is a kontrollal megegyező nagyságrendű ^{14}C -PEG-4000, illetve ^{14}C -mannitol átjutási sebességet mértünk.

	P_{app} (cm/s $\times 10^{-7}$) A-B		P_{app} (cm/s $\times 10^{-7}$) B-A	
	PEG-4000	Mannitol	PEG-4000	Mannitol
Kontroll	$2,90 \pm 0,86$	$3,44 \pm 1,19$	$4,24 \pm 2,14$	$4,44 \pm 0,63$
CSA	$4,27 \pm 1,38$	$3,31 \pm 0,04$	$4,98 \pm 1,70$	$1,78 \pm 0,26$
Rameb	nincs adat	$4,25 \pm 2,15$	nincs adat	$1,86 \pm 0,16$
MaRameb	$4,21 \pm 1,97$	$5,66 \pm 0,75$	$2,25 \pm 0,05$	nincs adat
SuRameb	$2,71 \pm 1,00$	$5,02 \pm 0,88$	$2,54 \pm 0,18$	nincs adat

5. táblázat. PEG-4000 és mannitol, mint paracelluláris markerek folyamatos 10 μM CSA, 20 mM Rameb, 20mM MaRameb és 20 mM SuRameb kezelés során mért látszólagos permeabilitási koefficiensei \pm SD

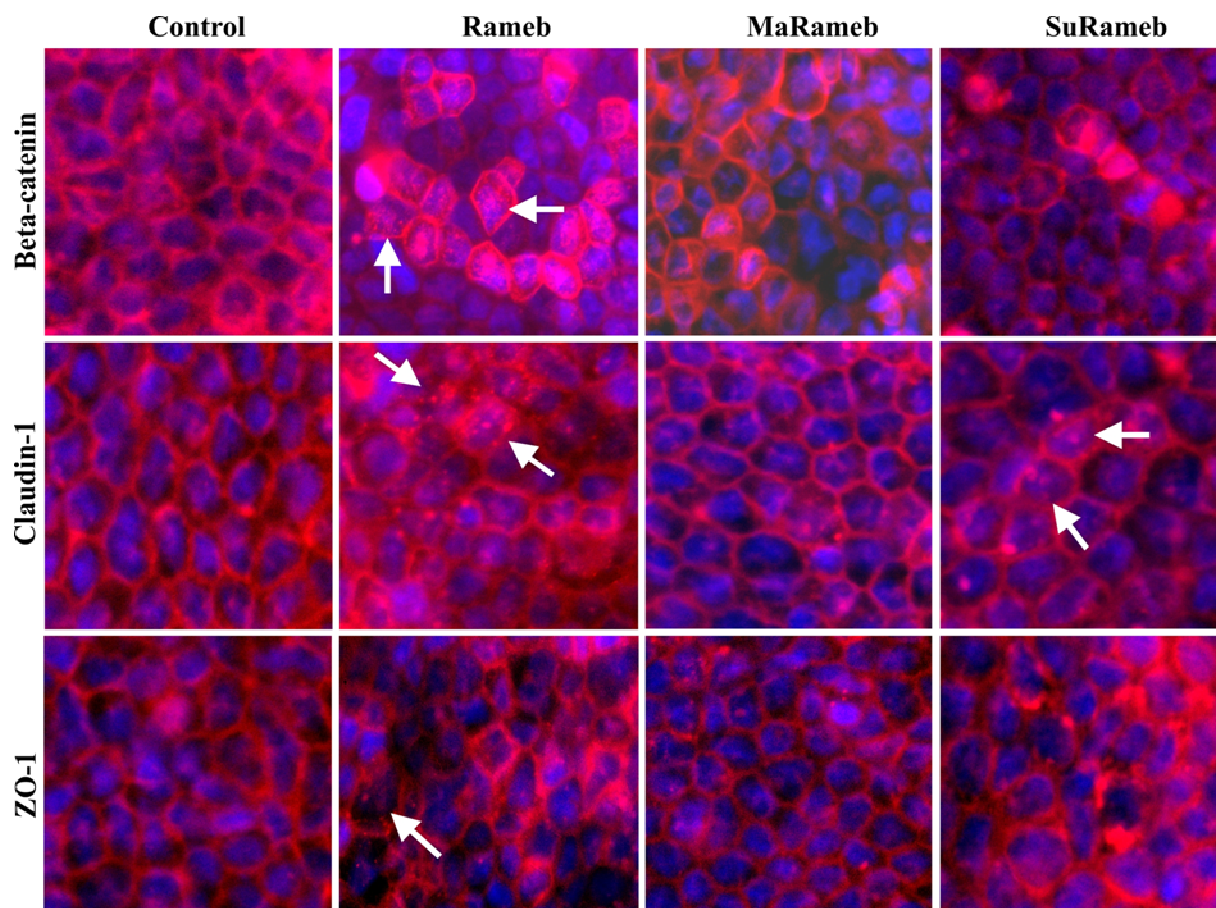
A TEER értékek a MaRameb és SuRameb kezelések után nem mutattak szignifikáns különbséget a kontrollhoz viszonyítva ($p>0,05$), azonban a Rameb hatására szignifikáns TEER értékcsökkenést figyeltünk meg, de $1000 \text{ Ohm}\times\text{cm}^2$ alá nem esett le egyik vizsgálat során sem (21. ábra).



21. ábra. A Caco-2 monolayer transzepitheliális elektromos ellenállás (TEER) 90 perces permeabilitási vizsgálat végén mért értékei A mért adatokat átlag±SD formában ábrázoltuk (n=6) ($p<0,05$).

5.7. Az immunhisztokémia

Az immunhisztokémiai vizsgálat során a szoros junkciónális ZO-1, claudin-1, és β -catenin fehérjéket jelöltünk meg. A szoros junkcionális proteinek immunfluoreszcens festésével élesen kirajzolódott a Caco-2 sejtek körvonala és az intakt monolayer. A kontroll monolayeren a szoros junkcionális proteinek a plazmamembránban lokalizálódtak. 2 órás 20 mM CD kezelés hatására láthatóan nem szakadt meg a monolayer integritása, és a kontrollal igen nagy hasonlóságot mutatott a MaRameb-bel kezelt monolayer. Megfigyeléseinket alátámasztják a PEG-4000, illetve a mannitol esetében mért permeabilitási értékek is. Ennek ellenére a Rameb és SuRameb kezelésen átesett monolayerek festésén nyíllal jelölt citoplazmás pettyezettség a szoros junkcionális fehérjék disztribúciójában történt változásra utalhat (22. ábra). Ez az immunfestődési eltérés a szoros junkcionális fehérjék membránból történő redisztribúcióját jelezheti, amely utalhat a meggyengült barrier funcióra. A Rameb esetében megfigyelt TEER érték csökkenése és a szoros junkcionális fehérjék relokalizációja jelezhet csökkent barrier integritást és emelkedett paracelluláris permeabilitást.



22. ábra. A jukcionális ZO-1, claudin-1, β -catenin fehérjék immunfluoreszcens festése Az ábra a kontroll mellett a 2 órás 20 mM Rameb, Marameb, SuRameb kezelés hatását szemlélteti. A jukcionális fehérjék vörössel festődtek. A sejtmag biz-benzimid hatására kékre festődött. A citoplazma pettyezettségére mutató nyilak internalizálódott jukcionális fehérjéket jelölnek.

6. Megbeszélés

6.1. A β -CD-ek szerkezete, citotoxicitása, hemolitikus aktivitása és koleszterinoldó képessége közötti összefüggések

Vizsgálataink kezdetén Hela sejtvonalon MTT-teszt segítségével megvizsgáltuk néhány β -ciklodextrin sejtekre gyakorolt hatását. A ciklodextrinek szubsztituáltságuktól függően különböző mértékben hatottak a sejtek életképességére. A különbségek a teszt segítségével könnyen megállapíthatók. A metilezett nem ionos β -CD-ek szignifikánsan több sejt mitokondriális enzimjét voltak képesek gátolni, mint az ionos származékok.

Mivel további terveink között szerepelt a β -CD-ek transzepitheliális transzportra gyakorolt hatásának vizsgálata, kiválasztottuk egy, a felszívódás *in vitro* modellezésére alkalmas sejtvonalat, a Caco-2-t. A további kísérleteinket ezen a sejtvonalon végeztük, és kiegészítettük a hemolitikus aktivitás mérésével.

A toxicitási vizsgálatok során számos β -CD Caco-2 és Hela sejtek életképességére, valamint sejtmembránra gyakorolt hatását vizsgáltuk meg MTT-teszt, illetve hemolitikus aktivitás teszt segítségével. Az irodalomból ismert, hogy a β -CD-ek interakcióba lépnek a sejtmembránban lévő koleszterinnel [Kilsdonk és mtsai. 1995.; Zidovetzki és Levitan 2007.], de a vegyületek szerkezetét és koleszterinoldó képességét a citotoxicitás összefüggésében eddig még nem megvizsgálták. Az MTT-teszt segítségével akut citotoxicitást vizsgáltunk, ennek megfelelően 30 perces rövid protokollt alkalmaztunk, így nem kellett számolnunk az esetleges proliferációra gyakorolt hatással. Eredményeink a sejtmembrán-CD interakciót tükrözik, így a koncentrációfüggő citotoxicitás összevethető a koleszterinoldó képességgel. Ezek a tulajdonságok a metil csoportok számától, illetve az egyéb ionos és nem ionos csoportoktól függenek. Ezeket a jellemzőket típusonként a 4. táblázat foglalja össze.

Eredményeink igazolják feltételezésünket, mivel jelentős összefüggéseket találtunk a szerkezet, illetve a citotoxicitás között. A metil csoportok számának növelése jelentős sejtmembránkárosító hatást eredményez. A Crysmeb, amely 3-4 metil csoportot tartalmaz, még 200 mM koncentrációban sem éri el az 50%-os enzimaktivitás gátlást. A metil csoportokat tartalmazó Rameb, Trimeb, illetve a különböző izomer tisztaságú Dimeb-ek a citotoxicitási görbéjük lefutása alapján jelentős toxicitást mutattak a Caco-2 sejteken. Ez az eredmény összhangban áll a hemolitikus aktivitás mérése során meghatározott HC_{50} értékekkel. Az izomer tisztaság citotoxicitásra gyakorolt hatását vizsgálva megállapíthatjuk, hogy bár némi különbség adódott az IC_{50} értékekben, a görbék lefutása nem tér el szignifikánsan. Ezek alapján

elmondható, hogy a sejtmembrán - metilezett β -CD interakció jelentős mértékben függ a metil csoportok számától, és kis mértékben a metil csoport helyétől.

Az ionos csoportok bevitele jelentősen csökkentette a sejtmembrán-károsító hatást a semleges töltésű, metilezett β -CD-ekhez viszonyítva. Az általunk vizsgált koncentráció tartományban mind a negatív (karboximetil) mind a pozitív (trimetilamino) töltésű csoportok jelenléte gátolta a jelentősebb citotoxicitás kialakulását.

Bár a β -CD-ek sejtmembrán károsító hatásának mechanizmusát nem vizsgáltuk, irodalmi adatok alapján sejtmembránra gyakorolt hatása más mechanizmussal történik, mint a felületaktív anyagoké. A β -CD létrehoz egy apoláros fázist a sejtmembránt körülvevő poláros, vizes fázisban a 7-glükopiranoz egység által formált üreg formájában. Tulajdonképpen ez az apoláros üreg képes a sejtmembrán apoláros alkotóit reverzibilisen extrahálni [Kilsdonk és mtsai. 1995.]. A lipid kompartmentek, főleg a koleszterin kivonása a sejtmembránból a membrán széteséséhez vezethet [Arima és mtsai. 2004.; Ohtani és mtsai. 1989.; Fenyvesi és mtsai. 2008.].

Ezt a hipotézist alátámasztja az a megfigyelésünk, melyben a legtoxikusabbnak mutatózó Rameb, illetve Dimeb koleszterinnel alkotott komplexeinek citotoxicitását vizsgáltuk. Kísérleteink során ezek a koleszterint tartalmazó komplexek nem mutattak citotoxicitást. Ez azzal magyarázható, hogy a β -CD-ek ürege megtelt koleszterinnel, így a sejtmembránból nem tudott lipid alkotót kivonni. További megfigyeléseink is alátámasztják ezt a hipotézist: jelentős korrelációt találtunk a β -CD-ek koleszterinoldó képessége, illetve citotoxicitása, hemolitikus aktivitása között. Irie és mtsai korábbi kísérleteik során kisebb számú β -CD-t tanulmányozva szoros kapcsolatot detektáltak hemolitikus aktivitás, illetve a koleszterinoldó képesség között. [Irie és Uekama 1997.].

Mindezen összefüggésekből megállapíthatjuk, hogy a β -CD koleszterinoldó képessége előrevetíti a sejtmembránnal történő interakció mértékét, amely nagymértékben függ a β -CD szerkezetétől, a metil csoportok számától, pozíciójától, illetve az ionos és nem ionos csoportok jelenlététől.

6.2. A Caco-2 transzport modell és permeabilitási vizsgálatok

6.2.1. A Caco-2 transzport modell modell

Vizsgálataink másik irányvonalát a β -CD-ek membrán permeabilitásra gyakorolt hatásának tanulmányozása képezte. A felszívódás modellezésére az irodalomban már ismert Caco-2 sejtek által kialakított transzport modellt alkalmaztuk [Artursson 1991.]. A modell működésének alapfeltétele a monolayer kialakulása, mely az inzertre való kiültetés 15. napjára megtörtént. Ezt igazoltuk transzepitheliális elektromos ellenállás méréssel, illetve paracelluláris markerek permeabilitásának vizsgálatával. A modell jellemzése során olyan anyagok átjutását vizsgáltuk a monolayeren, melyek humán abszorpciós értékei ismertek, illetve amelyeknek a látszólagos permeabilitási értékei megtalálhatóak a szakirodalomban. A jellemzés sikerességét mutatják az irodalomban szereplő intervallumon belül lévő mért értékeink. [Artursson és mtsai. 1996.].

A Caco-2 transzport modellen egy gyógyszeranyag mind aktív, mind passzív transzport mechanizmusa vizsgálható. Ebből adódóan a modell alkalmas lehet a nem megfelelő felszívódás okának felderítésére. Számos gyógyszeranyag (pl. digoxin) nem kielégítő felszívódásának és inadekvát disztribúciójának hátterében az intesztinális epitheliális sejtek membránjában [Sparreboom és mtsai. 1997.], illetve agyi kapillárisokban [Hosoya és mtsai. 2002.] expresszáldó aktív efflux transzporterek (pl. Pgp) működése áll. Az efflux fehérjék a sejt membránjából visszapumpálják a vékonybél, illetve a kapilláris lumenébe a hatóanyagot, amelynek következménye a rossz biohasznosíthatóság, és a hatás elmaradása. Számos tanulmány foglalkozik e fehérjék működésének modulálásával [Malingré és mtsai. 2001.; Varma és Panchagnula 2005.; Collnot és mtsai. 2006.]. Transzport modellünk kifejezett barrier funkcióját a magas TEER értékek, a paracelluláris markerek alacsony permeabilitási értékei, illetve a taxol látszólagos permeabilitási koefficiensének igen nagy B-A/A-B hányadosa jelzi, tehát az általunk kialakított modell alkalmas a Rameb és származékainak taxol permeabilitására gyakorolt hatásának tanulmányozása, amelyet még eddig nem vizsgáltak.

Sok tanulmány foglalkozott a Pgp szubsztrát, tumor ellenes taxol orális formulációjának kérdésével, ellenben megoldás még nem született rá. Az taxol orális biohasznosíthatósága két fő faktortól függ: az oldékonyságtól és az ABC transzporterek efflux tevékenységétől. A β -CD-ek lipofil anyagok oldékonyságát növelő hatása [Ventura és mtsai. 2006.; Szejtli 1994.] mellett az irodalomban található a β -CD-ek Pgp működésére gyakorolt hatásáról adatokat [Arima és mtsai. 2001.; 2004.; Fenyvesi és mtsai. 2008.].

6.2.2. A Rameb és származékainak hatása a taxol permeabilitására

A metilezett β -CD-ek segédanyagként történő alkalmazása a toxicitásuk miatt limitált. A toxicitási tulajdonságok és koleszterinoldási képességek ismeretében kiválasztottunk három β -CD-t, a Rameb-et és két, második generációs származékát a MaRameb-et, mely kationos csoportot tartalmaz, és a SuRameb-et, mely anionos csoportot tartalmaz. Az ionos csoport molekulába történő bevitele lecsökkentette a koleszterinoldó képességet és a citotoxicitást, ahogyan azt az előző vizsgálataink mutatják.

Ezen β -CD származékok a taxol transzportjára gyakorolt hatását 20 mM-os koncentrációban vizsgáltuk. Két eltérő protokollt alkalmaztunk, egyikben CD előkezelést, a másik esetben folyamatos CD kezelést és jelentős különbséget tapasztaltunk közöttük.

Az CD-előkezelés koncepciója mögött egy korábbi, Dimeb-bel végzett kísérlet megfigyelései álltak, mely szerint a β -CD-ek kivonják a sejtmembránból a koleszterint, melynek következtében megváltozik a membrán szerkezete, permeabilitása, illetve a Pgp aktivitása [Fenyvesi és mtsai. 2008.]. Ezt a hipotézist a Rameb, illetve a SuRameb és a MaRameb esetében nem tudtuk alátámasztani, mert az előkezelés hatására nem tapasztaltunk szignifikáns taxol permeabilitás változást a kezeletlen kontrollhoz viszonyítva.

A második protokoll szerint, mikor a β -CD-ek állandóan jelen voltak a transzport modell felső kamrájában, a taxol A-B irányú transzportjának sebessége jelentősen megváltozott. A β -CD-származékok sokkal hatékonyabban megnövelték a taxol A-B irányú átjutását, mint a 10 μ M CSA, mely kompetitív antagonistaként gátolta Pgp szubsztrát-Pgp interakció kialakulását [Saeki és mtsai. 1993.]. A taxol A-B irányban mért P_{app} értéke a kontroll értékének Rameb esetén 5,9-szeresére, MaRameb esetén 4-szeresére, SuRameb esetén 3,9-szeresére növekedett. Eredményeink felvetették azt a kérdést, hogy a fokozott A-B irányú taxol transzport a Pgp gátlás révén jön-e létre.

Ezt a hipotézist a B-A irányú transzport tanulmányozásával vizsgáltuk. Ebben az esetben is a Pgp inhibitort, illetve a β -CD-eket az apikális kamrába helyeztük. A taxol, mint Pgp-szubsztrát igen nagy sebességgel transzportálódik az efflux mechanizmus következtében a bazális kamrából az apikális felé [Walle és Walle 1997.; Jeong és Choi 2007.]. A várttal ellentétben a Rameb és származékai nem csökkentették a taxol transzportjának sebességét B-A irányban, míg a CSA a Pgp inhibíció révén jelentősen csökkentette. Ezek az eredmények azt mutatják, hogy a β -CD folyamatos, taxol-CD komplex formában történő jelenléte szükséges a taxol megnövekedett A-B irányú permeabilitásához, de nem Pgp gátlás felelős érte.

A taxolra vonatkozó kinetikai méréseink alapján megállapítottuk, hogy a folyamatos β -CD kezelés során a kontrollhoz viszonyítva nem csak a taxol A-B irányú transzportjának sebessége nő, hanem a monolayeren átjutott anyagmennyiség is.

A B-A/A-B hányados információt nyújt a kísérlet során lezajló transzportmechanizmusokról. Abban az esetben, mikor aktív efflux mechanizmus is szerepet játszik a transzportban, a B-A irányú látszólagos permeabilitási érték jelentősen nagyobb, mint az A-B irányú érték, hányadosuk > 2 . Amennyiben a rendszerhez olyan anyagot teszünk, amely képes gátolni az efflux mechanizmust, a hányados értéke 2 körüli értékre csökken, tehát az A-B és a B-A irányú transzport sebessége közel egyenlő. Ennek háttérében az áll, hogy míg az első esetben az efflux mechanizmus dominál, a második esetben az efflux mechanizmus gátlása révén a passzív diffúzió határozza meg a hatóanyag eloszlását az apikális és a bazális kamra között [Szakács és mtsai. 2008.; Adachi és mtsai. 2001.]. Az A-B irányú passzív diffúzió ugyanolyan, vagy közel hasonló sebességű, mint a B-A irányú. Mivel a taxol lipid mediált szabad diffúzióval jut át a biológiai barrieréken, csak a membrán apikális oldalán elhelyezkedő ABCB1 és ABCG2 efflux transzporter befolyásolja a transzportját. Ez alapján elmondható, hogy az influx és az efflux folyamatok aránya határozza meg a taxol transzport irányát, illetve a B-A/A-B hányadost.

A kontroll esetében a taxol B-A/A-B hányadosa 12 volt, amely igen jelentős aktív efflux mechanizmusra utal, az össz efflux mértéke tizenkétszer nagyobb, mint az influx mértéke. A CSA mellett tapasztalt taxol B-A/A-B hányados a kontroll esetében mért hányadoshoz viszonyítva jelentősen lecsökkent, értéke 2 volt. Ennek háttérében a CSA Pgp gátlása áll, melynek következtében a B-A irányú taxol transzportjának mértéke lecsökkent. A CSA alkalmazása során a taxol transzportjának mértékét és irányát a passzív diffúzió határozta meg. CD-ek alkalmazásakor a taxol A-B irányban mért transzportja jelentősen megnövekedett, a B-A irányú taxol transzport mértéke nem változott a kontrollhoz képest. Ezáltal a folyamatos β -CD kezelések esetén a B-A/A-B hányados lecsökkent 3-ra. Ez a változás azzal magyarázható, hogy a megnövekedett influx mellett a kontroll esetén mért erőteljes efflux mechanizmusok mértékében nem történt változás, az efflux pumpák aktivitása változatlan maradt. Ha a vizsgált β -CD-ek gátolták volna az efflux pumpákat, akkor a B-A/A-B hányados 3-nál jóval kisebb érték lenne. Bár a CSA és a β -CD-ek alkalmazása esetén hasonló B-A/A-B hányadost kaptunk, a fent említett adatokból kitűnik, hogy a taxol permeabilitását egészen eltérő módon befolyásolják

6.2.3. A Rameb, MaRameb, illetve SuRameb taxol permeabilitására gyakorolt hatásának lehetséges mechanizmusai

A vizsgált ciklodextrinek képesek a taxol permeabilitását fokozni. Ez teoretikusan négy úton valósulhat meg:

- a. Növelik a taxol oldékonyságát
- b. A membrán lipid-összetételét modulálva permeabilizálják a membránt
- c. A szoros junkcionális proteinek működését változtatják meg
- d. Gátolják az efflux pumpák működését

A Rameb taxolra gyakorolt oldékonyság növelő hatását Bouquet és mtsai is megfigyelték [Bouquet és mtsai. 2007.]. Mivel a Rameb származékaival kapcsolatban nem állt rendelkezésünkre információ, a Cyclolab meghatározta a taxol oldékonyságának változását. Szobahőmérsékleten, vizes közegben mért értékek alapján a Rameb. A SuRameb és a MaRameb legalább három nagyságrenddel növelték a taxol oldékonyságát. 20 mM Rameb vizes oldatában 30 mg/ml, 20 mM SuRameb 25 mg/ml, 20 mM MaRameb 26 mg/ml taxol koncentrációt mértek. A Rameb, Dimeb, illetve a HPBCD esetében már jelentek meg olyan tanulmányok, melyek szerint 1:20 molarányban 100%-os komplexálási hatékonysággal képesek a taxolt komplexálni [Sharma és mtsai. 1995.; Bouquet és mtsai. 2007.]. A mi kísérleteink során a [³H]taxol (15 nM) és a CD (20 mM) molaránya 1:1000000 volt, amely biztosította a 100%-os komplexálást [Szente és mtsai. 1999.]. Ezekből az adatokból kitűnik, hogy a Rameb és vizsgált származékai jelentős mértékben növelik a taxol oldékonyságát komplexálás révén, és így hordozómolekula szerepét tölthetik be. A vizsgált β -CD-ek komplexáló tulajdonságuk révén képesek a kis vízdoldékonyságú taxolt oldatban tartani [Hamada és mtsai. 2006.], ezáltal elősegítik a taxol lipid membránba való bejutását a vizes közegből. Hasonló jelenséget más kutatócsoport is megfigyelt, mely szerint az apoláros anyagok a számukra barrierként funkcionáló vizes közeget a β -CD-nel alkotott komplex formájában képesek áttörni, így a β -CD, mint egy hordozó molekula, a sejtmembrán közelébe szállítja a komplexált, nem vízdoldékony molekulát [Másson és mtsai. 1999.]. Ezt az elgondolást alátámasztja az a tény is, hogy a taxol A-B irányú átjutásának sebességnövekedése csak a β -CD-ek jelenlétében történt meg.

Ezen túlmenően a nagy feleslegben alkalmazott β -CD más hatást is kifejthet a komplexáláson kívül. Eddig megjelent tanulmányokból ismeretes, hogy a metil- β -CD-ek képesek 10 mM koncentráció felett gátolni a CYP-450 enzimeket [Ishikawa és mtsai. 2005.],

többek között az enterocyták lumenális membránjában megtalálható CYP-2C-t, amely felelős a taxol-ból a vízoldékony, inaktív 6- α -OH-paclitaxel metabolit képzéséért [Hellinger és mtsai. 2010.].

A β -CD-ek koleszterint vonnak ki a sejtmembránból. A sejtmembrán koleszterin szintjének csökkenése következtében az ATPase enzim aktivitása is lecsökken [Garrigues és mtsai. 2002.]. A Pgp aktív efflux transzporter az ATP hidrolíziséből származó energiát hasznosítja. Ebből adódóan a lecsökkent ATPase aktivitás csökkent Pgp aktivitást von maga után [Fenyvesi és mtsai. 2008.]. Ezáltal β -CD-ek hatására sejtmembránban bekövetkező változások elősegíthetik a Pgp-szubsztrátok átjutását a lipid kettősrétegen [Eckford és Sharom 2008.]. A fentebb említett folyamatok összessége hozzájárulhatna a taxol A-B irányú fokozott átjutásához, ellenben az általunk vizsgált Rameb és ionos származékai, a SuRameb és MaRameb 20 mM koncentrációban nem befolyásolták a Pgp működését.

Kisméretű hidrofil molekulák felszívódása fokozható a paracelluláris transzport útvonalak megnyitásával [Chao és mtsai. 1998.]. A sejtmembrán összetételének modulálása révén a β -CD-ek jelenléte az epiteliális barrier funkció változását is eredményezheti. Az apikális junkcionális komplex (AJC) biztosítja az epiteliális sejtek szoros kapcsolatát, illetve a sejtek polaritását. A szoros junkció a legjelentősebb alkotója az AJC-nek, amely szabályozza a paracelluláris anyagáramlást [Alhamoruni és mtsai. 2010.]. A szoros junkciók koleszterin-dús lipid raftokhoz kapcsolódnak. A Caco-2 sejtek membránjából történő koleszterin kivonás változást eredményez a szoros junkciók felépítésében, illetve a szoros junkcionális fehérjék disztribúciójában [Lambert és mtsai. 2005.; Deli 2009.]. A Rameb és származékai barrier funkcióra gyakorolt hatásának vizsgálatához TEER méréseket, és paracelluláris permeabilitás mérést végeztünk, illetve a monolayer alkotó Caco-2 sejtek közötti zonula occludens fehérjéket immunfestés segítségével fejtettünk meg. A TEER érték a Rameb esetében szignifikánsan csökkent a kontrollhoz viszonyítva, viszont még így is 1000 Ohm \times cm² felett maradt. Ez a változás a paracelluláris transzport vizsgálata során nem tükröződött, ellenben a szoros junkcionális fehérjék redisztribúciója megfigyelhető volt. A megfestett szoros junkció alkotók, a ZO-1, β -catenin, és claudin-1 az intakt sejtek egymással érintkező felszínein helyezkednek el, melyek a fluoreszcenciás mikroszkópban kirajzolják a sejtek körvonalait. A sejtek szélén Rameb és SuRameb hatására gyengébben és egyenetlenül festődtek a szoros junkcionális fehérjék, ellenben a citoszol területén pontszerű festődéseket detektáltunk, melyek internalizációra utalnak. A Rameb hatására végbemenő szoros junkcionális fehérjék átrendeződése a TEER érték csökkenésében is megjelenik. Ezek a folyamatok hozzájárulhatnak a Rameb kezelés során tapasztalt A-B, illetve B-A irányú taxol transzport növekedéshez.

A MaRameb kezelések során megnövekedett A-B irányú taxol transzport nem függ össze a barrier funkció csökkenésével. Ezt a következtetést alátámasztják a méréseink, mely szerint a MaRameb esetében ugyanolyan taxol permeabilitás fokozódást tapasztaltunk, de 20 mM koncentrációban nem mutatott toxicitást, illetve nem hatott sem a TEER értékekre, sem a szoros junkcionális fehérjékre.

Mindent összevetve, eredményeink alapján a MaRameb bizonyult a legalkalmasabbnak a vizsgált β -CD-ek közül a taxolból készítendő per os gyógyszerforma formulálására, mint oldékonyságot növelő, komplexképző és transzport fokozó segédanyag. A jövőbeli terveink között szerepel a taxol-MaRameb komplex szerkezeti vizsgálata, per os gyógyszerforma kialakítása, és preklinikai vizsgálatként a komplex farmakokinetikai és farmakodinamikai tulajdonságainak tanulmányozása *in vivo*.

7.1. Összefoglalás

1. A Debreceni Egyetem Gyógyszertechnológiai Tanszékén beállítottam, jellemeztem a Caco-2 sejtekkel kialakított bélhám modellt. Ez a modell alkalmas a felszívódás *in vitro* szimulálására, segítségével tanulmányozható a transzportfolyamatok széles spektruma.
2. Az új generációs metil- β -CD-ek az anyavegyületekhez képest jelentősen kisebb citotoxikus hatást fejtenek ki. A koleszterinnel töltött CD-ek esetében nem tapasztalható citotoxicitás. Ezáltal kísérletes úton igazoltam, hogy a sejtkárosító hatás összefügg a membránból történő koleszterin kivonással. A hemolitikus aktivitási tesztek eredményei összhangban állnak az MTT-teszt eredményeivel.
3. Szerkezet-hatás összefüggés elemzése során megállapítottam, hogy a metil- β -CD származékok citotoxicitása, hemolitikus aktivitása és koleszterinoldó képessége jelentős mértékben függ az ionos (anionos vagy kationos) szubsztituensek jelenlététől, a metil csoportok számától, viszont lényegében független a pozíciójuktól. A kísérletek alapján szoros korreláció állapítható meg a koleszterinoldó képesség és a citotoxicitás, illetve a koleszterinoldó képesség és hemolitikus aktivitás között, mely alapján kijelenthető, hogy a koleszterinoldó képesség prediktív faktorként utal a CD sejtkárosító hatására.
4. A toxicitási profil alapján további vizsgálatokhoz kiválasztottam három CD-t, ezek a Rameb, MaRameb, SuRameb. Megállapítottam, hogy a kiválasztott CD-ek képesek a taxol permeabilitást fokozni, melyhez állandó CD jelenlét szükséges, taxol-CD komplex formában. Ennek háttérében az oldékonyság növelése, illetve a CD-ek sejtmembránnal történő kölcsönhatása áll.
5. Az ismert Pgp inhibitor, CSA hatásával eltérő módon, a CD-ek nem befolyásolták 20 mM koncentrációban az aktív efflux mechanizmusok aktivitását. Rameb esetében elmondható, hogy a permeabilitás fokozódás összefügg a barrier funkciók csökkenésével. A Rameb ionos származékai a monolayer barrier funkcióját és a szoros junkciókat alkotó egyes fehérjék internalizációját sem befolyásolták a Ramebhez hasonló mértékben, ám mégis jelentősen növelték a taxol monolayeren történő átjutását. Mindent egybevetve a MaRameb bizonyult a legalkalmasabbnak a vizsgált β -CD-ek közül a taxolból készítendő per os gyógyszerforma formulálására.

7.2. Summary

1. A Caco-2 transport model was installed and characterized at the Department of Pharmaceutical Technology, University of Debrecen. The Caco-2 intestinal model is widely used for *in vitro* simulation of drug absorption, and is an appropriate model for studying the different ways of absorption.
2. The new generation CD derivatives showed lower cytotoxicity than the parent methylated compounds. The complexation of cholesterol into the cyclodextrin ring dramatically decreased the cytotoxicity of CDs on Caco-2 cells. The cytotoxicity of various CD derivatives depends on their cholesterol extraction capacity from the cell membrane. Haemolytic activity test results were in accordance with MTT test results.
3. From structure-activity analysis it can be concluded that in the case of methylated- β -CD compounds the cytotoxicity depends highly on the number and slightly on the position of methyl groups. Significant correlation can be observed between the cytotoxicity, hemolytic activity and the cholesterol complexing capacity of various CD compounds. I propose that cholesterol-solubilizing properties can be a predictive factor for β -CD cell toxicity which depends on the structure of the CD derivative.
4. Based on their cytotoxicity profile, three CD derivatives were chosen: Rameb, MaRameb, and SuRameb. I have demonstrated that Rameb and its less toxic ionic derivatives MaRameb and SuRameb effectively increase taxol permeability in Caco-2 monolayers, but the continuous presence of these CD derivatives is necessary for the enhanced taxol permeability in taxol-CD complex form. This effect could primary be mediated by increased complexation and solubility of taxol and also possibly by the interaction of CDs with cell membrane.
5. In contrast to the well-known active efflux pump inhibitor CSA, the examined CD derivatives at 20 mM concentration did not influence the activity of active efflux pumps. In the case of Rameb, the increased paracellular permeability can indicate attenuated barrier integrity. However the ionic derivatives of Rameb did not change the barrier function of the Caco-2 monolayer and did not induce a drop in TEER or internalization of specific tight junction proteins, they are able to enhance the taxol influx in Caco-2 cell monolayer. MaRameb proved to be the most suitable β -CD in oral formulation of taxol.

8. Irodalomjegyzék

Adachi Y.; Suzuki H.; Sugiyama Y. 2001. Comparative studies on in vitro methods for evaluating in vivo function of MDR1 P-glycoprotein. *Pharm Res.* 18(12). 1660-8.

Agüeros M.; Zabaleta V.; Espuelas S.; Campanero M.A.; Irache J.M. 2010. Increased oral bioavailability of paclitaxel by its encapsulation through complex formation with cyclodextrins in poly(anhydride) nanoparticles. *J Control Release* 145. 2-8.

Alani A.W.G.; Rao D.A.; Seidel R.; Wang J.; Jiao J.; Kwon G.S. 2010. The effect of novel surfactants and Solutol® HS 15 on paclitaxel aqueous solubility and permeability across a Caco-2 monolayer. *J Pharm Sci* 99. 3473-3485.

Albers E.; Müller B.W. 1995. Cyclodextrin derivatives in pharmaceuticals. *Crit. Rev. Ther. Drug Carrier Syst.* 12. 311–337.

Alcaro S.; Ventura C.A.; Paolino D.; Battaglia D.; Ortuso F.; Cattel L.; Puglisi G.; Fresta M. 2008. Preparation and characterization molecular modelling and in vitro activity of paclitaxel-cyclodextrin complexes. *Bioorg Med Chem Lett* 12. 1637-1641.

Alhamoruni A.; Lee A.C.; Wright K.L.; Larvin M.; O'Sullivan S.E. 2010. Pharmacological effects of cannabinoids on the Caco-2 cell culture model of intestinal permeability. *J Pharmacol Exp Ther.* 335(1). 92-102.

Amidon G.L.; Lennernäs H.; Shah V.P.; Crison J.R. 1995. A theoretical basis for biopharmaceutic drug classification: the correlation of in vitro drug product dissolution and in vivo bioavailability. *Pharm Res* 120. 413-420.

Anderle P.; Niederer E.; Rubas W.; Hilgendorf C.; Spahn-Langguth H.; Wunderli-Allenspach H.; Merckle H.P.; Langguth P. 1998. Glycoprotein (P-gp) mediated efflux in Caco-2 cell monolayers: the influence of culturing conditions and drug exposure on P-gp expression levels. *J. Pharm. Sci.* 87. 757-762

Antal István és Dévay Attila A gyógyszeres terápia biofarmáciai alapjai 2009. Medicina könyvkiadó

Arima H, Yunomae K, Hirayama F, Uekama K 2001. Contribution of P-glycoprotein to the enhancing effects of dimethyl- β -cyclodextrin on oral bioavailability of tacrolimus. *J Pharmacol Exp Ther* 297:547-555.

Arima H.; Yunomae K.; Morikawa T.; Hirayama F.; Uekama K. 2004. Contribution of cholesterol and phospholipids to inhibitory effect of dimethyl- β -cyclodextrin on efflux function of P-glycoprotein and multidrug resistance-associated protein 2 in vinblastine-resistant Caco-2 cell monolayers. *Pharm. Res.* 21. 625–634.

Artursson P.; Karlsson J. 1991. Correlation between oral drug absorption in humans and apparent drug permeability coefficients of human intestinal epithelial (Caco-2) cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 175. 880-885

Artursson P.; Palm K.; Luthman K. 1996. Caco-2 monolayers in experimental and theoretical predictions of drug transport. *Advanced Drug Delivery Reviews* 22. 67-84

Artursson P.; Ungell A.-L.; Löfroth J.-E. 1993. Selective paracellular permeability in two models of intestinal absorption: cultured monolayers of human intestinal epithelial cells and rat intestinal segments. *Pharm. Res.* 10. 1123-1129

Attoui F.; Al-Omar A.; Leray E.; Parrot-Lopez H.; Finance C.; Bonaly R. 1994. Recognition ability and cytotoxicity of some oligosaccharidylsubstituted β -cyclodextrins. *Biol. Cell.* 82. 161-167

Bailey C.A.; Piotr Bryla; A. Waseem Malick 1996. The use of intestinal epithelial cell culture model, Caco-2; in pharmaceutical development. *Advanced Drug Delivery Reviews* 22. 85-103

Beijnen J.H.; Huizing M.T.; ten Bokkel Huinink W.W.; Veenhof C.H.; Vermorken J.B.; Giaccone G.; Pinedo H.M. 1994. Bioanalysis, pharmacokinetics, and pharmacodynamics of the novel anticancer drug paclitaxel (Taxol). *Semin Oncol.* 21(5 Suppl 8). 53-62.

Benet L.Z.; Chi-Yuan Wu; Hebert M.F.; Wacher V.J. 1996. Intestinal Drug metabolism and antitransport process *J Control Rel* 39. 139-143.

Bhardwaj V., Ankola D.D.; Gupta S.C.; Schneider M.; Lehr C.M.; Kumar M.N. 2009. PLGA nanoparticles stabilized with cationic surfactant: safety studies and application in oral delivery of paclitaxel to treat chemical-induced breast cancer in rat. *Pharm Res* 26. 2495-2503.

Bilensoy E.; Gürkaynak O.; Dogan A.L.; Hincal A.A. 2008. Safety and efficacy of amphiphilic β -cyclodextrin nanoparticles for paclitaxel delivery. *Int J Pharm.* 374. 163-170.

Bouquet W.; Ceelen W.; Fritzing B.; Pattyn P.; Peeters M.; Remon J.P.; Vervaet C. 2007. Paclitaxel/ β -cyclodextrin complexes for hyperthermic peritoneal perfusion – Formulation and stability. *Eur J Pharm Biopharm* 66. 391-397.

Braun A.; Sybille Hämmerle; Kayoshi Suda; Barbara Rothen-Rutishauser; Maja Günthert; Stefanie D. Krämer; Heidi Wunderli-Allenspach. 2000. Cell cultures as tool in biopharmacy. *European Journal of Pharmaceutical Sciences* 11.Suppl. 2. S51-S60

Burkhart C.A.; Berman J.W.; Swindell C.S.; Horwitz S.B. 1994. Relationship between the structure of taxol and other taxanes on induction of tumor necrosis factor-alpha gene expression and cytotoxicity. *Cancer Res.* 54(22). 5779-82.

Chao A.C.; Taylor M.T.; Daddona P.E.; Broughakk M.; Fix J.A. 1998. Molecular weightdependent paracellular transport of fluorescent model compounds induced by palmitoylcarnitine chloride across the human intestinal epithelial cell line Caco-2. *J Drug Target* 6. 37-43.

Collnot E.M.; Blades C.; Wempe M.F.; Hyatt J.; Navarro L.; Edgar K.J.; Schaefer U.F.; Lehr C.M. 2006. Influence of vitamin E TPGS poly(ethylene glycol) chain length on apical efflux transporters in Caco-2 cell monolayers. *J Control Release* 111. 35-40.

Cserháti T.; Holló J. 1994. Interaction of taxol and other anticancer drugs with hydroxypropyl- β -cyclodextrin. *Int J Pharm* 108. 69-75.

Deli M.A. 2009. Potential use of tight junction modulators to reversibly open membranous barriers and improve drug delivery. *Biochim Biophys Acta* 1788. 892-910.

Dix C.J.; Hassan I.F.; Obray H.Y.; Shah R.; Wilson G. 1990. The transport of vitamin B12 through polarized monolayers of Caco-2 cells. *Gastroenterology* 98. 1272-1279

Dressman J.B.; Amidon G.L.; Reppas C.; Shah V.P. 1998. Dissolution testing as a prognostic tool for oral drug absorption: Immediate dosage forms *Pharm Res* 15. (1) 11-22.

Eckford P.D.; Sharom F.J. 2008. Interaction of the P-glycoprotein multidrug efflux pump with cholesterol: effects on ATPase activity, drug binding and transport. *Biochemistry* 47. 13686-13698.

Eiseman J.L.; Eddington N.D.; Leslie J.; MacAuley C.; Sentz D.L.; Zuhowski M.; Kujawa J.M.; Young D.; Egorin M.J. 1994. Plasma pharmacokinetics and tissue distribution of paclitaxel in CD2F1 mice. *Cancer Chemother Pharmacol.* 34(6). 465-71.

Fenyvesi F.; Fenyvesi E.; Szenté L.; Goda K.; Bacsó Zs.; Bácskay I.; Váradi J.; Kiss T.; Molnár E.; Janáky T.; Szabó Jr. G.; Vecsernyés M. 2008. P-glycoprotein inhibition by membrane cholesterol modulation. *Eur. J. Pharm. Sci.* 34. 236-242.

French D. 1957. The Schardinger-dextrins. *Adv. Carbohydr. Chem.* 12. 189-260.

Fujita H.; Okamoto M.; Takao A.; Mase H.; Kojima H. 1994. Pharmacokinetics of paclitaxel in experimental animals. Part 1. Blood level *Gan To Kagaku Ryoho.* 21(5). 653-8.

Garrigues A.; Escargueil A.E.; Orlowski S. 2002. The multidrug transporter, P-glycoprotein, actively mediates cholesterol redistribution in the cell membrane. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 99. 1037-10352.

Giacomini K.M.; Huang Shiew-Mei; Tweedie D.J.; Benet L.Z.; Brouwer K.L.R.; Chu X.; Dahlin A.; Evers R.; Fischer V.; Hillgren K.M.; Hoffmaster K.A.; Ishikawa T.; Keppler D.; Kim R.B.; Lee C.A.; Niemi M.; Polli J.W.; Sugiyama Y.; Swaan P.W.; Ware J.A.; Wright S.H.; Yee S.W.; Zamek-Gliszczyński M.J.; Zhang L. 2010. Membrane transporters in drug development. *Nature Rev Drug Discov* 9. 215-236.

Hamada H.; Ishihara K.; Masuoka N.; Mikuni K.; Nakajima N. 2006. Enhancement of water-solubility and bioactivity of paclitaxel using modified cyclodextrins. *J Biosci Bioeng* 102(4) 369-71.

Harris J.W.; Rahman A.; Kim B.R.; Guengerich F.P.; Collins J.M. 1994. Metabolism of taxol by human hepatic microsomes and liver slices: participation of cytochrome P450 3A4 and an unknown P450 enzyme. *Cancer Res.* 54(15) 4026-35.

Hellinger É.; Bakk L.M.; Pócsa P.; Tihanyi K.; Vastag M. 2010. Drug penetration model of vinblastine-treated Caco-2 cultures. *Eur J Pharm Sci* 41. 96-106.

Hidalgo I.J.; Li J. 1996. Carrier-mediated transport and efflux mechanisms in Caco-2 cells *Adv. Drug Deliv. Rev.* 22. 53-66.

Hidalgo I.J.; Raub T.J.; Borchardt R.T. 1989. Characterization of the human colon carcinoma cell line (Caco-2) as a model system for intestinal epithelial permeability. *Gastroenterology* 96. 736-749.

Hilgers A.R.; Conradi R.A.; Burton P.S. 1990. Caco-2 cell monolayers as a model for drug transport across the intestinal mucosa. *Pharm. Res.* 7. 902-910

Hillgren K.; Kato A.; Borchardt R. 1995. In vitro systems for studying intestinal drug absorption. *Medicinal Research Reviews* 15. 83-109.

Hochman J.; Artursson P. 1994. Mechanisms of absorption enhancement and tight junction regulation. *Journal of Controlled Release* 29. 253-267.

Horwitz S.B.; Cohen D.; Rao S.; Ringel I.; Shen H.J.; Yang C.P. 1993. Taxol: mechanisms of action and resistance. *J Natl Cancer Inst Monogr.* 15. 55-61.

Hosoya K.; Ohtsuki S.; Terasaki T. 2002. Recent advances in the brain-to-blood efflux transport across the blood-brain barrier. *Int J Pharm.* 248(1-2). 15-29.

Hunter J.; Hirst B.H. 1997. Intestinal secretion of drugs. The role of P-glycoprotein and related drug efflux systems in limiting oral drug absorption. *Advanced Drug Delivery Reviews* 25. 129-157.

Hunter J.; Jepson M.A.; Tsuruo T.; Simmons N.L.; Hirst B.H. 1993. Functional expression of P-glycoprotein in apical membranes of human intestinal Caco-2 cells. *J. Biol. Chem.* 268. 14991-14997.

Irie T.; Otagiri M.; Sunada M.; Uekama K.; Ohtani Y.; Yamada Y.; Sugiyama Y. 1982. Cyclodextrin-induced hemolysis and shape changes of human erythrocytes in vitro. *J. Pharmacobiodyn.* 5. 741-744.

Irie T.; Uekama K. 1997. Pharmaceutical applications of cyclodextrins. III. Toxicological issues and safety evaluation. *Journal of Pharmaceutical Sciences.* 86. 147-162.

Ishikawa M.; Yoshii H.; Furuta T. 2005. Interaction of modified cyclodextrins with cytochrome P-450. *Biosci Biotechnol Biochem.* 69(1). 246-8.

Jeong J.M.; Choi C.H. 2007. Enhancement of paclitaxel transport and cytotoxicity by 7,3',4'-trimethoxyflavone, a P-glycoprotein inhibitor. *J Pharm Pharm Sci.* 10(4). 547-53.

Jordan M.A.; Toso R.J.; Thrower D.; Wilson L. 1993. Mechanism of mitotic block and inhibition of cell proliferation by taxol at low concentrations. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 90(20). 9552-6.

Jumarie C.; Malo C. 1991. Caco-2 cell cultured in serum-free medium as a model for the study of enterocytic differentiation in vitro. *J. Cell. Physiol.* 149. 24-33.

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. 2004 Molecular properties of WHO essential drugs and provisional biopharmaceutical classification *Mol Pharmaceutics* 1. 85-96.

Kilsdonk E.P.C.; Yancey P.G.; Stoudt G.W.; Bangerter F.W.; Johnson W.J.; Phillips M.C.; Rothblat G.H. 1995. Cellular cholesterol efflux mediated by cyclodextrins. *J. Biol. Chem.* 270. 17250–17256.

Kim D.-C.; Burton P.S.; Brochard R.T. 1993. A correlation between the permeability characteristics of a series of peptides using an in vitro cell culture model (Caco-2) and those using an in situ perfused rat ileum model of the intestinal mucosa. *Pharm. Res.* 10. 1710-1714.

Kraehenbuhl J-P.; Neutra M.R.; 1992. Molecular and cellular basis of immune protection of mucosal surfaces. *Physiol. Rev.* 72. 853-879.

Lambert D.; O'Neill C.A.; Padfield P.J. 2005. Depletion of Caco-2 cell cholesterol disrupts barrier function by altering the detergent solubility and distribution of specific tight junction proteins. *Biochem J* 387. 553-560.

Lennernäs H.;Lennernäs H.; Palm K.; Fagerholm U.; Artursson P. 1996. Correlation between paracellular and transcellular drug permeability in the human jejunum and Caco-2 monolayers. *Int. J. Pharm.* 127. 103-107.

Leroy-Lechat F.; Wouessidjewe D.; Andreux J.P.; Puisieux F.; Duchêne D. 1994. Evaluation of the cytotoxicity of cyclodextrins and hydroxypropylated derivatives. *Int. J. Pharm.* 101. 97–103.

Loftsson T.; Brewster M.E., 1996. Pharmaceutical applications of cyclodextrins. 1. Drug solubilization and stabilization. *J. Pharm. Sci.* 85. 1017–1025.

Maestrelli F.; Zerrouk N.; Cirri M.; Mennini N.; Mura P. 2008. Microspheres for colonic delivery of ketoprofen-hydroxypropyl- β -cyclodextrin complex. *Eur. J. Pharm. Sci.* 34. 1–11.

Malingré M.M.; Beijnen J.H.; Schellens J.H.M. 2001. Oral delivery of taxanes. *Invest New Drugs* 19. 155-162.

Marino A. M.; Melissa Yarde; Hetal Patel; Saeho Chong; Praveen V. Balimane 2005. Validation of the 96 well Caco-2 cell culture model for high throughput permeability assessment of discovery compounds. *International Journal of Pharmaceutics* 297. 235-241.

Markowska M.; Oberle R.; Juzwin S.; Hsu C.P.; Gryzkiewicz M.; Streeter A.J. 2001. Optimizing Caco-2 cell monolayers to increase throughput in drug intestinal absorption analysis. *J Pharmacol Toxicol Methods* 46:151-55.

Martin Y.C 1981. A practitioner's perspective of the role of quantitative structure-activity analysis in medicinal chemistry. *J. Med.Chem.* 24. 229-237.

Másson M.; Loftsson T.; Másson G.; Stefánsson E. 1999. Cyclodextrins as permeation enhancers: some theoretical evaluations and in vitro testing. *J Control Release* 59. 107-118.

Matilainen L.; Toropainen T.; Vihola H.; Hirvonen J.; Järvinen T.; Jarho P.; Järvinen K. 2008. In vitro toxicity and permeation of cyclodextrins in Calu-3 cells. *J. Control. Release* 126. 10-16.

Meerum Terwogt J.M.; Beijnen J.H.; ten Bokkel Huinink W.W.; Rosing H.; Schellens J.H. 1998. Co-administration of cyclosporin enables oral therapy with paclitaxel. *Lancet.* 352(9124). 285.

Meerum Terwogt J.M.; Malingré M.M.; Beijnen J.H.; ten Bokkel Huinink W.W.; Rosing H.; Koopman F.J.; van Tellingen O.; Swart M.; Schellens J.H. 1999. Coadministration of oral cyclosporin A enables oral therapy with paclitaxel. *Clin Cancer Res.* 5(11). 3379-84.

Miyajima K.; Saito H.; Nakagaki M. 1987. *J. Pharmacobio-Dyn.* 10. s-123.

Miyazawa I.; Ueda H.; Nagase H.; Endo T.; Kobayashi S.; Nagai T. 1995. Physicochemical properties and inclusion complex formation of δ -cyclodextrins. *Eur. J. Pharm. Sci.* 3. 153-162.

Mosmann T. 1983. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. *Journal of Immunological Methods* 65. 55-63.

Nellans H.N. 1991. Paracellular intestinal transport: Modulation of absorption. *Advanced Drug Delivery Reviews* 7. 339-364.

Nilsson D.; Aquilonius S-M.; Ahrenstedt Ö.; Knutson L.; Paalzow L.K. 1993. The effect of The effect of L-leucine on the absorption of levodopa, studied by regional jejunal perfusion in man. *Br. J. Clin Pharmacol.* 35. 243-250.

Ohtani Y.; Irie T.; Uekama K.; Fukunaga K.; Pitha J. 1989. Differential effects of alpha, beta-, gamma-cyclodextrins on human erythrocytes. *Eur. J. Biochem.* 186. 17-22.

Pappenheimer J.R.; Reiss K.Z. 1987. Contribution of solvent drag through intercellular junctions to absorption of nutrients by the small intestine of the rat. *J. Membr. Biol.* 100. 123-136.

Parness J.; Horwitz S.B. 1981. Taxol binds to polymerized tubulin in vitro. *J. Cell Biol.* 91(2 Pt 1). 479-87.

Peltier S.; Oger J.M.; Lagarce F.; Couet W.; Benoît J.P. 2006. Enhanced oral paclitaxel bioavailability after administration of paclitaxel-loaded lipid nanocapsules. *Pharm Res* 23. 1243-1255.

Pinto M.; Ronine-Leon S.; Appay M.D.; Kidinger M.; Triadov N.; Dussaulx E.; Lacroix B.; Simon-Assmann P.; Hoffen K.; Fogh J.; Zwiebaum A. 1983. Enterocyte-like differentiation and polarization of the human colon carcinoma cell line Caco-2 in culture. *Biol. Cell.* 47. 323-330.

Rajewski R.A.; Stella V.J. 1996. Pharmaceutical application of cyclodextrins. 2. In vivo drug delivery. *J. Pharm. Sci.* 85. 1142-1169.

Rothen-Rutishauser B.; Krämer S.D.; Braun A.; Günthert M.; Wunderli-Allenspach H. 1998. MDCK cell cultures as an epithelial in vitro model: cytoskeleton and tight junctions as indicators for the definition of age-related stages by confocal microscopy. *Pharm. Res.* 15. 964-971.

Rousset M. 1986. The human colon carcinoma cell lines HT-29 and Caco-2: Two in vitro models for the study of intestinal differentiation. *Biochimie* 68. 1035-1040.

Rowinsky E.K.; Cazenave L.A.; Donehower R.C. 1990. Taxol: a novel investigational antimicrotubule agent. *J Natl Cancer Inst.* 82(15). 1247-59.

Rubas W.; Jezyk N.; Grass G.M. 1993. Comparison of the permeability characteristics of a human colonic epithelial (Caco-2) cell line to colon of rabbit, monkey, and dog intestine and human drug absorption. *Pharm Res* 10. 113-118.

Saeki T; Ueda K.; Tanigawara Y.; Hori R.; Komano T. 1993. Human P-glycoprotein transports cyclosporin A and FK506. *J Biol Chem.* 268(9). 6077-80.

Salem L.B.; Bosquillon C.; Dailey L.A.; Delattre L.; Martin G.P.; Evrard B.; Forbes B., 2009. Sparing methylation of β -cyclodextrin mitigates cytotoxicity and permeability induction in respiratory epithelial cell layers in vitro. *J. Control. Release* 136. 110–116.

Sarkadi B.; Homolya L.; Szakács G.; Váradi A. 2006. Human multidrug resistance ABCB and ABCG transporters: participation in a chemoimmunity defense system. *Physiol Rev.* 86(4). 1179-236.

Schiff P.B.; Fant J.; Horwitz S.B. 1979. Promotion of microtubule assembly in vitro by taxol. *Nature* 277(5698). 665-7.

Sharma U.S.; Balasubramanian S.V.; Straubinger R.M. 1995. Pharmaceutical and physical properties of paclitaxel (taxol) complexes with cyclodextrins. *J Pharm Sci* 84. 1223-1230.

Shet M.S.; Fisher C.W.; Holmans P.L.; Estabrook R.W. 1993. Human cytochrome P450 3A4: enzymatic properties of a purified recombinant fusion protein containing NADPH-P450 reductase. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 90(24). 11748-52.

Sparreboom A.; van Asperen J.; Mayer U.; Schinkel A.H.; Smit J.W.; Meijer D.K.; Borst P.; Nooijen W.J.; Beijnen J.H.; van Tellingen O. 1997. Limited oral bioavailability and

active epithelial excretion of paclitaxel (Taxol) caused by P-glycoprotein in the intestine. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 94(5). 2031-5.

Stewart B.H.; Chan O.H.; Lu. R.H.; Reynel E.R.; Schmid H.L.; Hamilton H.W.; Steinbaugh B.A.; Taylor M.D. 1995. Comparison of intestinal permeabilities determined in multiple in vitro and in situ models: Relationship to absorption in humans. *Pharm. Res.* 12. 693-699.

Szakács G.; Váradi A.; Özvegy- Laczka C.; Sarkadi B. 2008. The role of ABC transporters in drug absorption, distribution, metabolism, excretion and toxicity (ADME-Tox). *Drug Discov Today* 13. 379-393.

Szejtli J. 1994. Medical applications of cyclodextrins. *Medicinal Research Reviews* 14. 353-386.

Szejtli J. 1998. Introduction and general overview of cyclodextrin chemistry. *Chemical Reviews* 98. 1743-1753.

Szente L.; Vikmon M.; Szemán J.; Otta K. 1999. Methyl- β -cyclodextrin/paclitaxel aqueous solutions: a tool to test Cremophor-free paclitaxel. *STP Pharm. Sci.* 9. 243-247.

Uekama K.; Hirayama F.; Arima H. 2008. Pharmaceutical applications of cyclodextrins and their derivatives. In: Dodziuk, H. (Ed.), *Cyclodextrins and their Complexes*. Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim, 381–422.

Uekama K.; Otagiri M. 1987. Cyclodextrins in drug carrier systems. *Crit. Rev. Ther. Drug Carrier Syst.* 3. 1–40.

Valchon P.H.; Beaulieu J.-F. 1992. transient mosaic patterns of morphological and functional differentiation in the Caco-2 cell line. *Gastroenterology* 103. 414-423.

van Asperen J.; van Tellingen O.; van der Valk M.A.; Rozenhart M.; Beijnen J.H 1998. Enhanced oral absorption and decreased elimination of paclitaxel in mice cotreated with cyclosporin A. *Clin Cancer Res.* 4(10). 2293-7.

Varma M.V.; Panchagnula R. 2005. Enhanced oral paclitaxel absorption with vitamin E-TPGS: effect on solubility and permeability in vitro, in situ and in vivo. *Eur J Pharm Sci* 25. 445-453.

Ventura C.A.; Tommasini S.; Falcone A.; Giannone I.; Paolino D.; Sdrafkakis V.; Mondello M.R.; Puglisi G. 2006. Influence of modified cyclodextrins on solubility and percutaneous absorption of celecoxib through human skin. *Int J Pharm* 314. 37-45.

Walle U.K.; Walle T. 1998. Taxol transport by human intestinal epithelial Caco-2 cells. *Drug Metab Dispos* 26. 343-346.

Wani M.C.; Taylor H.L.; Wall M.E.; Coggon P.; McPhail A.T. 1971. Plant antitumor agents. VI. The isolation and structure of taxol, a novel antileukemic and antitumor agent from *Taxus brevifolia* *J. Am. Chem. Soc.* 93(9). 2325-7.

Wills. P.; Warnery A.; Phung-Ba V.; Schermann D. 1994. Differentiated intestinal epithelial cell lines a sin vitro models for predicting the intestinal absorption of drugs. *Cell Biology and Toxicology* 10. 393-397

Wilson G.; Hassan I.F.; Dix C.J.; Williamson I.; Shah R.; MacKay M.; Artursson P. 1990. Transport and permeability properties of human Caco-2 cells: An in vitro model of the intestinal epithelial cell barrier. *Journal of Controlled Release* 11. 25-40.

Wilson L.; Miller H.P.; Farrell K.W.; Snyder K.B.; Thompson W.C.; Purich D.L. 1985. Taxol stabilization of microtubules in vitro: dynamics of tubulin addition and loss at opposite microtubule ends. *Biochemistry* 24(19). 5254-62.

Yau Yi Lao; Yung-Hsiang Chen; Tong-tong Liu; Cheng Li; Xiaoming Cui; Roland E. White; K.-C. Cheng 2004. Evaluation of a novel in vitro Caco-2 hepatocyte hybrid system for predicting in vivo oral bioavailability. *Drug Metab. Dispos.* 32.(9) 937-942.

Yu L.X.; Amidon G.L.; Polli J.E.; Zhao H.; Mehta M.U.; Conner D.P.; Shah V.P.; Lesko L.J.; Chen M.L., Lee V.H., Hussain A.S. 2002 Biopharmaceutics classification system: The scientific basis for biowaiwer extensions *Pharm Res.* 19(7). 921-5.

Zidovetzki R.; Levitan I. 2007. Use of cyclodextrins to manipulate plasma membrane cholesterol content: evidence, misconceptions and control strategies. *Biochim. Biophys. Acta* 1768. 1311–1324.

9.1. Tárgyszavak

β -ciklodextrin, citotoxicitás, koleszterinoldó képesség, Caco-2; transzport modell; taxol, látszólagos permeabilitás

9.2. Keywords

β -cyclodextrin, cytotoxicity, cholesterol solubilization, Caco-2, transport model, taxol, apparent permeability

10. Köszönetnyilvánítás

Köszönöm Dr. Vecsernyés Miklós tanszékvezető docens úrnak, hogy lehetővé tette munkámat a Gyógyszertechnológiai Tanszéken. Köszönöm a témavezetését, segítségét, türelmét és hitét.

Köszönetemet fejezem ki Fenyvesi Ferenc adjunktus úrnak az áldozatkész segítségért, gyakorlati és elméleti útmutatásért, bátorításért és kritikai észrevételeiért, amellyel munkámat nagyban segítette.

Hálás köszönettel tartozom a Gyógyszertechnológiai Tanszék minden dolgozójának önzetlen segítségükért, amelyet munkám során kaptam tőlük.

Külön köszönettel tartozom a családomnak, barátaimnak önzetlen támogatásukért, bátorításukért, belém vetett hitükért.

11. Függelék



DEBRECENI EGYETEM EGYETEMI ÉS NEMZETI KÖNYVTÁR
KENÉZY ÉLETTUDOMÁNYI KÖNYVTÁRA

Iktatószám: DEENKÉTK /167/2011.
Tételszám:
Tárgy: Ph.D. publikációs lista

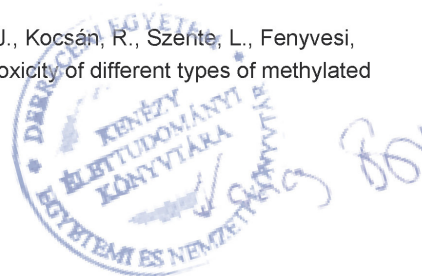
Jelölt: Kiss Tímea

Neptun kód: LZME2Y

Doktori Iskola: Gyógyszerészeti Tudományok Doktori Iskola

A PhD értekezés alapjául szolgáló közlemények

1. Fenyvesi, F., **Kiss, T.**, Fenyvesi, É., Szente, L., Veszelka, S., Deli, M.A., Váradi, J., Fehér, P., Ujhelyi, Z., Tósaki, Á., Vecsernyés, M., Bácskay, I.: Randomly Methylated beta-Cyclodextrin Derivatives Enhance Taxol Permeability Through Human Intestinal Epithelial Caco-2 Cell Monolayer.
J. Pharm. Sci. Epub ahead of print (2011)
DOI: <http://dx.doi.org/10.1002/jps.22666>
IF:3.031 (2010)
2. **Kiss, T.**, Fenyvesi, F., Bácskay, I., Váradi, J., Fenyvesi, É., Iványi, R., Szente, L., Tósaki, Á., Vecsernyés, M.: Evaluation of the cytotoxicity of beta-cyclodextrin derivatives: Evidence for the role of cholesterol extraction.
Eur. J. Pharm. Sci. 40 (4), 376-380, 2010.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ejps.2010.04.014>
IF:3.291
3. **Kiss T.**, Fenyvesi F., Bácskay I., Fehér P., Kocsán R., Váradi J., Szente L., Fenyvesi É., Iványi R., Vecsernyés M.: Ciklodextrin-származékok citotoxicitási vizsgálata Caco-2 sejtvonalon.
Acta Pharm. Hung. 77 (2), 150-154, 2007.
4. **Kiss, T.**, Fenyvesi, F., Pásztor, N., Fehér, P., Váradi, J., Kocsán, R., Szente, L., Fenyvesi, É., Szabó, G., Vecsernyés, M., Bácskay, I.: Cytotoxicity of different types of methylated beta-cyclodextrins and ionic derivatives.
Pharmazie. 62 (7), 557-558, 2007.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1691/ph.2007.7.7051>
IF:0.775



További Közlemények

5. Oláh, M., Fehér, P., Ihm, Z., Bácskay, I., Kiss, T., Freeman, M.E., Nagy, G.M., Vecsernyés, M.: Dopamine-Regulated Adrenocorticotropic Hormone Secretion in Lactating Rats: Functional Plasticity of Melanotropes.
Neuroendocrinology. 90 (4), 391-401, 2009.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1159/000232313>
IF:3.074
6. Fenyvesi, F., Fenyvesi, É., Sente, L., Goda, K., Bacsó, Z., Bácskay, I., Váradi, J., Kiss, T., Molnár, É., Janáky, T., Szabó, G., Vecsernyés, M.: P-glycoprotein inhibition by membrane cholesterol modulation.
Eur. J. Pharm. Sci. 34 (4-5), 236-242, 2008.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ejps.2008.04.005>
IF:3.65

A DEENK Kenézy Élettudományi Könyvtár a Jelölt által a Publikációs Adatbázisba feltöltött adatok bibliográfiai és tudományometriai ellenőrzését a tudományos adatbázisok és a Journal Citation Reports Impact Factor lista alapján elvégezte.

Debrecen, 2011.07.13



Posztterek

Fenyvesi F., **Kiss T.**, Dr. Bácskay I., Fodor Z., Fehér P., Váradi J., Dr. Fenyvesi É., Dr. Sente L., Dr. Vecsernyés M.: Caco-2 transzport modell és alkalmazásának lehetőségei ciklodextrinek felszívódást befolyásoló hatásának tanulmányozásában. Congressus Pharmaceuticus Hungaricus XIII. Budapest, 2006. május 25-27.

M.Vecsernyés, F.Fenyvesi, **T.Kiss**, J.Váradi, I.Bácskay, A.Dévay, É.Fenyvesi, L.Szente: Evaluation of the cytotoxic properties of various cyclodextrin derivatives. 6th. World Meeting of Pharmaceutics, Biopharmaceutics and Pharmaceutical Technology Spain, Barcelona 7-10. April 2008

Kiss T., Fenyvesi F., Szántó M., Bácskay I., Fenyvesi É., Sente L., Iványi R. Vecsernyés M.: Új generációs ciklodextrinek citotoxicitásának és koleszterinoldó képességének összefüggése. Gyógyszer az ezredfordulón VII. Sopron, 2008. szeptember 25-27.

Szántó M., **Kiss T.**, Fenyvesi F., Kocsán R., Vecsernyés M., Bácskay I.: Különböző típusú felületaktív anyagok citotoxicitásának összehasonlítása HeLa valamint CaCo-2-sejtvonalakon. Gyógyszer az ezredfordulón VII. Sopron, 2008. szeptember 25-27.

Kiss T., Fenyvesi F., Bácskay I., Ujhelyi Z., Váradi J., Fehér P., Sente L., Fenyvesi É., Vecsernyés M.: Új generációs β -ciklodextrin származékok a taxol transzportjára gyakorolt hatásának vizsgálata. Congressus Pharmaceuticus Hungaricus XIV. Budapest, 2009. november 13-15.

Ujhelyi Z., **Kiss T.**, Fenyvesi F., Váradi J., Vecsernyés M., Bácskay I.: Felületaktív anyagok és termer rendszerek citotoxicitásának vizsgálata. Congressus Pharmaceuticus Hungaricus XIV. Budapest, 2009. november 13-15.

Kiss T., Fenyvesi F., Bácskay I., Ujhelyi Z., Váradi J., Fehér P., Veszélka Sz., Deli M., Sente L., Fenyvesi É., Vecsernyés M.: Metil- β -ciklodextrin származékok taxol felszívódását elősegítő hatásának *in vitro* vizsgálata. XVI. Gyógyszer-technológiai Konferencia és VIII. Gyógyszer az Ezredfordulón Konferencia Siófok, 2010. október 20-22.

Réti-Nagy K., Bacsó Zs., Fenyvesi É., Sente L., Váradi J., **Kiss T.**, Ujhelyi Z., Fehér P., Vecsernyés M., Bácskay I., Fenyvesi F.: Fluoreszcens random metilezett béta-ciklodextrin intracelluláris akkumulációjának és *in vitro* felszívódásának vizsgálata. XVI. Gyógyszer-technológiai Konferencia és VIII. Gyógyszer az Ezredfordulón Konferencia Siófok, 2010. október 20-22.

Előadások

Kiss T.: Ciklodextrin-származékok hatásának vizsgálata Caco-2 transzport modellen. VIII. Clauder Ottó Emlékverseny Budapest, 2007. április 12-13.

Kiss T.; Bácskay I.; Fenyvesi F.; Fehér P.; Váradi J.; Ujhelyi Z.; Vecsernyés M. Host-guest complexation of silymarin and cyclodextrin complexation. Academic Days of Arad, The XXIth Edition, 20-22 May 2011.

Bácskay I.; Fenyvesi F.; Fehér P.; **Kiss T.;** Váradi J.; Ujhelyi Z.; Vecsernyés M. Pharmaceutical and cosmetic formulation of silymarin and Silybum Marianum seed oil. Academic Days of Arad, The XXIth Edition, 20-22 May 2011.

Fenyvesi F.; Bácskay I.; Fehér P.; **Kiss T.;** Váradi J.; Ujhelyi Z.; Vecsernyés M. Nanopharmaceutical formulation of drugs. Academic Days of Arad, The XXIth Edition, 20-22 May 2011.