

Egyetemi doktori (Ph.D.) értekezés tézisei

**ÚJ GENERÁCIÓS β -CIKLODEXTRINEK SEJTMEMBRÁNRA,
ILLETVE A TAXOL, MINT BCS IV. TÍPUSÚ FARMAKON
TRANSPORTJÁRA GYAKOROLT HATÁSÁNAK *IN VITRO*
VIZSGÁLATA**

Kiss Tímea

Témavezető: Dr. Vecsernyés Miklós



DEBRECENI EGYETEM

Gyógyszerészeti Tudományok Doktori Iskola

Debrecen, 2011

**ÚJ GENERÁCIÓS β -CIKLODEXTRINEK SEJTMEMBRÁNRA,
ILLETVE A TAXOL, MINT BCS IV. TÍPUSÚ FARMAKON
TRANSPORTJÁRA GYAKOROLT HATÁSÁNAK *IN VITRO*
VIZSGÁLATA**

Értekezés a doktori (Ph.D.) fokozat megszerzése érdekében
a gyógyszerészeti tudományok tudományágban

Írta: Kiss Tímea okleveles gyógyszerész

Készült a Debreceni Egyetem Gyógyszerészeti Tudományok doktori iskolája
(Farmakológia programja) keretében

Témavezető: Dr. Vecsernyés Miklós

A doktori szigorlati bizottság: elnök: Prof. Dr. Gergely Lajos, az MTA doktora
tagok: Prof. Dr. Halmos Gábor, Ph.D.

Dr. Antal István, Ph.D.

A doktori szigorlat időpontja: 2011. október 25. 11:00

Az értekezés bírálói: Prof. Dr. Vereb György az MTA doktora
Dr. Vastag Mónika, Ph.D.

A bírálóbizottság: elnök: Prof. Dr. Gergely Lajos, az MTA doktora
tagok: Dr. Antal István, Ph.D.

Prof. Dr. Halmos Gábor, Ph.D.

Dr. Vastag Mónika, Ph.D.

Prof. Dr. Vereb György az MTA doktora

Az értekezés védésének időpontja:

2011. október 25. 12:30 I. sz. Belgyógyászati Klinika tanterme

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. A Biofarmáciai Osztályozási Rendszer (BCS) szerint a hatóanyagok oldhatóságuk és membrán permeabilitásuk alapján négy csoportba sorolhatók:

- 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. 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.

A legnagyobb kihívást a IV. osztályba tartozó farmakonok per os formulációja jelenti, pedig vannak olyan IV. osztályba gyógyszerceportok, 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.

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

Ciklodextrinek

A szénhidrátok közé tartozó keményítő fontos alkotó eleme szinte minden élő szervezetnek, építőelemei az amilóz és az amilopektin. Ezen két makromolekula glükopiranoz egységek százaiból épül fel. 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). Három alaptípus keletkezik a gyűrűvé záródás során a leggyakrabban: α -CD, β -CD, γ -CD. 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.

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, oldallancát, 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 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 CD típusonként rendkívül eltérő lehet. Ez a különbség a membránkomponensekre gyakorolt különböző mértékű szolubilizációs hatás miatt adódik. A CD-ek a 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, jelentősen megnövekedik a sejtmembrán fluiditása. Ez a folyamat a sejt széteséséhez vezethet.

Gyógyszertechnológiai szempontból a β -CD származékok a legjelentősebbek. Sokféle β -CD-t szintetizáltak annak érdekében, hogy a tökéletesítsék a fizikai-kémiai paramétereiket, illetve csökkentsék a toxikus hatások számát és mértékét.

Taxol és a CD-ek

A paclitaxel, más néven taxol széles körben elterjedt daganatellenes szer. Szubnanomoláris koncentrációban a taxol hatására a mikrotubulusok polimerizációjának fokozásával és bontásuk gátlásával rendkívül statikus, nagy mennyiségű diszfunkcionális mikrotubulus képződik. Az így keletkezett statikus mikrotubulusok vezetnek a sejt halálához, mivel sem az interfázis folyamatai, sem a sejtosztódás nem tud végbemenni. 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 taxol ismert P-glikoprotein (Pgp) szubsztrát. Az MDR-ABC transzporterek (**multi drug resistance – ATP binding cassette**) biztosítják a „kémiai immunitást” a sejtek, szövetek számára. Ezek a transzporterfehérjék szelektíven szabályozzák a sejtbe illetve a sejtből történő anyagforgalmat. Meggátolják a xenobiotikumok illetve bomlástermékeiknek felhalmozódását a szövetekben. Az Pgp másnéven MDR1 (ABCB1) e kémiai immunitást biztosító transzporter-család jelentős tagja.
- A taxol a bélhámsejtek illetve a máj citokróm P450 (CYP 450) enzimjeihez nagy affinitással kötődik, így még a szisztémás hatás elérése előtt jelentős mennyiségű (inaktív) hidrox-, illetve dihidroxipaclitaxel képződik.

Ezek ismeretében a következő utakon lehet javítani a taxol igen csekély, mindössze 1-2%-os orális biohasznosíthatóságán. Az alkalmazott segédanyag vagy hordozórendszer ideális esetben képes növelni az oldékonyságot, gátolja a Pgp működését és esetlegesen a CYP 450 enzimrendszert is. Ezenfelül 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.

A CD-ek alkalmasak a kis vízdékonyságú molekulák oldékonyságának és ezzel együtt a biohasznosíthatóságának növelésére. A taxollal történő komplexképzés terén leghatékonyabbnak a metil- β -CD-ek bizonyultak (90%-os hatékonyság). A β -CD-ek lipofil anyagok oldékonyságát növelő hatása mellett az irodalomban található a β -CD-ek Pgp működésére gyakorolt hatásáról is adatokat, mely felveti alkalmazásuk lehetőségét kemoterapeutikumok orális gyógyszerkészítményként való formulálásában. Ebből adódóan több kutatócsoport is tanulmányozta a komplexálási tulajdonságukon kívül a biztonságosságukat, ám az új típusú CD-ek a szervezetre gyakorolt hatásainak és toxicitásának ismeretei hiányosak.

Sejtkultúrák, Caco-2

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 toxicitása, illetve farmakokinetikai tulajdonsága. Ilyen sejtvonal a Hela sejtvonal, mely humán cervix carcinoma eredetű. Mivel könnyen tenyészthető, alkalmas a farmakonok, segédanyagok előzetes tesztelésére. A Caco-2 sejtvonal humán colon adenokarcinoma eredetű. Ezt a sejttípust 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, segítségével tanulmányozható az intesztinális epitheliumon keresztüli transzport-folyamatok mindegyike. A monolayer polarizált enterocitákból áll. A differenciálódott sejtek apikális felszínét mikrovillusok borítják, és a sejtmembránjukban megtalálhatóak ugyanazon aktív transzporterek, mint a humán jejunumban. A monolayert alkotó sejtek közötti szoros kapcsolatot a szoros junctionok biztosítják.

CÉLKITŰZÉS

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 tulajdonságait.

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.

ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

A ciklodextrinek

A kísérletek során számos β -CD származék hatását vizsgáltuk. A Rameb (Random metil- β -ciklodextrin) a Wacker Chemie-től (Németország), a Crysmeb (Metilezett- β -ciklodextrin) 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.

A sejtenyésztés

A Hela sejtvonala

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)% tripszin-0,02(m/v)% EDTA-oldatot [0,5 g/l tripszin (Sigma-Aldrich, Magyarország); 0,2 g/l EDTA (Sigma-Aldrich, Magyarország)] alkalmazva a sejtek felválasztásához.

A Caco-2 sejtvonala:

Vizsgálataink során a Hela sejtvonala 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)% tripszin 0,02(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.

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 megszürték, 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.

Az MTT-teszt

Az MTT tesztet sejttípusoknak megfelelően két protokoll alapján végeztük:

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 µl 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 sejttörmelék 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 sejttörmelék 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.

A Caco-2 sejt vonal

A vizsgált β -CD-ek Caco-2 sejtekre gyakorolt hatását MTT teszttel vizsgáltuk. 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 formazán 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).

A hemolitikus aktivitás vizsgálata

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.

A Caco-2 transzport modell kialakítása, jellemzése

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 vizsgálatához a sejteket Transwell® (Corning Costar, USA) polikarbonát inzertre helyeztük (0,4 μ m pórusméret, 2×10^5 sejt/inzert). A sejtek tenyésztése a sejttenyésztés 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 monolayert alkottak. A monolayer kialakulását transzepitheliális elektromos ellenállás (TEER) méréssel követtük nyomon (Millicell-ERS voltohmmeter, Millipore, USA). A mért TEER értéket az alábbi egyenlet alapján korrigáltuk:

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

A transzport modell jellemzése ismert permeabilitású vegyületek segítségével

A transzport vizsgálatok során 1000 Ohm \times cm² feletti TEER értékű monolayereket használtunk, 3 párhuzamos mérést végeztünk. A jellemzés során ismert humán abszorpciójú, vegyületek átjutását vizsgáltuk a monolayeren keresztül. Az inzerteket HBSS-ben (Hanks' Balanced Salt Solution; Sigma 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 (Papp) a következő képlet alapján határoztuk meg:

$$\text{Papp} = \text{dQ/dt} \times 1/(\text{C}_{\text{null}} \times \text{A})$$

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

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

A = effektív felszín (cm²)

A Papp értékek tízes alapú logaritmusának függvényében ábrázoltuk a humán abszorpció értékeit.

[³H]-taxol permeabilitásának vizsgálata

A vizsgálatok előtt az inzerteket HBSS oldatban mostuk és inkubáltuk 37 °C-on 30 percig. A monolayerek 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 (Szukcinil-metil-β-ciklodextrin), MaRameb (Metil-6-monodeoxi-6-monoamino-β-ciklodextrin) 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 (Amersham USA) 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 térfogatot 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]mannitol 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 térfogatot 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 $\mu\text{Ci/ml}$ [^3H]taxol, illetve 0,5 $\mu\text{Ci/ml}$ [^{14}C]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 térfogatot 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 $\mu\text{Ci/ml}$ [^3H]taxol, illetve 0,5 $\mu\text{Ci/ml}$ [^{14}C]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 térfogatot 20 mM CD oldattal pótoltuk. A Pgp gátlás vizsgálatánál a 10 μM ciklosporin A-t (CSA; Sigma-Aldrich, Magyarország), mint ismert Pgp inhibitor 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}) határoztuk meg.

Immunohisztokémia

A vizsgálathoz a sejteket Transwell® (Corning Costar, USA) poliészter filterre helyeztük (0,4 µm pórusméret, 2×10^5 sejt/filter). A sejtek tenyésztése a sejtenyésztés 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-Aldrich, Magyarország) primer antitestek 5 µg/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 µg/ml), illetve sejtmagfestésre alkalmas bis-benzimiddel (Sigma-Adrich, Magyarország) (10 µM) inkubáltuk a sejteket további 1 órán keresztül. A festett sejtekkel együtt az inzertek membránját tárgylemezre rögzítettük Gel Mount-tal (Biomedica, USA), majd Nikon Eclipse TE2000 fluoreszcenciás mikroszkóppal tanulmányoztuk (Nikon Japán), Spot RT digitális kamerával fényképeztük (Diagnostic Instruments, USA).

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.

EREDMÉNYEK ÉS MEGBESZÉLÉS

Koleszterinoldó képesség

Megvizsgáltuk a különböző metil- β -CD-ek koleszterinoldó képességét a szubsztituáltság szemszögéből. 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 szubsztituenst tartalmazó Dimeb-nél éri el a maximumot, a további metil-csoportok nem emelik a koleszterin koncentrációját. 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 koncentrációkat 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 0,1 mg/ml érték alá. Ilyen alacsony értékű koleszterinoldással rendelkezik a SPDimeb (Szulfopropil-heptakis(2,6-di-O-metil)- β -ciklodextrin) a CMDimeb (Karboximetil-heptakis(2,6-di-O-metil)- β -ciklodextrin nátrium sója) és a CMHE-Dimeb (Karboximetil-hidroxietyl-heptakis(2,6-di-O-metil)- β -ciklodextrin).

A vizsgált nem-metilezett β -CD-ek esetében, úgymint a HPBCD (Hidroxiopropil- β -ciklodextrin), QABCD (Kvaterner amino- β -ciklodextrin), CMBCD (Karboximetil- β -ciklodextrin), amelyek hidroxipropil, trimetilamino vagy karboximetil szubsztituenst tartalmaznak, jóval kisebb koleszterin-

koncentrációt eredményeztek: $0,32 \pm 0,01$; $0,050 \pm 0,002$ és $0,055 \pm 0,005$ mg/ml.

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 hatásainak 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 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, de a vegyületek szerkezetét és koleszterinoldó képességét a citotoxicitás összefüggésében eddig még nem vizsgálták. 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 csoportok jelenlététől függnek.

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 (Heptakis(2,3,6-tri-O-metil)- β -ciklodextrin), 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-ekéhez 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 hatásuk 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. A lipid kompartmentek, főleg a koleszterin kivonása a sejtmembránból a sejt széteséséhez vezethet.

Ezt a hipotézist alátámasztja az a megfigyelésünk, melyben a legtoxikusabbnak mutatózó Rameb illetve Dimeb koleszterinnel alkotott komplexeinek citotoxicitását vizsgáltuk. Kísérleteink során ezek a koleszterin 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 a citotoxicitása, hemolitikus aktivitása között.

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.

Caco-2 transzport modell és permeabilitási vizsgálatok

Caco-2 transzport 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. A modell működésének alapfeltétele a monolayer kialakulása, mely az inzertre való kiültetés 15. napjára megtörtént. Ezt igazoltuk transzepitheliális elektromos ellenállás méréssel (TEER), illetve paracelluláris markerek permeabilitásának vizsgálatával. A TEER értékek a 15. napig emelkedtek, majd az ezt követő plató fázisban végeztük el a transzport kísérleteket $1000 \text{ Ohm} \times \text{cm}^2$ TEER érték felett. A modell további 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.

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 nem kielégítő felszívódásának és inadekvát disztribúciójának hátterében az intesztinális epitheliális sejtek membránjában, illetve agyi kapillárisokban expresszáldó aktív efflux transzporterek (pl. Pgp) működése áll. Transzport

modellünk kifejezett barrier funkcióját a magas TEER értékek, a paracelluláris markerek alacsony permeabilitási értékei jelzik, tehát az általunk kialakított modell alkalmas a Rameb és származékainak taxol permeabilitására gyakorolt hatásának tanulmányozása, amelyet még eleddig nem vizsgáltak.

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. 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. 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. 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 inhibitor, 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. 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. 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 hátterében 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

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:

1. Növelik a taxol oldékonyságát
2. A membrán lipid-összetételét modulálva permeabilizálják a membránt
3. A szoros junkcionális proteinek működését változtatják meg
4. Gátolják az efflux pumpák működését

A Rameb taxolra gyakorolt oldékonyság növelő hatását Bouquet és mtsi is megfigyelték. 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. A mi kísérleteink során a [³H]taxol (15 nM) és a CD (20 mM) molaránya 1:1000000 volt, amely biztosította a 100%-os komplexálást. 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 vízóldékonyságú taxolt oldatban tartani, 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 vízdékony molekulát. 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, többek között az enterocyták lumenális membránjában megtalálható CYP-2C-t, amely felelős a taxol-ból a vízdékony, inaktív 6- α -OH-paclitaxel metabolit képzéséért.

A β -CD-ek koleszterint vonnak ki a sejtmembránból. A sejtmembrán koleszterin szintjének csökkenése következtében az ATPase enzim aktivitása is lecsökken. A Pgp aktív efflux transzporter az ATP hidrolíziséből származó energiát hasznosítja. Ebből adódóan a lecsökkent ATPase aktivitás csökkent Pgp aktivitást von maga után. Ezáltal β -CD-ek hatására sejtmembránban bekövetkező változások elősegíthetik a Pgp-szubsztrátok átjutását a lipid kettősrétegen. 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. A sejtmembrán összetételének modulálása révén a β -CD-ek jelenléte az epitheliális barrier funkció változását is eredményezheti. Az apikális junkcionális komplex (AJC) biztosítja az epitheliális sejtek szoros kapcsolatát, illetve a sejtek polaritását. A szoros junkció a legjelentősebb alkotója az AJC-nek, amely szabályozza a paracelluláris anyagáramlást. 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. A Rameb és származékai barrier

funkcióra gyakorolt hatásának vizsgálatához TEER méréseket, és paracelluláris permeabilitás mérést végeztünk, illetve a monolayert alkotó Caco-2 sejtek közötti zonula occludens fehérjét immunfestés segítségével fejtettük meg. A TEER érték a Rameb esetében szignifikánsan csökkent a kontrollhoz viszonyítva, viszont még így is $1000 \text{ Ohm} \times \text{cm}^2$ felett maradt. Ez a változás a paracelluláris transzport vizsgálata során nem tükröződött, ellenben a szoros junctionális fehérjék redistribúciója megfigyelhető volt. A megfestett szoros junctionó 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 junctionális fehérjék, ellenben a citoszol területén ponszerű festődéseket detektáltunk, melyek internalizációra utalnak. A Rameb hatására végbemenő szoros junctionális 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 junctionális 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*.

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 összefügghet a barrier funkciók csökkenésével. A Rameb ionos származékai a monolayer barrier funkcióját és a szoros junctionokat 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.



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

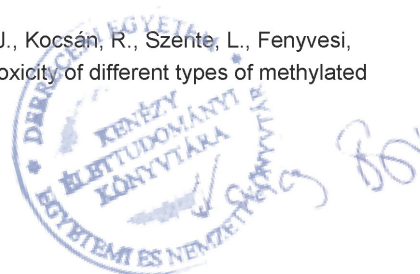
Jelölt: Kiss Tímea

Neptun kód: LZME2Y

Doktori Iskola: Gyógyszerészeti Tudományok Doktori Iskola

A PhD értekezés alapjául szolgáló közlemények

1. Fenyvesi, F., **Kiss, T.**, Fenyvesi, É., Szente, L., Veszélka, 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 Adrenocorticotrophic 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., Szente, 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



POSZTEREK

Fenyvesi F., **Kiss T.**, Dr. Bácskay I., Fodor Z., Fehér P., Váradi J., Dr. Fenyvesi É., Dr. Szente 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., Szente 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., Szente 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., Veszelka 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.

A munka a felsoroltak támogatásával készült el:

- NKFP-1A-041/2004.
- HURO/0901/058/2.2.2.

