

# INAUGURAL-DISSERTATION

zur Erlangung der Doktorwürde  
der Naturwissenschaftlich-Mathematischen Gesamtfakultät  
der  
Ruprecht-Karls-Universität  
Heidelberg

vorgelegt von  
Apotheker  
Markus Greulich  
aus Mannheim

Tag der mündlichen Prüfung: 12. Dezember 2003

**EINFLUSS VON TENSIDEN  
AUF DIE RESORPTION  
VON SUBSTRATEN  
DER ABC-TRANSPORTPROTEINE**

Gutachter: Prof. Dr. Gert Fricker  
Prof. Dr. Helga Oeser

Meinen Eltern

Die vorliegende Arbeit wurde am Institut für Pharmazie und Molekulare Biotechnologie (Abteilung Pharmazeutische Technologie und Biopharmazie) der Universität Heidelberg angefertigt.

Mein Dank gilt:

Herrn Prof. Dr. Gert Fricker für die interessante Fragestellung und die gute Betreuung bei ausreichendem wissenschaftlichen Freiraum, die stete Ansprechbarkeit und die Anregungen bei der Bearbeitung des Themas.

Frau Prof. Dr. Helga Oeser für die Anfertigung des Zweitgutachtens.

Frau Dr. Roos Masereeuw (Center for Molecular Life Sciences, Nijmegen) für den MRP2-Antikörper.

Herrn Priv.-Doz. Dr. Massing für die Überlassung des Fluoreszenzspektrometers zur Anisotropiemessung.

Für die Teilnahme am Ringversuch zur Standardisierung des Caco-2-Modells:  
Across Barriers GmbH  
Zentrallaboratorium Deutscher Apotheker, Eschborn  
Center for Drug Evaluation and Research, Food and Drug Administration, Rockville  
Institut für Biopharmazie und Pharmazeutische Technologie der Universität des Saarlands

Vito, Tilo und Martin für die Lösung sämtlicher Computerprobleme.

Susanne für die Einarbeitung in den Umgang mit den Caco-2-Zellen.

Melanie für die Hilfe mit den Gehirnkapillarendothelzellen.

Allen Kollegen für die tolle Arbeitsatmosphäre, die gute Stimmung am Institut und auch bei sonstigen Unternehmungen.

Björn für gute Anregungen beim Forschen.

Jörg und Annette für die freundschaftliche Atmosphäre im gemeinsamen Labor.

Annette außerdem für die guten Ratschläge in allen Lebenslagen.

Meinen Eltern für die ständige Unterstützung während Studium und Promotion.

Sandra für die Hilfe bei der Suche nach Rechtsschreibfehlern, für die liebevolle Unterstützung beim Schreiben der Arbeit und dafür, dass sie immer für mich da ist.

Teile dieser Arbeit wurden präsentiert in:

Markus Greulich and Gert Fricker

*Interaction of Surfactants with ABC-Transportproteins*

Jahrestagung der Deutschen Pharmazeutischen Gesellschaft, Berlin, Oktober 2002

Markus Greulich and Gert Fricker

*Interaction of Surfactants with ABC-Transportproteins*

Frühjahrstagung der Deutschen Gesellschaft für experimentelle und klinische Pharmakologie und Toxikologie, Mainz, März 2003

Markus Greulich and Gert Fricker

*Influence of Surfactants on Transport Activity of ABC-Proteins*

International Meeting Pharmaceutics, Biopharmaceutics and Pharmaceutical Technology, Nürnberg

## **Zusammenfassung:**

Markus Greulich, Apotheker, 12.12.2003

Einfluss von Tensiden auf die Resorption von Substraten der ABC-Transportproteine

Referent : Prof. Dr. Gert Fricker

Koreferent: Prof. Dr. Helga Oeser

### 1. Standardisierung des Caco-2-Modells:

Das Caco-2-Modell ist das am weitesten verbreitete Resorptionsmodell. Zur Verbesserung der Vergleichsmöglichkeiten von Ergebnissen, die in verschiedenen Laboratorien erhalten werden, wurden in einem Ringversuch unter Teilnahme von fünf Einrichtungen die Permeabilitätseigenschaften von ausgewählten Substanzen unter Einhaltung vorher festgelegter Versuchsvorschriften bestimmt. Der Vergleich zeigte keine Übereinstimmung der Absolutwerte der Permeabilitätskoeffizienten. Es wurde jedoch eine einheitliche Einstufung in bezug auf die Permeabilitätseigenschaften der Substanzen vorgenommen. Zusätzlich wurde eine unterschiedliche Expression der aktiven Transportproteine, p-gp und MRP2 festgestellt. Dies stellt auch das größte Problem der Standardisierung des Modells dar.

### 2. Einfluss von Tensiden auf die Resorption von Arzneistoffen:

Zahlreiche Arzneistoffe haben eine schlechte Bioverfügbarkeit, weil ihre intestinale Resorption durch die Transportaktivität von Exportproteinen, z.B. p-gp und MRP2, eingeschränkt ist. Der Einfluss einer Reihe von Tensiden auf die Transportaktivität beider Proteine wurde im Caco-2-Modell untersucht. Viele Tenside inhibierten den Transport durch p-gp, wobei die Poloxamere, z.B. Pluronic P85, die größte Wirkung zeigten. Einige Tenside hemmten den Transport durch MRP2. Hierbei waren Cremophor RH40 und Solutol HS15 am effektivsten.

Nach Bestimmung der Kritischen Mizellbildungskonzentration zeigte sich, dass die effektivsten Tensidkonzentrationen im Bereich der CMC liegen, was für eine Aktivität der einzelnen Tensidmoleküle und nicht der Mizellen spricht.

Die untersuchten Tenside verursachten eine Erniedrigung der Membranfluidität der Zellen. Dies kann zur Hemmung der Aktivität der Transportproteine beitragen. Es konnte jedoch kein Unterschied zwischen mehr oder weniger wirksamen Tensiden festgestellt werden.

Die Tenside zeigten in den wirksamen Konzentrationen keine Toxizität, was in zwei Toxizitätsstudien gezeigt werden konnte.

Eine Resorptionsverbesserung von Arzneistoffen, die von p-gp und MRP2 transportiert werden, scheint durch Zugabe der wirksamen Tenside möglich zu sein.

## Summary:

Markus Greulich, Apotheker, 12.12.2003

### Influence of Surfactants on Absorption of Substrates of ABC-Transportproteins

Supervisor: Prof. Dr. Gert Fricker  
Co-Supervisor: Prof. Dr. Helga Oeser

#### 1. Standardisation of the Caco-2 model:

The Caco-2 model is the most common model for investigation of intestinal drug absorption. In a study with participation of five laboratories the permeability characteristics of a set of chosen drugs was determined under previously defined standard operating procedures to improve the possibility of interlaboratory comparison of results obtained with this model. The comparison showed a variation in absolute permeability coefficients, but all groups determined a common ranking in the permeability of the chosen drugs. In addition, altering expression of transport proteins, p-gp and MRP2, could be observed which seems to be the greatest problem in the standardisation of the Caco-2 model.

#### 2. Influence of surfactants on absorption of drugs:

Many drugs have a low oral bioavailability because their intestinal absorption is limited by the transport activity of export proteins. e.g. p-gp and MRP2. The influence of a range of surfactants on transport activity of both proteins was investigated using the Caco-2 model. Many surfactants caused an inhibition of p-gp, with poloxameres, e.g. Pluronic P85, showing the greatest effect. A few surfactants caused an inhibition of MRP2, hereby Cremophor RH40 and Solutol HS15 showed the most pronounced effect.

After determination of the critical micellization concentration of surfactants it could be observed that the most effective surfactant concentration was in the range of the CMC suggesting inhibiting activity of single molecules rather than micelles. Investigation of influence of all surfactants on membrane fluidity showed a decrease of membrane fluidity. This might affect transport activity of p-gp and MRP2, but a difference between more or less active surfactants could not be determined.

Surfactants did not cause any toxicity in effective concentrations as was shown in two toxicity assays.

Absorption enhancement of drugs transported by p-gp and MRP2 seems to be possible by adding effective surfactants.

<b>1 EINLEITUNG</b>	
<b>1.1. Resorption</b>	1
1.1.1 Epithelzellschicht	2
1.1.2. Resorptionswege	3
<b>1.2. In Vitro Modelle</b>	4
1.2.1. Isoliertes Gewebe	4
1.2.2. Zell-Modelle	5
1.2.3. Isolierte Enterozyten	5
1.2.4. Membranvesikel	5
1.2.5. Zellkulturmodelle	6
1.2.6. Künstliche Membranen	8
1.2.7 Computermodelle	8
<b>1.3. BCS (Biopharmaceutics Classification System)</b>	8
<b>1.4. Aktive Transportproteine</b>	9
1.4.1. ABC- Transportproteine	10
1.4.2. p-Glycoprotein	10
1.4.3. MRP2	12
<b>1.5. Tenside</b>	14
1.5.1. Anionische Tenside	15
1.5.2. Kationische Tenside	15
1.5.3. Amphotere Tenside	15
1.5.4 Nichtionische Tenside	16
<b>1.6. Zielsetzung</b>	17
<b>2 MATERIALIEN UND METHODEN</b>	18
<b>2.1. Caco-2</b>	18
2.1.1. Aufbewahrung	18
2.1.2. Auftauen	18
2.1.3. Kultivierung	18
2.1.4. Passagieren	19
2.1.5. Einfrieren	19
2.1.6. Aufnahmeversuche	19
2.1.7. Transportversuche	20
2.1.8. Auswertung	20
<b>2.2 Immunfärbung</b>	21
<b>2.3. Gehirnkapillarendothelzellen</b>	22
2.3.1. Isolierung	22
2.3.2. Aufnahmeversuche	23
<b>2.4. Bestimmung der kritischen Mizellbildungskonzentration</b>	24
<b>2.5. Anisotropiemessung – Membranfluidität</b>	25



<b>2.6. Zytotoxizitätsversuche</b>	25
2.6.1. Laktatdehydrogenase-Test	25
2.6.2. Alamar Blue-Test	25
<b>2.7. Medien und Puffer</b>	26
<b>2.8. Chemikalien</b>	29
<b>2.9. Materialien</b>	31
<b>2.10. Geräte</b>	32
<b>3 ERGEBNISSE UND DISKUSSION</b>	33
<b>3.1. Ringversuch zur Standardisierung des Caco-2-Modells</b>	33
3.1.1. Einführung	33
3.1.2. Ziel des Ringversuchs	34
3.1.3. Teilnehmende Einrichtungen	34
3.1.4. Durchführung	34
3.1.5. Unterschiede in Kultivierung/Versuchsdurchführung	35
3.1.6. Ergebnisse und Diskussion	36
3.1.7. Zusammenfassung	39
<b>3.2. Nachweis von p-gp und MRP2 in Caco-2-Zellen</b>	40
3.2.1. Immunfärbung	42
<b>3.3. Wechselwirkung von Tensiden mit p-gp (I)</b>	44
3.3.1. Aufnahmeversuche mit Caco-2-Zellen	44
3.3.2. Transportversuche mit Caco-2-Zellen	53
<b>3.4. Wechselwirkung von Tensiden mit MRP2</b>	59
3.4.1. Aufnahmeversuche mit Caco-2-Zellen	59
3.4.2. Transportversuche mit Caco-2-Zellen	67
<b>3.5. Wechselwirkung von Tensiden mit p-gp (II)</b>	74
3.5.1. Aufnahmeversuche mit Gehirnkapillarendothelzellen	74
<b>3.6. Kritische Mizellbildungskonzentration (CMC) von Tensiden</b>	76
<b>3.7. Membranfluidität</b>	79
3.7.1. Einfluss von Tensiden auf die Membranfluidität von Caco-2-Zellen	79
<b>3.8. Zytotoxizitätsuntersuchungen</b>	82
3.8.1. Laktatdehydrogenase-Test	82
3.8.2. Alamar Blue- Test	85
<b>4 ZUSAMMENFASSUNG UND AUSBLICK</b>	89
<b>5 LITERATURVERZEICHNIS</b>	91

## Abkürzungsverzeichnis

ab	Transport von der apikalen zur basolateralen Seite
ba	Transport von der basolateralen zur apikalen Seite
TEER	transepithelial electrical resistance
p-gp	p-Glycoprotein
MRP	multidrug resistance related protein
BA	Benzylalkohol
KRB	Krebs-Ringer buffer
HBSS	Hank's Balanced Salt Solution
$P_{app}$	apparenter Permeabilitätskoeffizient
BCS	Biopharmaceutics Classification System
AB	Acrsoo Barriers GmbH
UdS	Universität des Saarlands
Uni HD	Universität Heidelberg
FDA	Food and Drug Administration
ZL	Zentrallaboratorium Deutscher Apotheker
DSMZ	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH
ATTC	American Type Culture Collection
FCS	fetal calf serum
FITC	Fluoreszein-Isothiocyanat
TPGS	$\alpha$ -Tocopheryl Polyethylene Glycol1000 Succinat
CrRH40	Cremophor RH40
SoHS15	Solutol HS15
Cr EL	Cremophor EL
T80	Tween 80
P 85	Pluronic P85
L 44	Pluronic L44
L64	Pluronic L64
F68	Pluronic F68
CMC	Critical Micellization Concentration
MDR	Multi Drug Resistance
PBS	phosphate buffered saline
DPH	1,6-Diphenyl-1,3,5-hexatrien
BSA	Bovine Serum Albumin
NAD	Nicotinamid-adeninucleotid
LDH	Lactatdehydrogenase
PBCEC	porcine brain capillary endothelial cells
kCSF	künstliche Cerebrospinalflüssigkeit
EDTA	Ethylendiamintetraacetat

## **1 Einleitung**

Die orale Gabe ist nach wie vor der bevorzugte Applikationsweg für Arzneimittel, da für den Erfolg einer Arzneimitteltherapie die Patientencompliance von entscheidender Bedeutung ist. Die Einnahme eines Arzneimittels ist für den Patienten auf diesem Weg am angenehmsten. Bei jedem anderen Applikationsweg, z.B. dem parenteralen oder rektalen, nimmt die Bereitschaft zur Arzneimitteleinnahme stark ab, was einer erfolgreichen Therapie oft im Wege steht. Eine ausreichende Bioverfügbarkeit nach oraler Einnahme ist deshalb für Arzneimittel äußerst wichtig. Der Hauptresorptionsort für Arzneistoffe nach oraler Gabe ist der Dünndarm. Die wichtigste Barriere, die ein Arzneistoff hierbei überwinden muß, ist das Dünndarmepithel. Für eine Reihe von Wirkstoffen ist dies allerdings nur in eingeschränktem Ausmaß möglich, da sie von im Dünndarmepithel befindlichen aktiven Transportproteinen in das Darmlumen zurück befördert werden und somit den Blutstrom nicht erreichen. Dies führt zu einer schlechten Bioverfügbarkeit. Arzneiformen, die zur oralen Gabe zur Verfügung stehen, sind u.a. Tabletten, Kapseln, Granulate, Lösungen, Emulsionen und Suspensionen. Diese Formulierungen enthalten oft pharmazeutische Hilfsstoffe, z.B. Tenside als Lösungsvermittler oder Emulgatoren. Laut Definition werden Hilfsstoffe als physiologisch inert betrachtet. Durch Wechselwirkungen mit aktiven Transportproteinen können sie allerdings aktiv in den Resorptionsvorgang eingreifen. Dieser Effekt könnte dazu ausgenutzt werden, die Bioverfügbarkeit nach oraler Applikation einiger dieser Problemwirkstoffe zu verbessern. Diese Wechselwirkung kann sich allerdings auch nachteilig auswirken, falls diese Eigenschaft von Tensiden als eigentlich physiologisch inert eingeschätzten Hilfsstoffen bei der Rezepturentwicklung unterschätzt wird.

### **1.1 Resorption**

Der Hauptresorptionsort für Nährstoffe, wie z.B. Elektrolyte, Monosaccharide, Aminosäuren, Di- und Tripeptide oder Vitamine, aber auch für Arzneistoffe, ist der Dünndarm. Er ist ein schlauchförmiges Organ, bestehend aus der Serosa, die sich aus Längs- und Ringmuskulatur zusammensetzt, und der Mukosa, die sich aus einer Muskelschicht und der Epithelzellschicht zusammensetzt. Die Epithelzellschicht bildet die Grenze zum Darmlumen und stellt somit die wesentliche Resorptionsbarriere dar. Um seine Funktion als Hauptresorptionsorgan für Nährstoffe erfüllen zu können, benötigt der Dünndarm eine sehr große Oberfläche. Dies wird durch die Auffaltung der Darmwand, Ausstülpungen der Epithelzellschicht und durch die Ausbildung von Microvilli der Epithelzellen erzielt (Thews, 1999).

### 1.1.1 Epithelzellschicht:

Die Epithelzellschicht besteht aus verschiedenen, ca. 20 µm hohen Zellen. In den Krypten der Zotten liegen die Zellen noch undifferenziert vor. Die Zellen wandern vom Boden der Krypten bis zur Spitze der Zotte und unterlaufen dabei eine Differenzierung zu verschiedenen Zelltypen. An der Spitze der Zotte werden sie abgeschilfert, wodurch eine ständige Regenerierung der Zellschicht stattfindet. Durchschnittlich wird so die Epithelschicht alle drei bis sechs Tage vollständig erneuert.

Die weitaus häufigste Zellart des Dünndarmepithels stellt der Enterozyt dar. Er ist damit auch der für den Resorptionsvorgang wichtigste Zelltyp.

Enterozyten sind säulenförmige, stark polarisierte Zellen von ca. 20µm Höhe. Charakteristisch auf der apikalen Seite ist die Bürstensaummembran, die von den Mikrovilli mit ca. 1µm Höhe gebildet wird, und die für die Resorption notwendige Oberflächenvergrößerung sorgt. Zusätzlich befindet sich hier zum Schutz der Epithelzellschicht die Glykokalix, eine ca. 500 nm dicke Glycoproteinstruktur, die kovalent an die Zellmembran gebunden ist. Durch sie wird die Mucusschicht, die aus Wasser, Glycoproteinen, Elektrolyten und Proteinen besteht und die gesamte Epithelzellschicht bedeckt, an die Oberfläche gebunden. Die Mucusschicht ist ca. 100-500 µm dick und ist Bestandteil des unstirred water layer (unbewegte Wasserschicht). Ein weiteres wichtiges Merkmal ist die Ausbildung von tight junctions, die durch die Verknüpfung der Zellen miteinander durch spezielle Proteine (z. B. Occludin und Claudin 1-6) gebildet werden und die für einen dichten Abschluss der Zellschicht gegenüber dem Lumen sorgen (Tsukita et al., 1999,2001). In der apikalen und basolateralen Membran befinden sich außerdem aktive Transportproteine, die für die Resorption von Nährstoffen, Elektrolyten, aber auch von Arzneistoffen wichtig sind ( Madara et al., 1987; van Hoogdalem et al., 1989, Armstrong, 1987).

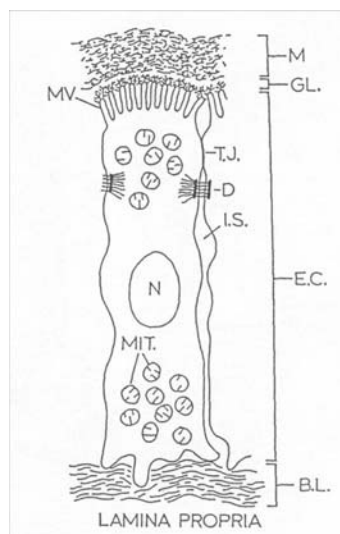


Bild 1: Enterozyt (Hillgren et al., 1995): M-Mucus, GL-Glykokalix, MV-Microvilli, T.J, tight junctions, D-Desmosom, IS-Intrazellularraum, N-Zellkern, MIT-Mitochondrien, E.C.-Enterozyt, B.L-Basalmembran

### 1.1.2 Resorptionswege:

Um vom Darmlumen in den Blutstrom zu gelangen, muss ein Arzneistoff die apikale und basolaterale Membran der Dünndarmepithelschicht überwinden. Diese Membranen bestehen aus Phospholipiddoppelschichten, und stellen somit eine lipophile Barriere dar. Ein Arzneistoff muß deshalb ausreichend lipophile Eigenschaften besitzen, um sich in die Lipidschicht einlagern zu können. Andererseits sind aber auch hydrophile Eigenschaften notwendig, da nur in Lösung befindliche Arzneistoffe resorbiert werden können. Ein erstes Hindernis auf dem Weg vom Darmlumen zur Epithelzellschicht stellen bereits der unstirred water layer und die Mucusschicht dar. Da es sich hierbei um eine wässrige Schicht handelt, kann es besonders für lipophile Arzneistoffe schwierig sein, in diese Schicht einzudringen. Auch eine Bindung an die Mucusschicht kann unter Umständen zu einer verminderten Resorption führen (Martinez et al., 2002; Jackson, 1987).

Es gibt verschiedene Wege, wie Stoffe die Barriere der Dünndarmepithelzellschicht überwinden können (Hillgren et al., 1995; Lennernäs, 1997).

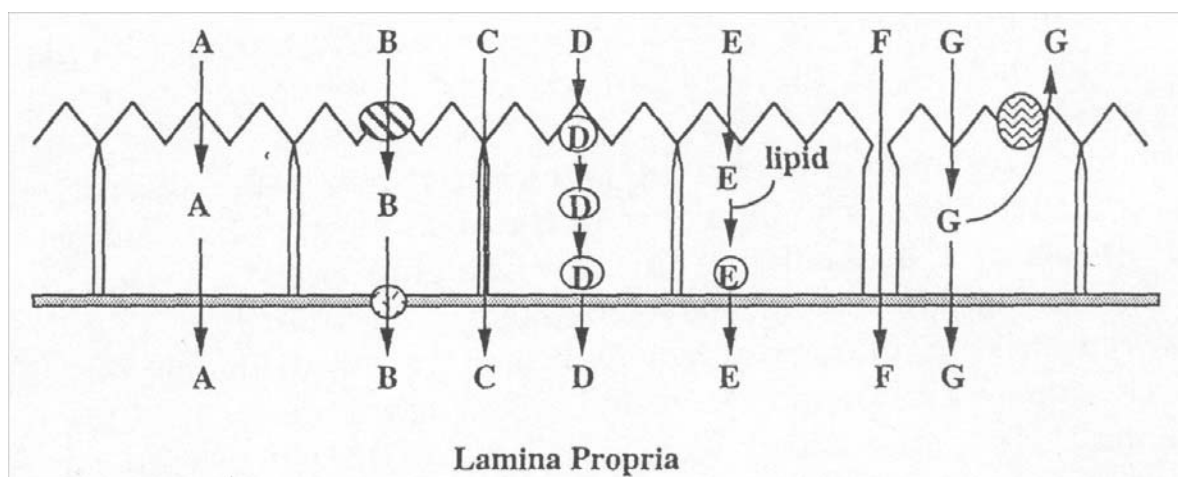


Bild 2: Resorptionswege (Hillgren et al., 1995)

#### 1.1.2.1 *Transzelluläre Passive Diffusion :*

A: Der für viele Arzneistoffe wichtigste Transportweg ist passive transzelluläre Diffusion. Hierbei diffundiert der Wirkstoff passiv aufgrund des Konzentrationsgefälles zwischen apikaler und basolateraler Seite der Zellschicht durch beide Membranen. Die so resorbierten Arzneistoffe müssen eine ausreichende Lipophilie besitzen.

#### 1.1.2.2 *Transporter-vermittelte transzelluläre Diffusion:*

B: Durch ihre Ähnlichkeit zu Nährstoffen, die durch einen aktiven Transport resorbiert werden, wie z. B. Dipeptide, sind einige Arzneistoffe Substrate dieser Transporter und können so aktiv durch die apikale Membran geschleust.

### **1.1.2.3 Parazelluläre Passive Diffusion:**

C: Dieser Resorptionsweg ist bei Vorhandensein eines intakten Epithels für Arzneistoffe von untergeordneter Bedeutung. Durch die Ausbildung von tight junctions, die im Dünndarmepithel stark ausgeprägt ist, kommt es zu einem dichten Abschluss der Epithelzellschicht gegenüber dem Darmlumen. Die tight junctions nehmen außerdem nur 0,01% der Dünndarmoberfläche ein, dadurch ist die Oberfläche, die dem parazellulären Transportweg zur Verfügung steht, sehr klein. Es besteht jedoch die Möglichkeit die tight junctions, z. B. durch die Applikation von Resorptionenhancern, teilweise zu öffnen. Auch eine pathologische Veränderung der tight junctions kann zu einem teilweisen Verlust der Barrierefunktion der Zellschicht führen. In diesen Fällen hat der parazelluläre Transportweg einen entscheidenden Anteil an der Gesamtresorption von Arzneistoffen (F).

### **1.1.2.4 Vesikulärer Transport:**

D, E : Eine weitere Möglichkeit der Resorption von Arzneistoffen ist der Transport in Membranvesikeln, die sich an der apikalen Membran abschnüren und den Wirkstoff auf der basolateralen Seite freigeben (Endozytose). Für Arzneistoffe ist dieser Resorptionsweg ist aber ebenfalls von untergeordneter Bedeutung.

### **1.1.2.5 Transzelluläre Passive Diffusion unter Einfluss von polarisierten Effluxmechanismen:**

G: Dies ist ein Sonderfall der passiven transzellulären Diffusion. Die Arzneistoffe diffundieren passiv durch beide Membranen, sind aber Substrate von apikal lokalisierten aktiven Transportproteinen, die die Wirkstoffe unter Energieverbrauch zurück in das Darmlumen transportieren. Somit gelangt nur ein kleiner Teil der Arzneistoffmenge zur basolaterale Seite der Epithelzellschicht, was zu einer schlechten Bioverfügbarkeit führt. Wichtige Transportproteine, die im Dünndarm vorkommen sind u.a. p-Glykoprotein (p-gp) und das Multi-drug-resistance-related Protein 2 (MRP2) (Fricker et al. 2001; Taipalensuu, 2001).

## **1.2 In Vitro-Modelle:**

Es ist von Bedeutung, die Resorptionseigenschaften eines Arzneistoffs zu kennen. Um die Anzahl von Tierversuchen zu verringern und um Reihenuntersuchungen durchführen zu können und dadurch Kosten zu sparen, wurden verschiedene In Vitro-Modelle entwickelt, die zum Ziel haben, die physiologischen Verhältnisse nachzuahmen (Pelkonen et al., 2001; Bohets et al., 2001).

### **1.2.1 Isoliertes Gewebe:**

Es gibt verschiedene Modelle unter Verwendung von isoliertem Dünndarmgewebe, z.B. Schweinedarm. Ein weit verbreitetes Modell ist die Ussing-Kammer, eine Vorrichtung, in die ein Stück Dünndarmgewebe, mit oder ohne Serosa, zwischen

zwei Kammern eingespannt wird. Dieses Modell hat den Vorteil, dass es die physiologischen Bedingungen gut imitiert, und dass man verschiedene Darmsegmente verwenden kann. Nachteile sind die zeitaufwendige Isolierung, die kurze Lebensfähigkeit nach der Isolierung durch die problematische Sauerstoffversorgung des Gewebes, die große benötigte Arzneistoffmenge und die begrenzte Anzahl an pro Isolierung erhaltenen Präparaten. Diese Modelle werden deshalb eher zur mechanistischen Aufklärung von Resorptionsvorgängen und weniger zur routinemäßigen Untersuchung der Resorptionseigenschaften von Arzneistoffen verwendet.

### **1.2.2 Zell-Modelle:**

Da die Epithelzellschicht des Dünndarms die entscheidende Resorptionsbarriere darstellt, besteht die Möglichkeit, Resorptionsmodelle weiter zu vereinfachen, und sie auf diese Zellschicht zu reduzieren (Braun et al., 2000).

### **1.2.3 Isolierte Enterozyten:**

Den physiologischen Bedingungen am ehesten entspricht die Verwendung von isolierten Enterozyten, da diese die mit Abstand am häufigsten vorkommende und für die Resorption entscheidende Zellart des Dünndarmepithels darstellen. Ihre Anwendung als Resorptionsmodell ist aber problematisch, da sie nur als Zellsuspension zu kultivieren sind. Sie haften nicht an Oberflächen an, bilden keine zusammenhängende Zellschicht aus und zeigen somit keine Polarisierung. Es kann deshalb nur die Arzneistoffaufnahme in die Enterozytenzelle untersucht werden und nicht der Transport durch eine Epithelzellschicht. Dadurch ist mit isolierten Enterozyten kein Resorptionsmodell im eigentlichen Sinn realisierbar (Hillgren et al., 1995).

### **1.2.4 Membranvesikel:**

Membranvesikel aus der Bürstensaummembran oder der basolateralen Membran von Enterozyten kann man relativ einfach und in großer Anzahl herstellen. Sie ermöglichen die Untersuchung der Aufnahme von Arzneistoffen in die Membranvesikel. Dadurch wird der Durchtritt von Arzneistoffen durch die Enterozytenmembran und damit die Aufnahme in die Epithelzelle simuliert. Somit wird auch hier nur ein Teilaspekt der Resorption und nicht die Resorption im Gesamten untersucht. Die Verwendung von Membranvesikeln dient deshalb vor allem zur mechanistischen Aufklärung von Transportprozessen in der Epithelzellmembran (Proulx, 1991).

### **1.2.5 Zellkultur-Modelle:**

Aufgrund der Probleme bei der Kultivierung von isolierten Enterozyten verwendet man Zelllinien, die aus Tumoren isoliert wurden. Sie besitzen im Vergleich zu isolierten Enterozyten einige entscheidende Vorteile. Sie sind relativ problemlos zu kultivieren, sie haften leicht an Oberflächen an, sie proliferieren sehr schnell und bilden zusammenhängende Zellschichten aus. Außerdem polarisieren sie stark, d.h. sie bilden die charakteristischen Eigenschaften der luminalen Bürstensaummembran und der basolateralen Membran aus. Durch die mögliche Kultivierung auf Filtern sind sowohl die apikale als auch die basolaterale Seite zugänglich, sodass mit diesem Modell der Durchtritt eines Arzneistoffs durch die Epithelzellschicht und nicht nur die Aufnahme in die Epithelzelle untersucht werden kann. Mit Hilfe dieser Zelllinien wurde es also möglich ein Zellkultur-Modell, das als Resorptionsmodell bezeichnet werden kann, zu realisieren.

Neben MDCK- (Madin Darby Canine Kidney) und HT-29-Zellen ist die am häufigsten als Resorptionsmodell verwendete Zelllinie die Caco-2 Zelllinie (Hidalgo et. al, 1989; Artursson, 1989).

#### **1.2.5.1 MDCK:**

Hierbei handelt es sich um aus Hunden isolierte Nierenepithelzellen. Die Verwendung als Modell zur Simulation der Resorption im Dünndarm erscheint zunächst verwunderlich, ist aber trotzdem möglich, da sie als Epithelzellen die wichtigsten Barriereigenschaften aufweisen und für viele Arzneistoffe eine ausreichende In Vivo-In Vitro-Korrelation aufweisen. Sie haften an Oberflächen an, proliferieren sehr schnell und bilden eine dichte, zusammenhängende Zellschicht aus. Außerdem ist kann die Transfektion die Expression wichtiger Transportproteine ( z.B. p-gp, MRP2) ermöglicht werden. Versuche mit MDCK-Zellen liefern deshalb häufig vergleichbare Ergebnisse zu Versuchen mit Darmzellen. Vorteilhaft ist die sehr kurze Kulturdauer von nur drei Tagen bis zur Versuchsdurchführung, von Nachteil ist der nicht-menschliche Ursprung.

#### **1.2.5.2 HT-29:**

Menschliche Kolonkarzinomzellen sind der Ursprung der HT-29-Zelllinie. Diese Zellen bilden unter normalen Bedingungen keine zusammenhängende Zellschicht aus, können aber unter besonderen Kulturbedingungen zur Ausbildung von polarisierten Zellschichten und auch zur Bildung von Mucus angeregt werden. Da die Barriereigenschaften von HT-29-Zellen nicht ausreichend genug ausgeprägt sind, ist ihre Verwendung als Resorptionsmodell eingeschränkt. Von wichtigerer Bedeutung ist ihre Verwendung als mucus-produzierende Zellen ( Hidalgo, 2001).



### **1.2.5.3 Caco-2:**

Das Zellkulturmodell, das am häufigsten als Resorptionsmodell Verwendung findet, ist das Caco-2-Modell. Hierbei handelt es sich um menschliche Adenokarzinom-Zellen, die aus dem Kolon eines 72-jährigen Mannes kaukasischer Rasse isoliert wurden. Diese Zelllinie besitzt die zur Verwendung als Resorptionsmodell wichtigsten Eigenschaften. Sie ist relativ einfach zu kultivieren. Caco-2-Zellen haften sehr gut an Oberflächen, z.B. auf dem Kunststoffmaterial von Zellkulturflaschen oder auch auf Filtermaterialien. Sie proliferieren sehr gut und bilden nach einigen Tagen eine zusammenhängende Einzelschicht aus. Nach dieser Phase tritt die Polarisierung der Zellen ein, d.h. die Zellen nehmen die für Epithelzellen charakteristische säulenförmige Struktur an, es bildet sich eine Bürstensaummembran aus und Transportproteine werden exprimiert (Ho, 1994; Makhey et al. 1998; Gutmann et al. 1999; Hirohasaki, 2000; Walgren, 2000). Nach ungefähr drei Wochen ist die Polarisierung abgeschlossen und die Zellen können für einen Resorptionsversuch verwendet werden. Sie stellen durch eine starke Ausprägung von tight-junctions eine sehr undurchlässige Barriere dar. Da es sich nicht um Dünndarm-, sondern um Kolonepithelzellen handelt, bilden sie eine etwas dichtere Barriere als das Dünndarmepithel aus und spiegeln so nicht eindeutig die physiologischen Verhältnisse wider. Diese Eigenschaft ist aber für die Verwendung im Modell nicht unbedingt von Nachteil, da dadurch der Bereich zur Einstufung der Arzneistoffe etwas breiter wird. Außerdem konnte eine ausreichende In Vitro-In Vivo-Korrelation nachgewiesen werden (Artursson et al., 1991, 2001; Yee, 1997). Aufgrund dieser Eigenschaften entwickelte sich dieses Modell seit seiner Etablierung zu Beginn der 90er Jahre in den letzten Jahren zu dem am meisten verwendeten und am besten charakterisierten Resorptionsmodell (Artursson, 1989; Audus et al., 1990; Hidalgo et al., 1989; Hilgers et al., 1990). Da es sich aber um Krebszellen handelt, können sich die Zellen im Lauf der Kultivierung verändern, sodass die Morphologie und bestimmte Zelleigenschaften, wie z.B. die Expressierung von Transportproteinen unter Umständen nicht sehr stabil sind. Eine regelmäßige Kontrolle der Zellen und eine strikte kontinuierliche Einhaltung der Arbeitsvorschriften sind deshalb unbedingt erforderlich. Trotz der Verwendung des Modells in sehr vielen Labors gibt es keine standardisierten Laborvorschriften, sodass es problematisch ist, die Ergebnisse unterschiedlicher Labors direkt zu vergleichen (Walter et al., 1995; Hosoya et al., 1996; Artursson et al., 1997; Briske-Anderson et al., 1996; Anderle et al., 1998). Trotz dieser Nachteile ist die Verwendung des Modells weit verbreitet, da die Vorteile eindeutig überwiegen. Der apparative Aufwand ist geringer als bei Verwendung von isoliertem Gewebe, sodass wesentlich mehr Untersuchungen durchgeführt werden können. Es kann mit sehr kleinen Volumina gearbeitet werden, somit auch mit sehr kleinen Arzneistoffmengen. Dies ist besonders in der industriellen Entwicklung von Bedeutung, da hier im Frühstadium der Arzneistoffentwicklung nur sehr geringe Arzneistoffmengen zur Verfügung stehen (Bailey et al., 1996). Auch der Nachteil der relativ langen drei-wöchigen Kulturdauer, kann durch vielversprechende Ergebnisse

bei der Entwicklung eines Modells mit dreitägiger Kulturdauer unter speziellen Kulturbedingungen behoben werden (Lentz et al., 2000; Chong et al. 1997; Liang et al., 1999; da Violante et al., 2002).

### **1.2.6 Künstliche Membranen:**

Eine weitere Vereinfachung des Systems ist die Verwendung von künstlichen Membranen. Hierbei werden Filter mit Lipiden imprägniert, um so die Resorptionsbarriere zu imitieren. Man entfernt sich mit diesem Modell sehr weit von den physiologischen Bedingungen. Wesentliche Faktoren können nicht erfasst werden, wie z.B. enzymatische Vorgänge, aktive Transportprozesse und den parazellulären Transportweg. Eigentlich können nur die passiven transzellulären Transporteigenschaften untersucht werden, sodass dieses Modell im Vergleich zum Zellkulturmodell trotz der einfachen Handhabung und einer hohen Durchsatzrate entscheidende Nachteile hat. Ein kommerzielles System ist z.B. unter der Bezeichnung PAMPA (parallel artificial membrane permeation assay) erhältlich (Hidalgo, 2001).

### **1.2.7 Computermodelle:**

In letzter Zeit gibt es auch die Möglichkeit mit Computermodellen die Resorptionseigenschaften zu berechnen. Zugrunde liegen hier die chemischen Eigenschaften der Arzneistoffe, die relativ einfach bestimmt werden können. Problematisch ist hier die bisher relativ geringe Datenmenge, auf der die weiteren Berechnungen beruhen. Sollte sich diese Basis aber noch verbreitern, können Computermodelle sicherlich mit Einschränkungen zur Einschätzung der Resorptionseigenschaften von Arzneistoffen beitragen (Bohets et al., 2001; Yamashita et al. 2002, Kulkarni et al. 2002).

## **1.3 BCS (Biopharmaceutics Classification System):**

Das biopharmazeutische Klassifizierungssystem ist ein von der Food and Drug Administration entwickeltes Hilfsmittel zur Abschätzung der Resorptionseigenschaften von Arzneistoffen (Amidon et al., 1995). Die Einteilung erfolgt nach den Löslichkeits- und Permeabilitätseigenschaften von Arzneistoffen. Die Löslichkeit kann relativ einfach in Lösungsversuchen bestimmt werden. Die Permeabilitätseigenschaften können durch Resorptionsstudien im menschlichen Organismus bestimmt werden. Eine Substanz wird als gut permeabel (highly permeable) eingestuft, falls 90% der Arzneistoffdosis resorbiert werden. Diese Einstufung kann auch mit den oben erwähnten In Vitro Modellen erfolgen, wenn ihre Eignung durch Korrelation mit Referenzsubstanzen nachgewiesen wurde (FDA Guidance for Industry, Oct. 2000).

Die Einteilung erfolgt danach in 4 Klassen:

Klasse	Löslichkeit (solubility)	Permeabilität (permeability)
1	gut (high)	gut (high)
2	schlecht (low)	gut (high)
3	gut (high)	schlecht (low)
4	schlecht (low)	schlecht (low)

Eine weitere Einteilung erfolgt nach der Freisetzungsgeschwindigkeit der Arzneiform bzw. Lösungsgeschwindigkeit des Arzneistoffs. Die Bestimmung kann mit einer Freisetzungsvorrichtung nach USP durchgeführt werden. Bei Vorliegen einer schnell freisetzenden Arzneiform (immediate release dosage form) und einer erfolgten Einstufung des Wirkstoffs in die Klasse 1 räumt die FDA die Möglichkeit ein, eine Erlassung von In Vivo-Resorptionsstudien, die eigentlich für eine Zulassung des Arzneimittels notwendig wären, zu beantragen (FDA, Guidance for Industry, Aug. 2000). Dieses Vorgehen kann dadurch begründet werden, dass für Arzneistoffe der Klasse 1 eine sehr gute In Vivo-In Vitro-Korrelation zu erwarten ist. Dies ist unter gewissen Voraussetzungen auch für Arzneistoffe der Klassen 2 und 3 der Fall. Deshalb gibt es mittlerweile Bestrebungen dieses Vorgehen auch auf Arzneistoffe dieser Gruppen auszudehnen. Auch die relativ strengen Einteilungskriterien werden überdacht, sodass möglicherweise eine größere Anzahl an Arzneistoffen in diese Gruppen eingeteilt werden könnte (FDA, Lawrence et al., 2001). Da eine Bestimmung der Permeabilitätseigenschaften in In Vitro-Modellen wesentlich einfacher und kostengünstiger als die Durchführung von In Vivo-Studien ist, wird die Verwendung von In Vitro-Modellen, besonders des Caco-2-Modells, sicherlich noch an Bedeutung gewinnen.

#### 1.4 Aktive Transportproteine:

Im Dünndarmepithel gibt es eine Reihe von aktiven Transportproteinen, die auf die Arzneistoffresorption einen großen Einfluss haben. So werden z.B. Cephalosporine von Dipeptidtransportern aktiv in die Zelle geschleust und so besser resorbiert. Wirkstoffe können aber auch aktiv ins Darmlumen sezerniert werden. Wenn ein Arzneistoff Substrat von Effluxpumpen ist, kann er aus der Epithelzelle- oder Epithelzellmembran direkt zurück in das Darmlumen transportiert werden, wodurch seine Resorption vermindert und seine Bioverfügbarkeit nach oraler Gabe gesenkt wird. Die wichtigsten im Dünndarm vorkommenden Transportproteine dieser Gruppe sind p-glycoprotein, p-gp, und Multi-drug-resistance-related Protein 2, MRP2. Sie gehören beide der großen Gruppe der ABC-Transporterfamilie an (Kusuhara et al., 2002, Ayerton et al., 2001; Bodo et al. 2003; Suzuki, et al. 2000).

### **1.4.1 ABC-Transporter:**

ABC bedeutet Adenosintriphosphat (ATP) binding cassette und steht für die 27 kDa schwere ATPase, die als hochkonserviertes Molekülteil das gemeinsame Merkmal der riesigen ABC-Transporterfamilie darstellt. Durch ATP-Hydrolyse treibt sie den Transport von Substanzen durch Zellmembranen gegen einen Konzentrationsgradienten an. Dieser Transport kann nach innen oder nach außen gerichtet sein. Mitglieder der ABC-Transporterfamilie können in großer Anzahl in allen Organismen gefunden werden. Das Substanzspektrum, das von diesen Proteinen transportiert wird, ist riesig und reicht von kleinsten Substanzen, wie z.B. Chlorid-Ionen über Phospholipide, vielen Arzneistoffmolekülen, Lipopolysacchariden, Peptiden bis hin zu sehr großen Polypeptiden. Wichtige Vertreter, die im menschlichen Organismus vorkommen, sind CFTR (cystic fibrosis transmembrane conductance regulator), ein Chlorid-Kanal, dessen genetischer Defekt die erbliche Krankheit Mukoviszidose hervorruft, oder auch p-gp und die MRP-Familie. Substanzen, die von ABC-Transportern transportiert werden, werden im weiteren als Substrate bezeichnet, obwohl dies definitionsgemäß eigentlich nicht korrekt ist, da ATP das eigentliche Substrat dieser Transporter darstellt (Holland et al., 1999; Schinkel et al., 2002; Dean et al., 2001).

### **1.4.2 p-Glycoprotein:**

#### **1.4.2.1 Multi Drug Resistance (MDR):**

MDR wurde als klinisches Phänomen zuerst bei der Zytostatikatherapie von Krebspatienten beobachtet, die Kreuzresistenzen gegen verschiedene Zytostatika entwickelten. MDR kann schon zu Beginn einer Zytostatikabehandlung vorhanden sein oder sich erst im Laufe der wiederholter Zytostatikagabe entwickeln. Das Transportprotein, p-glycoprotein, wurde in großen Mengen in diesen resistenten Tumorzellen gefunden. Da zahlreiche Zytostatika Substrate von p-gp sind, wird der Transportaktivität von p-gp ein Beitrag zum Entstehen von MDR zugeschrieben. Substrate werden aus der Krebszelle heraustransportiert und können ihre Zielstruktur in der Zelle, wie z. B. den Zellkern, nicht in einem ausreichenden Ausmaß erreichen und dadurch ihre Wirkung nicht entfalten (Aszalos et al., 1998; Krishan et al. 1997)

#### **1.4.2.2 Aufbau:**

Das Protein hat ein Molekulargewicht von 170 kDa, und setzt sich aus zwei Hälften mit je 6 Transmembrandomänen und je einer intrazellulären ATP-Bindungsstelle zusammen (Ambudkar et al. 1999).

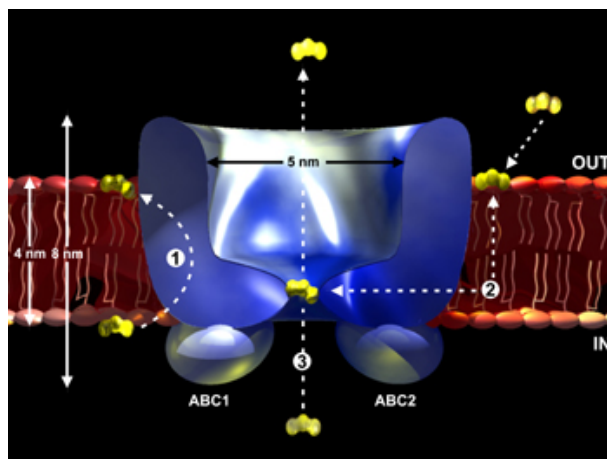


Bild 3: Modellhafte Darstellung von p-gp (Higgins et al.)

#### 1.4.2.3 **Transportmechanismus:**

Der exakte Mechanismus ist noch nicht aufgeklärt, aber man nimmt an, dass zuerst ATP an eine der beiden intrazellulären ATP-Bindungsstellen bindet und sich dann das Substrat an eine Bindungsstelle anlagert, die sich im inneren Leaflet der Membran befindet. Durch ATP-Hydrolyse kommt es zu einer Konformationsänderung des Proteins, das Substrat gelangt dadurch in das äußere Leaflet und von dort zurück auf die apikale Seite. Danach wird anorganisches Phosphat und ADP abgegeben. Die ATP-Bindungsstelle wird somit frei für einen neuen Transportzyklus. Im Besonderen das Zusammenwirken beider ATP-Bindungsstellen und die Wechselwirkungen zwischen beiden Substratbindungsstellen sind bisher noch nicht ausreichend aufgeklärt (Eytan et al. 1999).

#### 1.4.2.4 **Substrate:**

Bemerkenswert ist das für einen aktiven Transporter äußerst breite Substratspektrum. Generell werden eher lipophile und kationische Substanzen transportiert. Dazu zählen z.B. Zytostatika, wie Vinca-Alkaloide, und Anthrazykline, HIV-Proteaseinhibitoren, wie Ritonavir und Saquinavir, Immunsuppressiva, wie Cyclosporin A, Calciumantagonisten, wie Verapamil, oder auch Herzglykoside, wie Digoxin (Seelig, 1997; Seelig et al. 2000).

#### 1.4.2.5 **Vorkommen:**

Eine ausgeprägte Expression von p-gp findet man in Tumorzellen, was zum Phänomen der MDR beiträgt. Ein physiologisches Vorkommen findet man z.B. in Leber und Niere. Durch Anordnung in der luminalen Membran von Hepatozyten bzw. Tubuluszellen trägt p-gp hier zu aktiv zur Elimination seiner Substrate bei. Durch die ausgeprägte Expression in Gehirnkapillarendothelzellen verhindert p-gp durch seine Transportaktivität ein Eindringen seiner Substrate vom Blutstrom in das Gehirngewebe und trägt dadurch entscheidend zur Ausbildung der Blut-Hirn-

Schranke, einer speziellen Barriere zum Schutz des Gehirns, bei. Ein hohes Vorkommen an p-gp findet man auch im Dünndarm. Hier werden die Substrate aus der luminalen Enterozytenmembran zurück in das Darmlumen befördert, wodurch die Resorption dieser Substanzen stark verringert wird. Dies sind die am besten untersuchten Gewebearten mit der ausgeprägtesten p-gp-Expression. Außerdem findet man p-gp z.B. noch in Plazenta, Nebennierenrinde und Knochenmark (Gottesman et al. 1993).

#### **1.4.2.6      *Physiologische Funktion:***

Über die physiologische Funktion gibt es noch einige Diskussion. Ein Schutzmechanismus scheint am wahrscheinlichsten zu sein, was durch das oben beschriebene Vorkommen und die erwähnte Transportrichtung begründet werden kann. Ein Großteil der Substrate sind toxische oder für den Körper schädliche Substanzen. Durch den aktiven Transport von p-gp im Dünndarm wird die Resorption stark eingeschränkt. Gelangen diese Substanzen trotzdem in die Blutbahn wird ein Eindringen dieser Substanzen in das sehr empfindliche Gehirn verhindert und die Exkretion durch Niere, Leber wird beschleunigt. Für einige Arzneistoffe ist dies von Nachteil, da sie deshalb nicht in ausreichendem Ausmaß an ihren Wirkort gelangen. Viele sind aber in erster Linie für den gesunden Organismus toxische Substanzen, wie z.B. Zytostatika oder Digoxin. Erst im Krankheitsfall wird eine erhöhte Konzentration dieser Arzneistoffe im Organismus erwünscht. Deshalb kann man auch hier von einer sinnvollen Schutzfunktion des Körpers ausgehen, obwohl hier für den Patienten ein nachteiliger Effekt durch die Aktivität von p-gp zu beobachten ist. Eine aus einer fehlenden p-gp-Expression resultierende Krankheit ist nicht bekannt. Bei Mäusen, die p-gp nicht exprimieren, wurde lediglich eine erhöhte Empfindlichkeit gegenüber toxischen Substanzen festgestellt (van Tellingen, 2001; Johnstone et al. 2000).

#### **1.4.3 MRP2:**

##### **1.4.3.1      *Multi-Drug-Resistance:***

Wie auch p-gp kann die Familie der Multi-Drug-Resistance Proteine zum klinischen Phänomen der Multi-Drug-Resistance beitragen, indem sie Zytostatika aus den Tumorzellen heraustransportieren und so deren Wirkung stark einschränken. MRP2 gehört zur dieser Familie, aus der bis jetzt 7 Mitglieder nachgewiesen wurden (Borst et al. 2000).

##### **1.4.3.2      *Aufbau:***

MRP2 hat ein Molekulargewicht von 190 kDa und setzt sich, ähnlich wie p-gp, aus zwei Teilen mit je 6 Transmembrandomänen und je einer intrazellulären ATP-

Bindungsstelle. Zusätzlich besitzt MRP2 aber noch einen Molekülteil mit 5 Transmembrandomänen (Cole et al., 1998).

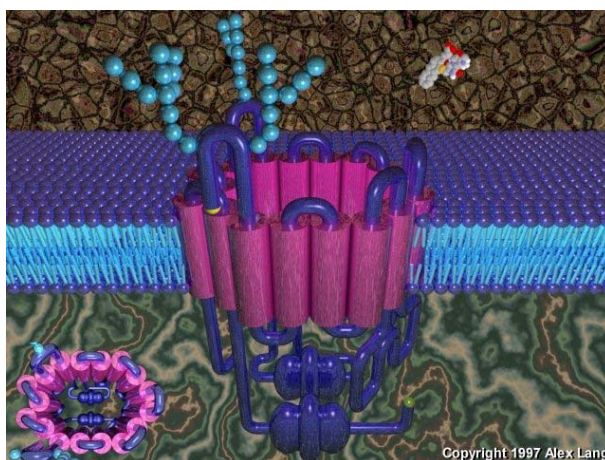


Bild 4: Modellhafte Darstellung von MRP2 (Cole et al., 1998)

#### **1.4.3.3 Transportmechanismus:**

Auch hier ist der Transportmechanismus noch nicht eindeutig aufgeklärt. Die benötigte Energie wird durch ATP-Hydrolyse nach Bindung von ATP an die ATP-Bindungsstellen des Transportproteins gewonnen: Wie diese Bindung erfolgt und wie beide Bindungsstellen eventuell miteinander interagieren ist bisher noch nicht bekannt. Beim Transport durch MRP2 spielt Glutathion (GSH) eine wichtige Rolle. Man nimmt an, dass MRP2 zwei Substratbindungsstellen besitzt, eine mit einer hohen Affinität zum Substrat und einer niedrigen zu GSH und eine mit einer hohen Affinität zu GSH und einer niedrigen zu dem Substrat. Wenn kein Substrat vorhanden ist, bindet GSH an beide Bindungsstellen, voraus einer geringer GSH-Transport resultiert. Bei niedriger Substratkonzentration wird eine Bindungsstelle von dem Substrat besetzt, was zu einem Cotransport von Substrat und GSH führt. Bei hohen Substratkonzentrationen kommt es zu einem alleinigen Transport von Substrat, da beide Bindungsstellen besetzt werden. So versucht man zu erklären, dass einige Substrate, wie z.B. Vincristin und Doxorubicin, GSH als Co-Substrat benötigen, andere hingegen, z.B. Methotrexat, eigenständig auch ohne GSH-Cotransport transportiert werden. Konjugate mit Glutathion, Glucuronid oder Sulfat benötigen zum Transport kein freies GSH, da ihre Affinität zu beiden Bindungsstellen sehr hoch ist. MRP2 ist wie p-gp in der apikalen Membran von Epithel- und Endothelzellen lokalisiert. Im Gegensatz dazu sind andere Mitglieder der MRP-Familie, wie MRP1, MRP3 und MRP5, in der basolateralen Membran lokalisiert (Borst et al. 1999).

#### **1.4.3.4 Substrate:**

Das sehr breite Substratspektrum umfasst zum einen amphiphile Anionen, vor allem Konjugate mit Glucuronid, Glutathion und Sulfat, u.a. auch von endogenen Substanzen, wie z.B. Leukotrien, Bilirubin- und Estradiolderivaten, zum anderen aber

auch eine Reihe von Zytostatika, z.B. Vincristin, Doxorubicin oder auch Cisplatin. Lange vor seiner Zuordnung zur MRP-Familie und seiner Benennung als MRP2 war das Transportprotein schon als in der kanalikulären Hepatozytenmembran lokalisierter Anionentransporter unter dem Namen cMOAT (canalicular multispecific organic anion transporter) bekannt (Keppler et al. 1999; Bakos et al., 2000).

#### **1.4.3.5 Vorkommen:**

MRP2 wurde in einigen Tumorzelllinien nachgewiesen und kann zur MDR beitragen, da es in der Lage ist, verschiedene Zytostatika aus der Krebszelle zu transportieren. Ein physiologisches Vorkommen findet man z.B. in Leber und Niere. Durch die Lokalisation in der luminalen Membran der Hepatozyten und Tubuluszellen trägt es durch seine Transportaktivität zur Elimination bei. Im Dünndarm schränkt MRP2 die Resorption seiner Substrate stark ein, da sie aus dem Dünndarmepithel zurück in das Darmlumen befördert werden (Gerk et al., 2002).

#### **1.4.3.6 Physiologische Funktion:**

Wie bei p-gp steht auch hier wahrscheinlich ein Schutzmechanismus des Organismus im Vordergrund, da durch die Aktivität des Transportproteins die Resorption toxischer Substanzen verhindert und deren Elimination beschleunigt wird. Im Gegensatz zu p-gp, das hauptsächlich oder sogar ausschließlich exogene Substanzen transportiert, gehören zum Substratspektrum von MRP2 auch endogene Substanzen, wie z.B. Leukotriene. Das Dubin-Johnsen Syndrom ist eine Erbkrankheit, bei der es durch eine Mutation des MRP2-Gens zu keiner Expressierung des Transportproteins kommt, was durch den mangelnden Transport von Bilirubinglucuroniden zu einer Hyperbilirubinämie führt. Trotz des ähnlichen Vorkommens in Leber, Niere und Dünndarm, der gleichen Transportrichtung und der teilweise überlappenden Substratspezifität, scheinen die beiden Transportproteine, p-gp und MRP2, unterschiedliche physiologische Eigenschaften zu besitzen, da bei MRP2 zur Schutzfunktion noch eine wichtige physiologische Funktion durch den Transport endogener Substanzen hinzukommt (Leslie et al., 2001).

## **1.5 Tenside:**

Tenside werden als Hilfsstoffe in pharmazeutischen Formulierung, wie z.B. Emulsionen, Suspensionen oder Lösungen, vielseitig eingesetzt. Sie bestehen aus hydrophilen und lipophilen Molekülteilen. Je nach Molekülaufbau stehen die lipophilen oder hydrophilen Eigenschaften der Tensids im Vordergrund, was durch den HLB(hydrophilic lipophilic balance)-Wert, der für nicht-ionische Tenside als ein Fünftel des prozentualen hydrophilen Molekularmassenanteils definiert ist, charakterisiert werden kann. Aufgrund dieser amphiphilen Eigenschaften können sie u.a. als Emulgatoren, die bei einem HLB-Wert von 3 bis 6 Wasser-in-Öl-Emulsionen und bei einem HLB-Wert von 8 bis 18 Öl-in-Wasser-Emulsionen ausbilden, oder



auch als Lösungsvermittler, die einen HLB-Wert von 14-18 aufweisen, verwendet werden. In Suspensionen lagern sie sich an die Partikeloberflächen an und tragen durch eine Verringerung der Grenzflächenspannung zu einer Stabilisierungserhöhung der Suspension bei. Als pharmazeutische Hilfsstoffe sollten Tenside eigentlich pharmakologisch inert sein. Aufgrund der amphiphilen Strukturen kann es aber zu Wechselwirkungen und Schädigungen der Zellmembran kommen, weshalb toxikologische Untersuchungen unerlässlich sind. Besonders wenn man an die Verwendung von Tensiden in peroralen oder parenteralen Zubereitungen denkt, sind hier strenge Anforderungen an die verwendeten Tenside zu stellen. Eine Einteilung kann aufgrund ihrer molekularen Eigenschaften erfolgen (Saha et al., 2000; Swenson et al., 1994; Kalinkova et al., 1999; Rege et al., 2000).

### **1.5.1 Anionische Tenside:**

Anionische Tenside setzen sich aus einer hydrophilen anionischen Kopfgruppe, z.B. einer Carboxyl- oder Sulfatgruppe, und einem langkettigen lipophilen Alkylrest zusammen. Zu dieser Gruppe gehören u.a. die Alkalisalze von Fettsäuren, z. B. Natriumstearat, die Schwefelsäureester höherer Fettalkohole, z.B. Natriumcetylstearylsulfat (Lanette E), oder die Alkalisalze der Gallensäuren, die durch das Emulgieren von Fetten in der Nahrung eine sehr wichtige physiologische Bedeutung besitzen. Ein Beispiel aus dieser Gruppe ist Natriumglycocholat. Da sie physiologisch nicht unbedenklich sind, werden sie pharmazeutisch hauptsächlich in topischen Zubereitungen und nicht in oralen oder parenteralen Zubereitungen verwendet.

### **1.5.2 Kationische Tenside:**

Kationische Tenside setzen sich aus einer, aufgrund seiner positiven Ladung, hydrophilen quartäreren Ammoniumgruppe und einem lipophilen Alkylrest zusammen. Der Hauptvertreter dieser Gruppe ist Benzalkoniumchlorid, das pharmazeutisch aber häufiger aufgrund seiner desinfizierenden und konservierenden Eigenschaften als Konservierungsmittel und weniger aufgrund seiner amphiphilen Eigenschaften als Emulgator eingesetzt wird.

### **1.5.3 Amphotere Tenside:**

Der wichtigste Vertreter dieser Gruppe ist das Lecithin, ein Phospholipid, das sich aus einem Glycerolgrundgerüst, Phosphorsäure, einem Fettalkohol und einer quartäreren Ammoniumverbindung zusammensetzt. Durch die Phosphat- und die Carboxylgruppe besitzt es je nach Bedingungen des umgebenden Mediums eine positive und eine negative Ladung. Da Lecithin ein natürlicher Membranbestandteil ist, ist seine Verwendung in peroralen und parenteralen Zubereitungen physiologisch unbedenklich.

#### **1.5.4 Nichtionische Tenside:**

Im Gegensatz zu den ionogenen Tensiden, besteht die hydrophile Gruppe der Moleküle dieser Gruppe nicht aus einer geladenen Gruppe, sondern aus ungeladenen Hydroxyl- oder Polyoxyethylengruppen. Der lipophile Molekülanteil ist auch hier in den meisten Fällen ein langkettiger Alkylrest. Die Gruppe der nichtionischen Tenside ist sehr vielfältig. Sie umfasst z.B. Fettalkohole (Cetylstearyalkohol) und Sterole (Cholesterol), aber auch Sorbitanfettsäureester (Span), Polyoxyethylen-Sorbitanfettsäureester (Tween) und Polyoxyethylen-Fettsäureglyceride (Cremphor EL und Cremophor RH 40). Poloxamere sind Blockcopolymere und bestehen aus einem lipophilen Mittelteil aus Polyoxypropylen und zwei hydrophilen Endteilen aus Polyoxypropylen (Pluronic, Synperonic). Durch Variation der Kettenlängen der lipophilen und hydrophilen Molekülbestandteile können eine sehr große Anzahl unterschiedlicher Tenside mit speziellen Eigenschaften, wie z.B. verschiedenen HLB-Werten erhalten werden. Aufgrund ihrer besseren physiologischen Verträglichkeit im Vergleich zu ionischen Tensiden können nichtionische Tenside nicht nur in topischen, sondern auch in peroralen und einige auch in parenteralen Zubereitungen verwendet werden (Kosswig et al., 1993; Voigt, 2000; Bauer et al., 1999).

## **1.6 Zielsetzung:**

Im Rahmen dieser Arbeit wurden mehrere Zielsetzungen verfolgt:

### **1. Standardisierung des Caco-2-Modells:**

In einen Ringversuch unter der Teilnahme mehrerer Laboratorien wurde ein Versuch zur Standardisierung des Caco-2-Modells unternommen, um die Ergebnisse, die mit diesem Modell unter unterschiedlichen Laborbedingungen und Arbeitsmethoden erzielt werden, besser vergleichbar zu machen.

### **2. Untersuchung des Einflusses von Tensiden auf die Resorption von Arzneistoffen:**

Von besonderem Interesse waren Wechselwirkungen von Tensiden mit den ABC-Transportproteinen, p-gp und MRP2. Zahlreiche Wirkstoffe sind Substrate dieser Exportproteine und verfügen deshalb über eine schlechte Bioverfügbarkeit. Es sollte untersucht werden, ob durch Tensidzugabe eine Resorptionsverbesserung dieser Wirkstoffe, zu erzielen ist. Durchgeführt wurden diese Untersuchungen im Caco-2-Modell, wobei die Expression beider Transportproteine zuvor durch Immunfärbung nachgewiesen wurde.

### **3. Untersuchung von Erklärungsmöglichkeiten der festgestellten Tensidwirkung:**

Da die festgestellten Wechselwirkungen der Tenside mit p-gp oder MRP2 eine auffallende Konzentrationsabhängigkeit zeigten, wurde die Kritische Mizellbildungskonzentration der Tenside bestimmt, um einen möglichen Zusammenhang dieser Konzentrationen zu untersuchen.

Der Einfluss der Tenside auf die Membranfluidität von Caco-2-Zellen wurde untersucht, da dies eine Beeinträchtigung der Funktion der in der Membran lokalisierten Transportproteine zur Folge haben könnte.

Um eine zellschädigende Wirkungen der Tenside auszuschließen, wurden Toxizitätsversuche mit Caco-2-Zellen durchgeführt.

## **2 Materialien und Methoden:**

### **2.1 Caco-2**

#### **2.1.1 Zellkultur:**

Die verwendeten Caco-2-Zellen stammen aus der American Type Culture Collection, Rockville, USA. Es wurden Zellen der Passagen 52 bis 65 verwendet. Um morphologische Veränderungen, die durch häufiges Passagieren auftreten können, zu vermeiden, wurden höchstens 10 Passagiervorgänge nach dem Auftauen vorgenommen. Alle Arbeiten mit den Zellkulturen wurden unter aseptischen Bedingungen in einer Laminar-Air-Flow-Arbeitsbank durchgeführt. Eine mikroskopische Kontrolle der Zellkultur erfolgte vor und nach jedem Arbeitsschritt.

#### **2.1.2 Aufbewahrung:**

Die Zellen wurden in Kryokonservierungsröhrchen in Einfriermedium zu je 3 Millionen Zellen pro ml in flüssigem Stickstoff bei  $-196^{\circ}\text{C}$  aufbewahrt.

#### **2.1.3 Auftauen:**

Ein Kryokonservierungsröhrchen wurde aus dem Stickstofftank genommen und in einem auf  $37^{\circ}\text{C}$  temperierten Wasserbad aufgetaut. Sofort nachdem die letzten Eiskristalle verschwunden waren, wurde der Inhalt des Röhrchens in ein Zentrifugenröhrchen, das 20ml Zellkulturmedium enthielt, überführt. Hierbei wurde zügig gearbeitet, da das Einfriermedium DMSO enthält, das eine toxische Wirkung auf die Zellen hat und durch diesen Arbeitsschritt verdünnt wurde. Danach wurde kurz durchmischt und für 5 Minuten bei 200xg zentrifugiert. Der Überstand über dem entstandenen Zellpellet wurde mittels Pasteurpipette und Vakuumpumpe abgesaugt. Das Zellpellet wurde mit Hilfe einer Pipette durch mehrmaliges Auf- und Absaugen in 15ml Zellkulturmedium resuspendiert und in eine Zellkulturflasche überführt.

#### **2.1.4 Kultivierung:**

Die Zellen wurden in einem Inkubationsschrank bei  $37^{\circ}\text{C}$ , 5%  $\text{CO}_2$ , 95% relativer Luftfeuchtigkeit kultiviert. Das Medium wurde dreimal wöchentlich gewechselt. Alle Flüssigkeiten (Medium, Puffer, etc.), die mit den Zellen in Kontakt kamen, wurden zuvor in einem Schüttelwasserbad auf  $37^{\circ}\text{C}$  temperiert.

### **2.1.5 Passagieren:**

Die Zellen wurden passagiert, wenn sie unter mikroskopischer Betrachtung zu 80% konfluent waren. Dazu wurden sie einmal mit HBSS (kalzium- und magnesiumfrei) gewaschen, danach wurden 10ml einer Trypsin/EDTA-Lösung (0,25%/0,02%) zugegeben und im Brutschrank inkubiert bis sich alle Zellen vom Boden der Flasche abgelöst hatten, was ungefähr 10 Minuten dauerte. Danach wurde der Inhalt der Flasche in ein Zentrifugenröhrchen überführt und für 5 Minuten bei 200xg zentrifugiert. Der Überstand über dem entstandenen Zellpellet wurde abgesaugt und das Zellpellet wurde in 10ml Zellkulturmedium resuspendiert. Zur Bestimmung der Anzahl der Zellen in der Suspension wurden 100µl der Suspension mit 100µl einer Trypanblaulösung (0,4%), gemischt und mikroskopisch mit einer Neubauer-Zählkammer bestimmt. Vitale Zellen erscheinen weiß, beschädigte Zellen werden durch Eindringen des Farbstoffs in die Zelle blau gefärbt. Je 3 Millionen Zellen wurden in 15ml Zellkulturmedium suspendiert, in eine Zellkulturflasche überführt und im Inkubationsschrank kultiviert. Sie dienten zur weiteren Vermehrung der Zellen durch weitere Passagiervorgänge. Die restlichen Zellen wurden für Transport- oder Aufnahmeversuche verwendet und mit einer Dichte von 65 000 Zellen/cm<sup>2</sup> in die jeweiligen Filter oder Platten ausgesät. Die erhaltene Zellsuspension wurde außerdem in den Versuchen zur Untersuchung der Membranfluidität benutzt.

### **2.1.6 Einfrieren:**

Zur langfristigen Lagerung wurde die Zellsuspension, die beim Passagieren erhalten wurde, eingefroren. Hierzu wurde eine Zellsuspension von 3 Millionen Zellen pro ml hergestellt und DMSO bis zur Endkonzentration von 10% zugegeben. 1ml dieser Suspension wurde in ein Kryokonservierungsröhrchen überführt und im Gefrierschrank bei -70°C in einem Einfrierbehältnis, das ein konstante Abkühlungsgeschwindigkeit von 1°C pro Minute gewährleistet, eingefroren. Nach einem Tag wurden die Kryokonservierungsröhrchen in einen Tank überführt, in dem sie in flüssigem Stickstoff bei -196°C langfristig gelagert werden können.

(Tavelin et al., 2000; Michael, 2000).

### **2.1.7 Aufnahmeversuche:**

96-well-Platten (Fläche pro well: 0,3cm<sup>2</sup> ) wurden mit Rattenschwanzkollagen beschichtet. Dazu wurde das lyophilisierte Kollagen, wie vom Hersteller empfohlen mit 0,02%iger Essigsäure gelöst (Kollagen-Konzentration: 2mg/ml) und dann mit Aqua bidest. verdünnt. Je 100µl dieser Lösung wurden in ein Well pipettiert, mindestens 3 Stunden im Well belassen und danach mit einer Pasteurpipette abgesaugt. Die aufgebrauchte Menge an Kollagen betrug 5µg/cm<sup>2</sup>. Danach wurden 200µl Zellsuspension pro Well mit einer Dichte von 65 000 Zellen/cm<sup>2</sup> aufgebracht. Die Platte wurde dann für ca. 21 Tage im Inkubationsschrank kultiviert und, wobei

dreimal wöchentlich das Medium gewechselt wurde. Vor dem Versuch wurde das Medium entfernt und die Zellen zweimal mit KRB gewaschen. Danach wurden die Probelösungen mit den jeweiligen Fluoreszenzfarbstoffen aufgegeben und die Platte bei 37°C für 90 Minuten inkubiert. Die Probelösungen wurden entfernt, die Zellen wurden dreimal mit eiskaltem KRB gewaschen und zum Lysieren der Zellen wurde pro Well 200µl einer 1%igen Triton-X 100-Lösung zugegeben und 30 Minuten im Dunkeln inkubiert. Die Bestimmung der pro Well vorhandenen Fluoreszenzfarbstoffmenge erfolgte mit einem Fluoreszenz-Plattenreader, indem die 96-well-Platte direkt vermessen wurde. Die Probelösung, die ausschließlich Fluoreszenzfarbstoff enthielt diente als Referenz, auf die die Ergebnisse der Probelösungen bezogen wurde. Der Versuch wurde als 4-fach-Bestimmung durchgeführt.

### **2.1.8 Transportversuche:**

Für Transportstudien wurden die Zellen mit einer Dichte von 65 000/cm<sup>2</sup> auf Transwell Clear™ Filtereinsätzen (Material: Polyester; Porengröße: 0,4 µm; Fläche: 1,13cm<sup>2</sup>) in 12-well-Platten für mindestens 21 Tage kultiviert. Um hydrostatische Effekte zu vermeiden, wurde zuerst das Medium im apikalen Kompartiment (0,5ml), danach das Medium im basolateralen Kompartiment (1,5ml) abgesaugt und das frische Medium in umgekehrter Reihenfolge zugegeben. Vor dem Versuch wurde das Medium entfernt, zweimal mit KRB gewaschen und 30 Minuten im Trockenschrank inkubiert. Zur Kontrolle, ob der Monolayer intakt war, wurde der transepitheliale elektrische Widerstand (TEER) mit einem Widerstandsmessgerät (Millcell-ERS) mit Chopstick-Elektroden (STX-2) gemessen. Danach wurde der Transportpuffer entfernt und die Probelösungen zugegeben. Je nach Richtung des zu untersuchenden Transportes wurde in eine neue 12-well-Platte 1,5ml Transportpuffer oder Probelösung vorgelegt und die Filter, die entweder 0,5ml Transportpuffer oder Probelösung enthielten, wurden bei Versuchsbeginn in diese Platte umgesetzt. Das Kompartiment mit Probelösung stellte das Donorkompartiment dar, das Kompartiment, das den Transportpuffer enthielt bildet das Akzeptorkompartiment. Nach 15, 30, 45, 60, 75 und 90 Minuten wurde eine Probe von 200µl aus dem Akzeptorkompartiment entnommen und durch 200µl frischen Transportpuffer ersetzt. Zusätzlich wurde zur Bestimmung der Ausgangskonzentration zu Beginn des Versuchs eine Probe aus dem Donorkompartiment gezogen. Der Fluoreszenzfarbstoffgehalt der Proben wurde mit Hilfe einer Eichgerade mit einem Fluoreszenzspektrometer (Ascent Fluoroskan™) bestimmt. Während des Versuchs wird die 12-well-Platte bei 100 Umdrehungen pro Minute geschüttelt (Titramax 101, Orbit:3mm). Der Versuch wurde als Dreifach-Bestimmung durchgeführt.

### 2.1.9 Auswertung:

Die zu jedem Zeitpunkt durch den Filter gelangte Farbstoffmenge wurde berechnet und gegen die Zeit aufgetragen. Die Steigung der Geradengleichung wurde durch lineare Regression berechnet und zur Berechnung des apparenten Permeabilitätskoeffizienten ( $P_{app}$ ) nach folgender Formel verwendet:

$$P_{app} = \frac{dQ}{dt} \cdot \frac{1}{n_0} \cdot \frac{1}{A} \cdot V_{donor[cm^3]}$$

$dQ/dt$  = transportierte Menge pro Zeiteinheit ermittelt aus der Regressionsgeraden [ $\mu\text{mol/s}$ ]

$A$  = Fläche der Zellschicht [ $\text{cm}^2$ ]

$n_0$  = Ausgangsmenge im Donorkompartiment [ $\mu\text{mol}$ ]

$V_{donor}$  = Volumen des Akzeptorkompartiments [ $\text{cm}^3$ ]

(Leuenberger, 2002)

### 2.2 Immunfärbung:

Um die Transportproteine, p-gp und MRP2, nachzuweisen wurde eine Immunfärbung durchgeführt. Spezifische Antikörper binden an Epitope der beiden Transportproteine, werden durch Bindung eines fluoreszenzmarkierten sekundären Antikörpers sichtbar gemacht und mit einem Konfokalen Laser Scanning Mikroskop untersucht.

Um eine gute Anhaftung der Zellen zu gewährleisten, wurden 8-well chamber slides (Fläche:  $0,8\text{cm}^2/\text{well}$ ) mit Rattenschwanzkollagen beschichtet. Dazu wurden pro Well  $200\mu\text{l}$  Kollagenlösung aufgebracht. Nach einer Zeit von mindestens 3 Stunden wurde die Lösung abgesaugt. Die aufgebrachte Kollagenmenge beträgt  $5\mu\text{g}/\text{cm}^2$ . Die Zellen wurden mit einer Dichte von  $65\,000$  Zellen/ $\text{cm}^2$  aufgebracht ( $400\mu\text{l}$  Zellsuspension pro Well) und 3 Wochen lang bei dreimaligem Mediumwechsel pro Woche kultiviert. Vor dem Versuch wurden die Zellen zweimal mit PBS ( $500\mu\text{l}$  pro Well) gewaschen. PBS wurde entfernt und je Well  $100\mu\text{l}$  der Fixierlösung (3% Paraformaldehyd, 1% Glutardialdehyd, 3,4% Saccharose) zugegeben und 3 Minuten lang bei Raumtemperatur inkubiert. Im Anschluss wurde die Fixierlösung entfernt, zweimal mit PBS gewaschen ( $500\mu\text{l}$  pro well) und jeweils 10 Minuten auf den Zellen belassen. Zum Permeabilisieren wurde nun für eine Minute eine Triton X 100-Lösung (1% in PBS) zugegeben, wobei der Objektträger mit einem Plattenschüttler geschüttelt wurde. Nach Entfernen der Lösung wurde PBS zugegeben und 10 Minuten auf dem Objektträger belassen. Nach Zugabe der primären Antikörperlösung (p-gp 1:10, MRP2 1:20; in 0,2% Triton X 100) wurde eine halbe Stunde bei  $37^\circ\text{C}$  inkubiert und erneut mit PBS gewaschen (2x 10 Minuten). Zur Markierung der primären Antikörper wurde ein FITC-markierter sekundärer Antikörper (1:50 in 1% BSA) zugegeben und bei  $37^\circ\text{C}$  30 Minuten lang im Dunkeln inkubiert. Zur Anfärbung der Zellkerne wurde

dieser Lösung Propidiumiodid (1µg/ml) zugesetzt. Als Negativkontrolle diente ein Well, das nur mit dem sekundären und zuvor nicht mit dem primären Antikörper, sondern mit PBS inkubiert wurde. Im Anschluss folgten drei Waschschriffe mit PBS, ein kurzer und zwei längere mit jeweils 10 Minuten. Zur Fixierung des Präparats wurden die Kammeraufsätze entfernt, Polymount-Lsg. auf den Objektträger (ungefähr ein Tropfen pro Well) gegeben, ein Deckglas aufgelegt und mit Nagellack fixiert. Das fertige Präparat wurde nun mit einem konfokalen Lasermikroskop untersucht. Der Objektträger kann bei 4°C im Dunkeln aufbewahrt werden. Nach Möglichkeit sollte er aber direkt nach der Färbung untersucht werden (Walgren et al., 2000).

## **2.3 Gehirnkapillarendothelzellen aus Schweinehirn (porcine brain capillary endothelial cells PBCEC):**

### **2.3.1 Isolierung:**

Die Isolierung der Kapillarendothelzellen erfolgte aus Schweinehirn, das vom Fleischversorgungszentrum Mannheim erhalten wurde. Für eine Präparation wurden ca. 18-20 (900-1000g) Schweinehirnhälften direkt bei der Schlachtung im Fleischversorgungszentrum abgeholt und in künstlicher Cerebrospinalflüssigkeit (kCSF) unter Eiskühlung ins Labor transportiert. Die Zeit zwischen Schlachtung und Beginn der Präparation im Labor betrug weniger als eine Stunde. Hier erfolgte zuerst die Entfernung von Hirnhäuten, Blutgefäßen, Choroid Plexus, Kleinhirn und verlängertem Rückenmark mit Pinzette und Skalpell. Die Hirnhälften wurden in kCSF gesammelt und unter Eiskühlung aufbewahrt. Nach Kontrolle und Waschen mit kCSF wurde die kortikale graue Substanz vom Großhirn mit einem Skalpell abgeschabt, zerkleinert und in 100ml Präparationspuffer (4°C) gesammelt. Danach wurde mit 37°C warmem Transportpuffer zu 700ml aufgefüllt, 50ml Dispase-Lösung zugegeben und der pH-Wert mit NaOH (1N) auf 7,4 eingestellt. Die Dispase-Konzentration betrug 5mg/ml. Nach einstündiger Inkubation bei 37°C unter ständigem Rühren wurde der Vorgang wiederholt und erneut eine Stunde inkubiert. Der Ansatz wurde auf 4 Zentrifugenbecher verteilt und mit Präparationspuffer (4°C) aufgefüllt und zentrifugiert (100xg, 10 Min., 4°C, Sorvall Superspeed RC-2B, Sorvall GSA Rotor). Der Überstand wurde verworfen und der Rest in 15%-iger Dextran-Lösung aufgenommen. Durch die Dextran-Dichtezentrifugation (5800xg, 15Min., 4°C) erfolgte eine erste Auftrennung in Gerhirnkapillaren, Erythrozyten, Zelltrümmer und lipophiles Material. Das lipophile Material wurde mit der Dextranlösung abgesaugt und verworfen. Die erhaltenen Pellets wurden in je 25 ml Transportpuffer (37°C) aufgenommen und vereinigt. Ein zweiter enzymatischer Verdauungsschritt erfolgte nun durch Zugabe von 30 mg Collagenase-Dispase, die zuvor in 5 ml Präparationspuffer gelöst wurde (Endkonzentration 1mg/ml), und die folgende Inkubation von 1,5-2 Stunden bei 37° C unter ständigem Rühren. Die Zellsuspension wurde durch ein Polyester-Monolen Siebgewebe ( Maschenweite: 150µm) gegeben



und mit Präparationspuffer (4° C) aufgefüllt. Nach Zentrifugation in zwei 50 ml Reaktionsgefäßen (10 Min., 130xg, 4°C, Beckman), wurde der Überstand verworfen und die Zellpellets in je 6 ml serumhaltigem Präparationspuffer suspendiert und vereinigt. Je 1,5 ml der Suspension wurden auf eine diskontinuierlichen Perkollgradienten aus 156ml Unterphase ( $\rho=1,07\text{g/ml}$ ) und 20ml Oberphase ( $\rho=1,03\text{g/ml}$ ) aufgetragen. Durch Zentrifugation (10 Min., 100xg, 4° C, Beckman) erfolgte die Auftrennung in Zelltrümmer, die auf der Oberphase flotierten, Erythrozyten, die sich als Pellet in der Unterphase befanden, und Endothelzellen, die sich zwischen beiden Phasen ansammelten. Die Endothelzellen wurden danach mit einer Pasteurpipette abgesaugt und zu 50ml mit Präparationspuffer (serumhaltig, 4°C) aufgefüllt. Nach Zentrifugation (10 Min. 130xg, 4°C, Beckman) wurde der Überstand verworfen und das Pellet in serumhaltigem Präparationspuffer (4°C) suspendiert. Dieser Schritt wurde einmal wiederholt und danach die Zellzahl unter Verwendung von Trypanblau-Lsg. (0,4%) mit einer Neubauer-Zählkammer bestimmt. Die Zellen wurden in Einfriermedium zu je 5 Mio. Zellen/ml in Kryokonservierungsröhrchen bei  $-70^\circ\text{C}$  eingefroren und nach 24 Stunden zur langfristigen Lagerung in einen Tank mit flüssigem Stickstoff ( $-196^\circ$ ) überführt (Bauer, 2000; Audus 1996).

### **2.3.2 Aufnahmeversuche mit Gehirnkapillarendothelzellen (PBCEC):**

96-well-Platten wurden mit Rattenschwanzkollagen beschichtet ( $5\mu\text{g/cm}^2$ ). Die Zellen wurden aus dem Stickstofftank genommen im Wasserbad ( $37^\circ\text{C}$ ) angetaut und sofort in ein Reaktionsgefäß mit 50ml Kulturmedium (serumhaltig) überführt. Nach Zentrifugation (10 Min, 130xg,  $4^\circ\text{C}$ ) wurde der Überstand verworfen und das Pellet in serumhaltigem Kulturmedium suspendiert. Die Zellen wurden zu je 250 000 Zellen/ $\text{cm}^2$  auf die 96-well-Platten (200 $\mu\text{l}$  Zellsuspension pro well) aufgebracht und im Inkubationsschrank kultiviert ( $37^\circ\text{C}$ , 5%  $\text{CO}_2$ , 95% rel. Luftfeuchtigkeit). Das serumhaltige Kulturmedium wurde nach einem, 3 und 5 Tagen gewechselt. Nach 6 Tagen wurde das serumhaltige durch serumfreies Kulturmedium ersetzt und nach 7 Tagen konnte der Versuch durchgeführt werden. Dazu wurde zweimal mit KRB gewaschen und 30 Minuten unter Kulturbedingungen inkubiert. Nach Entfernen des KRB wurden die Probelösungen aufgetragen und 90 Minuten lang inkubiert. Nachdem die Probelösungen entfernt wurden und dreimal mit eiskaltem KRB gewaschen wurde, wurde zum Lysieren der Zellen Triton-X 100- Lsg. (0,1%) zugegeben (200 $\mu\text{l}$  pro well) und 30 Minuten bei  $37^\circ\text{C}$  inkubiert. Die Fluoreszenzfarbstoffmenge, die ins Innere der Zellen gelangte, wurde durch direkte Analyse der 96-well-Platte im Fluoreszenz-Plattenreader bestimmt. Um die Effekte der zugegeben Substanzen auf die Farbstoffaufnahme zu veranschaulichen, erfolgte die Angabe der in der Zellen akkumulierten Farbstoffmenge in Relation zu Referenzlösung, die nur Fluoreszenzfarbstoff enthielt. Alle Versuche wurden als Vierfach-Bestimmung durchgeführt.

## 2.4 Bestimmung der Kritischen Mizellbildungskonzentration (CMC) von Tensiden:

Tenside haben die Eigenschaft sich in geringer Konzentration an der Wasseroberfläche anzulagern. Wird eine bestimmte Konzentration überschritten, lagern sich die Moleküle zu Aggregaten zusammen und bilden Mizellen (CMC). Zur Bestimmung dieser Konzentration wurde der Fluoreszenzfarbstoff Diphenylhexatrien (DPH) verwendet. DPH ist ein Farbstoff, der in Lösung nicht fluoresziert. In lipophiler Umgebung, z.B. bei der Einlagerung in Zellmembranen oder Mizellen zeigt sich ein deutliche Fluoreszenz (Zhang et al., 1996; Kabanov et al.; 1995).

Zur Bestimmung der CMC wurden Konzentrationsreihen der Tenside in 96-well-Platten (200µl/well) hergestellt, DPH (Endkonzentration: 10µM) zugegeben und für 24 Stunden bei 37°C in Dunkelheit inkubiert. Die Fluoreszenz der Lösungen wurde in den 96-well-Platten mit einem Fluoreszenz-Plattenreader (Ascent Fluoroskan, Labsystems) bestimmt. Hierbei wurde eine Vierfach-Bestimmung durchgeführt. Unterhalb der CMC war keine bzw. eine sehr geringe Fluoreszenz festzustellen, bei Erreichen der CMC kam es zu einem sprunghaften Fluoreszenzanstieg. Nach Auftragen der Fluoreszenz gegen die Konzentration konnte so die CMC graphisch bestimmt werden.

## 2.5 Anisotropiemessung - Membranfluidität:

Um den Einfluss von Tensiden auf die Membranfluidität der Zellen zu untersuchen, wurde die Fluoreszenzanisotropie von DPH, das sich in die Zellmembran einlagert, bestimmt. Für diese Versuche wurde eine Caco-2-Zellsuspension verwendet, die nach einem oben beschriebenen Passagiervorgang erhalten wurde. Die Zellen (100.000/ml) werden zusammen mit den jeweiligen Tensidlösungen und DPH (10µM) für eine Stunde bei 37°C im Dunkeln inkubiert. Danach wird eine Probe in eine Küvette gegeben und die Fluoreszenzintensität von DPH (Ex.: 345nm; Em.: 435nm) in horizontaler und vertikaler Polarisationssebene nach Anregung in vertikaler und horizontaler Polarisationssebene mit einem Fluoreszenzspektrometer (PerkinElmer) bestimmt.

Die Anisotropie wurde nach folgender Formel berechnet:

$$Anisotropie = \frac{(I_{vv} - (GF \cdot I_{vh}))}{(I_{vv} + (2GF \cdot I_{vh}))}$$

$$GF = \frac{I_{hv}}{I_{hh}}$$

*GF*: Grating Factor;

*I<sub>vv</sub>*: Emissionsintensität, Excitationspolarisierer vertikal und Emissionspolarisierer vertikal

*lvh*: Emissionsintensität, Excitationspolarisierer vertikal und Emissionspolarisierer horizontal

*lhv*: Emissionsintensität, Excitationspolarisierer horizontal und Emissionspolarisierer vertikal

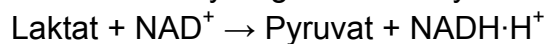
*lhh*: Emissionsintensität, Excitationspolarisierer horizontal und Emissionspolarisierer horizontal

(Sinicrope et al., 1992; Woodcock et al., 1992; Drori et al., 1995; Dudeja et al. 1995).

## 2.6 Zytotoxizitätsversuche

### 2.6.1 Laktatdehydrogenase (LDH) Test:

Die Laktatdehydrogenase katalysiert folgende Reaktion:



LDH katalysiert die Oxidation von Laktat zu Pyruvat bei gleichzeitiger Reduktion von Nicotinamid-adeninucleotid (NAD). Die Bildung von reduziertem NAD (NADH) kann fluorimetrisch (Ex.: 355nm; Em.: 466nm) analysiert werden. Zur Bestimmung der Laktatdehydrogenaseaktivität wurde ein Testreagenz von Sigma verwendet (LDH-L), das Laktat und NAD enthält, verwendet. Toxische Substanzen führen zu einer Zellwandschädigung der verwendeten Zellen. Dadurch kann Laktatdehydrogenase aus den Zellen austreten und im Überstand über den Zellen detektiert werden (LDH-L, Produktinformation, Sigma, Pogue et al., 2001; Gschwend et al., 2001).

Caco-2-Zellen wurden, wie unter dem Punkt „Aufnahmeversuche“ beschrieben, in 96-well-Platten 21 Tage lang kultiviert. Nach zweimaligem Waschen mit KRB, wurden die zu untersuchenden Lösungen aufgegeben und für 90 Minuten bei 37°C inkubiert. Aus jedem Well wurde eine Probe von 5µl aus dem Überstand entnommen und zu je 100µl der Reagenzlösung, die in einer neuen 96-well-Platte vorgelegt wurden, zugegeben. Nach 5 Minuten Inkubation bei 37°C wurde die Platte im Fluoroskan (Ex.:355nm;Ex.:460nm) vermessen.

Als Negativkontrolle diente eine Probe mit KRB, als Positivkontrolle eine Probe mit einer Triton X 100-Lösung (1%), die Ergebnisse wurden alle in Relation zur Negativkontrolle angegeben.

### 2.6.2 Alamar Blue:

Alamar Blue ist eine Substanz, die in ihrer oxidierten Form als blauer, nicht-fluoreszierender und in ihrer reduzierten Form als roter fluoreszierender Farbstoff vorliegt. Die metabolische Aktivität vitaler Zellen sorgt für eine reduzierende Umgebung der Zellen, was durch die Reduktion von Alamar Blue in seine rote,

fluoreszierende Form nachgewiesen werden kann (Alamar Blue, Produktinformation, Biozol).

Caco-2 Zellen wurden wie oben beschrieben in 96-well-Platten für 3 Wochen kultiviert. Vor dem Versuch wurden die Zellen zweimal mit KRB gewaschen. Danach wurden die Probelösungen zugegeben (200µl pro Well) und für 3 Stunden inkubiert. Nach dieser Zeit wurden 5 µl Alamar Blue pro Well hinzugegeben und für 30 Minuten inkubiert. Im Anschluss wird die Menge des entstandenen Farbstoffs fluorimetrisch (Ascent Fluoroskan) analysiert. Als Positivkontrolle diente eine Triton X 100-Lösung (1%), als Negativkontrolle eine Probe mit KRB. Die Angabe der Ergebnisse erfolgte in Relation zur Negativkontrolle.

## 2.7 Medien und Puffer:

### Zellkulturmedien:

---

#### **Zellkulturmedium Caco-2:**

Dulbeccos Modified Eagle Medium (DMEM) mit 3,7 g/l NaHCO <sub>3</sub> , mit 4,5 g/l Glucose mit stabilem Glutamin	380ml
Fötales Bovines Serum (FBS)	100ml
Penicillin (10.000E./ml) / Streptomycin (10.000 mg/ml)	5ml
Glutamin (200mM)	5ml
Nicht-essentielle Aminosäuren (NEAA) (100x)	5ml
Natriumpyruvat (100mM)	5ml

---

#### **Einfriermedium Caco-2:**

Zellkulturmedium	90ml
Dimethylsulfoxid	10ml

---

Zellkulturmedien Gehirnkapillarendothelzellen, PBCEC

---

#### **Zellkulturmedium PBCEC, serumhaltig:**

Medium 199	500ml
L-Glutamin (200mM)	2ml
Penicillin (10.000 E./ml) / Streptomycin (10.000µg/ml)	5ml
HEPES	5ml
Pferdeserum	50ml

---

**Zellkulturmedium PBCEC , serumfrei:**

DMEM/Ham's F12 (1:1)	500ml
L-Glutamin (200mM)	5ml
Penicillin (10.000E./ml) / Streptomycin (10.000 µg/ml)	5ml
HEPES	5ml

---

**Präparationsmedium PBCEC:**

Medium 199	500ml
L-Glutamin (200mM)	2ml
Penicillin (10.000E./ml) / Streptomycin (10.000 µg/ml)	5ml
Gentamicin (50mg/ml)	1ml
HEPES	5ml

---

**Präparationsmedium PBCEC, serumhaltig:**

Präparationsmedium	513ml
Pferdeserum	50ml

---

**Percoll-Lösung 1,03 g/ml:**

Percoll (1,131 g/ml)	115ml
Medium 199	13ml
L-Glutamin (200mM)	2ml
Penicillin (10.000E./ml) / Streptomycin (10.000 µg/ml)	5ml
Gentamicin (50mg/ml)	1ml
HEPES	5ml
KRB	ad 500ml

---

**Percoll-Lösung 1,07 g/ml:**

Percoll (1,131 g/ml)	270ml
Medium 199	30ml
L-Glutamin (200mM)	2ml
Penicillin (10.000E./ml) / Streptomycin (10.000 µg/ml)	5ml
Gentamicin (50mg/ml)	1ml
HEPES	5ml
KRB	ad 500ml

---

**Puffer:**

---

**Krebs-Ringer- Puffer (KRB):**

NaCl	8,3g
KCl	0,22g
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> x 3H <sub>2</sub> O	0,34g
HEPES	2,4g
D-Glucose (wasserfrei)	0,72g
MgCl <sub>2</sub> x 6H <sub>2</sub> O	0,24g
CaCl <sub>2</sub> x 2H <sub>2</sub> O	0,62g
Aqua bidest.	ad 1000ml

---

**Poshatpuffer, phosphate buffered saline (PBS):**

NaCl	8,0g
KCl	0,2g
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> x 2H <sub>2</sub> O	1,44g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,2g
Aqua bidest.	ad 1000ml

---

**Hank's Balanced Salt Solution (HBSS)- ohne Kalzium- und Magnesium:**

	0,4g
KCl	0,06g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,35g
NaHCO <sub>3</sub>	0,048g
NaCl	1,0g
D-Glucose	0,350g
NaHCO <sub>3</sub>	ad 1000ml
Aqua bidest.	

---

**Hank's Balanced Salt Solution (HBSS):**

CaCl <sub>2</sub> x 2H <sub>2</sub> O	1,85g
MgSO <sub>4</sub>	0,98g
KCl	0,4g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,06g
NaHCO <sub>3</sub>	0,35g
NaCl	0,048g
D-Glucose	1,0g
NaHCO <sub>3</sub>	0,350g
Aqua bidest.	ad 1000ml

---

**Cerebrospinalflüssigkeit, künstlich, (kCSF):**

NaCl	6,90g
KCl	0,22g
Na <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> x 12H <sub>2</sub> O	0,27g
NaHCO <sub>3</sub>	1,51g
Harnstoff	0,12g
D-Glucose	2,16g
MgCl <sub>2</sub> x 6H <sub>2</sub> O	0,15g
CaCl <sub>2</sub> x 2H <sub>2</sub> O	0,21g
Aqua bidest.	ad 1000ml
Penicillin (10.000E./ml) / Streptomycin (10.000µg/ml)	10ml
Gentamicin (50mg/ml)	2ml
Amphotericin B (1,25mg/ml)	2ml
HEPES	10ml

---

**2.8 Chemikalien:**

1,6-Diphenyl-1,3,5-hexatrien (DPH)	Fluka Chemie GmbH, Buchs, Schweiz
Alamar Blue	Biozol Diagnostica Vertrieb GmbH, Eching
Benzylalkohol	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Bovines Serum Albumin (BSA)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Amphotericin B (50mg/ml)	Biochrom AG, Berlin
anti-mouse-IgG, Fluoreszeinisothiocyanat-markiert, sheep	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
anti-rabbit IgG (whole molecule), Fluoreszeinisothiocyanat-markiert, sheep	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Atenolol	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim

CaCl <sub>2</sub> x 2H <sub>2</sub> O	Riedel-de-Haen, Seelze
Collagenase-Dispase	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
Collagenase II	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
Cremophor EL	BASF AG, Ludwigshafen
Cremophor RH40	BASF AG, Ludwigshafen
Dextran (durchschnittl. Molekulargewicht: 63.700 g/mol)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
D-Glucose	Merck AG, Darmstadt
D(+)- Saccharose	Riedel-de-Haen, Seelze
Dimethylsulfoxid (DMSO)	J.T. Baker, Deventer, Holland
Dulbeccos Modified Eagle Serum (DMEM)	Biochrom AG, Berlin
Dulbeccos Modifies Eagle Medium / Ham's F12	Biochrom AG, Berlin
Fluorescein	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Fluoresceinisothiscyanat-Dextran 4000	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Fötales Bovines Serum (FBS)	Biochrom AG, Berlin
Gentamicin (50mg/ml)	Biochrom AG, Berlin
Glutardialdehyd (25%)	Merck AG, Darmstadt
Harnstoff	J.T. Baker, Deventer, Holland
HCl, konz.	Riedel-de-Haen, Seelze
HEPES	Roth GmbH, Karlsruhe
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> x 3H <sub>2</sub> O	Merck AG, Darmstadt
KCl	ApliChem GmbH, Darmstadt
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	Gerbu Biotechnik GmbH, Gaiberg
Kollagen (Rattenschwanz)	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
Labrafac CC	Gattefosse, St. Priest, Frankreich
Labrasol	Gattefosse, St. Priest, Frankreich
Lauroglycol FCC	Gattefosse, St. Priest, Frankreich
LDH-L	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
L-Glutamin (200mM)	Biochrom AG, Berlin
Medium199	Biochrom AG, Berlin
MgCl <sub>2</sub> x 6H <sub>2</sub> O	J.T. Baker, Deventer, Holland
MK 571	Biomol, Hamburg
Monoclonal antibody to P-glycoprotein (C219), mouse	Alexis Corporation, Lausen. Schweiz
MRP2 antibody	Dr. Masereeuw, NCLMS, Nijmegen, Holland
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> x 2H <sub>2</sub> O	J.T. Baker, Deventer, Holland
Na <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> x 12 H <sub>2</sub> O	J.T. Baker, Deventer, Holland
NaCl	J.T. Baker, Deventer, Holland



NaHCO <sub>3</sub>	Ferak GmbH, Berlin
NaOH	J.T. Baker, Deventer, Holland
Natriumpyruvat (100mM)	Biochrom AG, Berlin
Nicht-essentielle Aminosäuren(NEAA) (100x)	Biochrom AG, Berlin
Paraformaldehyd	J.T. Baker, Deventer, Holland
Penicillin (10.000 E./ml)/ Streptomycin (10.000µg/ml)	Biochrom AG, Berlin
Percoll (1,131g/ml)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Pferdeserum	Biochrom AG, Berlin
Pluronic F108	C.H. Erbslöh GmbH, Düsseldorf
Pluronic F68	C.H. Erbslöh GmbH, Düsseldorf
Pluronic L35	C.H. Erbslöh GmbH, Düsseldorf
Pluronic L44	C.H. Erbslöh GmbH, Düsseldorf
Pluronic L62	C.H. Erbslöh GmbH, Düsseldorf
Pluronic L64	C.H. Erbslöh GmbH, Düsseldorf
Pluronic P105	C.H. Erbslöh GmbH, Düsseldorf
Pluronic P75	C.H. Erbslöh GmbH, Düsseldorf
Pluronic P85	C.H. Erbslöh GmbH, Düsseldorf
Polymount	Polysciences Inc., Warrington, USA
Propidiumiodid	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Propranolol	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
PSC 833	Novartis AG, Basel, Schweiz
Rhodamin 123	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Solutol HS15	BASF AG, Ludwigshafen
Sulforhodamin 101	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Triton X-100	Merck AG, Darmstadt
Trypanblau-Lsg. (0,4%)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Trypsin (0,25%) / EDTA (0,02%)	Biochrom AG, Berlin
Tween 80	ICI Surfactants, Cleveland, England
α-Tocopheryl Polyethylene Glycol1000 Succinat	Eastman, Kingsport, USA

## 2.9 Materialien:

Zellkulturflaschen, 75cm <sup>2</sup> 3376	Corning Costar, Wiesbaden
Transwell Clear Membraneinsätze, Polyester, Fläche: 1,13cm <sup>2</sup> , Porengröße: 0,4µm 3460	Corning Costar, Wiesbaden
Mikrotestplatten, 96-well 3595 9017 3903	Corning Costar, Wiesbaden
Zellkulturplatten; 12-well 3512	Corning Costar, Wiesbaden
LabTek Chamber Slide, 8-well Permanox Slide	Nalge Nunc Corp., Naperville, USA

## 2.10 Geräte:

Inkubationsschrank Heraeus BBD 6220	Heraus Instruments GmbH, Hanau
Inkubationsschrank Heraeus Cytoperm 2	Heraus Instruments GmbH, Hanau
Werkbank Heraeus Herasafe H2	Heraus Instruments GmbH, Hanau
Werkbank Heraeus LaminAir HB2472	Heraus Instruments GmbH, Hanau
Ascent Fluoroskan	Labsystems, Helsinki, Finnland
Luminescence Spectrometer LS50B	PerkinElmer, Überlingen
Zentrifuge Mistral 3000i	MSE, England
Zentrifuge Beckman TJ-6 TJ-R Refrigeration Unit	Bechman Instruments, München
Zentrifuge Sorvall Superspeed RC2-B Sorvall GSA Rotor	Sorvall, Bad Homburg
Widerstandsmessgerät Millicell-ERS Elektrodensystem STX-2	Millipore, Eschborn
Plattenschüttler Titramax 101	Heidolph, Schwabach
Inversmikroskop ID 03	Zeiss, Jena
Mikroskop DM IRBE mit Argon/Krypton und Helium/Neon Laser	Leica, Bensheim

## 3 Ergebnisse und Diskussion

### 3.1 Ringversuch zu Standardisierung des Caco-2-Modells:

#### 3.1.1 Einführung:

Die Verwendung des Caco-2-Modells für Resorptionsuntersuchungen wurde aufgrund seiner relativ einfachen Handhabung in den letzten Jahren immer populärer. Durch Einführung des Biopharmazeutischem Klassifizierungssystems (BCS) durch die FDA wird sich dieser Trend wahrscheinlich noch verstärken (Amidon et al., 1995). Das BCS ist ein Hilfsmittel zur Abschätzung der Resorptionseigenschaften von Arzneistoffen. Sie werden nach ihren Löslichkeits- und Permeabilitätseigenschaften eingeteilt. Die Bestimmung der Lösungseigenschaften kann relativ einfach in Lösungsversuchen erfolgen. Die Permeabilitätseigenschaften können u.a. unter Verwendung des Caco-2 Modells ermittelt werden. Eine Charakterisierung erfolgt hierbei durch Bestimmung des apparenten Permeabilitätskoeffizienten ( $P_{app}$ ). Ein weitere Einteilung erfolgt nach der Freisetzungsgeschwindigkeit der Arzneiform. Sie wird als schnell freisetzend eingestuft (immediate release dosage form), falls 85% des Wirkstoffs innerhalb von 30 Minuten in einem Volumen von höchstens 900ml in gelöster Form vorliegen. Eine seit dem Jahr 2000 bestehende Richtlinie der FDA ermöglicht es, den Erlass von normalerweise zur Zulassung von Arzneimitteln geforderten In Vivo-Studien zu beantragen, falls das Arzneimittel der Klasse 1 (gute Löslichkeit und gute Permeabilität) nach dem Biopharmazeutischen Klassifizierungssystem (BCS) zugeordnet werden konnte (FDA Guidance for Industry, 2000). Dies ist eine wesentliche Möglichkeit der Kostenersparnis. Aufgrund des Ursprungs der Caco-2-Zelllinie aus Tumorgewebe können mit fortschreitender Kulturdauer und steigender Passagezahl morphologische Veränderungen der Zellen auftreten, die sich von Labor zu Labor aufgrund unterschiedlicher Kulturbedingungen oder Arbeitsmethoden in verschiedener Ausprägung ausbilden können. Die Zellen haben z.B. durch unterschiedliche Enzym- oder Transporterausrüstung oder durch variierende Ausprägung von tight-junctions einen unterschiedlichen Einfluss auf die bestimmten Resorptionseigenschaften (Walter et al., 1995; Hosoya et al., 1996; Briske-Anderson et al., 1997). Dadurch ist es schwierig,  $P_{app}$ -Werte, die in verschiedenen Laboratorien bestimmt wurden, direkt miteinander zu vergleichen. In zahlreichen Veröffentlichungen wurde versucht, Arzneistoffe durch Korrelation von In Vitro- und In Vivo-Ergebnissen aufgrund der  $P_{app}$ -Werte, die Caco-2-Modell bestimmt wurden, als In Vivo gut oder schlecht resorbierbar einzustufen. Häufig werden Substanzen mit  $P_{app}$ -Werten kleiner als  $10^{-6}$  cm/s als schlecht resorbierbar, mit  $P_{app}$ -Werten zwischen  $1$  und  $10 \times 10^{-6}$  cm/s als mittelmäßig resorbierbar und mit  $P_{app}$  Werten grösser als  $10 \times 10^{-6}$  cm/s als gut resorbierbar eingestuft. Aber auch Abweichungen von dieser Einteilung wurden häufig vorgenommen. Ursachen hierfür können z.B. durch Unterschiede der folgenden Parameter hervorgerufen werden.: Bezugsquelle und

Passagezahl der Zellen; Zellkulturmedien; Kulturdauer; Material, Fläche und Porengröße der Filtereinheit; Zusammensetzung und pH-Wert des Transportpuffers (Yee, 1997; Artursson, 1990; Artursson and Karlsson, 1991; Bailey et al.1996; Hidalgo, 2001; Cerep Inc., 2001)

### **3.1.2 Ziel des Ringversuchs:**

Nach Festlegung von Arbeitsrichtlinien zur Routinekultivierung von Caco-2-Zellen sowie zur Bestimmung von  $P_{app}$ -Werten im Caco-2-Modell und durch den Vergleich der Ergebnisse der Permeabilitätsbestimmung von vorher festgelegten Substanzen sollte ein Versuch zur Standardisierung des Caco-2-Modells unternommen werden.

### **3.1.3 Teilnehmende Einrichtungen:**

- Zentrallaboratorium Deutscher Apotheker, Eschborn (ZL)
- Across Barriers GmbH, Saarbrücken (AB)
- Institut für Pharmazeutische Technologie und Biopharmazie, Universität des Saarlands, Saarbrücken (UdS)
- Institut für Pharmazeutische Technologie und Biopharmazie, Ruprecht-Karls Universität Heidelberg (Uni HD)
- Center for Drug Evaluation and Research (CDER), Food and Drug Administration (FDA), Rockville, Maryland, USA (FDA)

### **3.1.4 Durchführung:**

Vor der eigentlichen Durchführung des Ringversuchs wurden gemeinsam Arbeitsvorschriften für die Routinekultivierung der Zellen und für die Versuchsdurchführung erarbeitet. Um zu große Abweichungen von den bestehenden Vorschriften der einzelnen Laboratorien zu vermeiden, wurden einige Änderungen zugelassen, die aber genau zu dokumentieren waren.

Die Routinekultivierung der Caco-2-Zellen und die Versuchsdurchführung erfolgte gemäss den im Kapitel „Materialien und Methoden“ beschriebenen Arbeitsvorschriften.

Als Testsubstanzen wurden folgende Substanzen ausgewählt: Fluorescein und FITC-Dextran 4000 als Parazellulärmarker und sehr schlecht permeable Substanzen, Atenolol als schlecht permeable Substanz, Propranolol als gut permeable Substanz, Rhodamin 123 als p-gp-Substrat und Sulforhodamin 101 als MRP2-Substrat. Die einzusetzende Konzentration war für alle Substanzen 50  $\mu$ M, bei Atenolol betrug sie 500 $\mu$ M.

Die entnommenen Proben wurden entweder fluorimetrisch (Fluorescein, FITC-Dextran, Rhodamin 123 und Sulforhodamin 101) oder mittels HPLC-UV (Atenolol, Propranolol) analysiert. Die Einstufung der Substanzen nach ihren Permeabilitätseigenschaften erfolgte unter Angabe der Apparenten Permeabilitätskoeffizienten ( $P_{app}$ ).

### **3.1.5 Unterschiede in der Kultivierung der Zellen und Versuchsdurchführung:**

Es gab einige Unterschiede bei der Kultivierung der Zellen und bei der Versuchsdurchführung zur Bestimmung der  $P_{app}$ -Werte (Tab.1). Außer bei der Arbeitsgruppe von AB, die Zellen des DSMZ, Braunschweig, verwendeten, stammten die Zellen der übrigen Teilnehmer von der ATCC, Rockville, Maryland (USA). Es wurde festgelegt, dass die Passagezahl der verwendeten Zellen kleiner als 65 sein sollte. Da die Zellen des DSMZ ohne Angabe einer Passagezahl geliefert werden, kann bei Verwendung dieser Zellen die Zählung der Passagen erst innerhalb des Labors beginnen. Aus diesem Grund ist ein Vergleich mit Zellen der ATCC, die mit einer definierten Passagezahl geliefert werden, nicht möglich. Diese Tatsache stellt ein generelles Problem dar, das nicht nur auf diesen Ringversuch beschränkt ist. Auch die Kulturmedien wiesen leichte Unterschiede auf. Penicillin/Streptomycin war das bevorzugte Antibiotikum des ZL, der Uni HD und der FDA. Die UdS und AB bevorzugten Gentamicin. Die Kulturmedien enthielten einen Zusatz von 10% Fötalem Kälberserum (FCS) in den Laboratorien des ZL, von AB, der UdS und der FDA, das Kulturmedium der Uni HD enthielt hingegen einen Zusatz von 20% FCS. Auch bei der Versuchsdurchführung gab es leichte Unterschiede. So wurde es in den Labors der UdS, von AB und der Uni HD bevorzugt, Proben aus dem Akzeptorkompartiment zu entnehmen und das entnommene Volumen durch Zugabe frischen Transportpuffers zu ersetzen, während in den Labors des ZL und der FDA das Umsetzen der gesamten Filtereinsätze in frische mit Transportpuffer gefüllte Wells bevorzugt wurde. Als Transportpuffer verwendeten die Gruppen von AB, der UdS und der Uni HD KRB, die Gruppen des ZL und der FDA HBSS. Alle Arbeitsgruppen bevorzugten es, die Transportplatten während der gesamten Versuchsdauer zu schütteln. Einzige Ausnahme bildete die Gruppe von AB, die auf ein Schütteln der Platten verzichtete. Die Analytik der Proben erfolgte in den jeweiligen Laboratorien, wobei alle Proben der FDA und die Proben von Atenolol und Propranolol der Uni HD im ZL analysiert wurden. Zur Aufbewahrung und zum Transport dorthin wurden die Proben dieser Gruppen eingefroren, weshalb besonders die Ergebnisse der FDA unter Vorbehalt zu interpretieren sind, da hier durch das Einfrieren und den langen Transportweg wahrscheinlich Veränderungen der Proben aufgetreten sind.

Die Vorschriften zur Kultivierung und zur Versuchsdurchführung wurden in Treffen vor Beginn des Ringversuchs festgelegt. Einige Abweichungen waren wie oben beschrieben erlaubt, da ihr Einfluss auf die Versuchsergebnisse von den Versuchsteilnehmern als nicht entscheidend erachtet wurden und ein Abweichen von den etablierten Vorgehensweisen in den einzelnen Labors nur unter größerem Aufwand möglich gewesen wäre. So hätte z.B. die Verwendung eines anderen Puffers eine neue Validierung einiger Analytikverfahrens erfordert.

	ZL	UdS	AB	Uni HD	FDA
Ursprung der Zellen	ATCC	ATCC	DSMZ	ATCC	ATCC
Passage-Nummer	31	57	14/13	55	39
FCS	10%	10%	10%	20%	10%
CO <sub>2</sub>	10%	5%	5%	5%	5%
Antibiotikum	Pen/Strep	Gentamicin	Gentamicin	Pen/Strep	Pen/Strep
Schütteln der Platte	ja	ja	nein	ja	ja
Transportpuffer	HBSS	KRB	KRB	KRB	HBSS
Probenentnahme(P)/Umsetzen(U)	U	P	P	P	U
Einfrieren der Proben	nein	nein	nein	Ja (Atenolol, Propranolol)	ja
TEER ( $\Omega/\text{cm}^2$ )	500 - 600	450	350	300 – 450	300 - 500

Tab.1: Unterschiede in den Kulturbedingungen und der Versuchsdurchführung

### 3.1.6 Ergebnisse und Diskussion:

FITC-Dextran 4000 und Fluorescein wurden als sehr schlecht permeable Substanzen ausgewählt. Sie werden parazellulär transportiert und in vielen Labors routinemässig als Parazellulärmarker eingesetzt, um die Integrität der Zellschicht nachzuweisen. Jedes Labor legt normalerweise Richtwerte fest, die von den Parazellulärmarkern unterschritten werden müssen, um Versuchsergebnisse, die mit diesen Zellen erzielt wurden, zu akzeptieren. Im Ringversuch lagen die  $P_{app}$ -Werte für FITC-Dextran 4000 bei den Gruppen des ZL, von AB, der UdS und der Uni HD zwischen 0,05 und  $0,26 \times 10^{-6}$  cm/s. Die Gruppe der FDA ermittelte hier einen Wert von  $1,08 \times 10^{-6}$  cm/s (Tab.2). Häufig wird ein Wert unterhalb  $10^{-6}$  cm/s gefordert. Von der ersten 4 Arbeitsgruppen wurde dies deutlich erreicht. Die Proben der FDA waren wahrscheinlich durch das Einfrieren und den langen Transportweg beeinflusst, sodass dieser relativ hohe Wert mit Vorsicht zu interpretieren ist. Noch deutlicher wird dies bei den Werten für Fluorescein. Hier lagen die Werte der ersten 4 Gruppen zwischen 0,25 und  $0,81 \times 10^{-6}$  cm/s, der Wert der FDA aber bei  $3,01 \times 10^{-6}$  cm/s, ein

Wert, der deutlich über dem Wert liegt, der normalerweise als noch akzeptabel erachtet werden (Tab.2). Die  $P_{app}$ -Werte der Parazelullärmarker lagen also deutlich unter  $10^{-6}$  cm/s und zeigten so das Vorliegen von dichten Zellschichten. Die Werte für FITC-Dextran 4000 lagen dabei etwas tiefer, im unteren Bereich von  $10^{-7}$  cm/s, was durch das größere Molekulargewicht auch zu erwarten war. Zu den unterschiedlichen Ergebnissen können auch die unterschiedlichen Molekulargewichte der verwendeten Ausgangssubstanzen beigetragen haben, da FITC-Dextran nicht mit einem definierten Molekulargewicht erhältlich ist. Die Angabe 4000 (g/mol) stellt nur eine durchschnittliche und näherungsweise Angabe des Molekulargewichts von Dextran-Molekülen unterschiedlicher Größe darstellt. Es können also z.B. unterschiedliche Mengen an kleineren Dextran-Moleküle vorliegen, die bessere Permeabilitätseigenschaften besitzen als größere Moleküle. Die Werte für Fluorescein lagen aufgrund des kleineren Molekulargewichts bei allen Gruppen etwas höher, im mittleren bis oberen Bereich von  $10^{-7}$  cm/s. Die angewendeten Kultivierungsmethoden führten also in jedem Labor zu dichten, konfluenten Zellschichten.

Atenolol wurde als eine Substanz ausgewählt, die als schlecht permeabel eingestuft wird. Die Werte des ZL, der UdS, und von AB lagen zwischen 0,48 und  $0,75 \times 10^{-6}$  cm/s und somit in einem relativ einheitlichen Bereich. Die Uni HD und die FDA ermittelten Werte von 2,16 bzw.  $2,20 \times 10^{-6}$  cm/s (Tab.2). Diese Werte übersteigen zwar den der anderen Teilnehmer, liegen aber im Bereich anderer Literaturangaben (Yee, 1997). Atenolol konnte somit von allen Teilnehmer als schlecht permeable Substanz eingestuft werden, war aber in allen Laboratorien besser permeabel als die verwendeten Parazellulärmarker.

Als ein Beispiel für eine gut permeable Substanz wurde Propranolol ausgewählt. Als lipophile Substanz wird Propranolol sehr gut transzellulär transportiert. Das ZL, die UdS, AB und die Uni HD ermittelten hier  $P_{app}$ -Werte zwischen 11,0 und  $35,6 \times 10^{-6}$  cm/s (Tab.2). Sie lagen einheitlich im unteren Bereich von  $10^{-5}$  cm/s. Propranolol zeigte somit in allen Labors deutlich bessere Permeabilitätseigenschaften als Atenolol und konnte von allen Teilnehmern eindeutig als gut permeable Substanz eingestuft werden. Der  $P_{app}$ -Wert von  $68,4 \times 10^{-6}$  cm/s der FDA übertraf die Werte der anderen Teilnehmer, aber trotz der möglichen oben erwähnten Probleme bei Einfrieren und Transport, konnte Propranolol auch hier als gut permeable Substanz eingestuft werden.

Um festzustellen, ob eine eventuell unterschiedliche Expression von aktiven Transportern in den verwendeten Caco-2-Zellen der einzelnen Gruppen einen Einfluss auf die Identifikation einzelner Substanzen als Substrat dieser Transporter hat, wurden die Substanzen Rhodamin 123 und Sulforhodamin 101 in die Studie einbezogen.

Rhodamin 123 diente als Modellsubstrat des aktiven Transporters, p-gp. P-gp transportiert als Effluxpumpe Substrate aus dem Inneren oder aus der Zellmembran von Caco-2-Zellen zurück ins apikale Kompartiment. Zur Untersuchung dieser aktiven Transporteigenschaften erfolgte bei diesen Substanzen nach Probenzugabe

in das basolaterale Kompartiment auch eine  $P_{app}$ -Wert-Bestimmung für den Transport von der basolateralen zur apikalen Seite. Wenn ein aktiver Transport in Richtung der apikalen Seite vorliegt, ist zu erwarten, dass der  $P_{app}$ -Wert dieser Richtung den der entgegengesetzten Richtung deutlich übersteigt. Um das Ausmaß des gerichteten Transports zu verdeutlichen, erfolgte die Angabe der Ergebnisse auch durch Quotienten aus ba- und ab-Transport:  $P_{app}(ba)/P_{app}(ab)$ . Die ermittelten  $P_{app}$ -Werte der Teilnehmer für den ab-Transport lagen zwischen  $0,36$  und  $1,08 \times 10^{-6}$  cm/s. Die Substanz konnte somit einheitlich als schlecht permeabel eingestuft werden. Für den entgegengerichteten Transport wurden  $P_{app}$ -Werte zwischen  $1,5$  und  $9,7 \times 10^{-6}$  cm/s bestimmt (Tab.3). Die  $P_{app}$ -Werte des ba-Transports waren bei allen Gruppen größer als die des ab-Transports. Dadurch konnte ein aktiver zur apikalen Seite gerichteter Transport nachgewiesen werden. Die Streuung der Ergebnisse war relativ groß, was höchstwahrscheinlich auf den unterschiedlichen Expressionsgrad von p-gp der unterschiedlichen Caco-2-Zellen zurückzuführen ist. Noch deutlicher wird dies bei der Betrachtung der unterschiedlichen Quotienten (ba/ab). AB ermittelte einen ba/ab-Quotienten von 21. Dieser Wert übertraf die der anderen Gruppen bei weitem und lässt auf einen sehr hohen p-gp-Gehalt dieser Zellen schließen. Die Quotienten des ZL und der UdS lagen mit 6,7 bzw. 6,5 im mittleren Bereich, während die Uni HD und die FDA mit 2,5 bzw. 2,6 die niedrigsten Quotienten ermittelten, was auf eine relativ geringe p-gp-Expression der in diesen Labors verwendeten Caco-2-Zellen hinweist (Tab.3). Aber auch in diesen Laboratorien war eindeutig ein aktiver zur apikalen Seite gerichteter Transport festzustellen. Rhodamin 123 wurde also auch von diesen Teilnehmern eindeutig als Substrat eines aktiven Transporters identifiziert.

Sulforhodamin 101 wurde als Modells substrat für MRP2 ausgewählt. MRP2 ist ein weiteres Transportprotein, das in Caco-2-Zellen exprimiert wird (Hirohashi et al. 2000). Die Transportrichtung ist die gleiche wie bei p-gp, sodass auch hier die oben beschriebenen Phänomene zu beobachten sind. Die ermittelten  $P_{app}$ -Werte der Teilnehmer lagen für den ab-Transport zwischen  $0,07$  und  $0,52 \times 10^{-6}$  cm/s. Sulforhodamin 101 wurde somit einheitlich als schlecht permeable Substanz eingestuft. Für die entgegengesetzte Transportrichtung lagen die bestimmten  $P_{app}$ -Werte zwischen  $0,11$  und  $5,5 \times 10^{-6}$  cm/s, und somit durchschnittlich höher die ab-Werte (Tab.3). Bei der Betrachtung der Quotienten fiel auf, dass das ZL mit einem ermittelten Wert von 15 einen sehr deutlichen gerichteten Transport beobachten konnte, was auf eine hohe MRP2-Expression der verwendeten Zellen schließen lässt. Auch die Werte von 4 von AB und 4,5 der Uni HD, ermöglichten die Beobachtung eines gerichteten Transports und deuten auf eine ausreichende Expression des Transportproteins hin. Die Gruppen der FDA und der UdS konnten allerdings in den dort durchgeführten Versuchen mit den Quotienten von 0,7 keinen zur apikalen Seite gerichteten Transport beobachten (Tab.3). Eigentlich deutet ein solcher Wert sogar auf einen aktiven Transport in Richtung basolateraler Seite hin. Da aber der Quotient relativ nahe bei 1 lag, kann man hier davon ausgehen, dass kein aktiver Transport in diesen Versuchen vorlag und die in diesen Labors verwendeten



Zellen nicht genug oder kein MRP2 exprimierten. Somit konnte Sulforhodamin 101 nicht als Substrat eines aktiven Transportproteins identifiziert werden.

### **Zusammenfassung:**

Alle Teilnehmer am Ringversuch waren in der Lage, die ausgesuchten Substanzen eindeutig als sehr schlecht (FITC-Dextran 4000, Fluoreszein), schlecht (Atenolol) und gut permeabel (Propranolol) einzustufen, wobei die Ergebnisse der FDA, aufgrund der möglichen Beschädigung der Proben unter Vorbehalt betrachtet werden müssen. Auch konnten die Substrate von aktiven Transportproteinen (Rhodamin 123, Sulforhodamin 101) identifiziert werden. Einzige Ausnahme war die fehlende Identifikation von Sulforhodamin 101 als Substrat eines aktiven Transportproteins durch die UdS, höchstwahrscheinlich aufgrund fehlender oder zu geringer MRP2-Expression der verwendeten Caco-2-Zellen. Trotz zum Teil erheblicher Unterschiede beim Vergleich der absoluten  $P_{app}$ -Werte erfolgten diese Einschätzungen eindeutig. So ermittelte z.B. die Uni HD immer relativ höhere  $P_{app}$ -Werte als die anderen Teilnehmer, was aber nicht zu einer anderen Einstufung der ausgewählten Substanzen führte. Es konnte auch keine entscheidende Auswirkung der unterschiedlichen Parameter der Versuchsdurchführung beobachtet werden. So konnte z.B. kein Einfluss der verwendeten Puffer oder der Durchführung bezüglich der Probennahme oder dem Umsetzen der Filter festgestellt werden. Das Schütteln der Platten hatte auch keine ersichtliche Auswirkung auf die Versuchsergebnisse. Bei den Werten für Propranolol hätte man hier einen Effekt vermuten können, da es sich um eine gut permeable Substanz handelt und der schnell anflutende Wirkstoff im Kompartiment durch Schütteln besser verteilt wird. Aber auch dieser Effekt konnte nicht beobachtet werden. Die größten Unterschiede wurden bei der Bestimmung der Permeabilitätseigenschaften der Modellsubstrate von p-gp und MRP2, Rhodamin 123 bzw. Sulforhodamin 101, deutlich. Hier wurden eindeutige Unterschiede in der Transportaktivität beider Proteine festgestellt. Die Expression von p-gp war z.B. in den Zellen von AB wesentlich höher als in den Zellen der anderen Teilnehmer, die Expression von MRP2 war in den Zellen des ZL am höchsten. Dieses Phänomen wurde auch schon von anderen Gruppen festgestellt und stellt eines der größten Probleme bei der Standardisierung dieses Modells dar (Hosoya et al., 1996; Briske-Anderson et al., 1997). Dies kann vermutlich auf die unterschiedliche Kultivierung der Zellen zurückgeführt werden kann. Es wurden zwar einheitliche Richtlinien zur Routinekultivierung der Caco-2-Zellen erarbeitet, sie kamen allerdings erst bei dieser Versuchsdurchführung zur Anwendung. In den einzelnen Labors wurde aber schon längere Zeit nach den jeweiligen Vorschriften gearbeitet, sodass sich im Lauf der Zeit morphologische Veränderungen entwickelt haben können. Von Einfluss können hier einige Faktoren sein: Der p-gp-Gehalt kann sich z.B. mit höheren Passagezahlen verändern (Anderle et al., 1998). Der Zeitpunkt der Passagierung sollte auf jeden Fall immer deutlich vor Erreichen der Konfluenz liegen. Die Dauer der Trypsinisierung und die Aussaatdichte der Zellen kann ebenfalls die Entwicklung der Zellkultur beeinflussen.

Die erarbeiteten Richtlinien können zur Standardisierung des Modells behilflich sein. Allerdings konnte die langfristige Überprüfung der konsequenten Anwendung dieser Vorschriften in diesem Versuch nicht erfolgen. Für die passiv transportierten Substanzen lieferte der Ringversuch zufrieden stellende Ergebnisse, für die aktiv transportierten allerdings nur mit Einschränkungen, sodass hier eine erneute Überprüfung wünschenswert wäre.

Substanz	Apparente Permeabilitätskoeffizienten $P_{app}$ [ $\times 10^{-6}$ cm/s; n=4] (RSD%)				
	ZL	UdS	AB	Uni HD	FDA
FITC-Dextran	0.17 *) -	0.05 *) (20)	0.07 (7.9)	0.26 (26.1)	1.08 (44.4)
Fluorescein	0.48 (11.9)	0.25 **) -	0.4 (8.8)	0.81 (8.4)	3.01 (13.2)
Atenolol	0.7 (22.8)	0.75 (12)	0.48 (24)	2.16 (6.4)	2.20 (18.2)
Propranolol	35.6 (2.0)	30.0 (1.9)	11 **) (14.5)	15.9 (6.5)	68.43 (4.9)

\*) n=3

\*\*\*) n=1

Tab. 2: Apparente Permeabilitätskoeffizienten ( $P_{app}$ ) der ausgewählten Substanzen: Parazellulärmarker, sehr schlecht permeable (FITC-Dextran 4000, Fluorescein), schlecht permeable (Atenolol), gut permeable (Propranolol)

	Apparente Permeabilitätskoeffizienten $P_{app}$ [ $\times 10^{-6}$ cm/s; n=4] (RSD%) ba/ab-Quotienten				
Substanz	ZL	UdS	AB	Uni HD	FDA
Rhodamin 123 (a-b)	0.8 (19.3)	0.36 (13.9)	0.46 (10.9)	1.08 (4.6)	0.6 (5.0)
Rhodamin 123 (b-a)	5.33 (12.7)	2.33 (6.4)	9.7 (13.7)	2.75 (17.4)	1.5 (44.7)
Quotient: ba/ab	6.7	6.5	21	2.6	2.5
Sulforhodamin 101 (a-b)	0.37 (12.8)	0.16 (6.3)	0.07 (13.2)	0.52 (13.5)	0.2 (25.0)
Sulforhodamin 101 (b-a)	5.5 (4.8)	0.11 (9.1)	0.27 (17.3)	2.3 (9.0)	0.14 (7.1)
Quotient: ba/ab	15	0.7	4	4.5	0.7

Tab. 4:  $P_{app}$ -Werte der ausgewählten Substrate für aktive Transporter für beide Richtungen und Angabe des Quotienten:  $P_{app}(ba)/P_{app}(ab)$ .

## **3.2 Nachweis von p-gp und MRP2 in Caco-2-Zellen:**

### **3.2.1 Immunfärbung**

Die Expression der ABC-Transportproteine, p-gp und MRP2, in Caco-2-Zellen wurde in der Literatur bereits beschrieben (Ho, 1994; Makhey et al. 1998; Gutmann et al. 1999; Hirohasaki, 2000; Walgren, 2000). Durch verschiedene Kulturbedingungen und Passagezahlen kann es aber zu morphologischen Veränderungen der Zellen und einer unterschiedlich ausgeprägten Expression der Proteine kommen (Walter et al., 1995; Hosoya et al., 1996; Artusson et al., 1997; Briske-Anderson et al., 1996; Anderle et al., 1998). Dieses Phänomen wurde auch bei den verschiedenen Zellstämmen der Teilnehmer des Ringversuchs deutlich. Da eine ausreichende Expression beider Proteine in den verwendeten Caco-2-Zellen für die weiteren Untersuchungen im Rahmen dieser Arbeit von entscheidender Bedeutung war, wurden beide Proteine auch in den hier verwendeten Zellen nachgewiesen. Ein funktioneller Nachweis der Transportaktivität wurde durch Permeationsstudien erbracht, da ein deutlicher zur apikalen Seite gerichteter Transport von spezifischen Substraten beider Transportproteine festgestellt werden konnte. Ein direkter Nachweis der Proteine sollte durch eine Immunfärbung erfolgen. Hierzu wurden die Zellen drei Wochen lang auf einem Objektträger kultiviert. Nach Inkubation der Zellen mit spezifischen primären Antikörpern erfolgte die Bindung der Antikörper an die Zielstruktur des Proteins. Die primären Antikörper wurden durch Bindung eines mit einem Fluoreszenzfarbstoff (FITC) gekoppelten sekundären Antikörpers sichtbar gemacht, indem Bilder mit einem Fluoreszenzmikroskop aufgenommen wurden. Durch die deutlich sichtbare grüne Fluoreszenz konnte sowohl p-gp (Bild 1) als auch MRP2 (Bild 3) nachgewiesen werden. Die Negativkontrollen wurden ausschließlich mit dem jeweiligen sekundären Antikörper inkubiert. Da hier keine Fluoreszenz zu erkennen war (Bild 2 und Bild 4), konnte eine unspezifische Bindung der sekundären Antikörper ausgeschlossen werden. Durch Färbung mit Propidiumiodid erscheinen die Zellkerne rot.

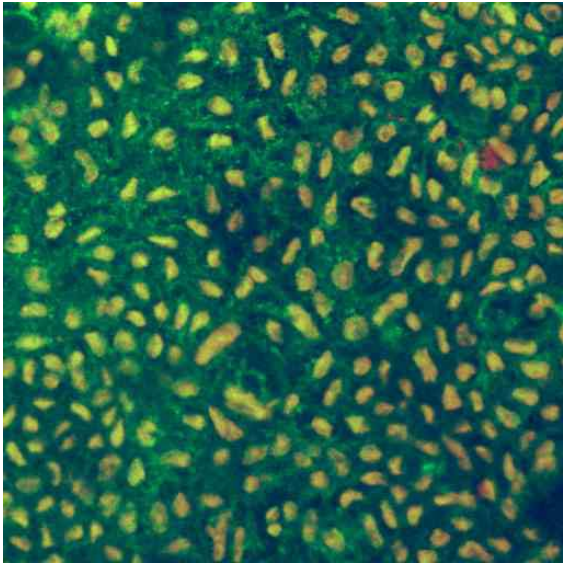


Bild 1: Immunfärbung p-gp

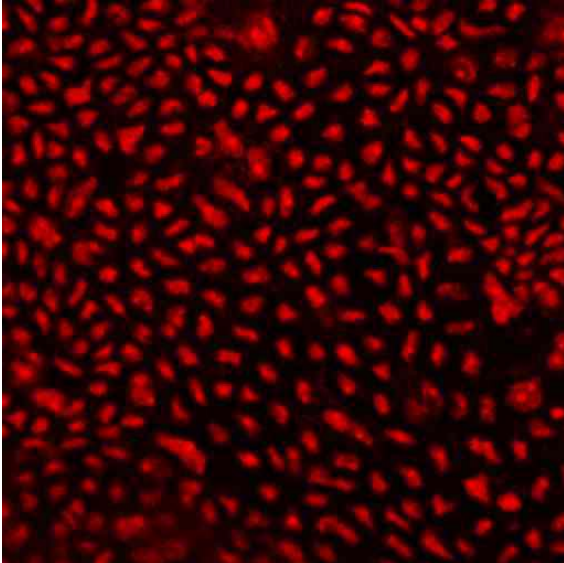


Bild 2: Negativkontrolle p-gp

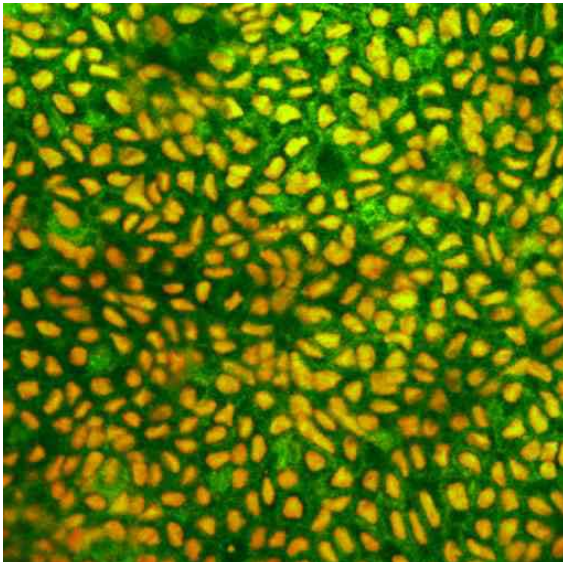


Bild 3: Immunfärbung MRP2

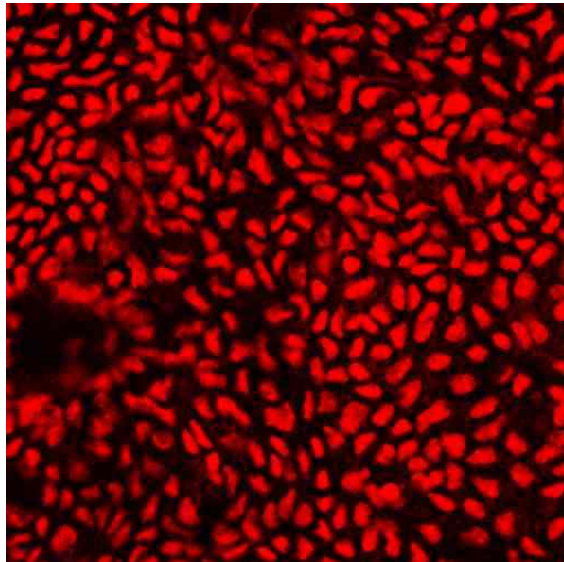


Bild 4: Negativkontrolle MRP2

### 3.3 Wechselwirkung von Tensiden mit p-gp (I)

#### 3.3.1 Aufnahmeversuche mit Caco-2-Zellen:

Der Einfluss von Tensiden auf die Transporteigenschaften von p-gp wurde zuerst in Aufnahmeversuchen mit Caco-2-Zellen untersucht. Zur Auswahl kamen nicht-ionische Tenside, da hier keine oder nur sehr geringe toxische Einflüsse zu erwarten waren und diese häufig pharmazeutisch in Formulierungen zur peroralen Anwendung Verwendung finden. Als Modellsubstrat diente der Fluoreszenzfarbstoff Rhodamin 123, da diese Substanz von p-gp selektiv transportiert wird, und die Möglichkeit der fluorimetrischen Analytik in diesem Versuchsaufbau von großem Vorteil war. Aufgrund dieser Eigenschaften entwickelte sich Rhodamin 123 zu einer der Standardsubstanzen zur Untersuchung von p-gp-Transport und wird von vielen Arbeitsgruppen in verschiedene Versuchsanordnungen verwendet (Rege et al., 2002; Dudeja et al., 1995; Miller et al., 1997; Dintaman et al. 1999). Die Zellen wurden als Referenz mit Farbstoff allein und zur Überprüfung der Tensidwirkung zusammen mit den einzelnen Tensiden in verschiedenen Konzentrationen inkubiert. Die Farbstoffmenge, die in die Zelle gelangte, wurde bestimmt und dadurch der Einfluss der zugesetzten Tenside ermittelt. Die Angabe der Ergebnisse erfolgte in Relation zur Referenzprobe, die nur Farbstoff enthielt. Die in die Zellen aufgenommene Farbstoffmenge dieser Referenzprobe wurde jeweils als 100%-Wert definiert. Rhodamin 123 wurde in einer Konzentration von 5µM eingesetzt.

Ein Einfluss von sehr geringem Ausmaß konnte bei folgenden Tensiden festgestellt werden: Tween 80 (Abb. 15), Labrafil, Labrasol, Lauroglycol (Abb.12-12) und TPGS (Abb.10). Sie verursachten eine erhöhte Rhodaminaufnahme von nur 120-140%. Mit Werten um 150% fiel dieser Effekt für Cremophor EL (Abb.13), Cremophor RH 40 (Abb.14) und Solutol HS15 (Abb.17) etwas deutlicher aus.

Ein wesentlich stärkerer Einfluss auf die Rhodaminaufnahme konnte bei allen Mitgliedern der Pluronic-Gruppe festgestellt werden. Die größten Auswirkungen verursachten Pluronic P85, Pluronic P75 und Pluronic P105 (Abb. 1-3). Sie waren in der Lage, die in der Zelle akkumulierte Rhodaminmenge auf Werte von bis zu 900% der Kontrolle zu steigern. Auch bei Verwendung von Pluronic 44, Pluronic L62 und Pluronic L64 (Abb. 3-5) wurden noch deutliche Steigerungen auf Werte von ca. 300% beobachtet. Weniger große, aber immer noch eindeutige Effekte konnten für Pluronic F68, Pluronic F108 und Pluronic L35 (Abb. 7-9) bestimmt werden. Die Zugabe dieser Tenside hatte eine Erhöhung der aufgenommenen Rhodaminmenge auf Werte von 250% zur Folge.

Es konnte somit ein deutlicher Unterschied zwischen den getesteten Tensiden festgestellt werden, wobei die Gruppe der Poloxamere (Pluronic) eindeutig die größten Effekte verursachte.

Bei allen Tensiden, die einen Einfluss auf die Rhodaminanreicherung in den Zellen hatten, war eine auffallende Konzentrationsabhängigkeit des Effektes zu beobachten. Zuerst konnte mit Erhöhung der Konzentration auch eine kontinuierliche

Steigerung der Rhodaminaufnahme festgestellt werden. Nach Erreichen eines Maximums war durch weitere Konzentrationserhöhung der Tenside keine weitere Steigerung, sondern eine Verminderung dieses Effektes zu beobachten. Wie später noch gezeigt werden wird, liegt dieses Maximum im Bereich der CMC (critical micellization concentration) dieser Tenside. Dies weist darauf hin, dass die Anreicherung von Rhodamin 123 von den einzelnen Tensidmolekülen und nicht durch Mizellen hervorgerufen wird. Zwischen Tensidmolekülen, die frei in Lösung vorliegen und Tensidmolekülen, die in Mizellen gebunden sind, kommt es zur Ausbildung eines Gleichgewichtszustands, sodass die Anzahl an frei vorliegenden Tensidmolekülen nach Überschreiten der CMC konstant bleibt. Trotz einer Erhöhung der gesamten Tensidkonzentration kommt es also nicht zu einer weiteren Steigerung des Effekts, da die Konzentration an wirksamen freien Tensidmolekülen nicht größer wird. Die Verringerung der Tensidwirkung bei Konzentrationen oberhalb der CMC kann durch die Tatsache begründet werden, dass ein Teil der Rhodaminmenge in die Mizellen eingeschlossen wird, dadurch nicht in Kontakt mit der Zellmembran kommen kann und deshalb nicht in die Zelle aufgenommen wird. Wie in Toxizitätsstudien noch gezeigt werden wird, haben die meisten der getesteten Tenside erst bei Konzentration über 1% eine toxische Wirkung. Dies ist in dieser Versuchsreihe durch ein Absinken der aufgenommenen Rhodaminmenge unter den 100%-Referenzwert bei hohen Konzentrationen zu erkennen. Bei wenigen Tensiden, wie z.B. Pluronic L62 (Abb.5) und Pluronic L64 (Abb.6) zeigt sich dies schon bei Konzentrationen um 1%. Die Verringerung der beobachteten Tensidwirkung nach Überschreiten der CMC ist somit nicht auf toxische Wirkungen zurückzuführen.

Die wirksamsten Tenside gehören zur großen Gruppe der Polxamere (Pluronic). Diese Tenside bestehen aus einer lipophilen zentralen Polyoxypropylenkette und zwei seitlichen hydrophilen Polyoxyethylenkette. Durch Variation der Kettenlängen entstehen zahlreiche Tenside mit unterschiedlichen hydrophilen und lipophilen Eigenschaften. Bei genauer Betrachtung dieser Eigenschaften fällt auf, dass die Tenside mit vorwiegend hydrophilen Eigenschaften, wie z.B. Pluronic F68 und Pluronic F108, und die Tenside mit vorwiegend lipophilen Eigenschaften, wie z.B. Pluronic L62, weniger effektiv sind als die Tenside mit ausgewogeneren hydrophilen und lipophilen Eigenschaften, wie z.B. Pluronic P85 oder Pluronic P105. Zwei Aspekte spielen hier eine Rolle. Eine gewisse Lipophilie scheint für die Wirksamkeit erforderlich zu sein. Tenside mit vorwiegend lipophilen Eigenschaften besitzen aber eine relativ niedrige CMC, sodass sich bei diesen Tensiden nur wenige Moleküle frei in Lösung befinden. Die Konzentration an aktiven Molekülen bleibt deshalb relativ gering. Bei hydrophilen Tensiden liegt die CMC wesentlich höher. Hier liegen wesentlich mehr Moleküle frei vor, sodass trotz geringerer Wirksamkeit eine ähnlicher großer Effekt wie bei lipophilen Tensiden beobachtet werden kann. Die besten Effekte zeigen nun Tenside, die beide Eigenschaften vereinigen. Aufgrund einer ausreichenden Lipophilie zeigten sie eine gute Wirksamkeit. Zusätzlich zeichnen sie sich durch hydrophile Eigenschaften aus, was zur Folge hat, dass die CMC in einem mittleren Konzentrationsbereich liegt, wodurch genügend

Tensidmoleküle frei in Lösung und nicht in Mizellen eingebunden vorliegen. In dieser Versuchsreihe waren dies Pluronic P 85, Pluronic P75 und Pluronic P105.

Um die Transportaktivität von p-gp zu überprüfen, wurde der Einfluss von PSC 833 auf die Rhodaminaufnahme in die Zellen untersucht. PSC 833 ist ein Strukturanalogon von Ciclosporin A und ein sehr potenter Inhibitor von p-gp-Transportprozessen. Hier wurden Steigerungen auf Werte bis zu 400% beobachtet. Es wurde also eine ausreichende Aktivität von p-gp nachgewiesen. Zusätzlich wurde der Effekt von MK 571 überprüft. MK 571 ist ein spezifischer Inhibitor von MRP2, einem Transportprotein, das ebenfalls in Caco-2-Zellen exprimiert wird und ähnliche Transporteigenschaften wie p-gp aufweist. Da keine Auswirkung von MK 571 auf die Rhodaminaufnahme in die Zellen festzustellen war, kann man davon ausgehen, dass Rhodamin 123 nicht von MRP2 transportiert wird und die beobachteten Effekte nicht mit einem MRP2-Transport in Zusammenhang stehen.

Eine Erklärungsmöglichkeit für die Wirkungsweise dieser Tenside könnte eine generelle Erhöhung der Durchlässigkeit der Membran sein, die durch die Einlagerung in die Phospholipid-Doppelschicht der Zellmembran hervorgerufen werden könnte. Bei der Verwendung von Sulforhodamin 101, einem Farbstoff, der nicht von p-gp transportiert wird, und auch von anderen Fluoreszenzfarbstoffen, wie z.B. Fluoreszein und Carboxyfluoreszein, wurde durch Zugabe der in diesem Versuch wirksamen Tenside jedoch keine erhöhte Aufnahme in die Zellen festgestellt. Deshalb kann man davon ausgehen, dass die beobachtete Anreicherung von Rhodamin 123 nicht durch eine unspezifische Membranbeeinflussung sondern vielmehr durch direkte Wechselwirkungen mit p-gp verursacht wurde. Die wirksamen Tenside sind in der Lage die Transportaktivität von p-gp, so zu beeinflussen, dass das Transportprotein sein Substrat nicht mehr im normalen Ausmaß aus der Zelle bzw. aus der Zellmembran transportieren kann. Dadurch gelangt mehr Rhodamin 123 in das Innere der Zellen. Diese Tenside können also einen Einfluss auf die Resorption von p-gp-Substraten ausüben und eventuell zu einer gezielten Resorptionsverbesserung eingesetzt werden.

Die Versuchsanordnung in dieser Versuchsreihe ermöglichte die Untersuchung einer relativ großen Anzahl von Tensiden in verschiedenen Konzentrationen. Allerdings konnte lediglich die Aufnahme des Wirkstoffs in die Zellen und nicht die Permeation durch die Zellschicht untersucht werden. Um dies zu untersuchen und eine genauere Aussage über das Resorptionsverhalten machen zu können, wurden mit einigen der getesteten Tenside zusätzlich Transportstudien durchgeführt.



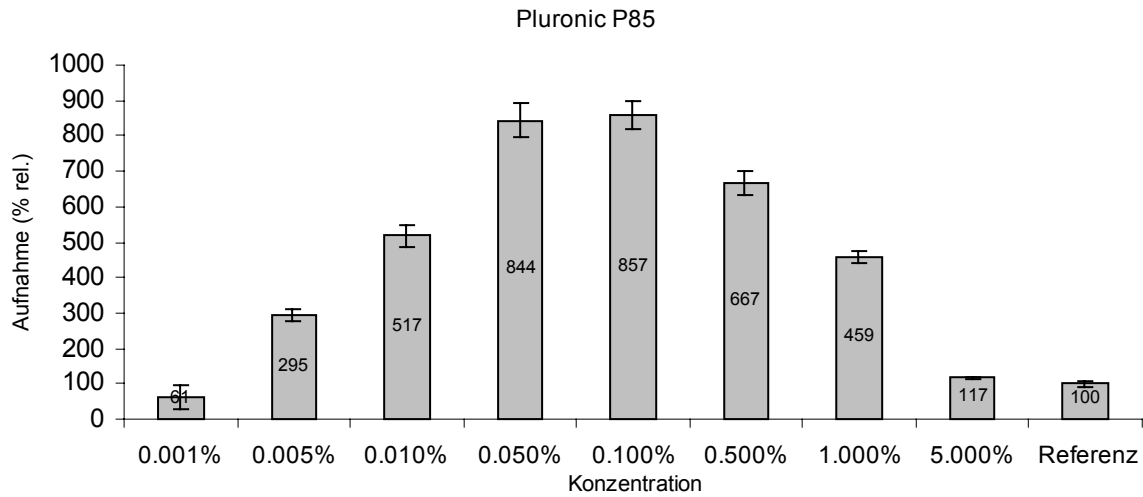


Abb.1: Einfluss von Pluronic P85 auf die Aufnahme von Rhodamin 123 (CMC: 0,030%)

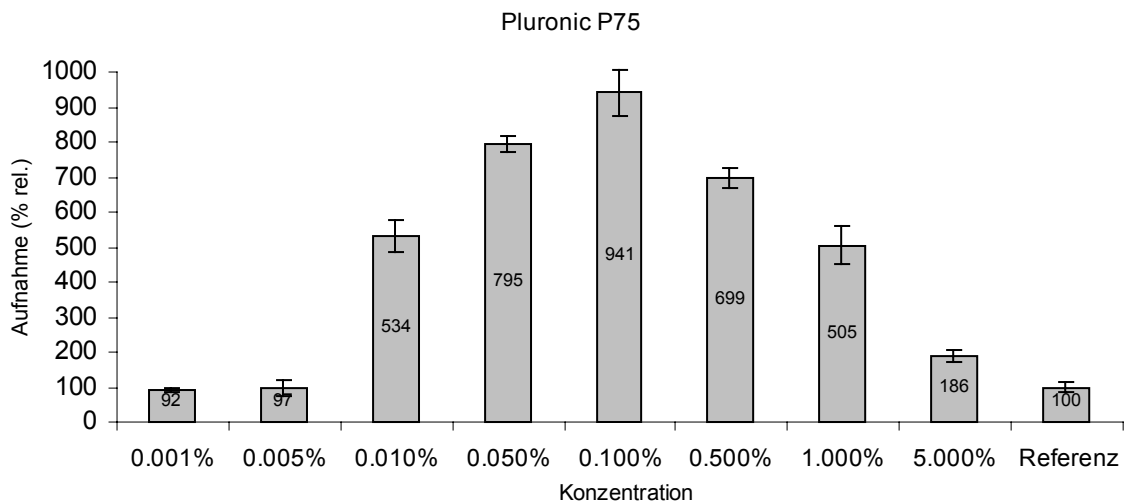


Abb.2: Einfluss von Pluronic P75 auf die Aufnahme von Rhodamin 123 (CMC: 0,063%)

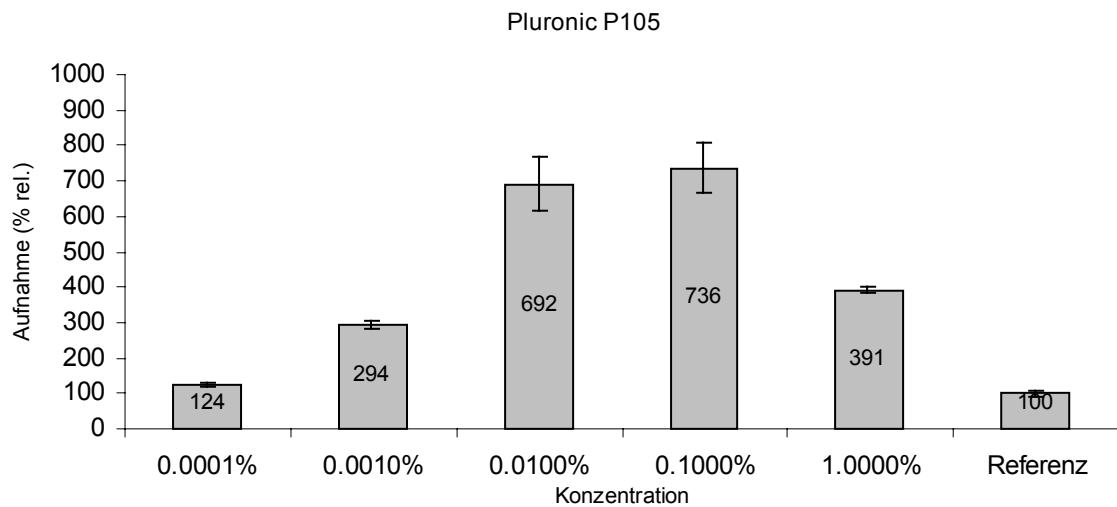


Abb.3: Einfluss von Pluronic P105 auf die Aufnahme von Rhodamin 123 (CMC:0,036%)

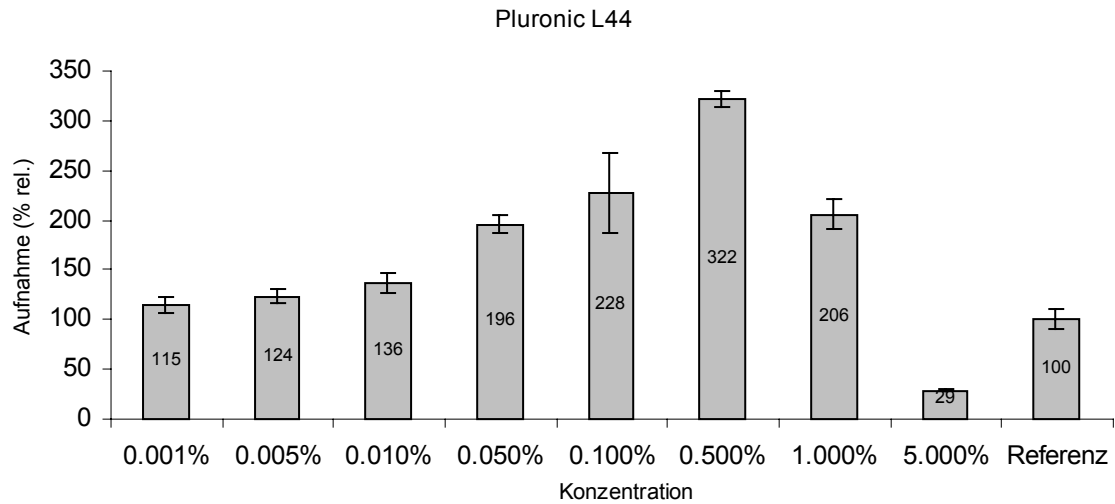


Abb.4: Einfluss von Pluronic L44 auf die Aufnahme von Rhodamin 123 (CMC:0,52%)

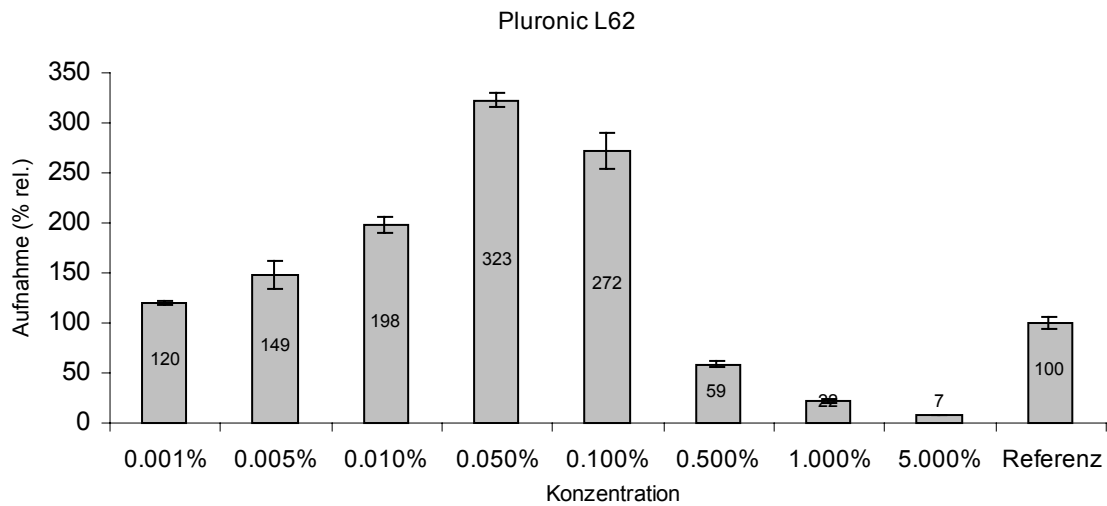


Abb.5: Einfluss von Pluronic L62 auf die Aufnahme von Rhodamin 123 (CMC:0,060%)

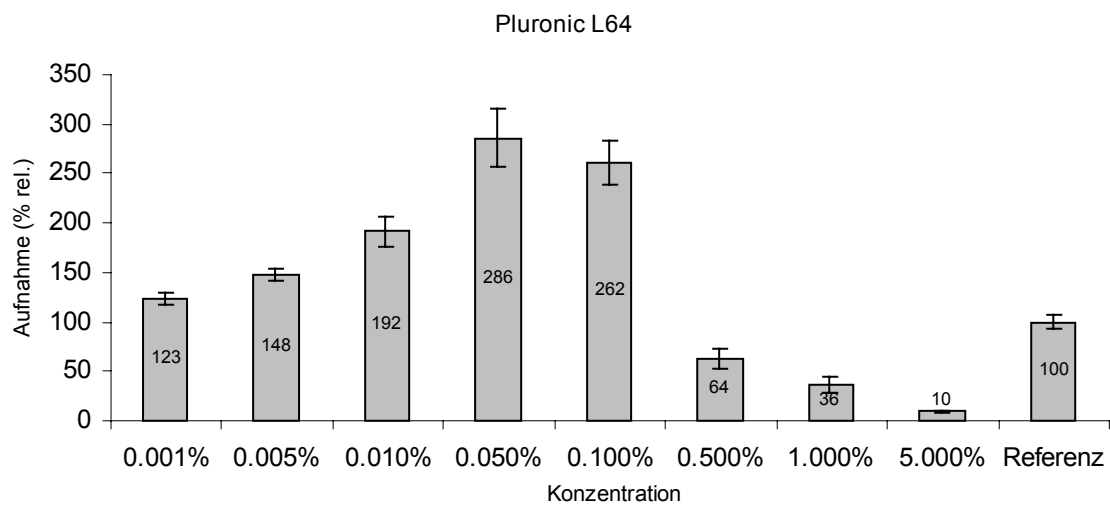


Abb.6: Einfluss von Pluronic L64 auf die Aufnahme von Rhodamin 123 (CMC:0,079%)

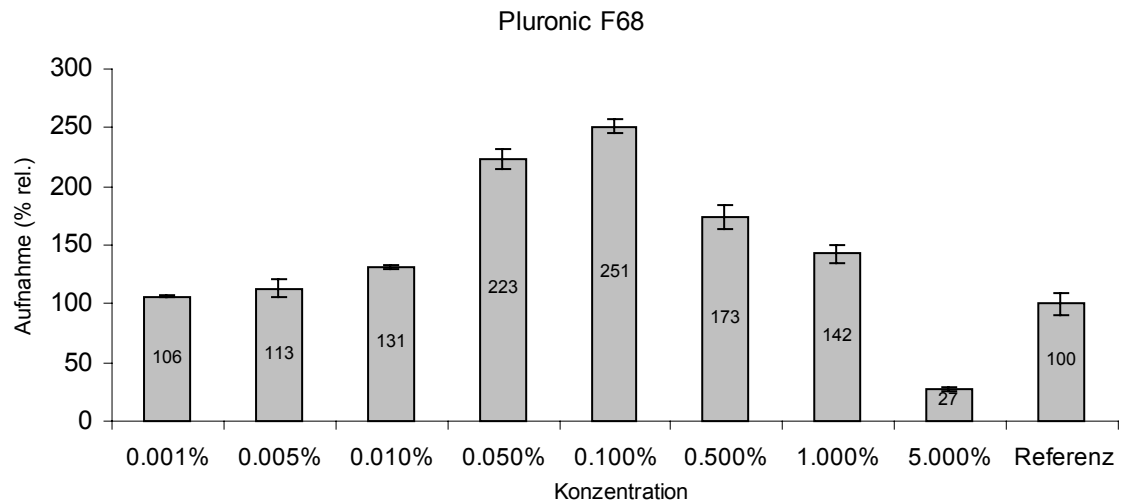


Abb.7: Einfluss von Pluronic F68 auf die Aufnahme von Rhodamin 123 (CMC:0,26%)

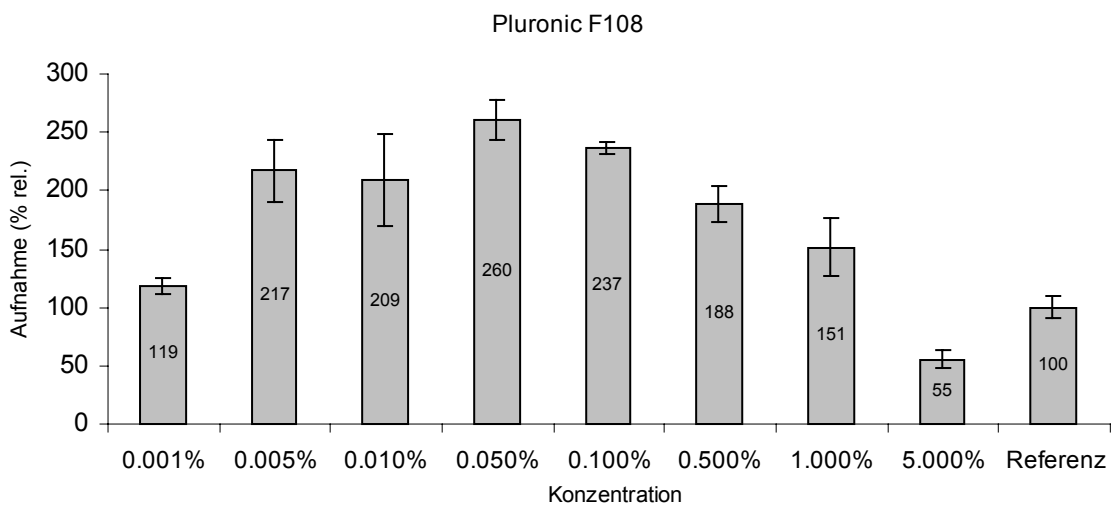


Abb.8: Einfluss von Pluronic F108 auf die Aufnahme von Rhodamin 123 (CMC:0,046%)

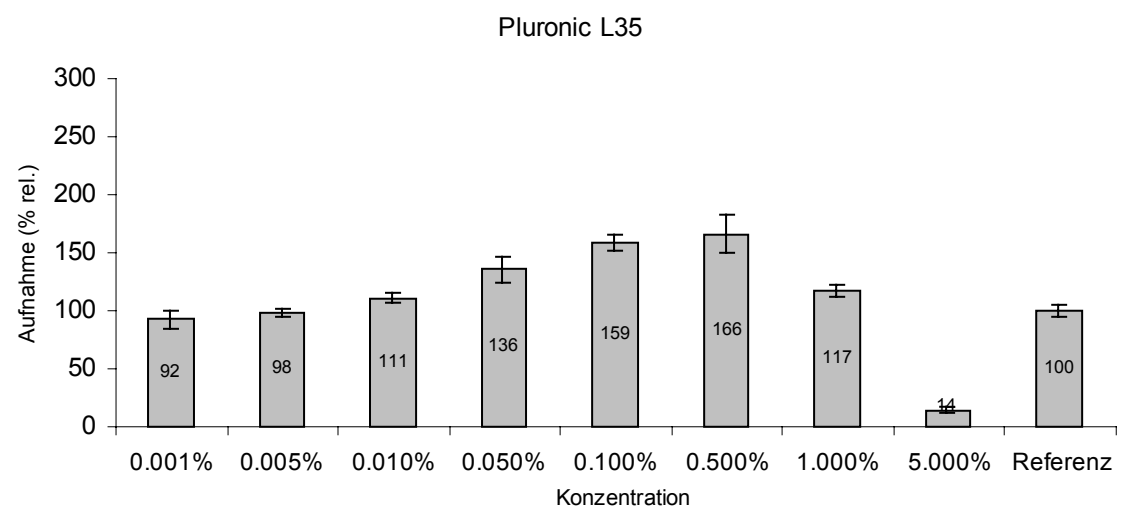


Abb.9: Einfluss von Pluronic L35 auf die Aufnahme von Rhodamin 123 (CMC:0,92%)

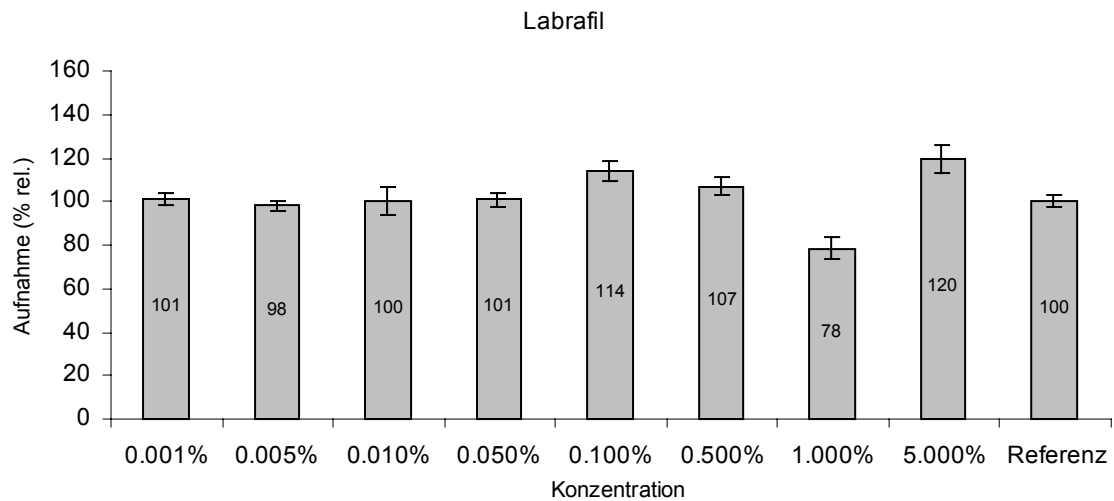


Abb.10: Einfluss von Labrafil auf die Aufnahme von Rhodamin 123

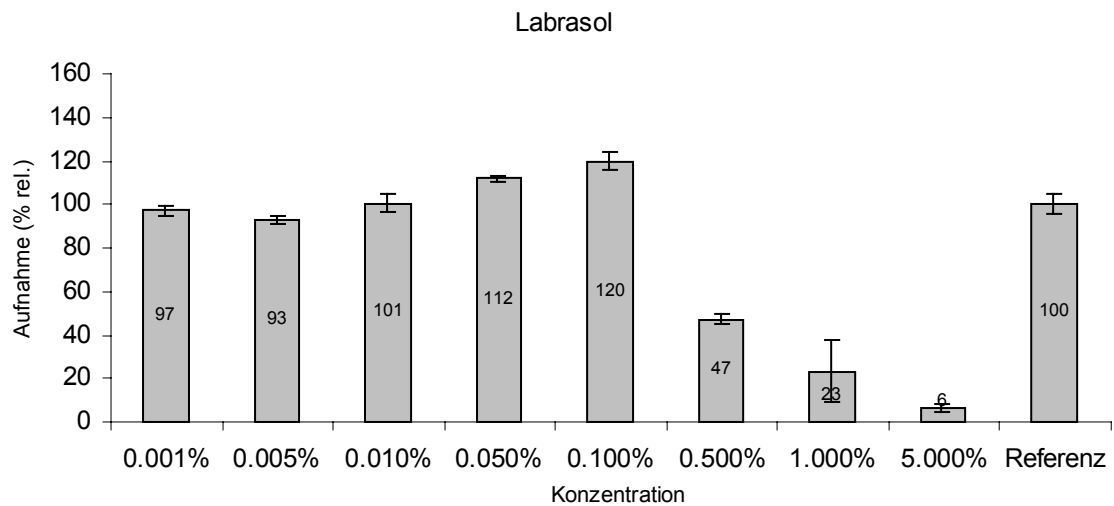


Abb.11: Einfluss von Labrasol auf die Aufnahme von Rhodamin 123

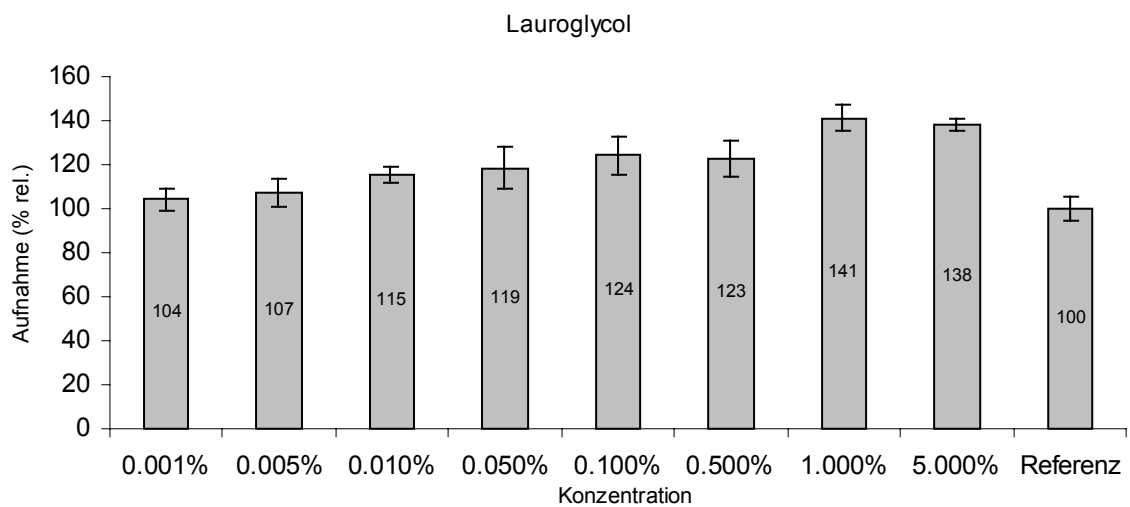


Abb.12: Einfluss von Lauroglycol auf die Aufnahme von Rhodamin 123

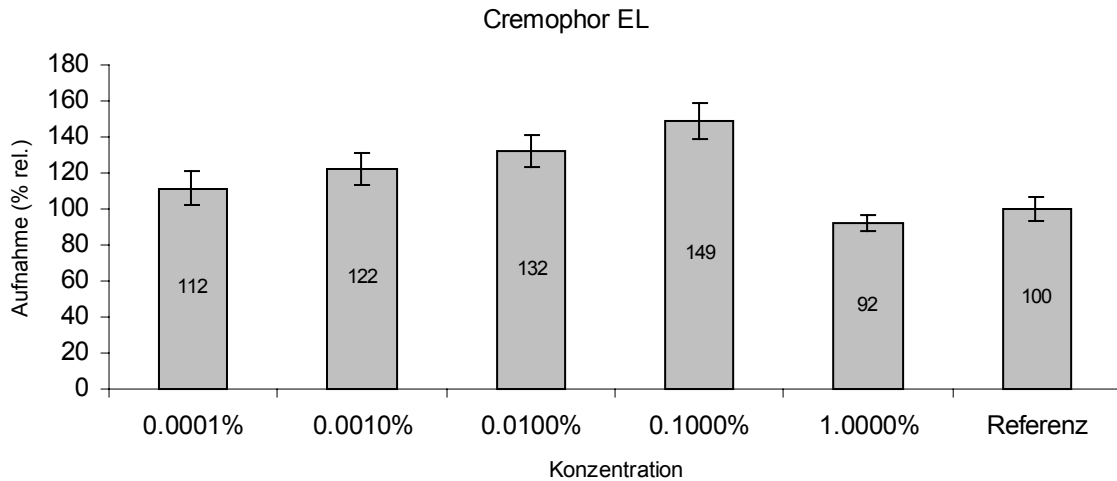


Abb.13: Einfluss von Cremophor EL auf die Aufnahme von Rhodamion 123 (CMC:0,013%)

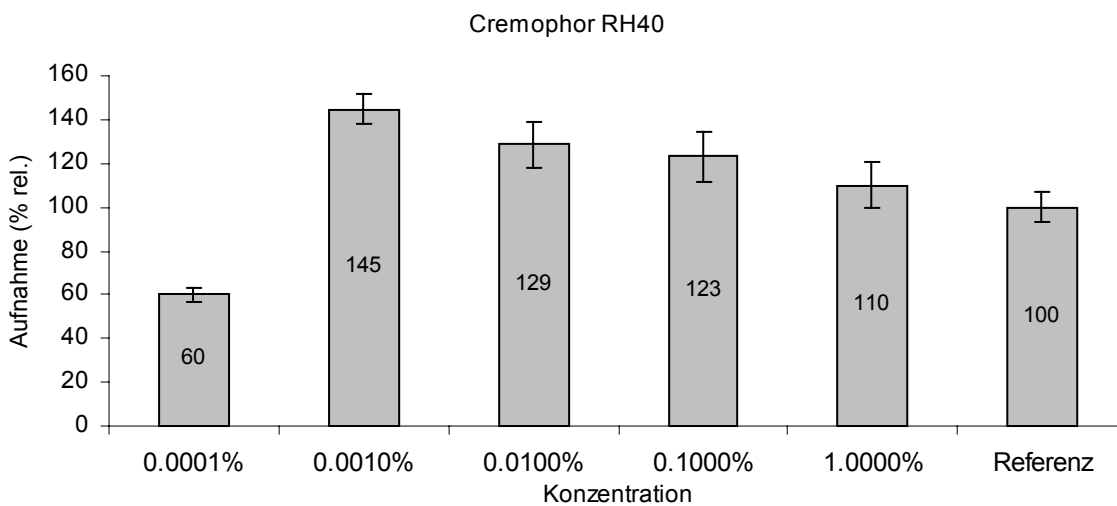


Abb.14: Einfluss von Cremophor RH40 auf die Aufnahme von Rhodamin 123 (CMC: 0,033%)

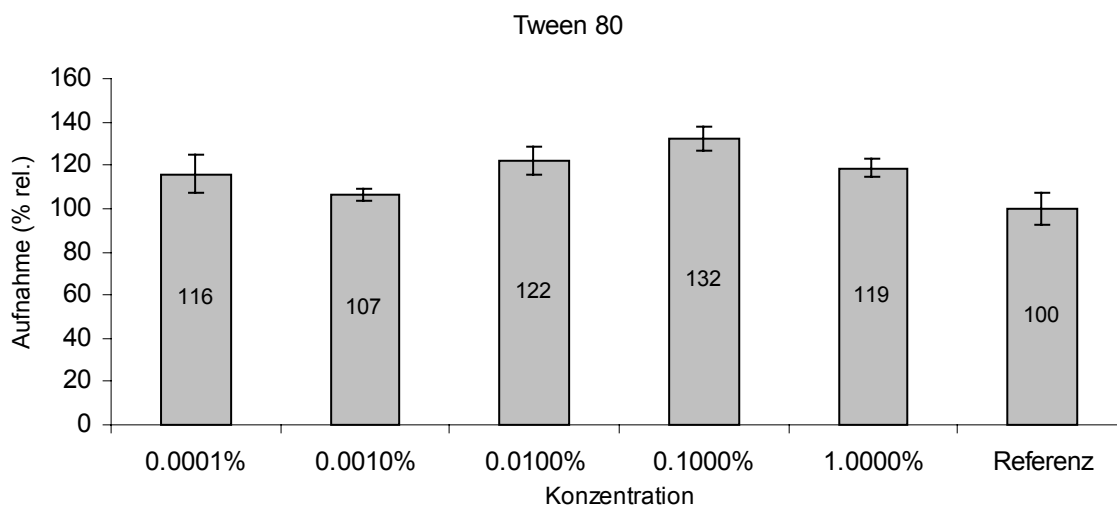


Abb.15: Einfluss von Tween 80 auf die Aufnahme von Rhodamin 123 (CMC: 0,047%)

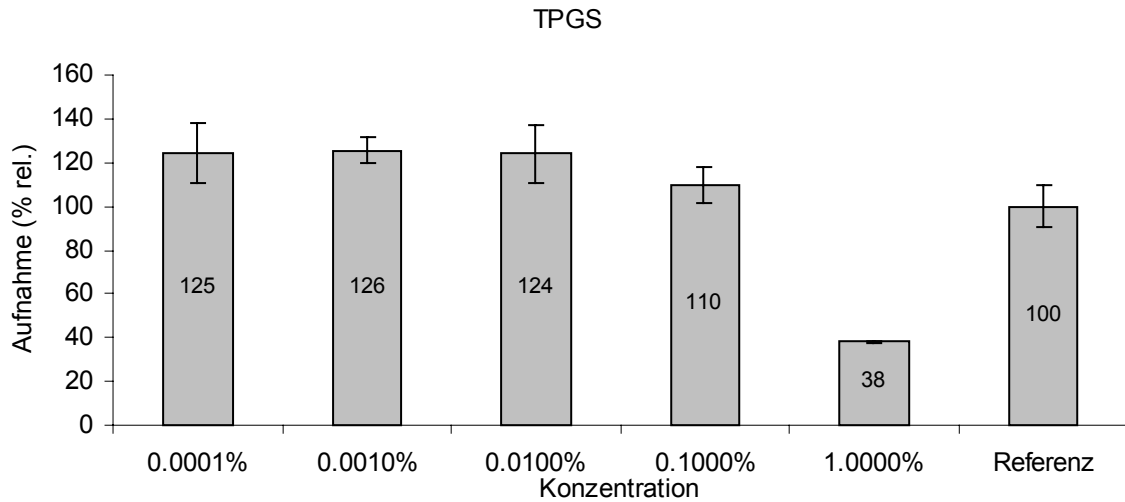


Abb.16: Einfluss von TPGS auf die Aufnahme von Rhodamin 123 (CMC:0,020%)

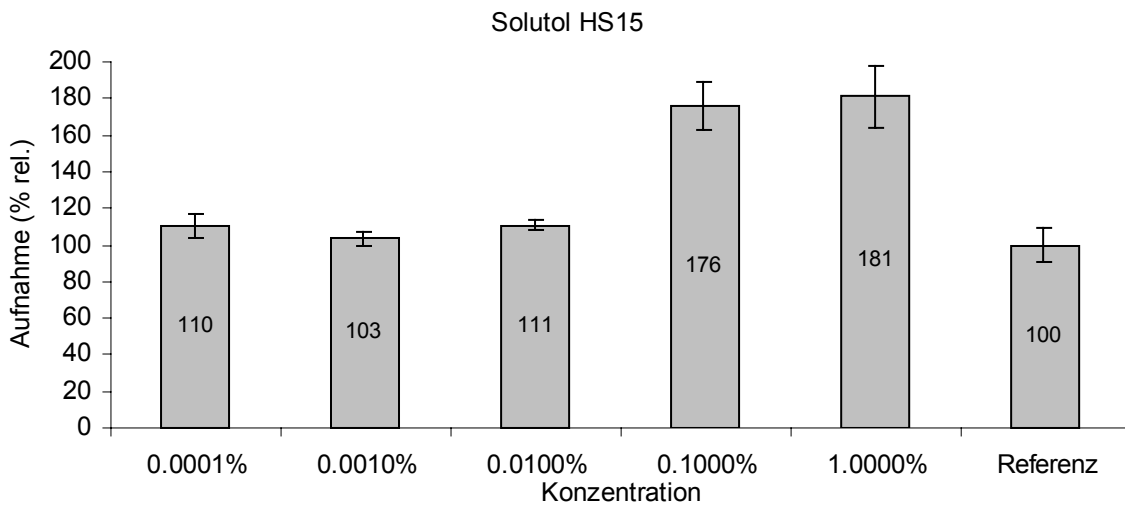


Abb.17: Einfluss von Solutol HS15 auf die Aufnahme von Rhodamin 123 (CMC:0,046%)

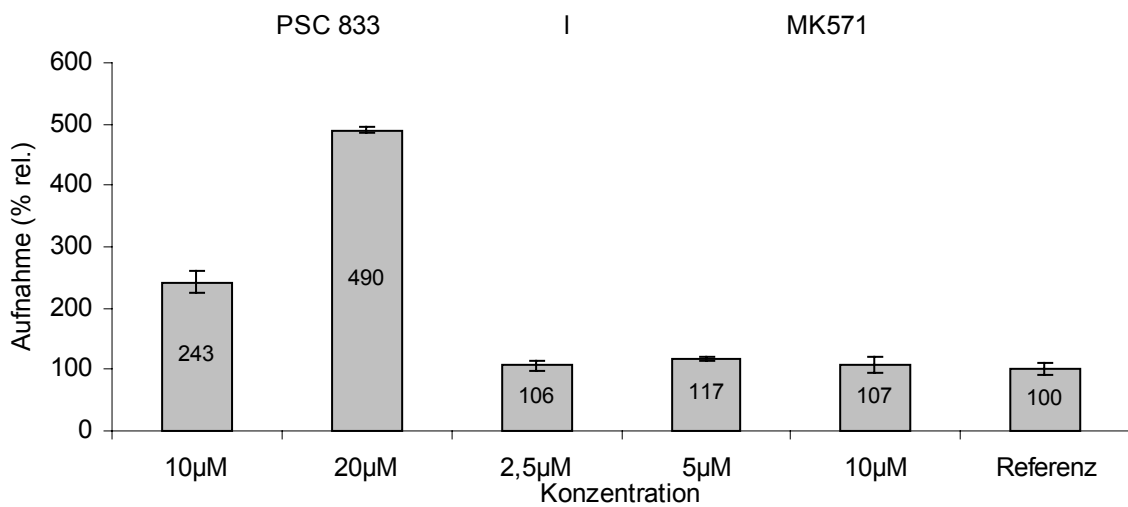


Abb.18: Einfluss von PSC833 und MK 571 auf die Aufnahme von Rhodamin 123

### 3.3.2 Transportversuche mit Caco-2-Zellen:

Zur genaueren Beurteilung der in den Aufnahmeversuchen festgestellten Effekte der getesteten Tenside wurde der Einfluss einiger ausgewählter Substanzen in Transportstudien untersucht. In dieser Versuchsanordnung kann der Durchgang des Wirkstoffs durch die Zellschicht und nicht nur die Aufnahme in die Zellen untersucht werden. Dadurch kann eine bessere Aussage im Hinblick auf den zu den erwartenden Einfluss auf die Resorption von Wirkstoffen gemacht werden.

Als Modellsubstrat von p-gp diente wiederum Rhodamin 123 (Rege et al., 2002; Dudeja et al., 1995; Miller et al., 1997; Dintaman et al. 1999). Die Integrität der verwendeten Monolayer wurde durch Überprüfung mit dem Parazellulärmarker FITC-Dextran 4000 und durch Bestimmung des trans-epithelialen elektrischen Widerstands (TEER) sichergestellt. Ausgewählt wurde Pluronic P85, da es in den Aufnahmeversuchen einen sehr grossen Effekt hatte und eine Anreicherung von Rhodamin 123 auf über das achtfache (850%) im Vergleich zur Referenzprobe verursachte. Die Tenside Cremophor RH40 und Solutol HS15 hatten nur einen geringen Einfluss und waren in der Lage die Rhodaminmenge lediglich auf Werte von 150% bzw. 180% anzuheben. Sie haben aber, wie später noch gezeigt wird, einen grossen Einfluss auf den Transport von MRP2-Substraten. Um den Unterschied zwischen p-gp- und MRP2-Transport zu verdeutlichen, wurden auch diese Tenside in Transportversuchen untersucht. Pluronic P85 wurde in einer Konzentration von 0,05%, Solutol HS15 und Cremophor RH40 in einer Konzentration von 0,01% eingesetzt. Die verwendete Konzentration von Rhodamin 123 betrug 5µM.

Die Charakterisierung des Transports von Rhodamin 123 durch die Zellschicht erfolgte durch Bestimmung des apparenten Permeabilitätskoeffizienten ( $P_{app}$ ). Für den Transport von der apikalen zur basolateralen Seite (ab) wurde ein  $P_{app}$ -Wert von  $1,46 \times 10^{-6}$  cm/s und für den Transport von der basolateralen Seite ein Wert von  $5,83 \times 10^{-6}$  cm/s ermittelt (Abb.19 und 20). Durch den deutlichen Unterschied konnte ein aktiver, zur apikalen Seite gerichteter Transport nachgewiesen werden. Der Zusatz von Pluronic P85 zur Probelösung von Rhodamin 123 hatte eine deutliche Auswirkung auf die bestimmten  $P_{app}$ -Werte. Der ab-Transport wurde auf einen  $P_{app}$ -Wert von  $3,45 \times 10^{-6}$  cm/s erhöht und der ba-Transport auf einen Wert von  $3,45 \times 10^{-6}$  cm/s erniedrigt (Abb.19 und 20). Die Zugabe von Pluronic P85 erfolgte hier zusammen mit Rhodamin 123 auf der basolateralen Seite. Auch bei Untersuchung des ba-Transports nach Zugabe von Pluronic P85 zur apikalen Seite wurde ein  $P_{app}$ -Wert von  $3,56 \times 10^{-6}$  cm/s ermittelt (Abb. 19 und 20). Es spielte also keine Rolle zu welcher Seite Pluronic P85 zugegeben wurde, es wurden die gleichen Effekte erzielt. Die beobachteten Auswirkungen von Pluronic P85 sprechen für eine Inhibierung des aktiven Transports von Rhodamin 123 durch p-gp. Das Transportprotein pumpt Rhodamin 123 aus der Zelle bzw. aus der Zellmembran aktiv in das apikale Kompartiment der Diffusionskammer. Bei Zugabe zur apikalen Seite wird Rhodamin 123 entgegen seiner Diffusionsrichtung zurück zur apikalen Seite transportiert. Dies hat eine relativ niedrigen  $P_{app}$ -Wert zur Folge. Durch Zugabe von Pluronic P85 wird

dieser aktive Transport unterbunden und Rhodamin 123 kann ungestört durch die Zelle diffundieren. Bei Zugabe zur basolateralen Seite pumpt p-gp Rhodamin 123 in Diffusionsrichtung zur apikalen Seite. Dies resultiert in einem relativ hohen  $P_{app}$ -Wert. Bei Hemmung des aktiven Transports, erfolgt der Durchtritt durch die apikale Zellmembran nur aufgrund passiver Diffusion, was eine Erniedrigung des  $P_{app}$ -Wertes zur Folge hat. Die  $P_{app}$ -Werte für den ab- und den ba-Transports sind nach Hemmung des aktiven Transports identisch. Dies spricht für eine vollständige Inhibierung des p-gp-Transports durch Zugabe von Pluronic P85, sodass die ermittelten  $P_{app}$ -Werte die Werte für die passive Diffusion von Rhodamin 123 darstellen.

Zur Überprüfung der Transportaktivität von p-gp wurde auch der Transport von Rhodamin 123 nach Zugabe des spezifischen p-gp-Inhibitors PSC 833 untersucht. Durch Zugabe von PSC 833 wurde der  $P_{app}$ -Wert des Transport von der apikalen zur basolateralen Seite auf von  $1,46 \times 10^{-6}$  auf  $3,73 \times 10^{-6}$  cm/s erhöht und der  $P_{app}$ -Wert für die entgegengesetzte Richtung von  $5,83 \times 10^{-6}$  auf  $3,53 \times 10^{-6}$  cm/s erniedrigt. Die nach Inhibitorzugabe ermittelten  $P_{app}$ -Werte liegen nahe zusammen, wodurch eine vollständige Inhibierung des aktiven Transports durch p-gp gezeigt werden konnte (Abb.21 und 22).

In den Versuchen zur Untersuchung des Einflusses von Cremophor RH40 (Abb.22 und 23) und Solutol HS15 (Abb.24 und 25) betrug der  $P_{app}$ -Wert für den ab-Transport von Rhodamin 123  $1,18 \times 10^{-6}$  cm/s bzw.  $6,17 \times 10^{-6}$  cm/s für den ba-Transport. Es war also auch hier ein aktiver Transport zur apikalen Seite festzustellen. Von einer ausreichenden Expression von p-gp in den verwendeten Zellen war somit auszugehen. Nach Zugabe von Cremophor RH40 und Solutol HS15 wurden für den ab-Transport  $P_{app}$ -Werte von  $1,35 \times 10^{-6}$  cm/s bzw.  $1,40 \times 10^{-6}$  cm/s bestimmt. Es konnte nur ein geringer Einfluss dieser Tenside festgestellt werden. Auch für den Transport von der basolateralen zur apikalen Seite konnte nur eine sehr schwache Wechselwirkung mit p-gp festgestellt werden, da hier Werte von  $5,86 \times 10^{-6}$  cm/s bzw.  $5,88 \times 10^{-6}$  cm/s ermittelt wurden. Diese Werte liegen alle im Bereich der  $P_{app}$ -Werte für Rhodamin 123 ohne Tensidzugabe.

Die Ergebnisse aus den Ausnahmeversuchen konnte in den Transportversuchen bestätigt werden. Pluronic P85 ist in der Lage den Transport durch p-gp komplett zu inhibieren und könnte somit zur Resorptionsverbesserung von p-gp-Substraten eingesetzt werden. Cremophor RH40 und Solutol HS15 zeigten kaum Wechselwirkungen mit p-gp, die leichten Effekte, die in den Aufnahmeversuchen zu beobachten waren, reichten nicht aus, um entscheidende Auswirkungen in den Transportversuchen zu verursachen.

Die Wirkungsverbesserung von Zytostatika durch Tensidzugabe, z.B. von Cremophor EL, vor allem in multi-drug-resistenten Krebszelllinien wurden schon von einiger Zeit beobachtet. Jordan-Nuo et al. (1993) beschrieben Wechselwirkungen von Triton X 100 mit p-gp in sehr geringen Konzentrationen. Cremophor EL, Solutol HS15 und andere PEG-Fettsäureester sind Tenside, für die ebenfalls entsprechende Effekte



nachgewiesen wurden (Buckingham et al., 1996). Nerurkar et al. (1996, 1997) beobachteten Auswirkungen auf den Transport eines Modellpeptids im Caco-2-Modell durch Zugabe der Tenside, Tween 80 und Cremophor EL. Eine Wirkung u.a. auch für Tween 80 wurde von Lo (98, 2003) festgestellt. Auch für TPGS wurden schon vergleichbare Effekte gezeigt (Dintaman, 1999). Rege et al. untersuchten die Wechselwirkungen von Tween 80, Cremophor EL und TPGS mit verschiedenen Transportproteinen in Caco-2-Zellen und konnte einen Einfluss auf die p-gp-Transportaktivität feststellen. Tayruoz et al. (2003) konnten durch Zugabe von Cremophor RH40 eine Resorptionsverbesserung von Digoxin beobachten. Die Gruppe der Poloxamere wurde von Batrakova et al. (1998) genauer untersucht. Für alle getesteten Poloxamere wurden in Versuchen sowohl mit Caco-2-Zellen als auch mit Gehirnkapillarendothelzellen Wechselwirkungen mit p-gp festgestellt. Die größten Effekte wurden hierbei für Pluronic P85 beobachtet. In anderen Studien zeigte sich auch Pluronic L61 als sehr wirkungsvoll (Evers et al., 2000; Venne et al. 1996). Ein direkter Vergleich des Ausmaßes der in diesen Studien festgestellten Wechselwirkungen von Tensiden mit p-gp ist schwierig, da alle Versuche mit unterschiedlichen Zelllinien in verschiedenen Versuchsanordnungen durchgeführt wurden. So wurden z.B. häufig Krebszelllinien verwendet, einige Arbeitsgruppen verwendeten Caco-2- oder auch Gehirnkapillarendothelzellen. Einige Ergebnisse wurden durch Humanstudien erhalten. Außerdem wurden verschiedene Substrate von p-gp verwendet. Im Rahmen dieser Arbeit ist ein Vergleich des Effekts der verschiedenen Tenside möglich, da für alle Tenside die gleichen Versuchsbedingungen vorlagen. Hierbei wurde deutlich, dass viele Tenside Wechselwirkungen zeigten, aber die Gruppe der Poloxamere (Pluronic) eindeutig die größten Effekte verursachte.

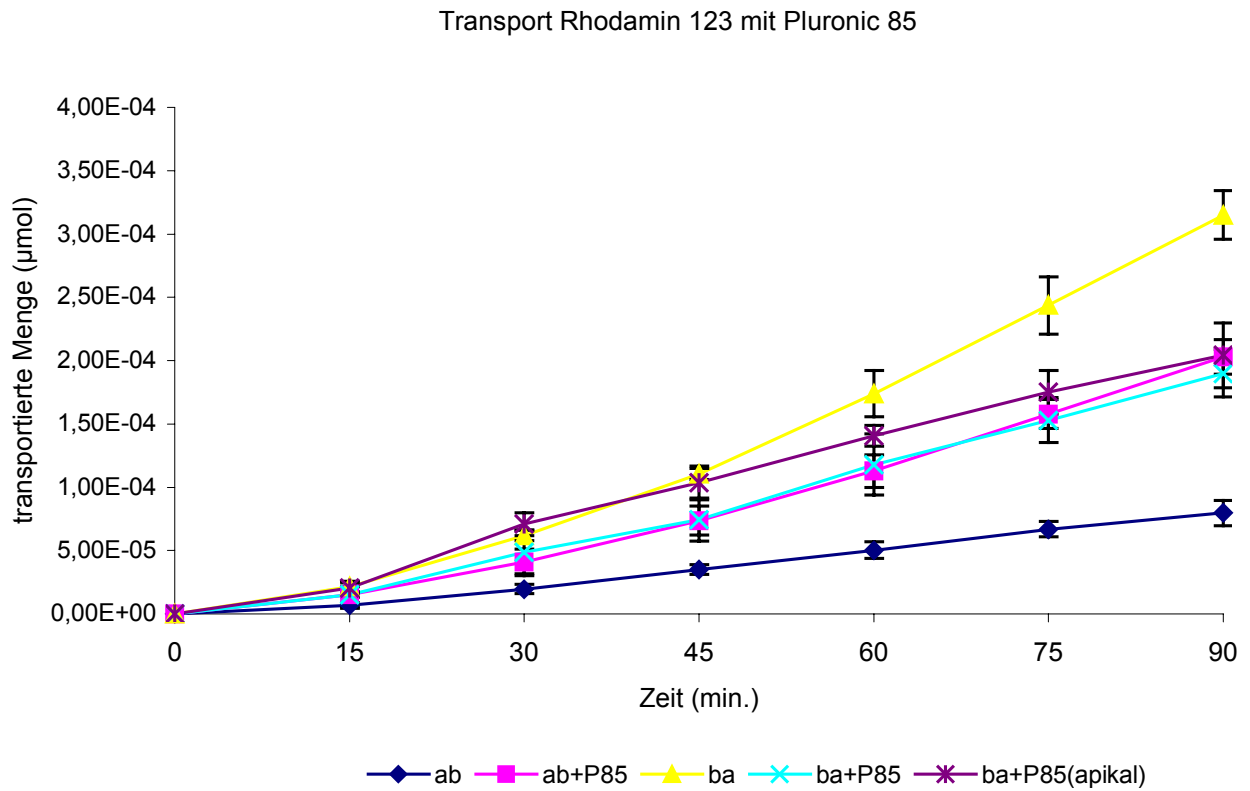


Abb.19: Transport von Rhodamin123 unter Einfluss von Pluronic P85

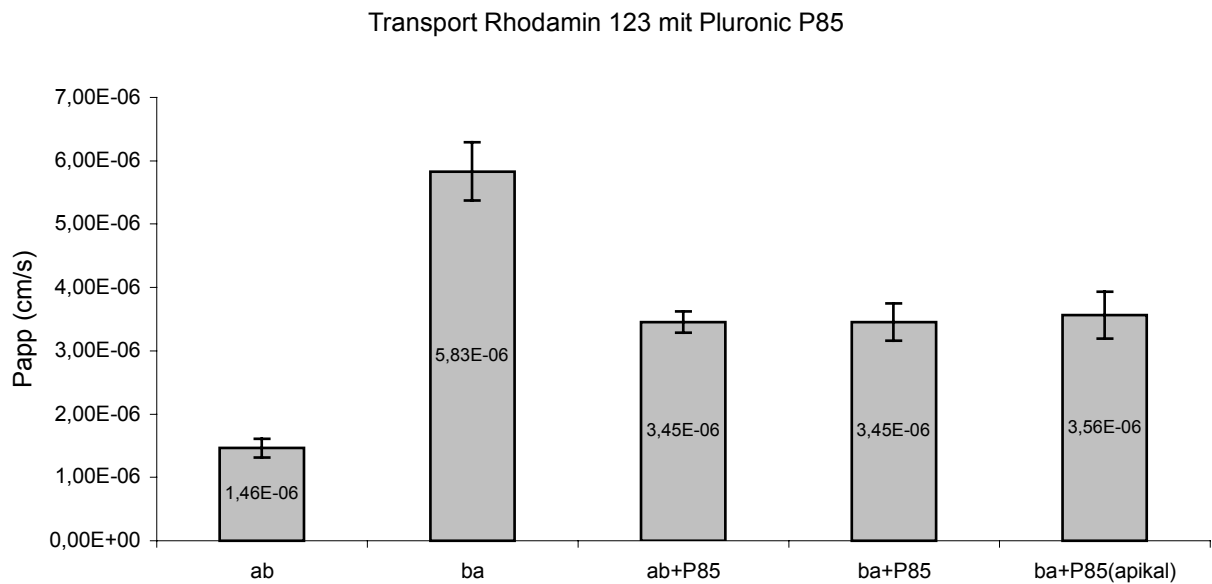


Abb.20: P<sub>app</sub>-Werte des Transport von Rhodamin 123 unter dem Einfluss von Pluronic P85

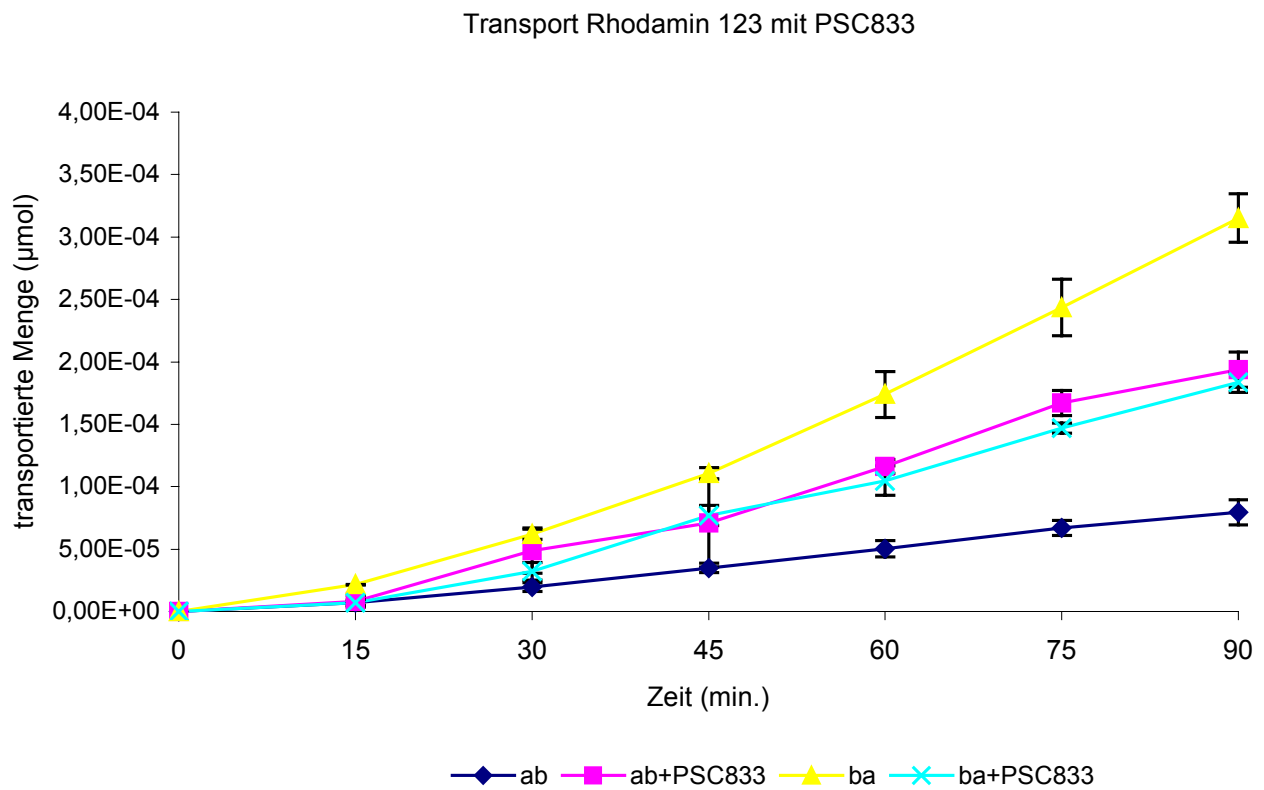


Abb.22: Transport von Rhodamin123 unter Einfluss von PSC 833

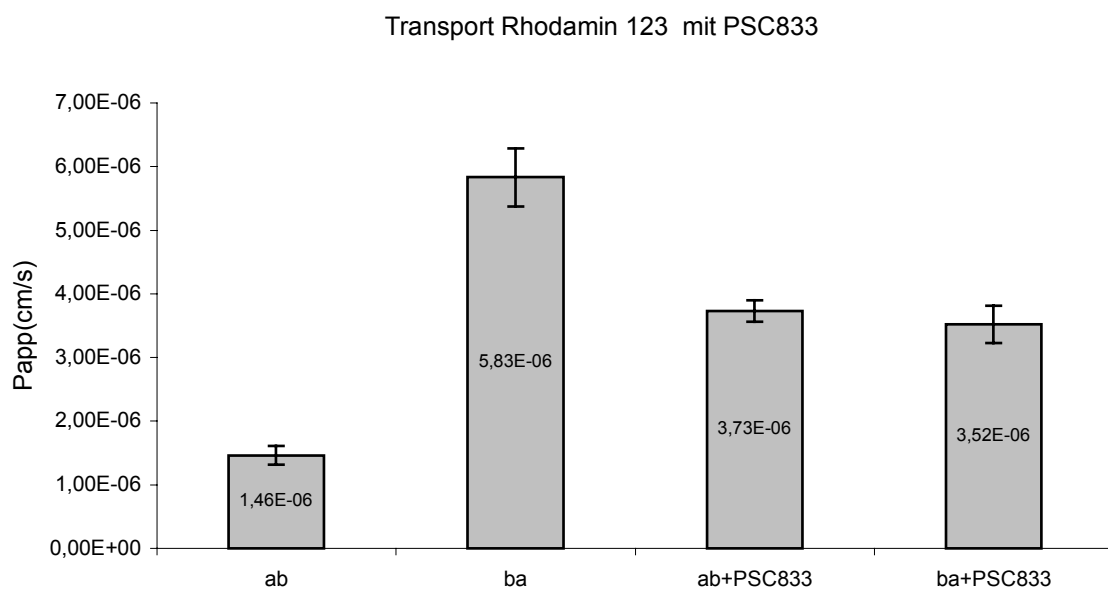


Abb.23: P<sub>app</sub>-Werte des Transports von Rhodamin 123 unter Einfluss von PSC 833

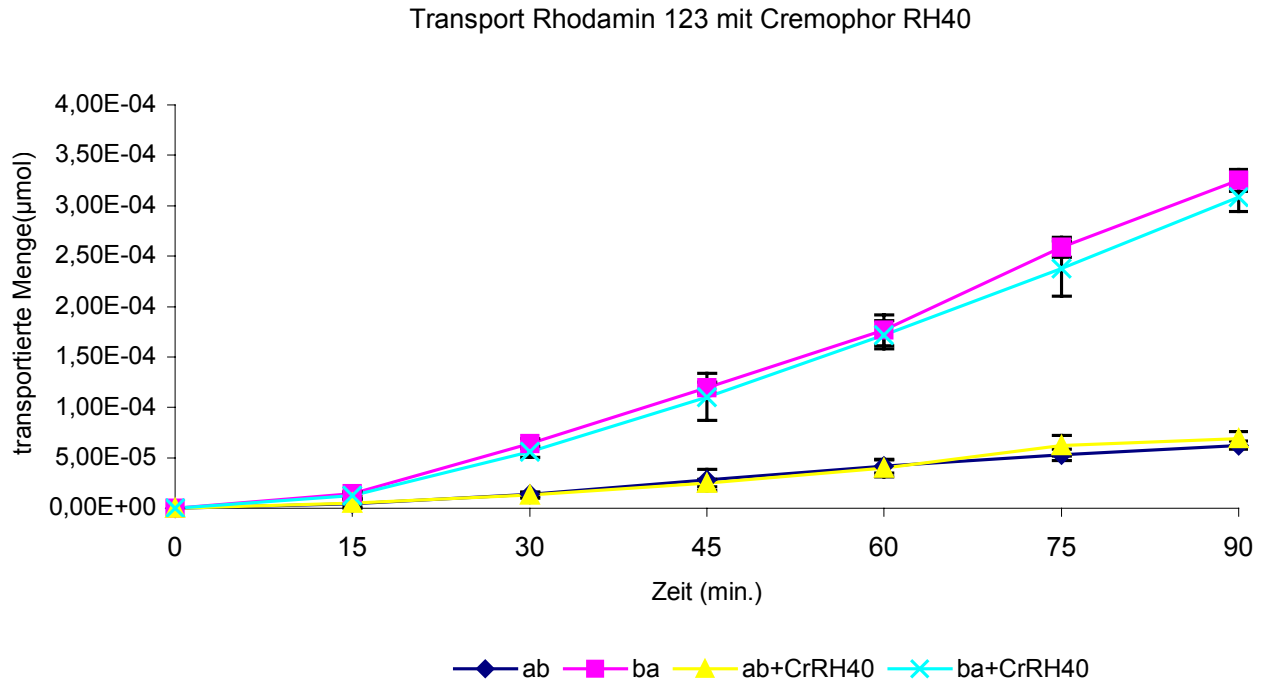


Abb.24: Transport von Rhodamin 123 unter dem Einfluss von Cremophor RH40

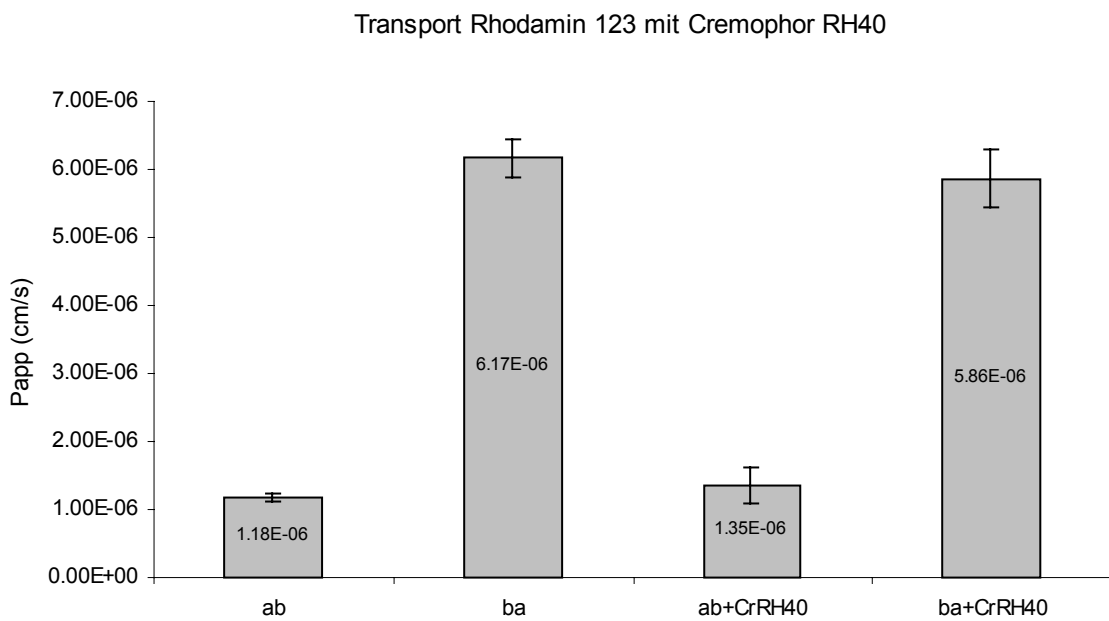


Abb.25: P<sub>app</sub>-Werte des Transports von Rhodamin 123 unter dem Einfluss von Cremophor RH40

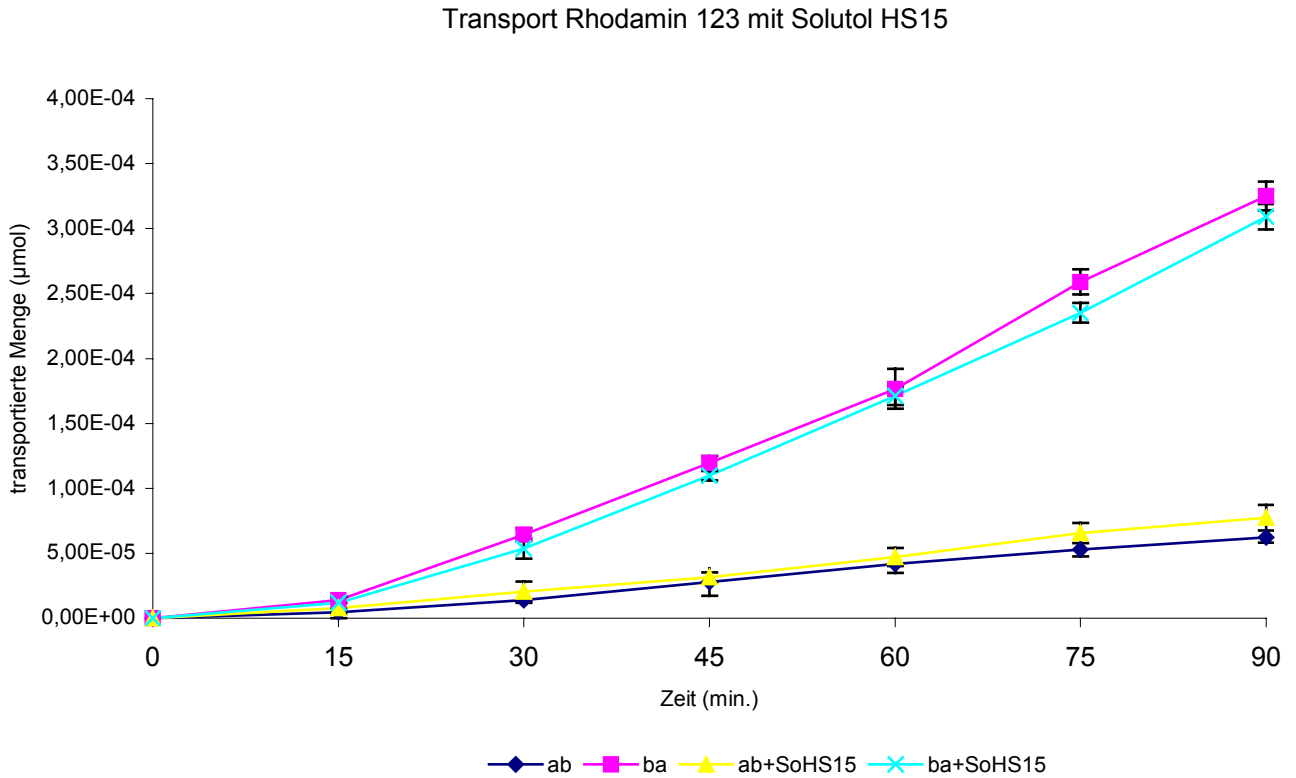


Abb.26: Transport von Rhodamin 123 unter dem Einfluss von Solutol HS15

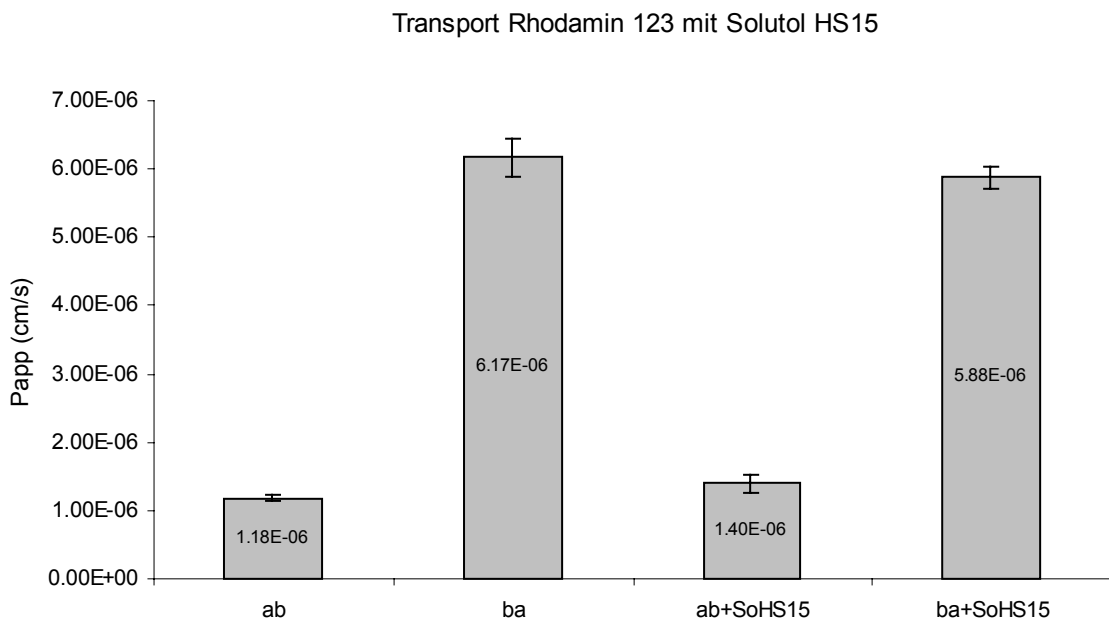


Abb.27: P<sub>app</sub>-Werte des Transports von Rhodamin 123 unter dem Einfluss von Solutol HS15

## 3.4 Wechselwirkung von Tensiden mit MRP2

### 3.4.1 Aufnahmeversuche mit Caco-2-Zellen:

Zur Untersuchung des Einflusses von Tensiden auf den Transport durch MRP2, wurde zunächst die Aufnahme eines MRP2-Substrats in Caco-2-Zellen untersucht. Da MRP2 ebenso wie p-gp zur ABC-Transporterfamilie gehört und dadurch ähnliche Transporteigenschaften aufweist, war es von Interesse, ob vergleichbare Effekte wie in den vorhergehenden Versuchen zur Untersuchung der Wechselwirkungen von Tensiden mit p-gp zu beobachten sind. Als Modellsubstrat zur Untersuchung des Transports durch MRP2 wurde der Fluoreszenzfarbstoff Sulforhodamin 101 ausgewählt. Diese Substanz wird selektiv von MRP2 transportiert und kann relativ einfach fluorimetrisch analysiert werden (Miller et al., 1998). Zur Auswahl kamen die gleichen Tenside, die schon in den Versuchen zur Untersuchung des p-gp-Transport getestet wurden.

Nach Inkubation der Caco-2-Zellen mit Sulforhodamin 101 wurde die Menge an Farbstoff, die in die Zellen gelangte fluorimetrisch bestimmt. Die Referenzprobe enthielt ausschließlich Sulforhodamin 101. Die Menge, die sich hier in den Zellen anreicherte wurde als 100%-Wert definiert. Der Einfluss der Tenside wurde durch gleichzeitige Zugabe von Tensiden in verschiedenen Konzentrationen untersucht. Die Angabe der in die Zellen aufgenommenen Menge an Sulforhodamin 101 erfolgte in Relation zur Referenzprobe. Sulforhodamin 101 wurde in einer Konzentration von 5µM eingesetzt.

Im Gegensatz zu den Versuchen mit Rhodamin 123 zeigten hier Poloxamere (Pluronic) nur einen sehr geringen Einfluss auf die Aufnahme von Sulforhodamin 101 in das Zellinnere. Die meisten verursachten keine Veränderung der aufgenommenen Substanzmenge, wie z.B. Pluronic P85 (Abb.29), Pluronic L44 (Abb.31), Pluronic L62 (Abb.32), Pluronic F68 (Abb. 35) und Pluronic F108 (Abb. 37). Einige Poloxamere, wie z.B. Pluronic L35 (Abb.30), Pluronic L64 (Abb.33), Pluronic P75 (Abb.34) und Pluronic P105 (Abb.37) verursachten mit Werten von 150-180% einen leichten Anstieg der aufgenommenen Sulforhodaminmenge. Auch die Tenside TPGS (Abb.40), Tween 80 (Abb.39) und Cremophor EL (Abb.38) konnten keinen entscheidenden Einfluß auf die im Zellinnern angereicherte Menge an Sulforhodamin 101 ausüben. Ein eindeutiger Effekt konnte jedoch nach Zugabe von Cremophor RH40 (Abb.27) und Solutol HS15 (Abb.28) festgestellt werden. Diese beiden Tenside waren in der Lage, die Sulforhodaminmenge, die ins Innere der Zellschicht gelangen konnte, auf Werte über 300% anzuheben. Auch hier zeigte sich eine auffallende Konzentrationsabhängigkeit des zu beobachtenden Effekts. Das Ausmaß der Sulforhodaminanreicherung vergrößerte sich bis zu einem Maximum, das im Bereich der CMC lag, danach war eine Verringerung der Effekts festzustellen. Dies ist auf die Wirksamkeit der freien Tensidmoleküle zurückzuführen. Nach Erreichen der CMC steigt die Konzentration an freien Tensidmolekülen nicht mehr an, sodass keine Steigerung des Effekts mit steigender Tensidkonzentration zu

beobachten ist. Oberhalb der CMC bilden sich Mizellen, in die Sulforhodamin 101 eingeschlossen wird und so nicht mehr in direkten Kontakt mit der Zellmembran kommen kann. Dies führt zu einer Verringerung der aufgenommenen Wirkstoffmenge im Vergleich zum Maximalwert.

Zur Überprüfung einer ausreichenden Aktivität von MRP2 wurde der Effekt des selektiven MRP-Inhibitors, MK 571, untersucht. MK 571 verursachte eine Erhöhung der intrazellulär angereicherten Sulforhodaminmenge auf einen Wert von 310% (Abb.41). Dadurch konnte gezeigt werden, dass die verwendeten Zellen über eine ausreichende Expression und Funktionalität von MRP2 verfügen. Der p-gp-Inhibitor, PSC 833, hatte keinen Einfluss auf die Anreicherung von Sulforhodamin 101 im Zellinnern (Abb.41). Durch diesen Versuch konnte ausgeschlossen werden, dass Effekte die beim Transport von Sulforhodamin 101 beobachtet wurden, mit einem p-gp-Transport in Zusammenhang stehen.

Die beobachteten Effekte von Cremophor RH40 und Solutol HS15 sind auf Wechselwirkungen mit MRP2 zurückzuführen. Durch den Einfluss dieser Tenside kommt es zu einem Verlust der Transportaktivität von MRP2, sodass Substrate nicht mehr aus der Zelle gepumpt werden und dadurch in einer größeren Menge in das Zellinnere gelangen.

Trotz der Ähnlichkeit zwischen MRP2 und p-gp wurden nicht die gleichen Wechselwirkungen mit Tensiden festgestellt. In den Untersuchungen zu beiden Transportproteinen konnten Wechselwirkungen mit Tensiden festgestellt werden, jedoch in beiden Fällen mit Tensiden unterschiedlicher Gruppen. Die Poloxamere zeigten einen deutlichen Einfluss auf die Aktivität von p-gp und beeinflussten die Transporteigenschaften von MRP2 kaum. Die Tenside Cremophor RH40 und Solutol HS15 wiederum zeigten deutliche Wechselwirkungen mit MRP2, und verursachten kaum Veränderungen der Aktivität von p-gp. Es müssen hier also spezifische Wechselwirkungen mit den jeweiligen Transportproteinen vorliegen. Bei einer allgemeinen Membranbeeinflussung durch die Tenside und einer daraus resultierenden größeren Durchlässigkeit der Zellmembran, wären diese Unterschiede nicht so deutlich zu beobachten.

Um eine genauere Aussage über die zu erwartenden Auswirkungen der wirksamen Tenside auf die Resorption machen zu können, wurde mit diesen Tensiden auch Transportversuche durchgeführt. In diesen Versuchen kann nicht nur die Aufnahme des Wirkstoffs in die Zellen, sondern auch der Durchtritt durch die Zellschicht untersucht werden.

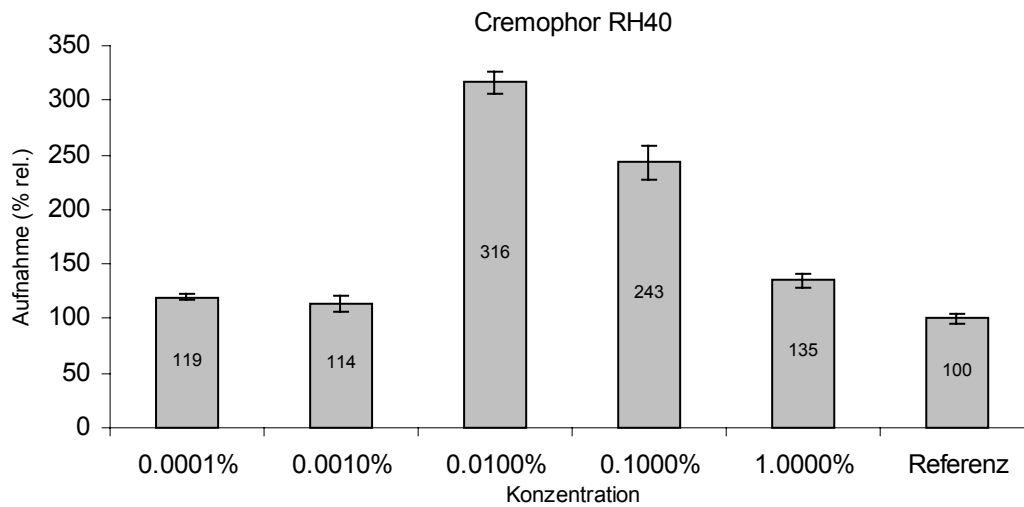


Abb.27: Einfluss von Cremophor RH40 auf die Aufnahme von Sulforhodamin 101 (CMC:0,033%)

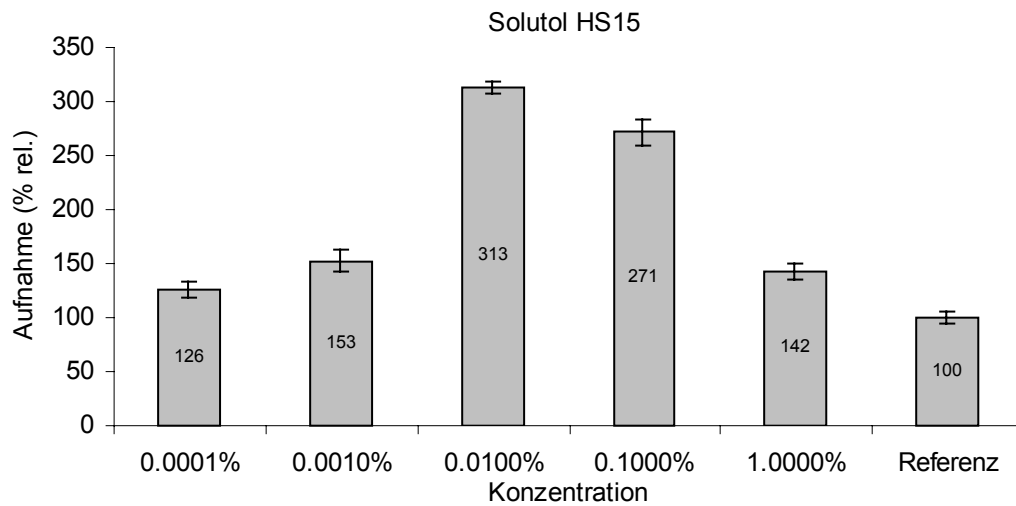


Abb.28: Einfluss von Solutol HS15 auf die Aufnahme von Sulforhodamin 101 (CMC:0,049%)

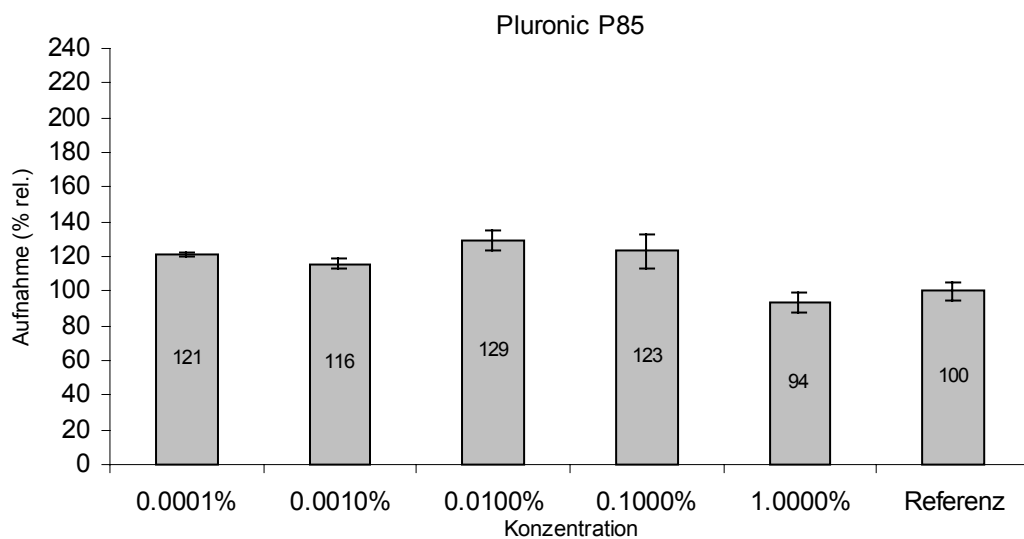


Abb.29: Einfluss von Pluronic P85 auf die Aufnahme von Sulforhodamin 101 (CMC:0,047%)



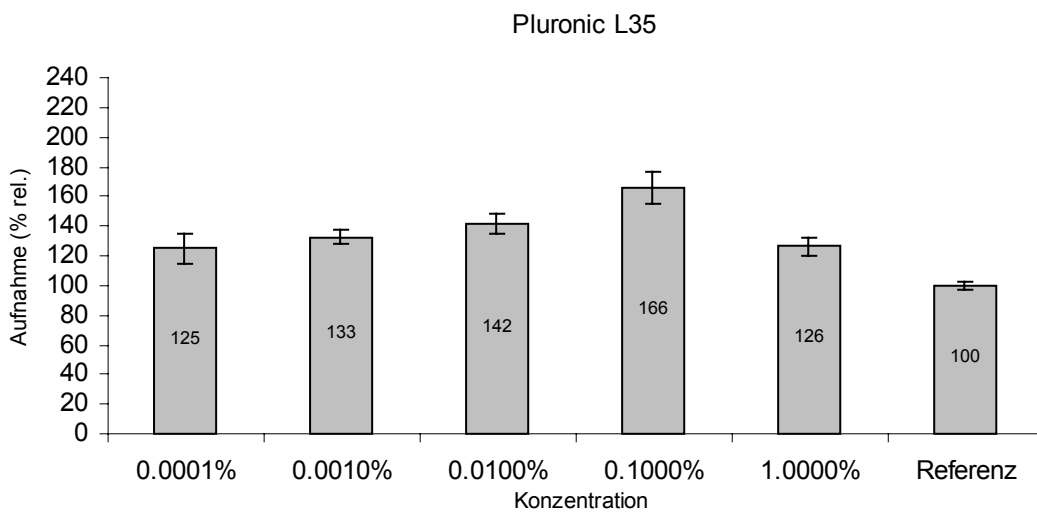


Abb.30: Einfluss von Pluronic L35 auf die Aufnahme von Sulforhodamin 101 (CMC:0,92%)

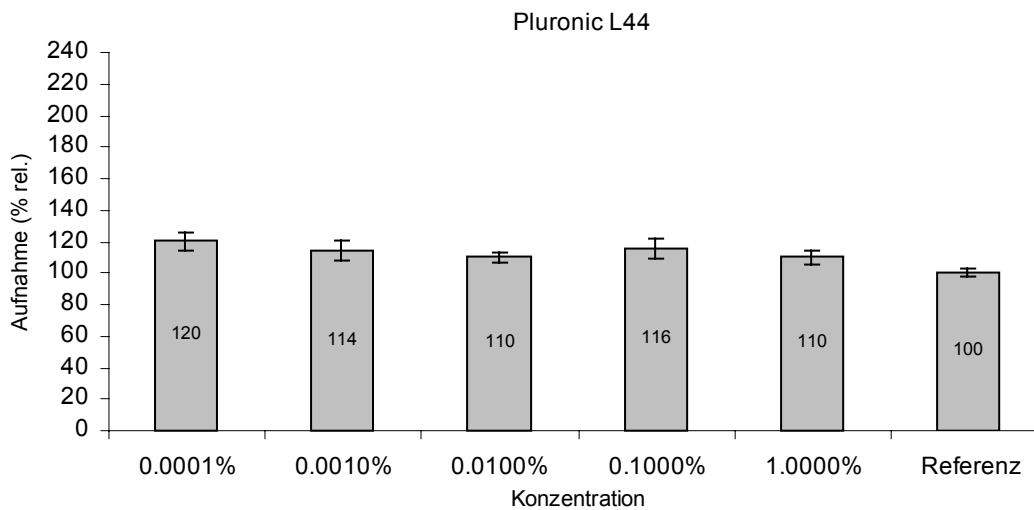


Abb.31: Einfluss von Pluronic L44 auf die Aufnahme von Sulforhodamin 101 (CMC:0,52%)

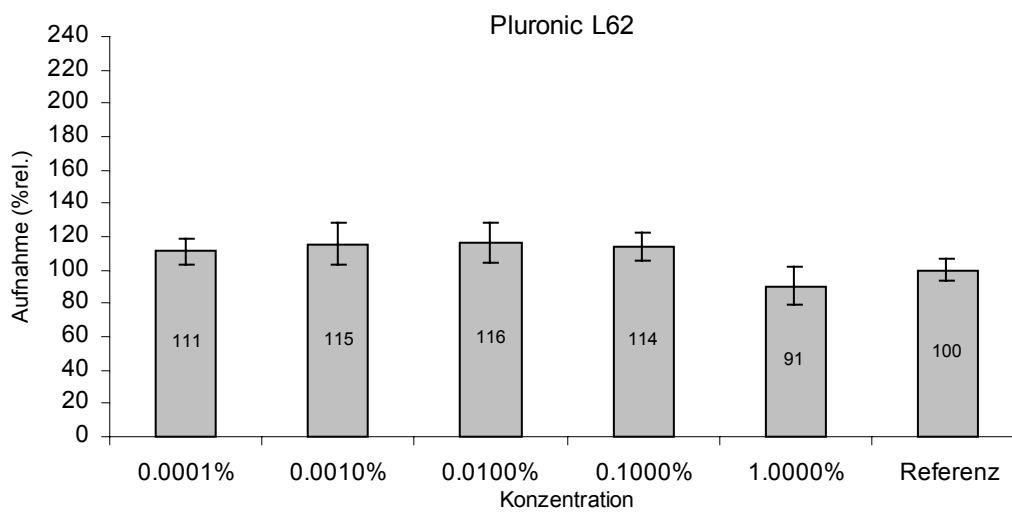


Abb.32: Einfluss von Pluronic L62 auf die Aufnahme von Sulforhodamin 101 (CMC: 0,060%)

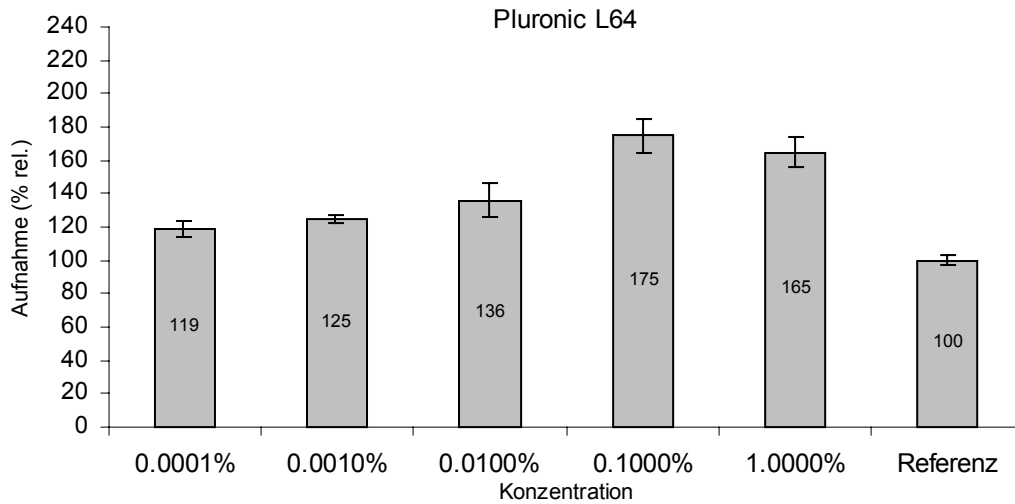


Abb.33: Einfluss von Pluronic L64 auf die Aufnahme von Sulforhodamin 101 (CMC:0,079%)

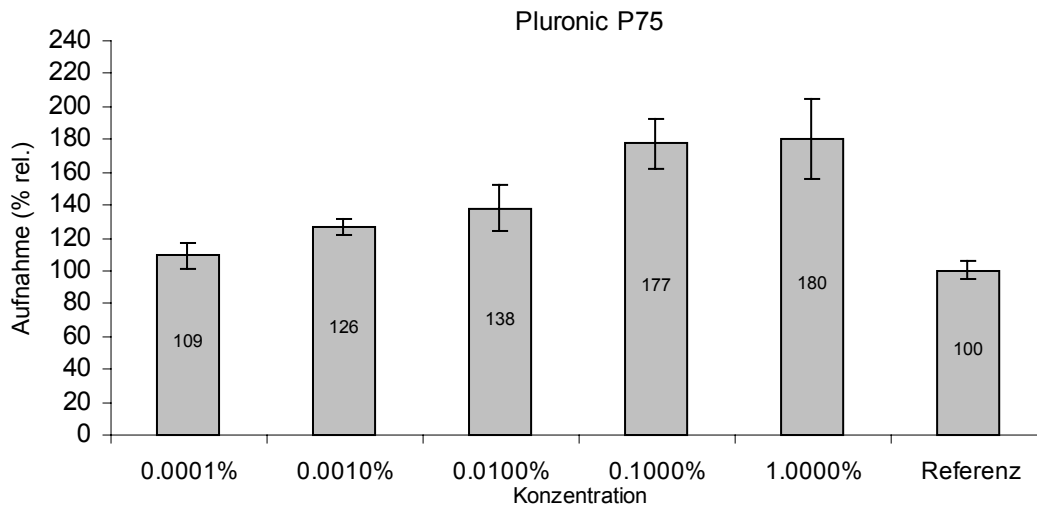


Abb.34: Einfluss von Pluronic P75 auf die Aufnahme von Sulforhodamin 101 (CMC:0,063%)

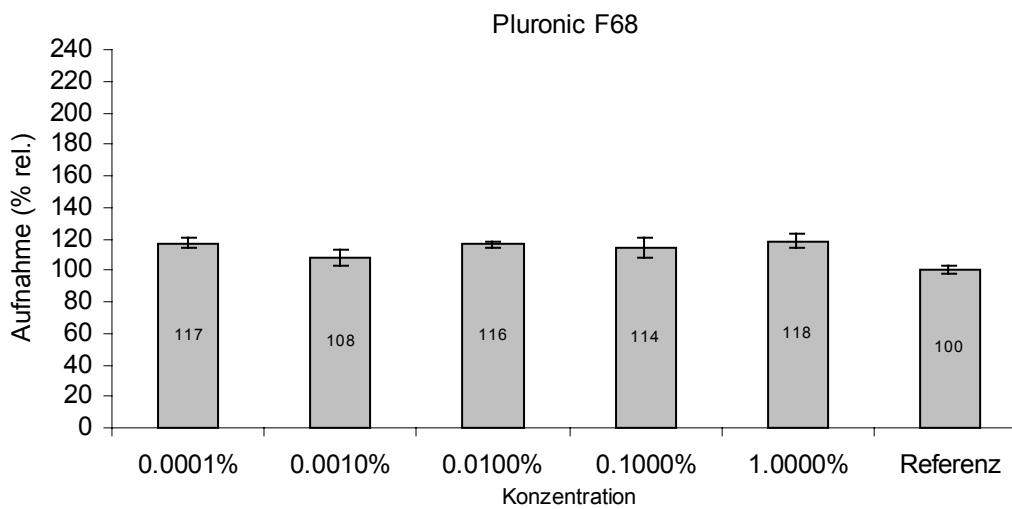


Abb.35: Einfluss von Pluronic F68 auf die Aufnahme von Sulforhodamin 101 (CMC:0,26%)

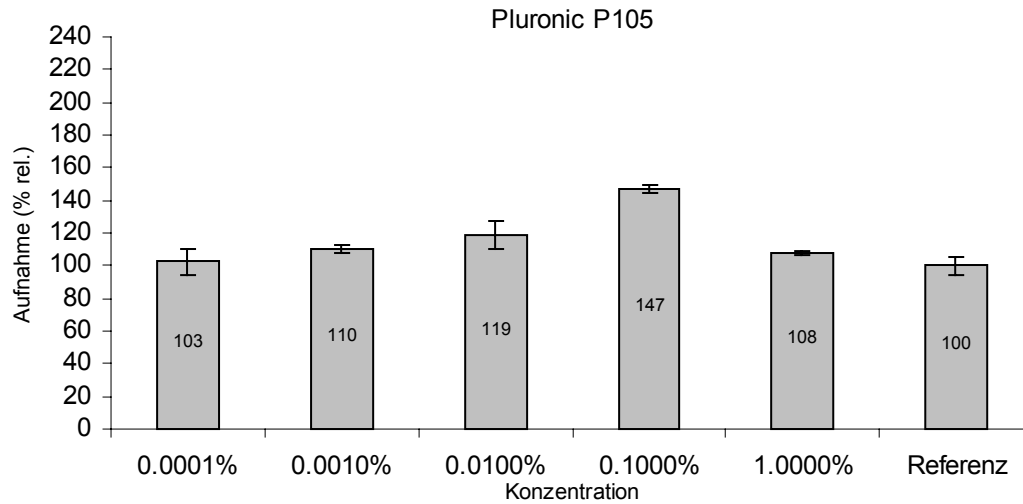


Abb.36: Einfluss von Pluronic P105 auf die Aufnahme von Sulforhodamin 101 (CMC:0,036%)

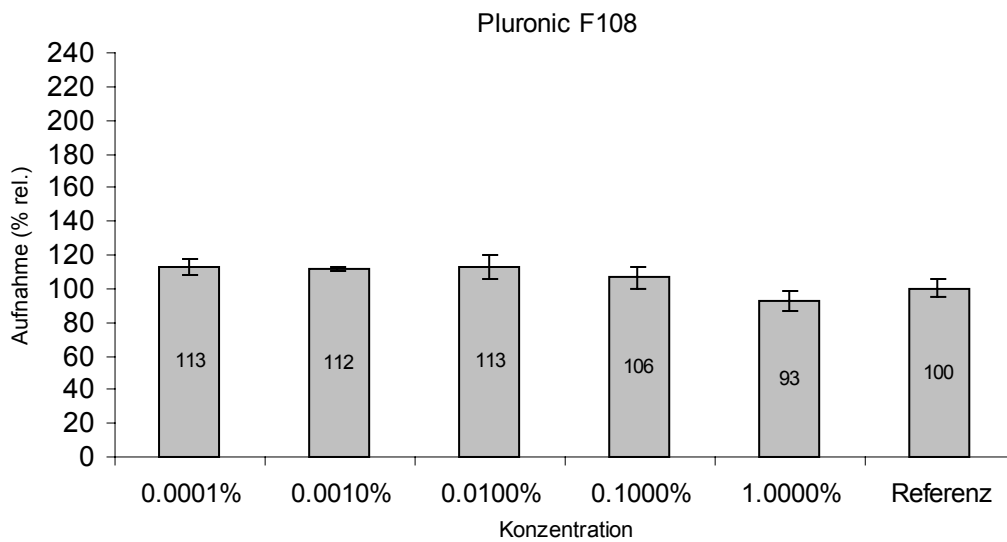


Abb.37: Einfluss von Pluronic F108 auf die Aufnahme von Sulforhodamin 101 (CMC:0,046%)

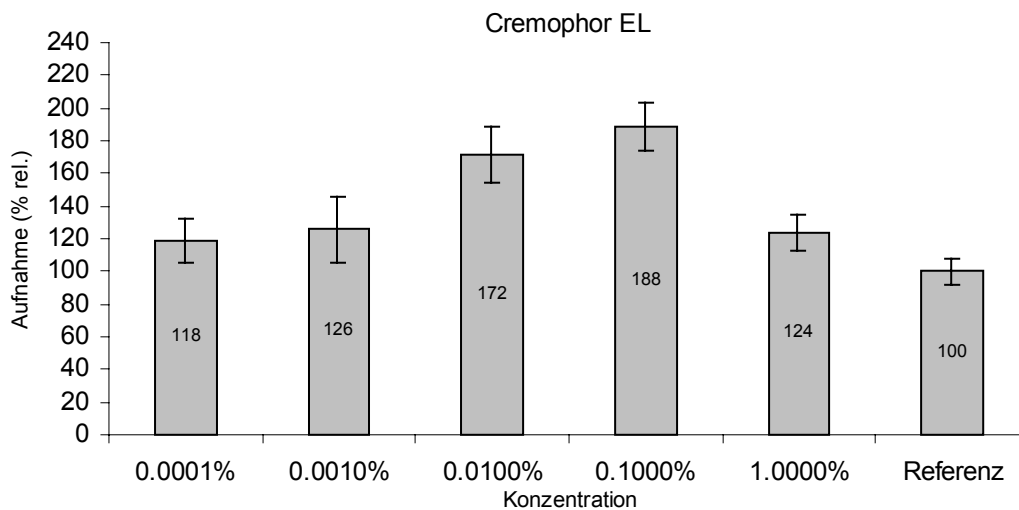


Abb.38: Einfluss von Cremophor EL auf die Aufnahme von Sulforhodamin 101 (CMC:0,013%)

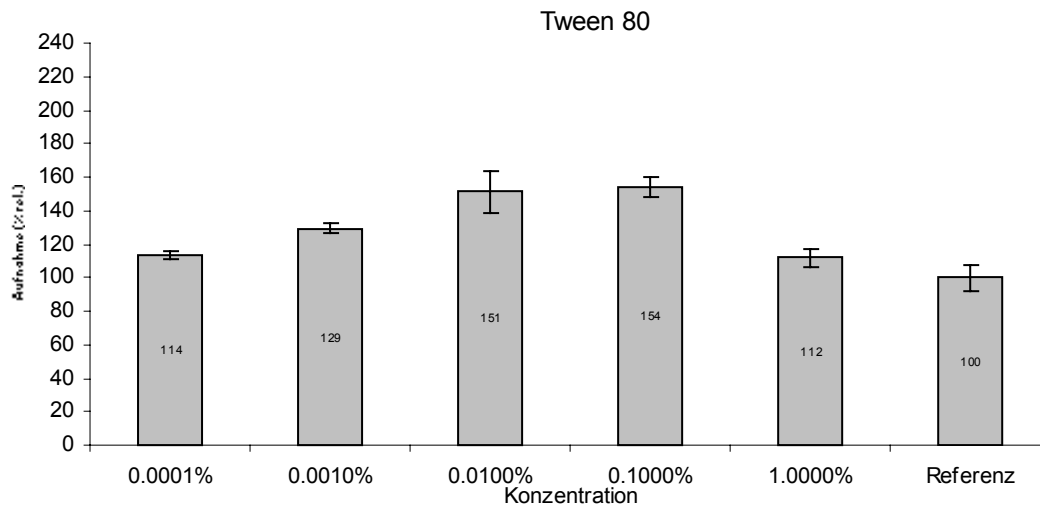


Abb.39: Einfluss von Tween 80 auf die Aufnahme von Sulforhodamin 101 (CMC:0,047%)

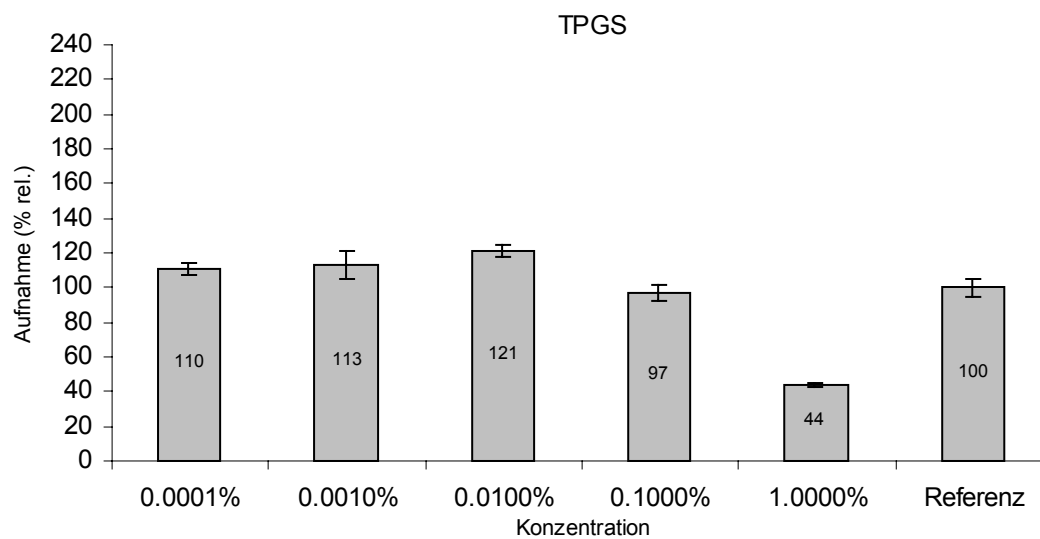


Abb.40: Einfluss von TPGS auf die Aufnahme von Sulforhodamin 101 (CMC:0,020%)

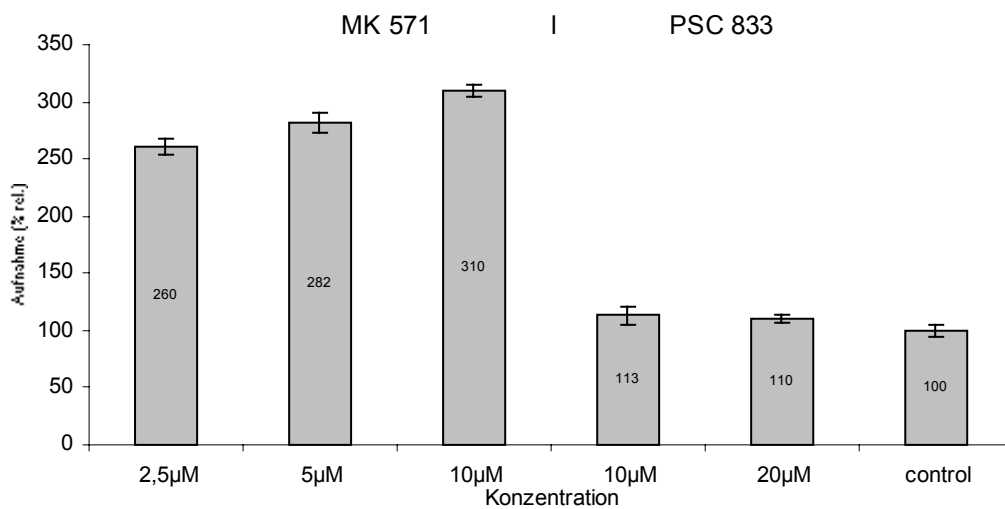


Abb.41: Einfluss von MK 571 und PSC 833 auf die Aufnahme von Sulforhodamin 101

### 3.4.2 Transportversuche mit Caco-2-Zellen:

Nach Durchführung der Aufnahmeversuche zur Feststellung einer Wechselwirkung zwischen Tensiden und MRP2, wurden einige Tenside auch in Transportstudien untersucht. In Transportstudien wird der Durchtritt von Substanzen durch die Zellschicht und nicht nur deren Aufnahme in das Innere der Zellen bestimmt. Durch diese Versuchsanordnung können die zu erwartenden Auswirkungen auf die Resorption besser beurteilt werden.

Da die Tenside, Cremophor RH40 und Solutol HS15 in den Aufnahmeversuchen den größten Einfluss auf den Transport durch MRP2 aufwiesen, wurden sie auch in Transportversuchen untersucht. Zur Kontrolle wurde außerdem Pluronic P85 getestet. Dieses Tensid zeigte in den Aufnahmeversuchen keine große Wirkung auf den MRP2-vermittelten Transport, dagegen einen großen Einfluss auf den Transport durch p-gp. Als Modells substrat für den MRP2-Transport diente wiederum Sulforhodamin 101, da es selektiv von diesem Exportprotein transportiert wird und fluorimetrisch relativ einfach zu analysieren ist (Miller et al., 1998). Der Transport von Sulforhodamin 101 wurde sowohl von der apikalen zur basolateralen (ab) als auch von basolateralen zur apikalen Seite (ba) bestimmt. Die Zugabe der Tenside erfolgte zusammen mit Sulforhodamin 101. Zusätzlich wurden die Tenside bei der Untersuchung des ba-Transports in das apikale Kompartiment, Sulforhodamin 101 hingegen in das basolaterale Kompartiment, zugegeben. Die Tenside wurden in den Konzentrationen eingesetzt, die in den Aufnahmeversuchen die deutlichsten Effekte zeigten. Bei Cremophor RH40 und Solutol HS15 betrug sie 0,01%, bei Pluronic P85 0,05%. Sulforhodamin 101 wurde in einer Konzentration von 5µM eingesetzt. Die Integrität der verwendeten Monolayer wurde durch Bestimmung des transepithelialen Widerstands (TEER) und durch Bestimmung der Permeationsrate des Parazellulärmarkers, FITC-Dextran 4000, sichergestellt.

Die Charakterisierung des Transports erfolgte anhand der Bestimmung des apparenten Permeabilitätskoeffizienten ( $P_{app}$ ) von Sulforhodamin 101 durch die Zellschicht. Für den Transport von Sulforhodamin 101 ohne Tensidzugabe von der apikalen zur basolateralen Seite (ab) wurde ein  $P_{app}$ -Werte von  $3,1 \times 10^{-7}$  cm/s und für den Transport von der basolateralen zur apikalen Seite (ba) eine Wert von  $1,7 \times 10^{-6}$  cm/s ermittelt (Abb.42 und 43). Durch den deutlichen Unterschied dieser Werte konnte eindeutig ein zur apikalen Seite gerichteter aktiver Transport festgestellt werden. Die Zugabe von Cremophor RH40 verursachte einen Anstieg des  $P_{app}$ -Werts des ab-Transports auf  $5,21 \times 10^{-6}$  cm/s und eine Verringerung des Werts für den ba-Transport auf  $1,06 \times 10^{-6}$  cm/s. Die Bestimmung des  $P_{app}$ -Werts für den ba-Transport und Zugabe von Cremophor RH40 zur apikalen Seite ergab einen Wert von  $8,37 \times 10^{-6}$  cm/s und zeigte, dass die Wirksamkeit nicht vom Ort der Applikation abhängt (Abb.44 und 45). Cremophor RH40 übte also einen deutlichen Einfluss auf den Transport von Sulforhodamin 101 aus, wobei der Einfluss auf den ab-Transport geringer ausfiel als auf den ba-Transport. Nach Zugabe von Cremophor RH40 war noch ein Unterschied in den  $P_{app}$ -Werten für beide Richtungen zu erkennen. Dieses Tensid war also nicht der Lage den aktiven Transport vollständig zu blockieren.

Die Verwendung von Solutol HS15 führte hingegen zu einer vollständigen Inhibierung des aktiven Transports von Sulforhodamin 101. Der  $P_{app}$ -Wert für den ab-Transport erhöhte sich auf von  $3,1 \times 10^{-7}$  auf  $9,17 \times 10^{-7}$  cm/s und der Wert für den ba-Transport verringerte sich auf von  $1,7 \times 10^{-6}$  auf  $1,05 \times 10^{-6}$  cm/s. Bei Zugabe zur apikalen Seite wurde für den ba-Transport ein  $P_{app}$ -Wert von  $1,08 \times 10^{-6}$  cm/s ermittelt (Abb.44 und 45). Auch hier spielte die Seite der Applikation keine Rolle für die Wirksamkeit des Tensids. Die  $P_{app}$ -Werte des ab-Transports und des ba-Transport unterscheiden sich nach Verwendung von Solutol HS15 kaum. Es war also kein gerichteter Transport mehr zu erkennen. Dies spricht für eine vollständige Hemmung der Transportaktivität von MRP2 durch Solutol HS15.

Zur Kontrolle, ob es sich bei den Effekten, die beim Transport von Sulforhodamin 101 beobachtet werden, tatsächlich um Wechselwirkungen mit MRP2 handelt, wurden auch Transportstudien unter Verwendung von MK 571, einem spezifischen Inhibitor von MRP2, durchgeführt. Die Zugabe von MK 571 hat eine Erhöhung des  $P_{app}$ -Werts für den ab-Transport von  $3,10 \times 10^{-7}$  auf  $1,02 \times 10^{-6}$  cm/s und eine Erniedrigung des  $P_{app}$ -Werts für den ba-Transport von  $1,70 \times 10^{-6}$  auf  $1,10 \times 10^{-6}$  cm/s zur Folge (Abb. 46 und 47). Es wurde also kein gerichteter Transport mehr festgestellt. Dadurch konnte gezeigt werden, dass MK 571 den aktiven Transport von Sulforhodamin 101 komplett hemmt. Daraus kann geschlossen werden, dass Sulforhodamin 101 hauptsächlich von MRP2 aktiv transportiert wird.

Pluronic P85 ist ein Tensid, das in den vorausgehenden Versuchen sehr starke Wechselwirkungen mit p-gp zeigte und in der Lage war, bei Verwendung von Rhodamin 123, einem p-gp-Substrat, die Transportaktivität von p-gp vollständig zu hemmen. Zur Kontrolle wurde auch dieses Tensid auf seine Wechselwirkungen mit MRP2 untersucht. In dieser Versuchsreihe ergaben sich  $P_{app}$ -Werte für den Transport von Sulforhodamin 101 von  $5,76 \times 10^{-6}$  (ab) und  $1,16 \times 10^{-5}$  cm/s (ba). Die Werte lagen hier etwas höher, aber es konnte auch hier ein deutlich gerichteter Transport festgestellt werden. Nach Zugabe von Pluronic P85 wurden Werte von  $6,3 \times 10^{-6}$  cm/s für den ab-Transport und  $1,10 \times 10^{-5}$  cm/s für den ba-Transport ermittelt (Abb.48 und 49). Pluronic P85 übte somit keinen Einfluss auf die Transporteigenschaften vom MRP2 aus.

Die in den Aufnahmeversuchen erhaltenen Ergebnisse konnten in den Transportversuchen bestätigt werden. Die beiden Tenside Cremophor RH40 und Solutol HS15 gehen Wechselwirkungen mit MRP2 ein und sind in der Lage die Transportaktivität von MRP2 zu unterbinden. Hierbei war Solutol HS15 etwas wirksamer als Cremophor RH40. Diese beiden Tenside üben also nicht nur einen deutlichen Einfluss auf die Aufnahme von MRP2-Substraten in die Zellschicht aus, sondern auch auf den Transport von Substanzen durch die Zellschicht hindurch. Es ist somit zu erwarten, dass sie auch Auswirkungen auf die Resorption zeigen. Beide Tenside könnten somit gezielt zu einer Resorptionsverbesserung von MRP2-Substraten eingesetzt werden. Wie in den vorigen Versuchen zeigte sich auch in diesen Versuchen ein deutlicher Unterschied zwischen den Wechselwirkungen von Tensiden mit p-gp und MRP2. Pluronic P85 hatte ganz im Gegensatz zu den

Versuchen zur Wechselwirkung mit p-gp in diesen Versuchen keinen entscheidenden Einfluss auf den Transport von Sulforhodamin 101. Es liegt hier also wahrscheinlich nicht der gleiche Inhibierungsmechanismus vor. Auch eine unspezifische Beeinflussung der Zellmembran durch die zugesetzten Tenside und eine daraus resultierende erhöhte Durchlässigkeit der Zellmembran kann als Ursache eines gesteigerten Substanztransports ausgeschlossen werden. In diesem Fall hätte man eine erhöhte Transportrate in beide Richtungen beobachten müssen. In diesen Versuchen wurde aber durch einen Tensidzusatz der Transport des MRP2-Substrats von der basolateralen zur apikalen Seite erniedrigt. Außerdem wären keine so deutlichen Unterschiede in den Wechselwirkungen der Tenside auf die beiden Transportproteine festzustellen gewesen.

Während die Wechselwirkungen von Tensiden mit p-gp von einigen Arbeitsgruppen schon untersucht wurden, gibt es zu der Auswirkung von Tensiden auf die Aktivität von anderen Mitglieder der ABC-Transporterfamilie bisher noch sehr wenige Ergebnisse. Für Cremophor EL z.B. konnte in einer Studie von Aszalos et al. (1999) keine eindeutige Wirkung auf MRP1 nachgewiesen werden. Miller et al. (1999) untersuchten die Auswirkungen einiger Poloxamere und auf den Transport von MRP1 und konnten hierbei zeigen, dass Pluronic L81, Pluronic P85 und Pluronic F108 in Lage waren, die Aktivität von MRP1 zu inhibieren. Diese Ergebnisse konnten jedoch für Pluronic L61 nicht bestätigt werden (Evers et al., 2000). Hierbei wurden außer den Wechselwirkungen mit MRP1 auch die Wechselwirkungen mit MRP2 untersucht. Pluronic L61 hatte aber auf die Aktivität beider Transportproteine keinen Einfluss. In einer Studie von Bogman et al. (2003) wurde eine Reihe von Tensiden, unter ihnen u.a. Cremophor EL, TPGS, Tween 80, Pluronic L61 und Pluronic L81, an MRP2-überexprimierenden Zellen untersucht. Auch hier konnte keine Beeinträchtigung der Aktivität von MRP2 durch Zugabe der erwähnten Tenside beobachtet werden.

Auch in dieser Arbeit zeigten die meisten der getesteten Tenside keinen Einfluss auf die Aktivität von MRP2, es konnten jedoch mit Cremophor RH40 und Solutol HS15 zwei Tenside identifiziert werden, die in der Lage waren, den Transport durch MRP2 zu hemmen. p-gp und MRP2 besitzen als Mitglieder der gleichen Transporterfamilie einen teilweise ähnlichen Aufbau und vergleichbare Transporteigenschaften. Trotz dieser Gemeinsamkeiten wurde in dieser Arbeit und allen bisherigen Veröffentlichungen ein unterschiedlicher Einfluss Tenside auf den Transport von p-gp und MRP2 festgestellt. Es liegt somit wahrscheinlich nicht derselbe Wirkungsmechanismus zugrunde, sondern spezifischere Wechselwirkungen der Tenside mit den einzelnen Transportproteinen.

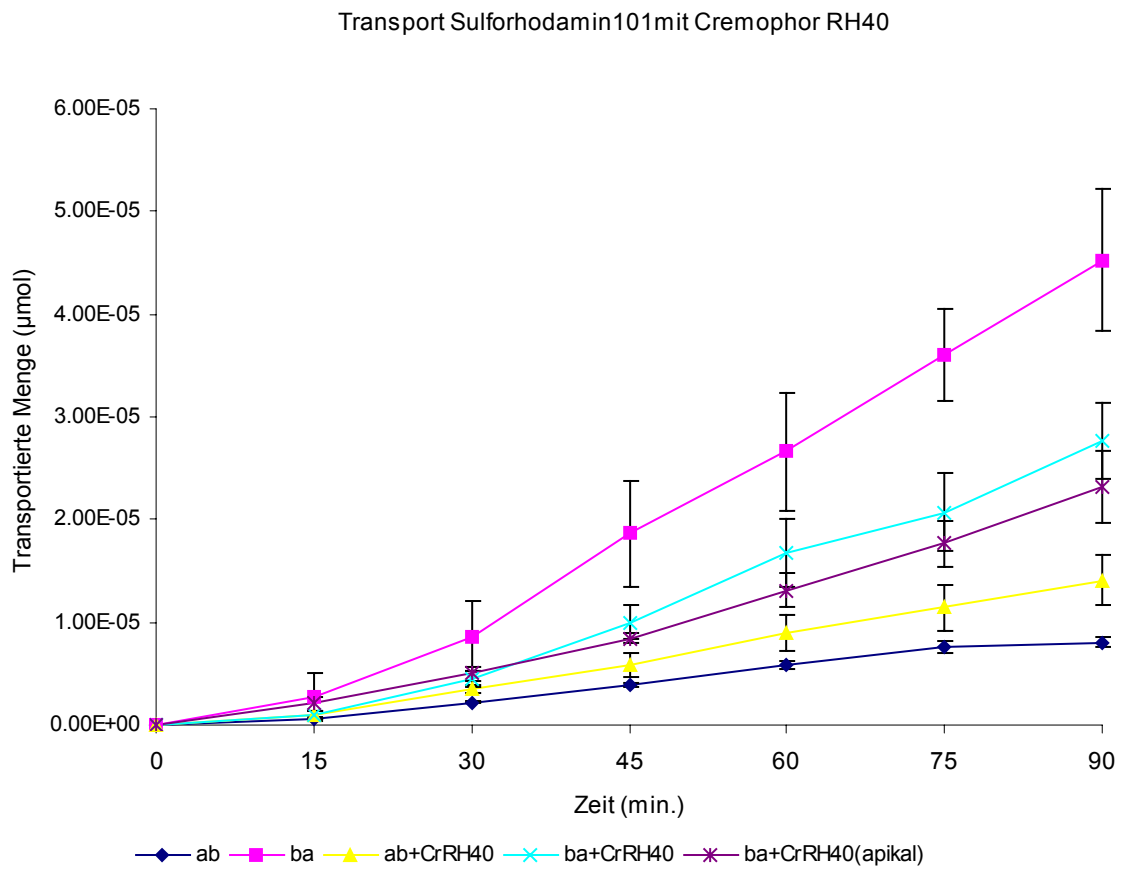


Abb.42: Transport von Sulforhodamin 101 unter Einfluss von Cremophor RH40

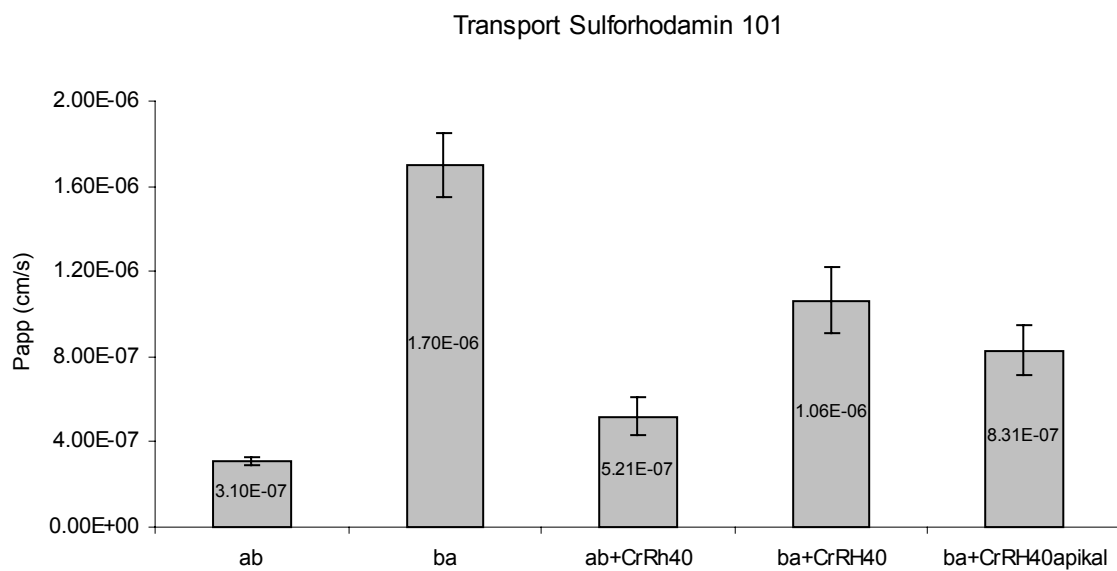


Abb.43: P<sub>app</sub>-Werte des Transports von Sulforhodamin 101 unter Einfluss von Cremophor RH40



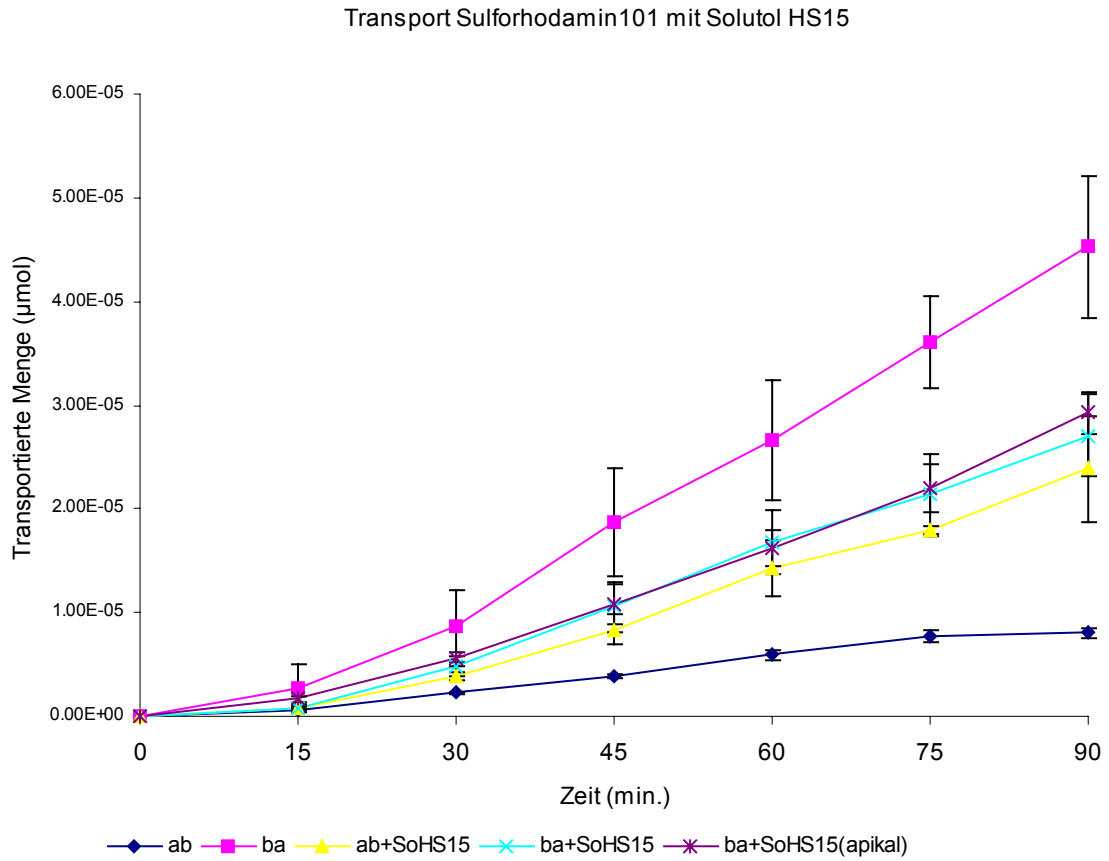


Abb.44: Transport von Sulforhodamin 101 unter Einfluss von Solutol HS15

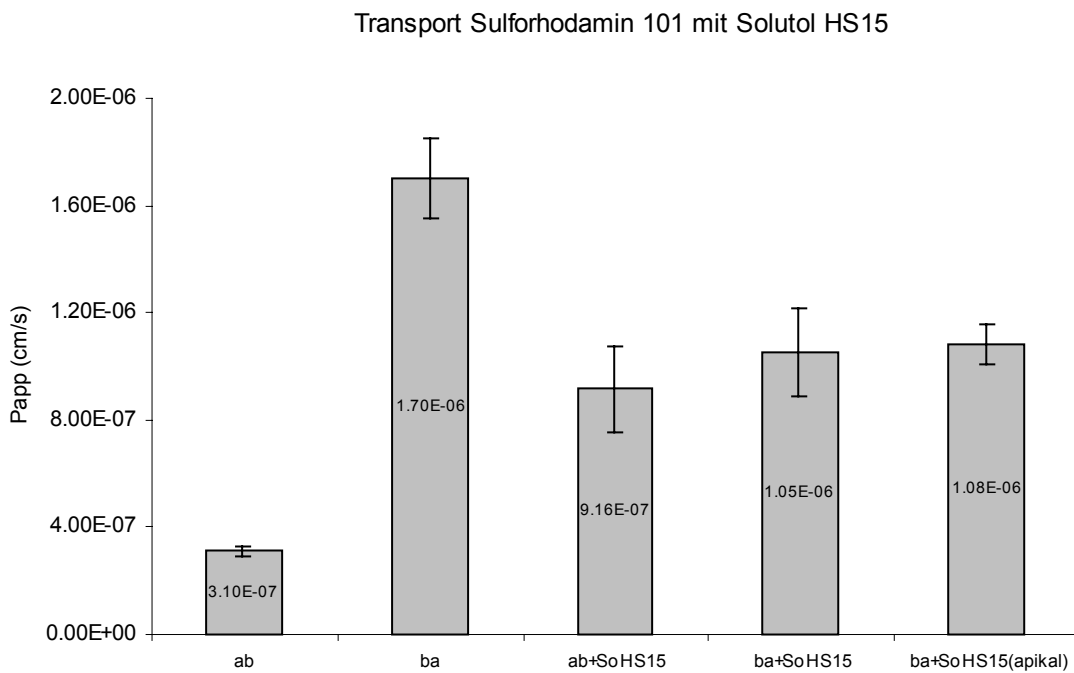


Abb.45: P<sub>app</sub>-Werte des Transports von Sulforhodamin 101 unter Einfluss von Solutol HS15

Transport Sulforhodamin101 mit MK 571

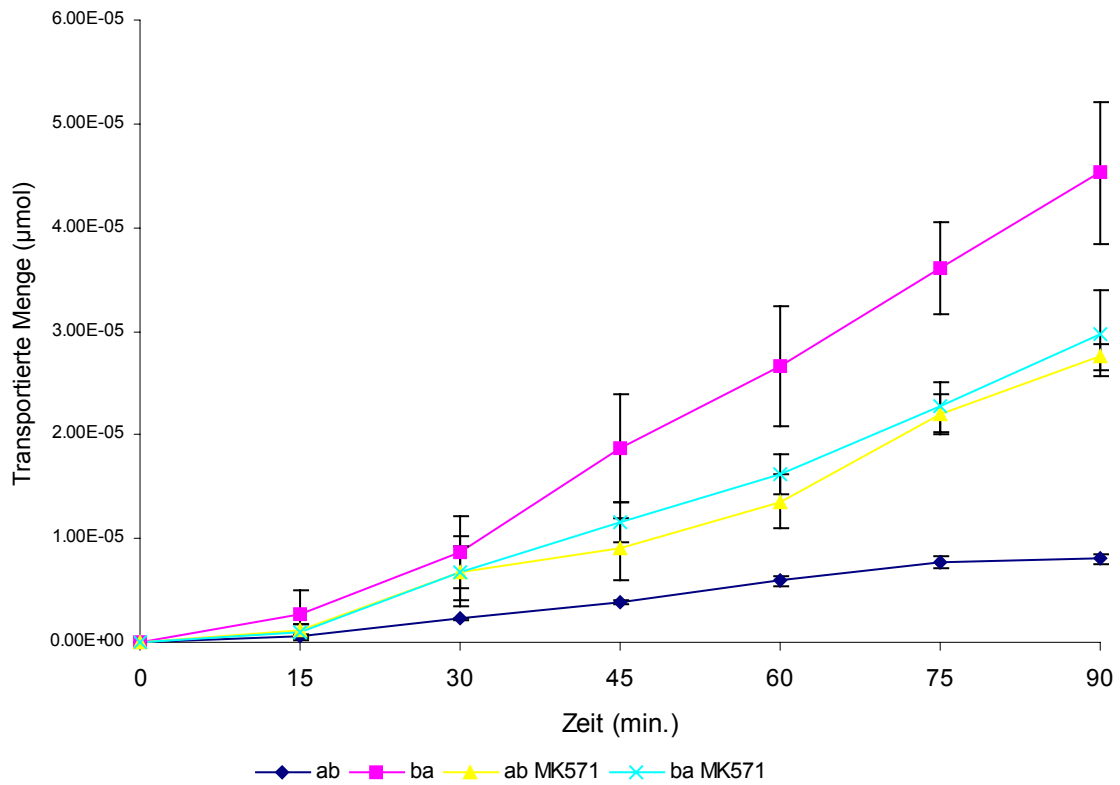


Abb.46: Transport von Sulforhodamin 101 unter Einfluss von MK571

Transport Sulforhodamin 101 mit MK 571

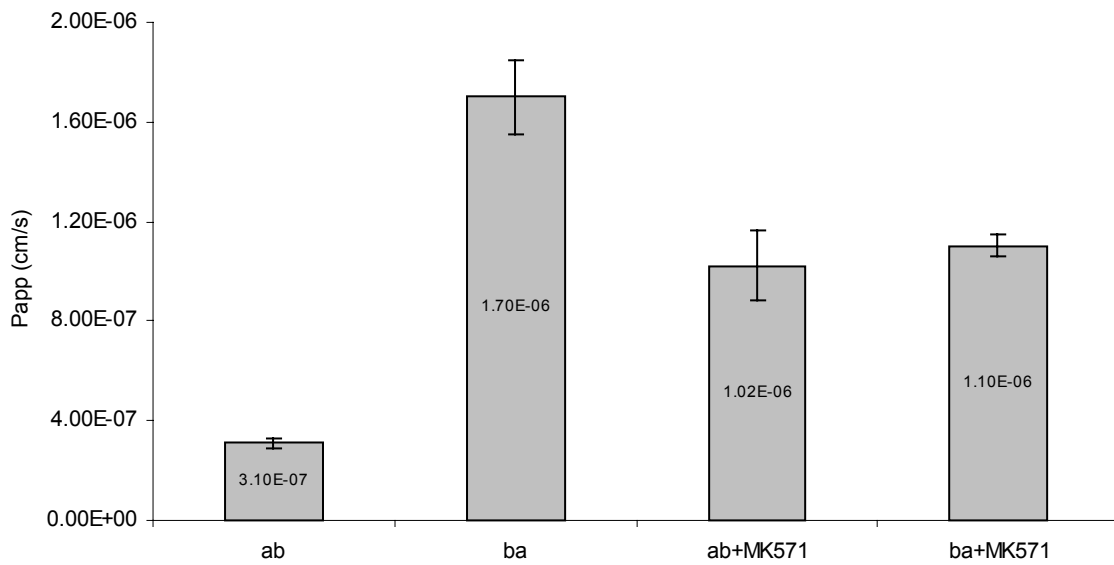


Abb.47: P<sub>app</sub>-Werte des Transports von Sulforhodamin 101 unter Einfluss von MK571

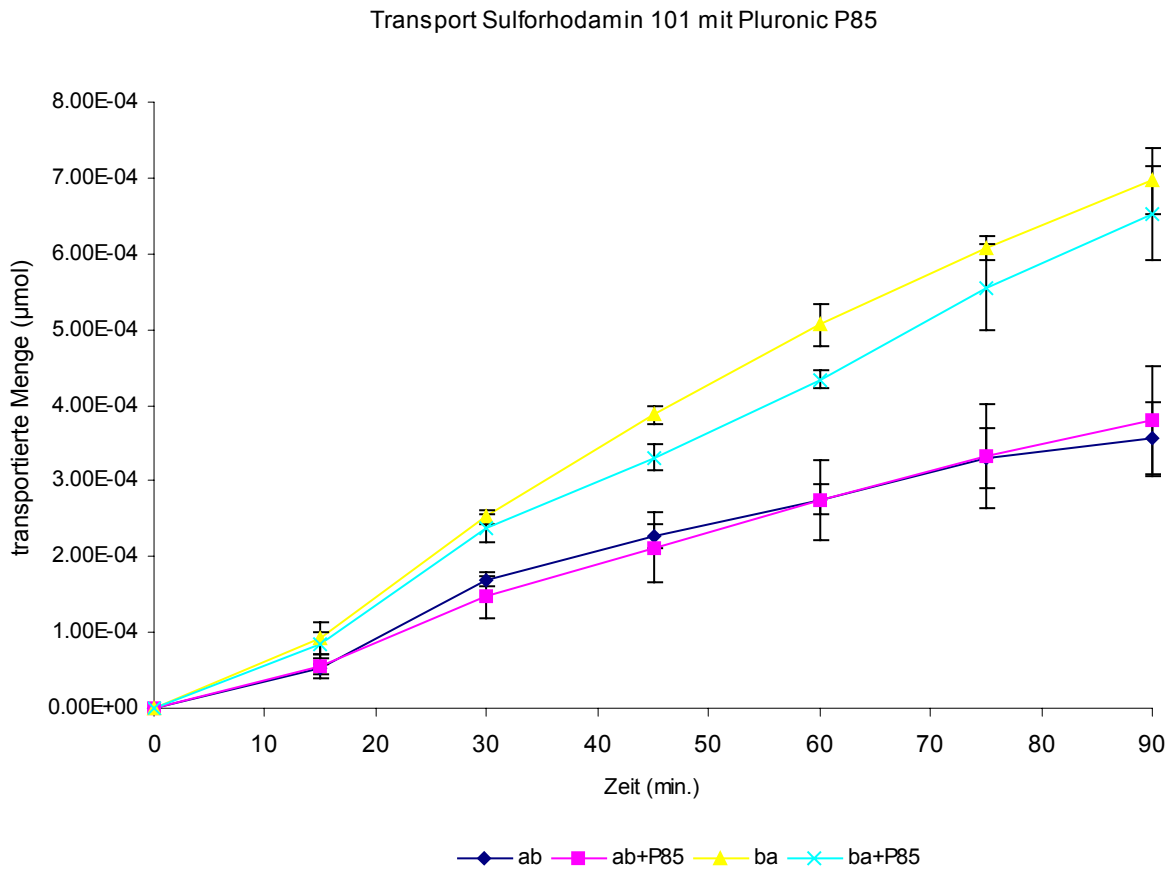


Abb.48: Transport von Sulforhodamin 101 unter Einfluss von Pluronic P85

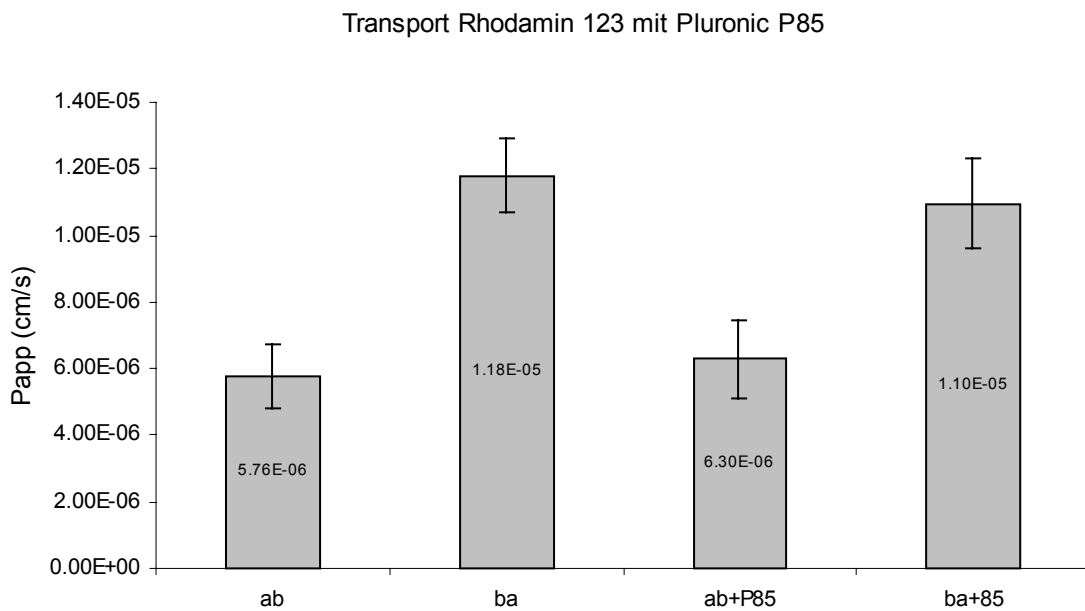


Abb.49: P<sub>app</sub>-Werte des Transports von Sulforhodamin 101 unter Einfluss von Solutol HS15

### **3.5 Wechselwirkung von Tensiden mit p-gp (II)**

#### **3.5.1 Aufnahmeversuche mit Gehirnkapillarendothelzellen**

Die Blut-Hirn-Schranke (blood brain barrier, BBB) stellt für Arzneistoffe, deren Zielorgan das Gehirn ist, eine bedeutende Barriere dar. Sie wird durch einen dichten Abschluss des Lumens der Kapillaren gegenüber dem Gehirngewebe aufgebaut. Dies wird u.a. durch eine ausgeprägte Ausbildung von tight-junctions zwischen den Gehirnkapillarendothelzellen erreicht. Eine wichtige Rolle zur Aufrechterhaltung dieser Barriere spielt außerdem das Transportprotein, p-gp. Durch seine Anordnung in der luminalen Membran der Endothelzellen transportiert es seine Substrate, aus der Zelle bzw. bereits aus der Zellmembran zurück in das Kapillarlumen, wodurch ein Eindringen dieser Substanzen vom Blutstrom in das Gehirngewebe ganz verhindert oder zumindest stark eingeschränkt wird (Schinkel, 1999, Misra et al., 2003). Wie auch die Epithelzellschicht des Dünndarms stellt die Endothelzellschicht der Gehirnkapillaren eine Barriere dar, die das Passieren vieler Stoffe erschwert. Hierbei spielen Transportproteine eine wichtige Rolle. Da bereits in den Versuchen mit Caco-2-Zellen, als Modell für das Dünarmepithel, gezeigt wurde, dass Tenside eine Wechselwirkung mit Transportproteinen eingehen und dadurch einen Einfluss auf die Resorption ausüben, sollte nun untersucht werden, ob ein entsprechender Effekte ebenfalls in Gehirnendothelzellen, als Modell für die Blut-Hirn-Schranke, zu beobachten ist. Sollte eine Wirksamkeit festgestellt werden, könnte durch Zugabe dieser Tenside eine bessere Aufnahme von Arzneistoffen in das Gehirngewebe erzielt werden, die normalerweise von p-gp zurück in den Blutstrom transportiert werden.

Die Versuche wurden mit einer Primärkultur von Gerhinkapillarendothelzellen, die aus Schweinehirn isoliert wurden (porcine brain capillary endothelial cells, PBCEC), durchgeführt. Als Modellsubstrat zur Untersuchung des Einflusses von Tensiden auf die Transportaktivität von p-gp diente der Fluoreszenzfarbstoff Rhodamin 123. Der Versuchsaufbau entsprach den vorherigen Versuchen mit Caco-2-Zellen. Die Zellen wurden mit Rhodamin 123 allein und zusammen mit Tensiden in verschiedenen Konzentration inkubiert und ein Unterschied in der in die Zellen aufgenommenen Farbstoffmenge bestimmt. Die Angabe der Ergebnisse erfolgte in Bezug zur Referenzprobe, die nur Rhodamin 123 enthielt und als 100%-Wert definiert wurde. Untersuchungen zur Wechselwirkung von Tensiden mit dem Transportprotein MRP2 waren mit diesen Zellen nicht möglich. Nach Inkubation der Zellen mit Sulforhodamin 101, einem MRP2-Substrat, und Zugabe von MK 571, einem MRP2-Inhibitor, konnte keine Veränderung der aufgenommenen Sulforhodaminmenge festgestellt werden. Dies lässt auf eine nicht ausreichend MRP2-Expression dieser Zellen schließen. Das Vorkommen von MRP2 in Gehirnendothelzellen wurde in isolierten Kapillaren schon gezeigt (Nobmann; 2001). Die Expression von MRP2 in der Primärkultur ist aber noch nicht eindeutig nachgewiesen. In diesen Versuchen war die Expression jedoch

nicht vorhanden oder zumindest so gering, dass keine funktionelle Aktivität beobachtet werden konnte.

Die Versuche ergaben ähnliche Ergebnisse wie in den vorherigen Untersuchungen mit Caco-2-Zellen. Pluronic P85 war in Lage die aufgenommene Rhodaminmenge auf einen Wert von über 300% anzuheben (Abb.50). Auch hier war wieder eine charakteristische Konzentrationsabhängigkeit des Effekts zu beobachten. Das maximale Ausmaß des Einflusses lag ungefähr im Bereich der CMC, bei höheren Konzentrationen war es weniger stark ausgeprägt. Dies deutet erneut darauf hin, dass dieser Effekt von den frei in Lösung vorliegenden Tensidmolekülen und nicht von Mizellen verursacht wird.

Die Tenside, Cremophor RH40 und Solutol HS15, die beide einen großen Einfluss auf den Transport durch MRP2 zeigten, hatten in diesen Versuchen wie auch schon in den Untersuchungen mit Caco-2-Zellen keine Auswirkung auf die Anreicherung von Rhodamin 123 in der Endothelzellschicht (Abb.51 und 52).

Zur Kontrolle der p-gp-Aktivität wurde der spezifische p-gp-Inhibitor PSC 833 eingesetzt. Nach Zugabe dieses Inhibitors wurde einer Erhöhung der in die Zellen gelangte Menge an Rhodamin 123 auf einen Wert von über 300% des Kontrollwerts festgestellt (Abb.50). Dadurch konnte gezeigt werden, dass in den hier verwendeten Zellen eine ausreichende Aktivität von p-gp vorliegt. Ohne Zugabe des Inhibitors wurde Rhodamin 123 aus der Zelle bzw. Zellmembran transportiert und deshalb konnte nur eine geringe Substanzmenge in die Zellen diffundieren.

Die erhaltenen Ergebnisse der Untersuchungen mit Caco-2-Zellen konnten durch die Versuche mit Gehirnkapillarendothelzellen bestätigt werden. Es wurden deutliche Effekte durch Tenside auf die Aufnahme von Rhodamin 123 in die Zellen festgestellt. Hierbei gab es deutliche Unterschiede zwischen den Tensiden. Eine generelle Erhöhung der Durchlässigkeit der Zellmembran ist hierbei nicht der Grund der Substanzanreicherung in den Zellen, da in Versuchen mit Sulforhodamin 101, einem Fluoreszenzfarbstoff, der in diesen Zellen nicht aktiv transportiert wird, keine Auswirkung dieser Tenside auf die in die Zellen aufgenommene Substanzmenge zu beobachten war. Wie auch in den vorangegangenen Versuchen handelt es sich bei den beobachteten Effekten um Wechselwirkungen mit p-gp. Durch Hemmung der Transportaktivität, wird das Substrat nicht mehr aus der Zelle bzw. Zellmembran entfernt, sodass eine größere Menge des Substrats in die Zellen gelangt.

Aufgrund dieser Ergebnisse scheint es möglich zu sein, durch die Zugabe bestimmter Tenside eine bessere Aufnahme von Arzneistoffen, die durch die Transportaktivität von p-gp am Passieren der Blut-Hirn-Schranke gehindert werden, in das Gehirngewebe zu erzielen.

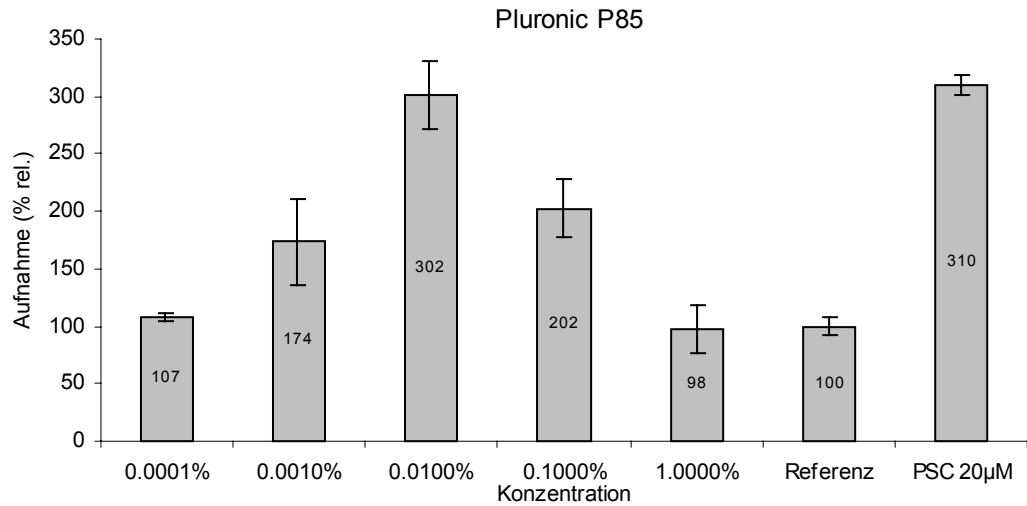


Abb.50: Einfluss von Pluronic P85 auf die Aufnahme von Rhodamin 123

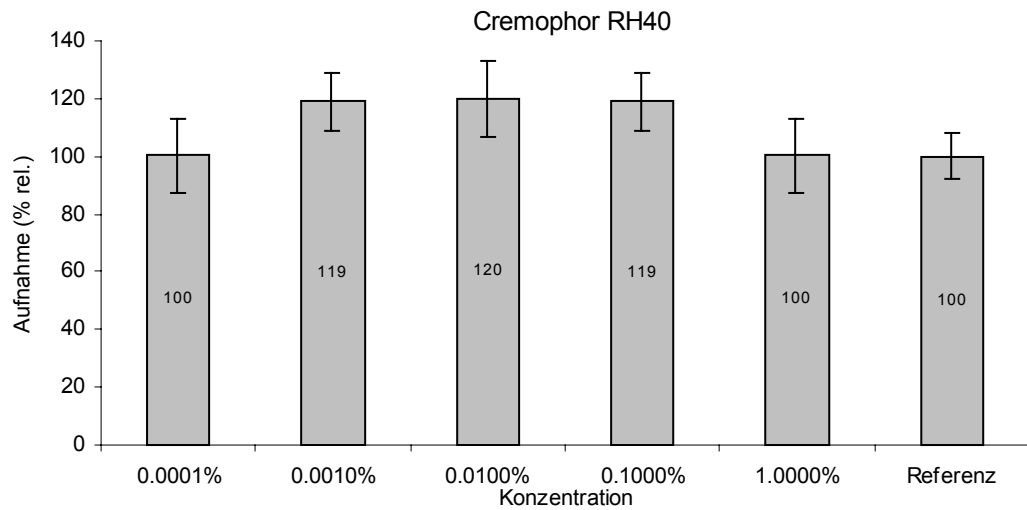


Abb.51: Einfluss von Cremophor RH40 auf die Aufnahme von Rhodamin 123

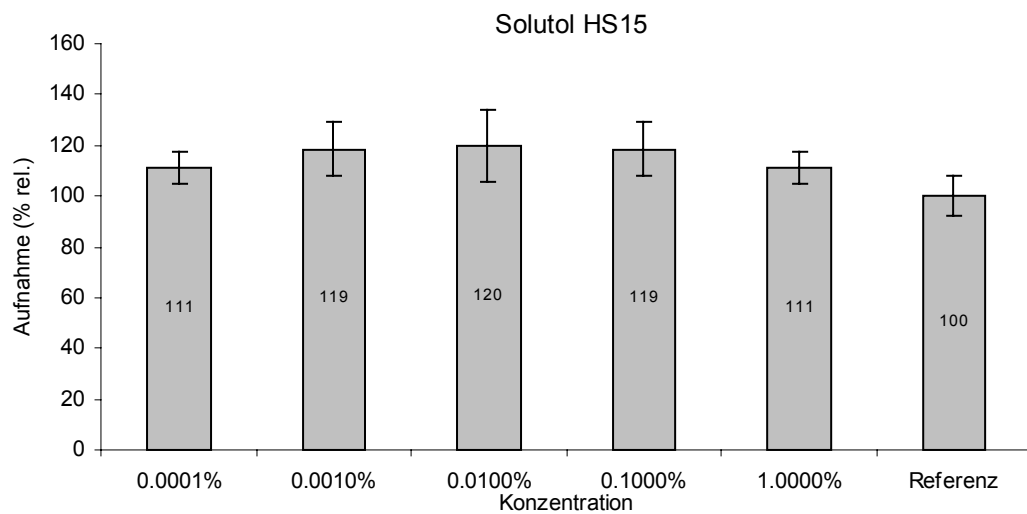


Abb. 52: Einfluss von Solutol HS15 auf die Aufnahme von Rhodamin 123

### 3.6 Kritischen Mizellbildungskonzentration (CMC) von Tensiden

Die Kritische Mizellbildungskonzentration (CMC) ist eine charakteristische Kenngröße für Tenside. Bei geringer Tensidkonzentration liegen die einzelnen Tensidmoleküle frei in Lösung vor und lagern sich an der Oberfläche der Lösung an. Bei Ansteigen der Tensidkonzentration wird die Oberfläche vollständig bedeckt und die Tenside lagern sich zu Aggregaten zusammen. Dies bezeichnet man als Mizellbildung. Die Tensidmoleküle richten sich hierbei im wässrigen Medium mit ihrem hydrophilen Molekülteil nach außen und mit ihrem lipophilen Molekülteil nach innen aus. Es bildet sich oberhalb der CMC ein Gleichgewicht zwischen Molekülen, die frei in Lösung vorliegen und Molekülen, die in Mizellen eingebunden sind, aus, wobei die Konzentration an freien Molekülen konstant bleibt. Die CMC hängt außerdem von der Temperatur ab. Sowohl der hydrophile als auch der lipophile Molekülteil liegt bei niedrigen Temperaturen hydratisiert vor. Bei steigender Temperatur verliert vor allem der lipophile Molekülteil seine Hydrathülle, wird wasserunlöslich und löst dadurch die Mizellbildung aus. Die Temperatur, bei sich Mizellen ausbilden wird auch als Kritische Mizellbildungstemperatur (critical micelle temperature, CMT) bezeichnet (Bauer, 1999; Voigt, 2000).

Es gibt verschiedene Methoden zur Bestimmung der CMC, die unterschiedliche Eigenschaften der Tensidlösungen ausnutzen. Häufig erfolgt die Bestimmung über die Ermittlung der Änderung der Oberflächenspannung oder der Viskosität. In dieser Arbeit wurde der Fluoreszenzfarbstoff Diphenylhexatrien (DPH) verwendet. Frei in Lösung vorliegend zeigt DPH keine oder nur eine sehr geringe Fluoreszenz. Befindet sich DPH jedoch in einer lipophilen Umgebung, wie zum Beispiel eingelagert zwischen die lipophilen Molekülteile der Tenside in einer Mizelle, kann eine starke Fluoreszenz beobachtet werden. Die Bestimmung der CMC erfolgt durch Ermittlung des sprunghaften Fluoreszenzanstiegs bei steigender Tensidkonzentration (Abb.53). Da die CMC stark temperaturabhängig ist, wurden die Versuche bei einer konstanten Temperatur von 37°C und nicht bei Raumtemperatur durchgeführt, da dies die Temperatur war, die bei der Durchführung der Zellversuche vorlag und da sie den physiologischen Bedingungen entspricht. Die Bestimmung erfolgte im Puffer (KRB), der in den Zellversuchen verwendet wurde, und nicht in reinem Wasser, da das Vorhandensein von Elektrolyten ebenfalls einen starken Einfluss auf die CMC ausübt. CMC-Angaben aus der Literatur sind oft nicht einheitlich. Dies kann zum einen an den oben beschriebenen unterschiedlichen Bestimmungsmethoden und Versuchsbedingungen liegen. Zum anderen kann die heterogene Zusammensetzung der Tenside problematisch sein. Durch ihre Synthese bedingt sind Tenside oft Stoffgemische unterschiedlicher Zusammensetzung, wodurch unterschiedliche CMC-Werte zu erklären sind.

Die Kenntnis der CMC war für diese Arbeit wichtig, da die festgestellten Wechselwirkungen der getesteten Tenside mit den Transportproteinen einen charakteristischen konzentrationsabhängigen Verlauf aufwiesen. Da dieser Verlauf ein auffälliges Maximum zeigte, lag die Vermutung nah, dass dieses Maximum mit

der CMC und mit dem Vorhandensein von frei in Lösung befindlichen und in Mizellen gebundenen Tensidmolekülen in Zusammenhang steht. Dies konnte durch die Ermittlung der CMC unter Einhaltung der Versuchsbedingungen bestätigt werden, da der maximale Effekt in den Versuchen zu den Wechselwirkungen der Tenside mit p-gp und MRP2 jeweils im Bereich der hier bestimmten CMC lag.

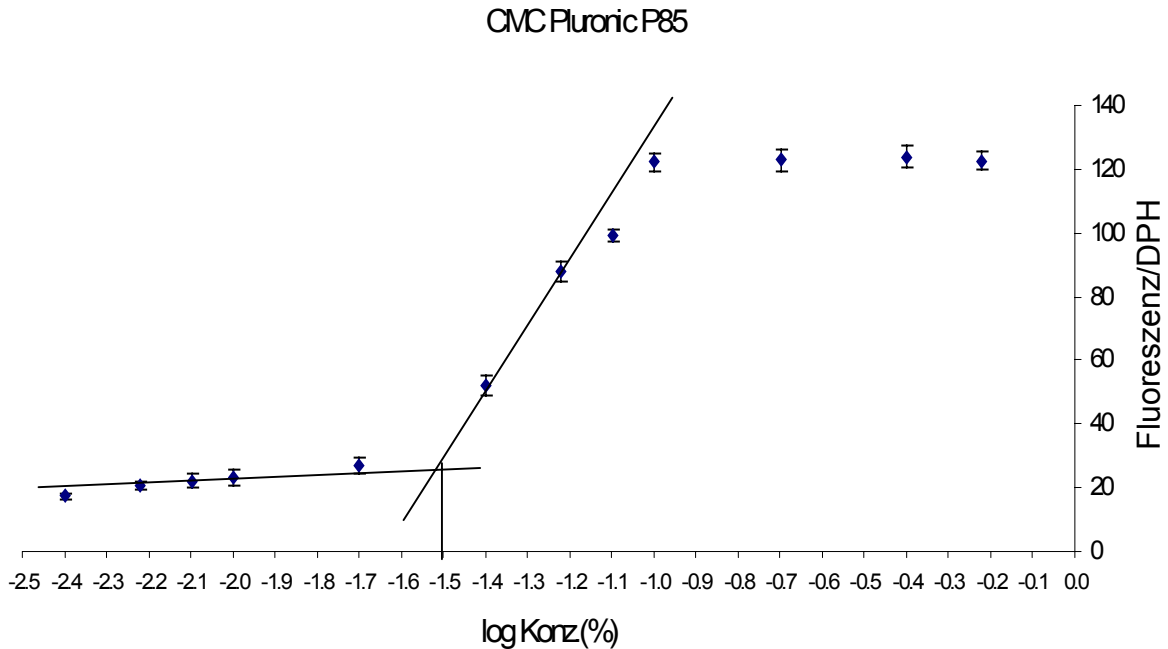


Abb.53: CMC Bestimmung am Beispiel von Pluronic P85 durch Fluoreszenzanstieg von DPH

Tensid	CMC (%)
Pluronic L35	0,920
Pluronic L44	0,520
Pluronic L62	0,060
Pluronic L64	0,079
Pluronic F68	0,260
Pluronic P75	0,063
Pluronic P85	0,030
Pluronic P105	0,036
Pluronic F108	0,046
Cremophor EL	0,013
Cremophor RH40	0,033
Solutol HS15	0,049
Tween 80	0,047
TPGS	0,020

Abb.54: Kritische Mizellbildungskonzentration (CMC) der verwendeten Tenside



### 3.7 Membranfluidität:

#### 3.7.1 Einfluss von Tensiden auf die Membranfluidität von Caco-2-Zellen

Der Mechanismus der Inhibierung von p-gp bzw. MRP2 durch Tenside ist bisher noch unbekannt. Eine interessante Erklärungsmöglichkeit wäre eine Änderung der Membranfluidität, die durch Einlagerung der Tenside in die Zellmembran hervorgerufen wird. Die umgebende Membran, in die ein Transportprotein eingebettet ist, hat einen großen Einfluss auf seine Transportaktivität (Romsicki et al., 1999). Durch eine Erhöhung oder Erniedrigung der Membranfluidität können z.B. Konformationsänderungen des Proteins, die für die Transportfunktion notwendig sind, erleichtert oder erschwert werden und so einen Einfluss auf die Transportktivität des Proteins ausüben. Um einen möglichen Zusammenhang zwischen der Änderung der Membranfluidität und der Inhibierung der Transportproteine zu untersuchen, wurde der Einfluss der Tenside auf den Ordnungszustand der Zellmembran durch Fluoreszenz-anisotropiemessungen mit dem Fluorophor Diphenylhexatrien (DPH) bestimmt.

DPH lagert sich in die Membran ein. Nach Anregung durch polarisiertes Licht emittiert DPH je nach Rotationsmöglichkeit in der Membran das Licht mit unterschiedlicher Intensität in verschiedene Richtungen. Durch Bestimmung des Quotienten aus vertikal und horizontal polarisiertem Anteil des emitittierten Lichts wird die Anisotropie berechnet.

Es wurden sowohl Tenside ausgewählt, die eine Wechselwirkung mit den untersuchten Transportproteinen zeigten, wie z.B. Pluronic P85 mit p-gp oder Cremophor RH40 und Solutol S15 mit MRP2, aber auch Tenside, die nur schwache Wechselwirkungen mit beiden Transportproteinen zeigten, wie Tween 80. Die Konzentrationen, in denen die Tenside eingesetzt wurden lagen unterhalb der jeweiligen CMC, da in diesem Konzentrationsbereich die deutlichsten Wechselwirkungen mit den Transportproteinen zu beobachten waren. Außerdem waren oberhalb der CMC Wechselwirkungen von DPH mit den Mizellen festzustellen, da sich DPH nicht nur in die Zellmembran, sondern auch in die Mizellen einlagerte und so das Messergebnis verfälschte. Die erhaltenen Ergebnisse zeigten, dass alle Tenside zu einer Verringerung der Anisotropie führten. Die Tenside, Cremophor EL, Cremophor RH40 (CrRH40, Abb.55), Solutol HS15 (SoHS15, Abb.55), Tween 80 (T80, Abb.56) und Pluronic F68 (F68, Abb.57) erniedrigten die Fluoreszenz-anisotropie deutlich auf Werte unter 0,12 im Vergleich zu 0,152 der Kontrolle, die keinen Tensidzusatz enthielt. Bei Pluronic P85 (P85, Abb.56) mit einem Wert von 0,137 und bei Pluronic L44 (L44, Abb.57) mit einem Wert von 0,142 fiel der Unterschied nicht ganz so deutlich aus. Als Kontrolle diente Benzylalkohol (BA), der eine Erhöhung der Membranfluidität verursacht, was in diesen Versuchen auch gezeigt wurde. Eine Verminderung der Anisotropie bedeutet ein Verlust des Ordnungszustands der Zellmembran und somit einer größeren Beweglichkeit der Membranbestandteile gegeneinander. Die getesteten Tenside führten somit zu einer Erhöhung der Fluidität der Membran.

Ein eindeutiger Zusammenhang zwischen dem Einfluss der getesteten Tenside auf die Membranfluidität und der Aktivität der Transportproteine konnte in diesen Versuchen nicht beobachtet werden. Die Tenside haben einen unterschiedlichen Einfluss auf die verschiedenen Transportproteine, z.B. starke Wechselwirkung mit p-gp oder MRP2 oder keine bzw. schwache Wechselwirkungen mit beiden Proteinen. Diese Unterschiede waren bei der Veränderung der Membranfluidität nicht zu erkennen. Es ist deshalb zwar möglich, dass eine Veränderung der Membranfluidität zu einer Inhibierung der Transportaktivität von p-gp und MRP2 beiträgt. Es scheinen aber noch andere spezifischere Wechselwirkungen zwischen Tensid und Protein vorliegen zu müssen, um die Inhibierung von p-gp und MRP2 durch die jeweiligen Tensiden zu erklären.

In Versuchen zur Auswirkung von MDR-Modulatoren, wie z.B. Verapamil, auf die Zellmembran wurde festgestellt, dass diese eine Erhöhung der Membranfluidität bewirken, und dies zur Hemmung von p-gp beiträgt (Woodcock et al., 1992). Sinicope et al. (1992) zeigten, dass eine Änderung der Membranfluidität zur Wirksamkeit von p-gp-Inhibitoren nicht notwendig ist, aber zu diesem Effekt beitragen kann. In Studien zur Wirkung von Tensiden wurden bisher unterschiedliche Ergebnisse erzielt. Eine Erhöhung der Membranfluidität durch Tenside wurde von Drori et al. (1995) mit einer p-gp-Inhibierung in Verbindung gebracht. Dudeja et al. (1995) beobachteten hingegen eine Verfestigung der Membran durch Tenside, die in der Lage waren die Aktivität von p-gp zu hemmen. Einen Zusammenhang zwischen einer erhöhten Membranfluidität und der Interaktion mit p-gp, wurde von Regev et al. (1999) gezeigt. Rege et al. (2002) stellten hingegen für die Tenside, Tween 80 und Cremophor EL, eine Verflüssigung und für TPGS eine Verfestigung der Membran fest. Batrakova et al. (2001) untersuchten speziell die Gruppe der Poloxamere und postulierten hier einen Wirkmechanismus der p-gp-Inhibierung, der zwei Faktoren beinhaltet: Einerseits eine Erniedrigung der Membranfluidität und andererseits eine Hemmung der ATP-Synthese durch diese Tenside. Einige Tenside wurden auch als Substrate identifiziert und könnten deshalb als Inhibitor fungieren (Loo et al., 2001; Seelig, 1998).

Wie zu sehen ist, ergibt sich hier kein einheitliches Bild, sodass man davon ausgehen kann, dass die Beeinflussung der Membranfluidität wahrscheinlich eine Rolle im Mechanismus der p-gp-Inhibierung durch Tenside spielt, aber sicher nicht der einzige Faktor ist, der hier von Bedeutung ist. Wenn die Änderung der Membranfluidität der entscheidende Grund der Wirksamkeit wäre, dann wären viel ähnlichere Ergebnisse in Bezug auf die beiden Transportproteine, p-gp und MRP2 zu erwarten gewesen. Dies war aber in den Ergebnissen dieser Arbeit nicht der Fall. Auch ein Beeinflussung anderer aktiver Transportproteine müsste zu beobachten sein, was aber in Untersuchungen zu einem Peptidtransporter (human intestinal peptide transporter, hPepT-1) und zu einem Carbonsäuretransporter (monocarboxylic acid transporter, MCT) nicht festzustellen war (Rege et al., 2002).

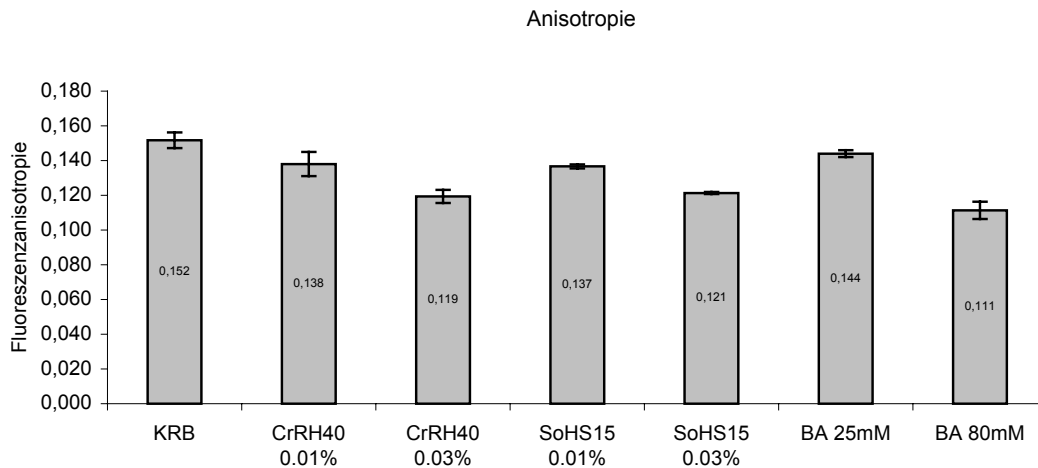


Abb.55: Anisotropie nach Zugabe von Cremophor RH40 und Solutol HS15

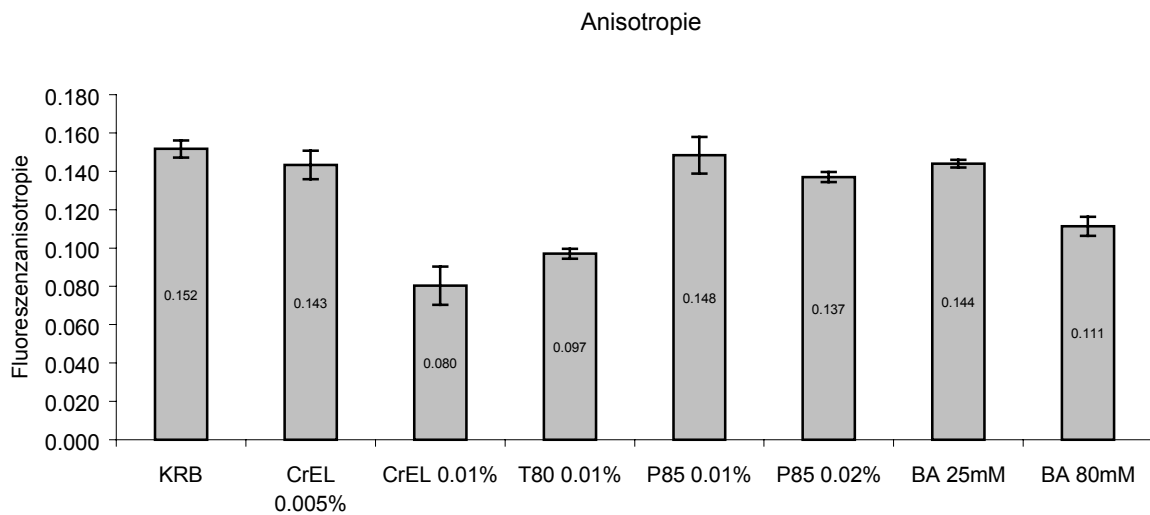


Abb.56: Anisotropie nach Zugabe von Cremophor EL und Tween 80

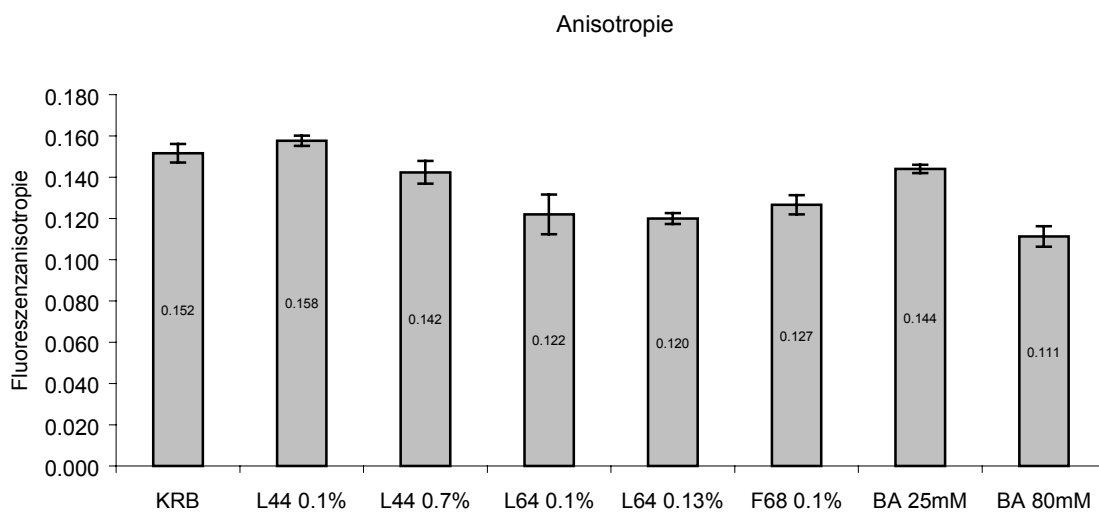


Abb.57: Anisotropie nach Zugabe von Pluronic L44 und Pluronic L64

### **3.8 Zytotoxizitätsuntersuchungen**

Durch ihre amphiphilen Eigenschaften lagern sich Tenside leicht in die Phospholipidschicht von Membranen ein. Sie können dadurch zu einer Schädigung der Zellmembran führen, wodurch die Zelle nicht mehr vor dem Verlust wichtiger Substanzen geschützt ist und in ihrer Lebensfähigkeit beeinträchtigt wird. Auch Zellorganellen können beeinflusst werden. So kann durch Tenside die Membranstruktur von Mitochondrien gestört werden, was zu einem Aktivitätsverlust der Mitochondrien und dadurch zu einer verringerten Energieversorgung der Zelle führt. Dies hat eine verminderte Vitalität der Zellen zur Folge. Zytotoxizitätsuntersuchungen sind deshalb vor Verwendung von Tensiden in Formulierungen, im Besonderen in Zubereitungen zur peroralen oder parenteralen Anwendung, sehr wichtig. Um eine toxische Wirkung der in dieser Arbeit untersuchten Tenside beurteilen zu können, wurden zwei verschiedene Zytotoxizitätstests durchgeführt. Zum einen wurde der Austritt von Lactatdehydrogenase (LDH) aus den Zellen bestimmt, wodurch eine Zellmembranschädigung festgestellt werden kann, zum anderen wurde die metabolische Aktivität der Zellen durch Umsetzung des Fluoreszenzfarbstoffs Alamar Blue untersucht. Dies ist ein Anzeichen für die Vitalität der Zellen.

#### **3.8.1 Laktatdehydrogenase (LDH)**

LDH katalysiert die Oxidation von Pyruvat bei gleichzeitiger Reduktion von Nicotinamid-adeninucleotid (NAD). Die Bildung von reduziertem NAD (NADH) führt zu einem Fluoreszenzanstieg. Beim Myokardinfarkt oder auch bei anderen pathologischen Prozessen, kommt es zu einer vermehrten LDH-Aktivität, weshalb die Bestimmung der LDH-Aktivität auch zur klinischen Diagnostik ausgenutzt wird (LDH-L, Sigma Diagnostics).

Diese chemische Reaktion wurde auch in den Zytotoxizitätsversuchen dieser Arbeit ausgenutzt. Hierbei wurden Caco-2-Zellmonoyer mit verschiedenen Tensidkonzentration inkubiert, aus dem Überstand eine Probe entnommen und die LDH-Aktivität mit Hilfe eines Testreagenzes, das Laktat und NAD enthält, über einen durch NADH verursachten Fluoreszenzanstieg ermittelt.

Hierbei konnte folgendes festgestellt werden: Die getesteten Tenside verursachten in den Konzentrationen, die in den Untersuchungen zu den Wechselwirkungen mit den Transportproteinen wirksam waren, keinen Fluoreszenzanstieg und damit auch keine erhöhte LDH-Aktivität im Vergleich zur Referenzprobe, die nur Puffer (KRB) und keinen Tensidzusatz enthielt. Ein deutlicher Fluoreszenzanstieg konnte bei den meisten Tensiden in hohen Konzentrationen festgestellt werden. Diese hohen Konzentrationen wurden in den Zellversuchen zur Wechselwirkungen nicht eingesetzt und dienten hier zur Kontrolle. Auch die Positivkontrolle mit Triton X-100 verursachte einen deutlichen Anstieg der LDH-Aktivität und verdeutlichte die Funktionalität des Tests (Abb.58-64).

Durch die LDH-Zytotoxizitätstests konnte gezeigt werden, dass die Tenside in den wirksamen Konzentrationen keinerlei zytotoxische Wirkung aufweisen. Ihr Einsatz ist demnach unbedenklich und die in den vorangegangenen Versuchen gezeigten Effekte sind nicht auf einen toxischen Einfluss der Tenside auf die Zellen, sondern auf spezifische Wechselwirkungen mit den Transportproteinen zurückzuführen.

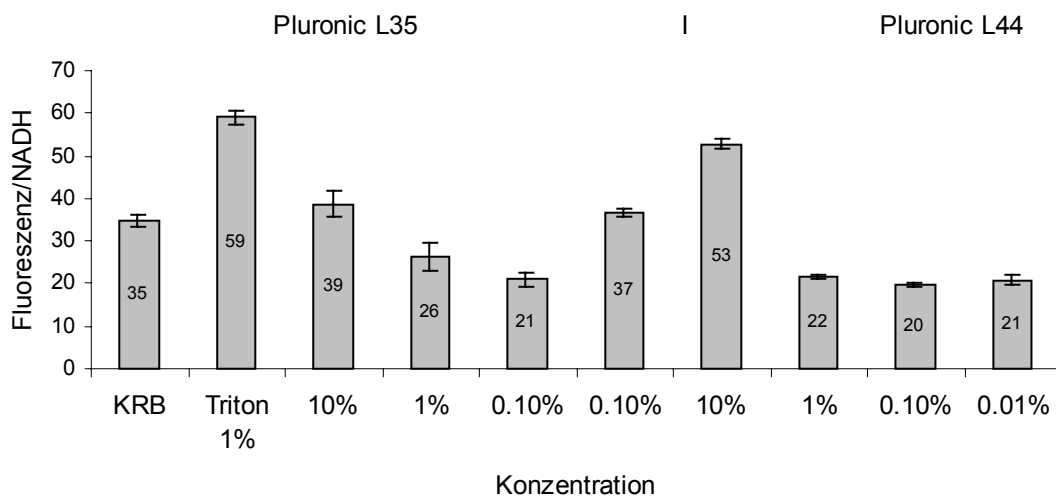


Abb.58: Toxizität (LDH) von Pluronic L35 und Pluronic L44

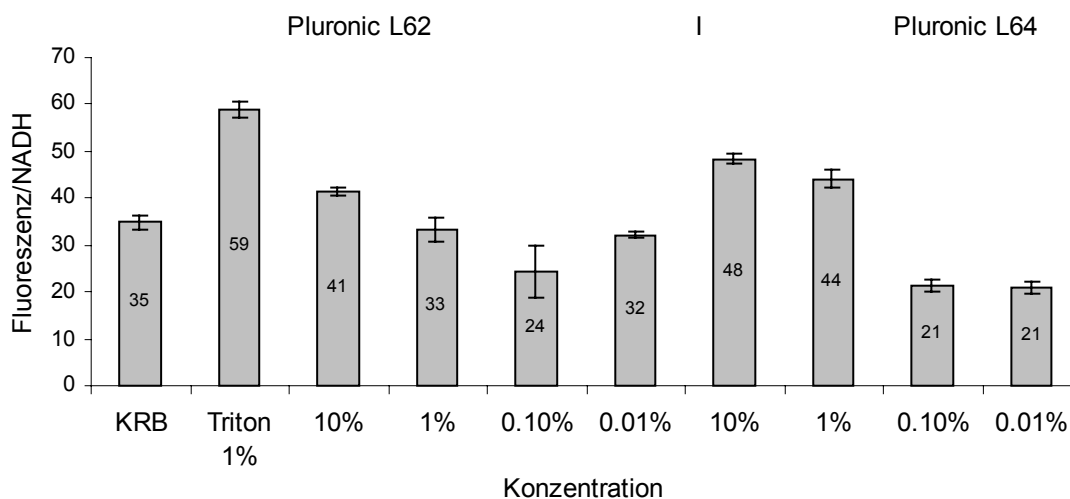


Abb.59: Toxizität (LDH) von Pluronic L62 und Pluronic L64

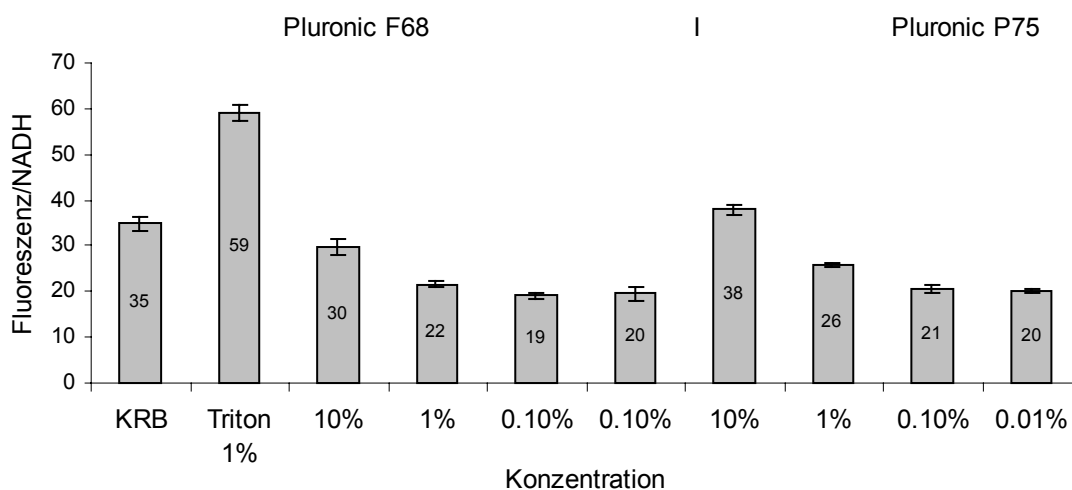


Abb.60: Toxizität (LDH) von Pluronic F68 und Pluronic P75

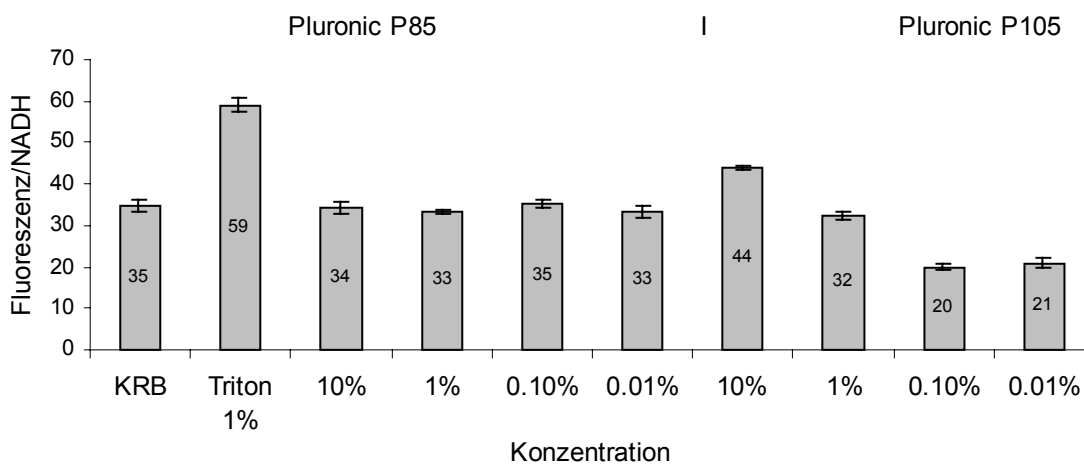


Abb.61: Toxizität (LDH) von Pluronic P85 und Pluronic P105

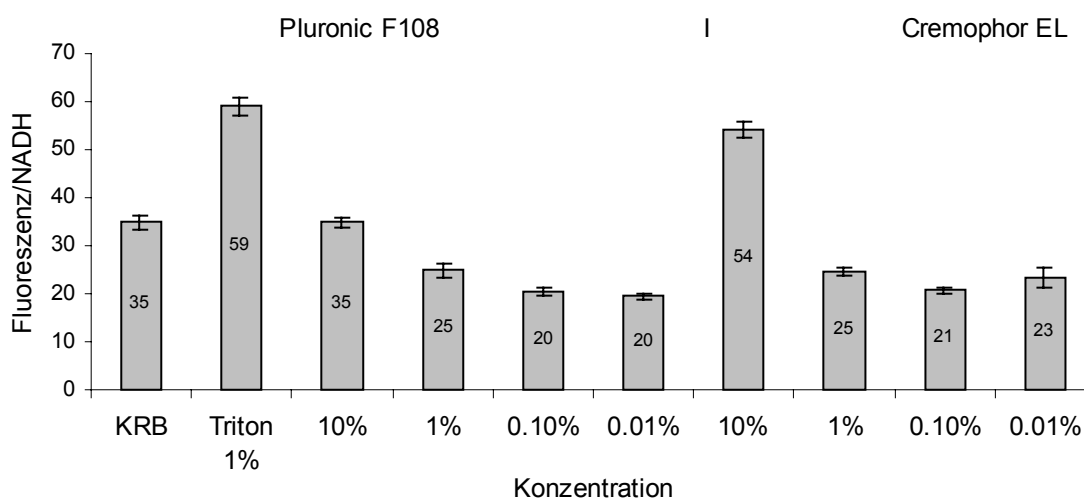


Abb.62: Toxizität (LDH) von Pluronic F108 und Cremophor EL

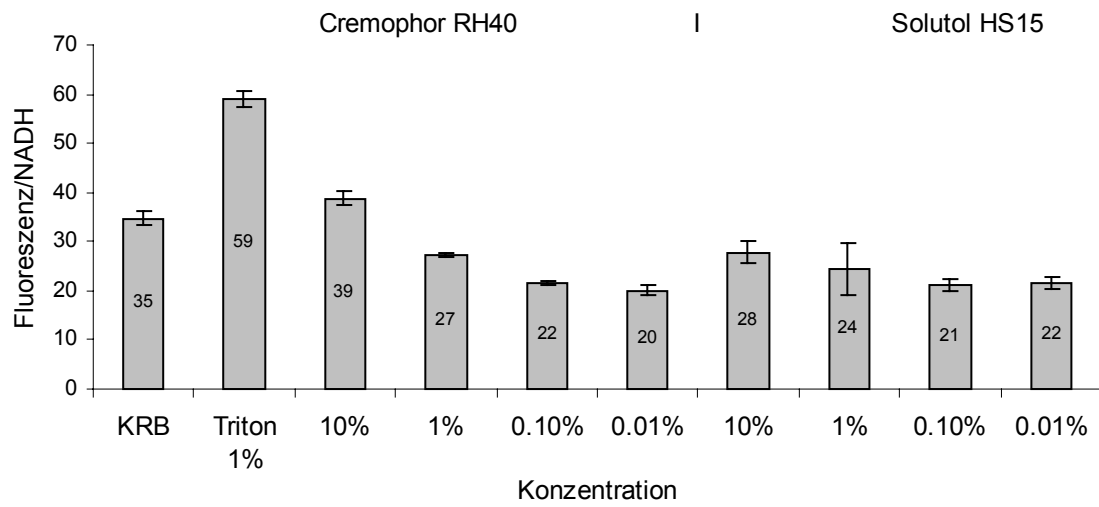


Abb.63: Toxizität (LDH) von Cremophor RH40 und Solutol HS 15

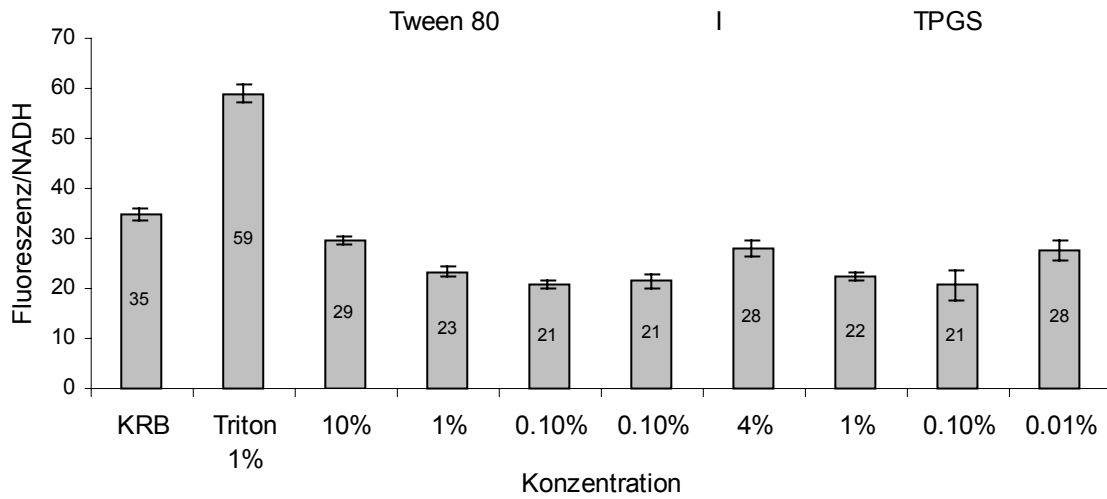


Abb.64: Toxizität (LDH) von Tween 80 und TPGS

### 3.8.2 Alamar Blue:

Zellwachstum und metabolische Aktivität sorgen für ein reduzierendes Milieu in der Zellumgebung. Bei unbeeinträchtigtem Wachstum der Zellen wird das zugegebene Alamar Blue durch Reduktion von seiner nicht-fluoreszierenden blauen Form in seine fluoreszierende rote Form umgewandelt. Diese Umwandlung kann leicht fluorimetrisch analysiert werden. Bei Beeinträchtigung der Zellaktivität ist eine verminderte Bildung des roten Fluoreszenzfarbstoffs zu beobachten (AlamarBlue™ Assay; Biozol Diagnostics).

Durch die Zugabe von Tensiden in den Konzentrationen, die sich in den vorangegangenen Zellversuchen als wirksam erwiesen, konnte in diesem Test keine verminderte Fluoreszenz und dadurch auch keine verringerte Umsetzung von Alamar Blue in sein fluoreszierende Form festgestellt werden. Obwohl höhere Tensidkonzentrationen nicht den Zellversuchen eingesetzt wurde, wurde ihre Toxizität zur Kontrolle überprüft und verursachten bei fast allen Tensiden eine verminderte Alamar Blue- Umsetzung. Auch die Kontrolle zur Wirksamkeit des Tests mit Triton X-100 erwies sich als sehr toxisch (Abb.65-70).

Auch in diesem Test konnte keine toxische Wirkung der Tenside in Konzentrationen, die den größten Einfluss auf die Transportproteine ausübten, festgestellt werden. Ihre Verwendung erscheint demnach unbedenklich und ein toxischer Einfluss ist demnach kein Begründung für die gezeigten Wechselwirkungen mit den Transportproteinen.

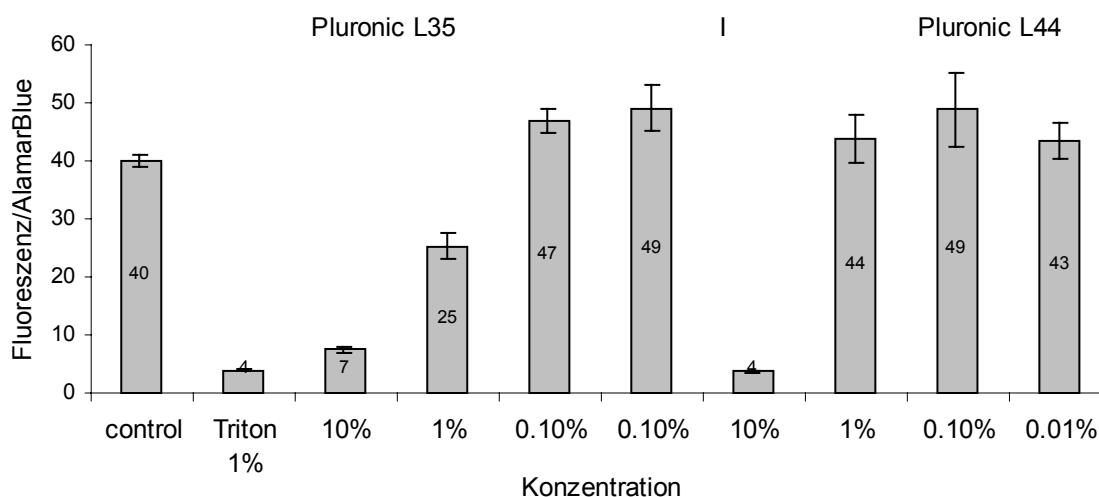


Abb.65 : Toxizität ( Alamar Blue) von Pluronic L35 und Pluronic L44



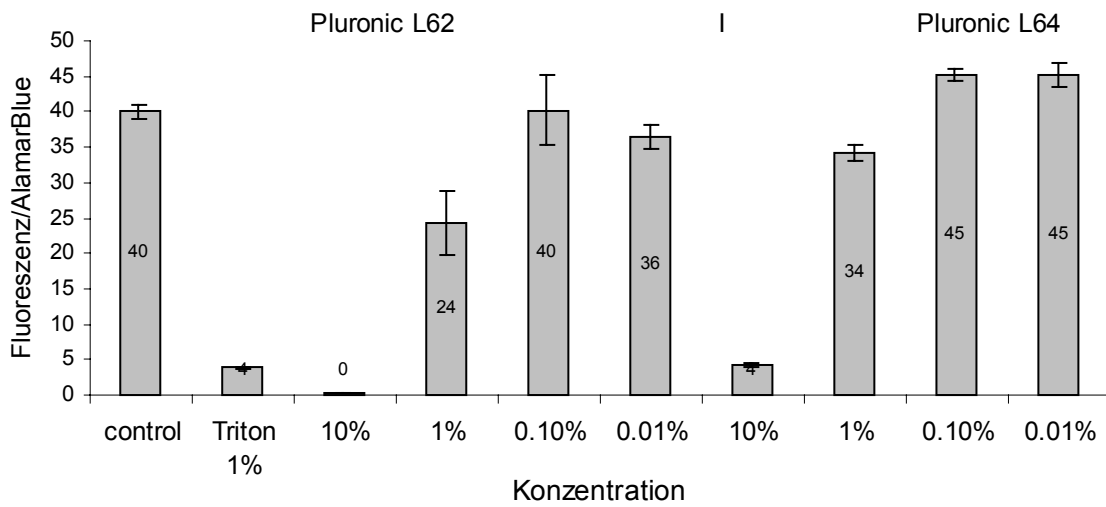


Abb.66 : Toxizität (Alamar Blue) von Pluronic L62 und Pluronic L64

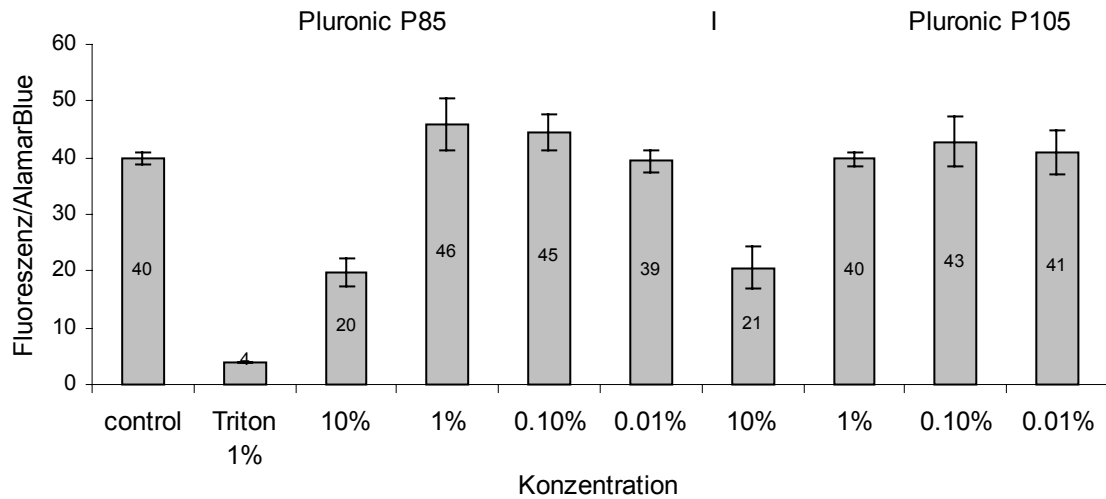


Abb.67: Toxizität (Alamar Blue) von Pluronic P85 und Pluronic P105

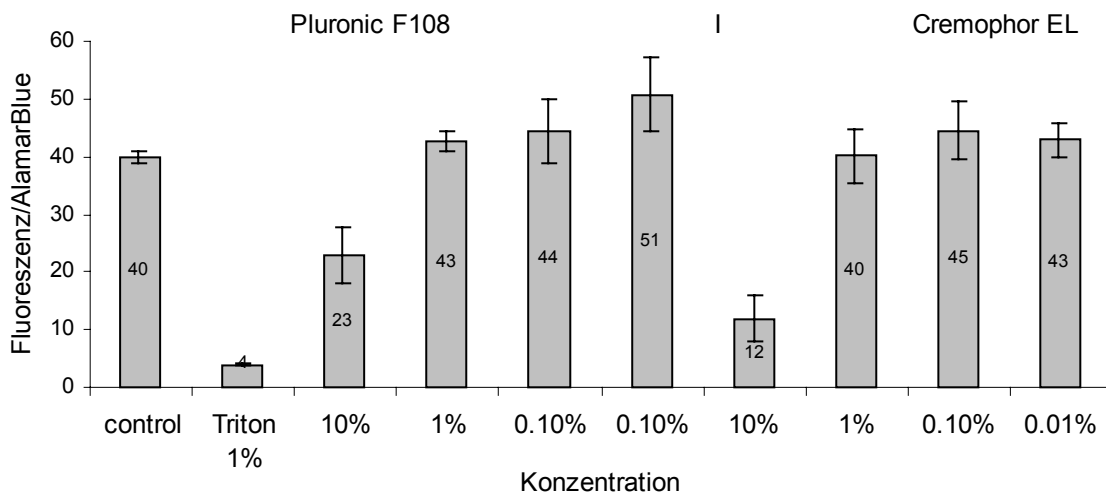


Abb.68: Toxizität (Alamar Blue) von Pluronic F108 und Cremophor EL

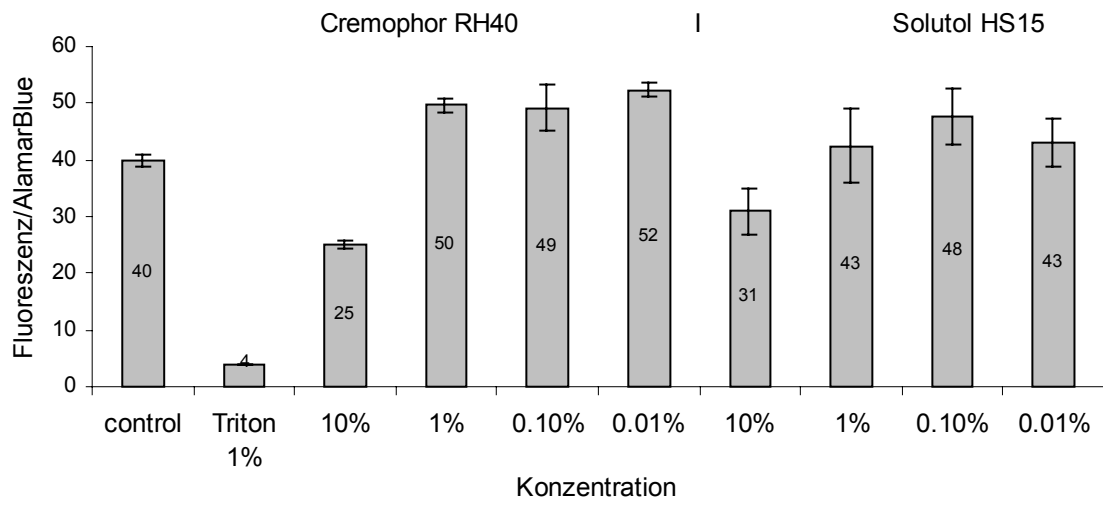


Abb.69: Toxizität (Alamar Blue ) von Cremophor RH40 und Solutol HS15

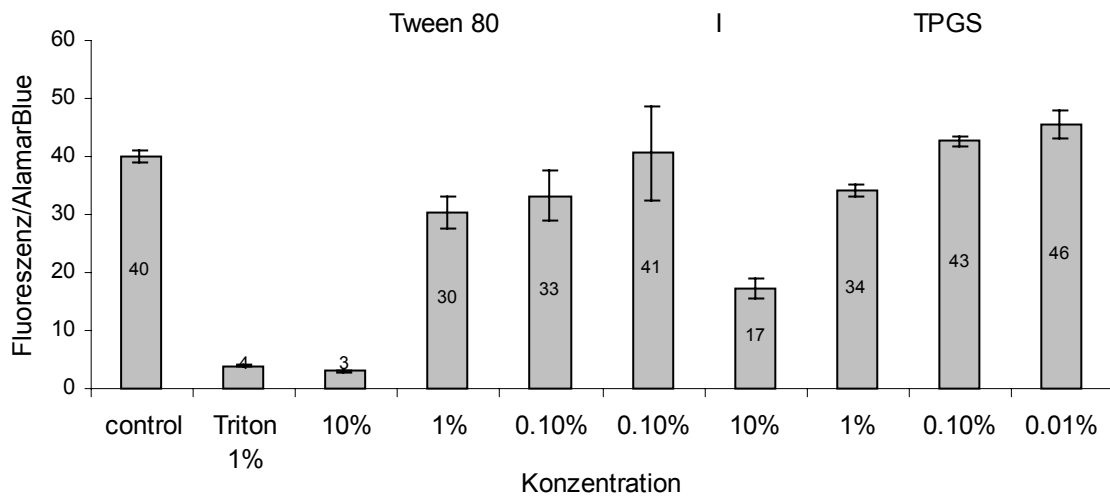


Abb.70: Toxizität (Alamar Blue) von Tween 80 und TPGS

## 4 Zusammenfassung und Ausblick

Im Rahmen dieser Arbeit wurden mehrere Zielrichtungen verfolgt:

### 1. Standardisierung des Caco-2-Modells

Der direkte Vergleich von Ergebnissen, die mit dem Caco-2-Modell in unterschiedlichen Laboratorien erhalten werden, ist aufgrund unterschiedlicher Kultivierungsbedingungen und möglicherweise daraus resultierenden morphologischen Veränderungen der Zellen oft problematisch. Um Vergleichsmöglichkeiten zu verbessern, wurden im Rahmen eines Ringversuchs unter Teilnahme verschiedener Einrichtungen die Permeabilitätseigenschaften ausgewählter Testsubstanzen unter Einhaltung einheitlicher Arbeitsvorschriften untersucht. Nach dem Vergleich der Ergebnisse wurde deutlich, dass keine Übereinstimmung der absoluten  $P_{app}$ -Werte festzustellen war. Alle Teilnehmer konnten jedoch die ausgewählten Substanzen einheitlich, z.B. als gut oder schlecht permeabel, einstufen und dadurch ein einheitliches Ranking vornehmen. Es konnte beobachtet werden, dass die Aktivität der beiden Transportproteine, p-gp und MRP2, in den verwendeten Zellstämmen der verschiedenen Einrichtungen unterschiedlich stark ausgeprägt war. Dies stellt wahrscheinlich das größte Problem bei der Standardisierung des Modells dar. Die erarbeiteten Vorschriften können als Grundlage zur Standardisierung des Caco-2-Modells dienen, wobei eine langfristige Beobachtung, v.a. im Hinblick auf die Expression von aktiven Transportproteinen, wünschenswert wäre.

### 2. Untersuchung des Einflusses von Tensiden auf die Resorption von Arzneistoffen:

Zahlreiche Arzneistoffe, die Substrate der aktiven Transportproteine, p-gp und MRP2, sind, verfügen über eine schlechte Bioverfügbarkeit, weil ihre Resorption durch die Transportaktivität dieser Exportproteine eingeschränkt ist. Der Einfluss einer Reihe von Tensiden auf die Transportaktivität beider Proteine wurde im Caco-2-Modell untersucht. Zahlreiche Tenside verursachten eine Hemmung der Transportaktivität von p-gp, wobei eindeutig die Gruppe der Poloxamere, u.a. Pluronic P85, die größten Effekte zeigte. Einige Tenside beeinträchtigten die Transportaktivität von MRP2. Hierbei zeigten nicht die Poloxamere, sondern die Tenside, Cremophor RH40 und Solutol H15, die größten Auswirkungen auf den Transport durch MRP2. Es konnte also gezeigt werden, dass Tenside mit beiden Transportproteinen Wechselwirkungen eingehen. Hierbei waren jedoch deutliche Unterschiede zwischen den Tensiden festzustellen.

Der Einfluss der Tenside auf die Transportaktivität von p-gp konnte auch in Versuchen mit Gehirnkapillarendothelzellen bestätigt werden.

### **3. Untersuchung der Erklärungsmöglichkeit der festgestellten Tensidwirkung:**

Die Wechselwirkungen der Tenside mit p-gp oder MRP2 zeigten eine charakteristische Konzentrationsabhängigkeit mit einem auffälligen Maximum. Nach Bestimmung der Kritischen Mizellbildungskonzentration (CMC) konnte festgestellt werden, dass dieses Maximum im Bereich der CMC der jeweiligen Tenside lag. Die Beeinflussung beider Transportproteine wird demnach durch die einzelnen Tensidmoleküle und nicht durch Mizellen hervorgerufen.

Die Fluidität der Membran, in die die Proteine eingebettet sind, hat einen Einfluss auf deren Transportaktivität. Da sich Tenside durch ihre amphiphile Struktur leicht in Membranen einlagern können und dadurch die Struktur der Membran verändern, wurde ihre Auswirkung auf die Membranfluidität von Caco-2-Zellen untersucht. Hierbei wurde festgestellt, dass alle Tenside die Membranfluidität erhöhen. Die unterschiedliche Beeinflussung der Transportaktivität von p-gp und MRP2 der verschiedenen Tenside zeigte sich allerdings nicht in einer unterschiedlichen Auswirkung auf die Membranfluidität. Deshalb kann die Erniedrigung der Membranfluidität zwar eine Ursache für den Einfluss der Tenside auf die Transportproteine sein, es müssen aber zusätzlich spezifischere Wechselwirkungen vorliegen.

Bei Verwendung von Tensiden in peroralen Formulierung ist die Toxizität der verwendeten Tenside von großer Bedeutung, da z.B. leicht Zellmembranschädigungen verursacht werden können. Die Zytotoxizität der im Rahmen dieser Arbeit untersuchten Tenside wurden in zwei verschiedenen Toxizitätsstudien untersucht. Hierbei konnte keine toxische Wirkung im den Konzentrationbereichen, in denen die stärksten Wechselwirkungen mit p-gp und MRP2 zu beobachten waren, festgestellt werden.

#### **Ausblick:**

Eine Resorptionsverbesserung von Arzneistoffen, die durch die Transportaktivität der aktiven Transportproteine, p-gp und MRP2, über eine schlechte Bioverfügbarkeit verfügen, könnte durch gezielte Zugabe der untersuchten Tenside zu Formulierungen zu peroralen Anwendung und eine daraus folgende Hemmung der Transportaktivität erzielt werden. Da schon niedrige Konzentrationen unterhalb der CMC der Tenside wirksam sind, könnten diese auch unter physiologischen Bedingungen erreicht werden. Eine Verwendung der Tenside in Formulierung erscheint unbedenklich, da keine toxische Wirkung nachgewiesen wurde. Aufgrund der festgestellten Wechselwirkungen greifen Tenside aktiv in den Resorptionsvorgang ein und sollten nicht als physiologisch inerte Hilfsstoffe betrachtet werden. Dies sollte bei der Entwicklung von Formulierungen zur peroralen Anwendung ausreichend berücksichtigt werden.

## 5 Literaturverzeichnis

### A

Aderle, Niederer, Rubas, Hilgendorf, Spahn-Langguth, Wunderli-Allenspach, Merkle and Langguth; P-Glycoprotein (p-gp) Mediated Efflux in Cell Monolayers: The Influence of Culturing Conditions and Drug Exposure on p-gp Expression Levels; Journal of Pharmaceutical Sciences, Vol. 87 No.6, 757-762, 1998

Alakhov, Moskaleva, Batrakova and Kabanov; Hypersensitization of Multidrug Resistant Human Ovarian Carcinoma Cells by Pluronic P85 Block Copolymers; Bioconjugate Chemistry, Vol. 7, 209-216, 1996

Ambudkar, Dey, Hrcyna, Ramachandra, Pastan and Gottesman; Biochemical, Cellular and Pharmacological Aspects of the Multidrug Transporter; Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol., Vol.39, 361-398, 1999

Amidon, Lennernäs, Shah and Crison; A Theoretical Basis for a Biopharmaceutic Drug Classification: The Correlation of in Vitro Drug Product Dissolution and in Vivo Bioavailability; Pharmaceutical Research, Vol. 12 No.3, 413-420, 1995

Anderberg, Nyström and Artursson; Epithelial Transport of Drugs in Cell Culture. VII: Effects of Pharmaceutical Excipients and Bile Acids on Transepithelial Permeability in Monolayers of Human Intestinal Epithelial (Caco-2) Cells; Journal of Pharmaceutical Sciences, Vol.81 No.9, 879-887, 1992

Armstrong; Cellular Mechanism of Ion Transport in the Small Intestine; Physiology of the Intestinal Tract, Chapter 45; 1987

Artursson and Borchardt; Intestinal Drug Absorption and Metabolism in Cell Cultures: Caco-2 and Beyond; Pharmaceutical Research, Vol.14 No.12, 1997

Artursson and Karlsson; Correlation between Oral Drug Absorption in Humans and Apparent Permeability Coefficients in Human Intestinal (Caco-2) Cells; Biochemical and Biophysical Research Communications, Vol. 175 No.3, 880-885, 1991

Artursson, Palm and Luthmann; Caco-2 monolayers in experimental and theoretical predictions of drug transport; Advanced Drug Delivery Reviews, Vol.46, 27-43, 2001

Artursson; Epithelial Transport of Drugs in Cell Culture. I: A Model for Studying the Passive Diffusion of Drugs over Intestinal Absorptive (Caco-2) Cells; Journal of Pharmaceutical Sciences, Vol. 79 No.6, 1990

Aszalos and Ross; Biochemical and Clinical Aspects of Efflux Pump Related Resistance to Anti Cancer Drugs; Anticancer Research, Vol.18, 2937-2944, 1998

Aszalos, Thompson, Yin and Ross; Combinations of P-glycoprotein Blockers, Verapamil, PSC 8333, and Cremophor act Differently on the Multidrug Resistance Associated Protein (MRP) and on P-glycoprotein (Pgp); Anticancer Research, Vol. 19, 1053-1064, 1999

Audus, Bartel, Hildalgo and Borchardt; The Use of Cultured Epithelial and Endothelial Cells for Drug Transport and Metabolism Studies; Pharmaceutical Research, Vol.7 No.5, 435-451,1990

Audus, Ng, Wang and Borchardt; Models for Assessing Drug Absorption and Metabolism; Chapter 13 Brain Microvessel Endothelial Cell Culture Systems; 1996

Ayrton and Morgan; Role of transport proteins in drug absorption, distribution and excretion; Xenobiotica, Vol. 31 No.8/9, 469-497, 2001

## **B**

Badary, Al-Shabanah, Al-harably and Elmazar; Effect of Cremophor EL on the pharmacokinetics , antitumor activity and toxicity of doxorubicin in mice; Anticancer Drugs, Vol. 9(9), 809-815, 1998

Bailey, Bryla and Malick; The use of the intestinal epithelial cell culture model. Caco-2 . in pharmaceutical development; Advanced Drug Delivery Reviews, Vol. 22, 85-103, 1996

Bakken and Jurs; Classification of Multidrug-Resistance Reversal Agents Using Structure-Based Descriptors and Linear Discriminant Analysis; Journal of Medicinal Chemistry, Vol.43, 4534-4541; 2000

Bakos, Evers, Sinko, Varadi, Borst and Sarkadi; Interactions of Multidrug Resistance Proteins MRP1 and MRP2 with Organic Anions; Molecular Pharmacology, Vol. 57, 760-768, 2000

Batrakova, Alakhov, Miller and Kabanov; Optimal Structure Requirements for Pluronic Block Copolymers in Modifying P-glycoprotein Drug Efflux Transporter Activity in Bovine Brain Microvessel Endothelial Cells; The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics, Vol.304, 845-854, 2002

Batrakova, Han, Alakhov, Miller and Kabanov; Effects of Pluronic Block Copolymers on Drug Absorption in Caco-2 Cell Monolayers; *Pharmaceutical Research*, Vol. 15 No.6, 850-855, 1998

Batrakova, Han, Miller and Kabanov; Effects of Pluronic P85 Unimers and Micelles on Drug Permeability in Polarized BBMEC and Caco-2 Cells; *Pharmaceutical Research*, Vol 15 No.10, 1525-1532; 1998

Batrakova, Lee, Li, Venne, Alakhov and Kabanov; Fundamental Relationships Between the Composition of Pluronic Block Copolymers and their Hypersensitization Effect in MDR Cancer Cells; *Pharmaceutical Research*, Vol.16 No.9, 1373-1379, 1999

Batrakova, Li, Miller and Kabanov; Pluronic P85 Increases Permeability of a Broad Spectrum of Drugs in Polarized BBMEC and Caco-2 Cell Monolayers; *Pharmaceutical Research*, Vol. 16 No.9, 1999

Batrakova, Li, Vinogradov, Alakhov, Miller and Kabanov; Mechanism of Pluronic Effect on P-glycoprotein Efflux System in Blood-Brain-Barrier: Contributions of Energy Depletion and Membrane Fluidization; *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*; Vol. 299 No.2, 483-493, 2001

Batrakova, Miller, Li, Alakhov, Kabanov and Elmquist; Pluronic P85 Enhances the Delivery of Digoxin to the Brain: In Vitro and in Vivo Studies; *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, Vol.296, 551-557, 2001

Bauer, Frömming, Führer; *Lehrbuch der Pharmazeutischen Technologie*; 6. Auflage, 1999

Bauer; In Vitro Zellkulturmodelle der Blut-Hirn-Schranke zur Untersuchung der Permeation und P-Glycoprotein-Interaktion von Arzneistoffen; *Dissertation Universität Heidelberg*, 2002

Bodo, Bakos, Szeri, Varadi and Sarkadi; The role of multidrug transporters in drug availability, metabolism and toxicity; *Toxicology Letters*, Vol.140-141, 133-143, 2003

Bogman, Erne-Brand, Alsenz and Drewe; The Role of Surfactants in the Reversal of Active Transport Mediated by Multidrug Resistance Proteins; *Journal of Pharmaceutical Sciences*, Vol.92 No.6,1250-1261, 2003

Bohets, Annaert, Mannens, van Beijsterveldt, Anciaux, Verboven, Meuldermans and Lavrijsen; Strategies for Absorption Screening in Drug Discovery and Development; *Current Topics in Medicinal Chemistry*, Vol.1 367-383, 2001

Borst, Evers, Kool and Wijnholds; A Family of Drug Transporters: the Multidrug Resistance-Associated Proteins; Journal of the National Cancer Institute, Vol.92 No.16, 1295-1302, 2000

Borst, Evers, Kool and Wijnholds; The multidrug resistance protein family; Biochimica et Biophysica Acta, Vol. 1461, 347-357; 1999

Brasitus and Dudeja; Correction of Abnormal Lipid fluidity and Composition of Rat Ileal Microvillus Membranes in Chronic Streptozotocin-induced Diabetes by Insulin Therapy; The Journal of Biological Chemistry, Vol.260, 12405-12409, 1985

Braun, Hämmerle, Suda, Rothen-Rutishauer, Günthert, Krämer and Wunderli-Allenspach; Cell Cultures as Tools in Biopharmacy; European Journal of Pharmaceutical Sciences, Vol. 11 Suppl.2, S51-S60, 2000

Briske-Anderson, Finley and Newman; The Influence of Culture Time and Passage Number on the Morphological Development of Caco-2 Cells; P.S.E.M.B., Vol. 214, 248-257, 1997

Buckingham, Balasubramanian, Safa, Shah, Komarov, Emanuele and Coon; Reversal of Multi-Drug Resistance In Vitro by Fatty Acid-PEG-Fatty Acid Diesters; International Journal of Cancer, Vol.65, 74-79, 1996

## C

Cerep Incorporation; Caco-2 Permeability; Product Information; 2001

Charuk, Grey, Reinhart and Reithmeier; Identification of the synthetic surfactant nonylphenol ethoxylate: a P-glycoprotein substrate in human urine; American Journal of Physiology, Vol.274, (Renal Physiology 43), F1127-F1139, 1998

Chong, Dado and Morrison; Evaluation of Biocoat Intestinal Epithelium Differentiation Environment (3-day Cultured Caco-2 Cells) as an Absorption Screening Model with Improved Productivity; Pharmaceutical Research, Vol. 14 No.12, 1835-1837, 1997

Cole and Deeley; Multidrug resistance mediated by the ATP-binding cassette transporter MRP; BioEssays, Vol.20.11, 931-940, 1998

Cornaire, Woodley, Saivin, Legendre, Decourt, Cloarec and Houin; Effect of Poloxyl 35 Castor Oil and Polysorbate 80 on the Intestinal Absorption of Digoxin in vitro; Arzneimittelforschung/Drug Research, Vol. 50(I), 576-579, 2000



## D

Da Violante, Zerrouk, Frendo, Zhinri, Lai-Khuan, Tricottet, Provot, Chaumeil and Arnaud; Short-term Caco-2/TC7 cell culture: Comparison between the conventional – week and a commercially available 3-day system

Dantzig, de Alwiand and Burgess; Considerations in the design and development of transport inhibitors as adjunctants to drug therapy; *Advanced Drug Delivery Reviews*, Vol. 55, 133-150, 2003

Dean, Rzhetsky and Allikmets; The Human ATP-Binding Cassette (ABC) Transporter Superfamily; *Genome Research*, Vol. 11, 1156-1166, 2001

Dimitrijevic, Shaw and Florence; Effects of Some Non-ionic Surfactants on Transepithelial Permeability in Caco-2 Cells; *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, Vol. 52, 157-62; 2000

Dimitrijevic, Whitton, Domin, Welham and Florence; Increased vigabatrin entry to the brain by polysorbate 80 and sodium caprate; *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, Vol. 53, 149-154, 2001

Dintaman and Silverman; Inhibition of P-Glycoprotein by- $\alpha$ -Tocopheryl Polyethylene Glycol 100 Succinate (TPGS); *Pharmaceutical Research*, Vol. 16 No.10, 1550-1556, 1998

Doige, Xiaohong and Sharom; The Effects of Lipids and Detergents on ATPase-active P-glycoprotein; *Biochimica et Biophysica Acta*, Vol.1146, 65-73, 1993

Drori, Eytan and Assaraf; Potentiation of anticancer-drug cytotoxicity by multidrug-resistance chemosensitizers involves alterations in membrane fluidity leading to increased membrane permeability; *European Journal of Biochemistry*, Vol.228,1020-1029, 1995

Dudeja, Anderson, Harris, Buckingham and Coon; Reversal of Multidrug Resistance Phenotype by Surfactants: Relationship to Membrane Fluidization; *Archives of Biochemistry and Biophysics*, Vol. 319 No.1, 309-315, 1995

## E

Evers, Kool, Smith, van Deemter, de Haas and Borst; Inhibitory effect of the reversal agents V-104, GF120918 and Pluronic L61 on MDR1 P-gp, MRP1- and MRP2. – mediated transport; *British Journal of Cancer*, Vol.83, 366-374, 2000

Eytan and Kuchel; Mechanism of Action of p-Glycoprotein in Relation to Passive Membrane Permeation; International Review of Cytology, Vol.1990,175-250;1999

## **F**

FDA Guidance for Industry; Studies for Orally Administered Drug Product – General Considerations; Department of Health and Human Services, Food and Drug Administration (FDA). Center for Drug Evaluation and Research (CDER), October 2000

FDA Guidance for Industry; Waiver of In Vivo Bioavailability and Bioequivalence Studies for Solid Immediate-release Dosage Forms Based on a Biopharmaceutics Classification System; U.S. Department of Health and Human Services, Food and Drug Administration (FDA). Center for Drug Evaluation and Research (CDER), August 2000

FDA Lawrence, YU, Amidon, Polli, Zhao, Mehta, Conner, Shah, Lesko, Lee and Hussain; BCS – The Scientific Basis for Biowaiver Extensions; Department of Health and Human Services, Food and Drug Administration (FDA). Center for Drug Evaluation and Research (CDER), 2001

Friche, Jensen, Sehested, Demant and Nissen; The solvents Cremophor EL and Tween 80 modulate daunorubicin resistance in multidrug resistant Ehrlich ascites tumor; Cancer Communication; Vol. 2(9), 297-303,1990

Fricke and Miller; Relevance of Multidrug Resistance Proteins for Intestinal Drug Absorption in vitro and in vivo; Pharmacology and Toxicology, Vol.90, 5-13, 2002

## **G**

Gerk and Vore; Regulation of Expression of the Multidrug Resistance-Associated Protein 2 (MRP2) and its Role in Drug Disposition; The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics, Vol. 302, 407-415, 2002

Gottesamn and Pastan; Biochemistry of Multidrug Resistance Mediated by the Multidrug Transporter; Annual Reviews of Biochemistry, Vol. 62, 385-427, 1993

Gschwend, Rüdell, Strauss, Sailer, Brinkmeier and Schneckenburger; Optical Detection of Mitochondrial NADH Content in Intact Human Myotubes; Cellular and Molecular Biology, Vol. 47 No.13, OL95-OL103, 2001

Gupta, Stravitz, Pandak, Müller, Vlahcevic and Hylemon; Regulation of Multidrug Resistance 2 p-Glycoprotein Expression in Rats and in Primary Cultures of Rat Hepatocytes; Hepatology. Vol. 32 No.2, 341-347, 2000

Gutmann, Fricker, Török, Michael, Beglinger and Drewe; Evidence of Different ABC-Transporters in Caco-2 Cells Modulating Drug Uptake; *Pharmaceutical Research*, Vol.16 No.23, 402-407, 1999

## H

Haltner, Schmitz, Gindorf and Ruoff; In Vitro Permeabilitätsuntersuchungen als Ersatz für Tier- und Humanstudien- welche Vorraussetzungen müssen erfüllt sein?; *ALTEX* Vol. 18,1/01, 81-87, 2001

Hidalgo, Raub and Borchardt; Characterization of the Human Colon Carcinoma Cell Line (Caco-2) as a Model for Intestinal Epithelial Permeability; *Gastroenterology*, Vol.96, 736-749, 1989

Hidalgo; Assessing the Absorption of New Pharmaceuticals; *Current Opinions in Medicinal Chemistry*, Vol. 1, 385-401, 2001

Hilgers, Conradi and Burton; Caco-2 Cell Monolayers as Model for Drug Transport Across the Intestinal Mucosa; *Pharmaceutical Research*, Vol.7 No.9, 902-910, 1990

Hillgren, Kato and Borchardt; In Vitro Systems for Studying Intestinal Drug Absorption; *Medicinal Research Reviews*, Vol. 15 No. 2, 83-109, 1995

Hirashi, Suzuki, Chu, Tamai, Tsuji and Sugiyama; Function and Expression of Multidrug Resistance-Associated Protein Family in Human Colon Adenocarcinoma Cells (Caco-2); *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, Vol. 292 No.1, 265-270, 2000

Ho, Burton, Conradi and Barsuhn; A Biophysical Model of Passive and Polarized Active Processes in Caco-2-Cells: Approaches to Uncoupling Apical and Basolateral Membrane Events in the Intact Cell; *Journal of Pharmaceutical Sciences*, Vol. 84 No.1, 21-26, 1995

Holland and Blight; ABC-ATPases, Adaptable Generators Fuelling Transmembrane Movement of a Variety of Molecules in Organisms from Bacteria to Humans; *Journal of Molecular Biology*; Vol.293, 381-399, 1999

Hosoya, Kim and Lee; Age-dependent Expression of P-Glycoprotein p-gp 170 in Caco-2 Cell Monolayers; *Pharmaceutical Research*, Vol13. No.6, 885-890, 1996

## J

Jackson; Drug Transport Across Gastrointestinal Epithelia; Physiology of the Gastrointestinal Tract; Chapter 59, 1987

Johnstone, Ruefli and Smyth; Multiple physiological functions for multidrug transporter P-glycoprotein; TIBS, Vol.25,1-6, 2000

## K

Kabanov and Alakhov; Puronic Block Copolymers in Drug Delivery: from Micellar Nanocontainers to Biological Response Modifiers; Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems, Vol. 19(1), 1-73, 2002

Kabanov, Batrakova and Alakhov; Pluronic block copolymers as novel therapeutics for drug and gene delivery; Journal of Controlled Release, Vol.82, 189-192, 2002

Kabanov, Batrakova and Miller; Pluronic Block Copolymers as modulators of drug efflux transporter activity in the blood-brain barrier; Advanced Drug Delivery Reviews, Vol.55, 151-164, 2003

Kabanov, Nazarova, Astafieva, Batrakova, Alakhov, Yaroslavov and Kabanov; Micelle Formation and Solubilization of Fluorescent Probes in Poly(oxyethylene-b-oxypropylene-b-oxyethylene) Solutions; Macromolecules, Vol.28, 233-241, 1995

Kalinova; Studies of beneficial interactions between active medicaments and excipients in pharmaceutical formulations; International Journal of Pharmaceutics, Vol.187, 1-15, 1999

König, Nies, Cui, Leier and Keppler; Conjugate export pumps of the multidrug resistance protein (MRP) family: localization, substrate specificity, and MRP2-mediated drug resistance; Biochimica et Biophysica Acta, Vol.1461, 377-394, 1999

Kozlov, Melik-Nubarov, Batrakova and Kabanov; Relationship between Pluronic Block Copolymer Structure, Critical Micelle Concentration and Partitioning Coefficient of Low Molecular Mass Solutes; Macromolecules, Vol.33, 3305-3313, 2000

Krishan, Fitz and Andritsch; Drug Retention, Efflux and Resistance in Tumor Cells; Cytometry, Vol.29, 279-285, 1997

Kulkarni, Han and Hopfinger; Predicting Caco-2 Permeation Coefficients of Organic Molecules Using membrane-Interaction QSAR Analysis; J. Chem. Inf. Sci., Vol.42, 331-342, 2002

Kusuhara and Sugiyama; Role of transporters in tissue-selective distribution and elimination of drugs: transporters in the liver, small intestine, brain and kidney; Journal of Controlled Release, Vol.8, 43-54, 2002

## L

Lautier, Canitrot, Deely and Cole; Multidrug Resistance Mediated by the Multidrug Resistance Protein (MRP) Gene; Biochemical Pharmacology, Vol.52, 967-977; 1996

Lennernäs; Human Intestinal Permeability; Journal of Pharmaceutical Sciences, Vol. 8 No.4, 403-410, 1998

Lentz, Hayashi, Lucisano and Polli; Development of a more rapid serum free culture system for Caco-2 monolayers and application to the biopharmaceutics classification system; International Journal of Pharmaceutics, Vol. 200, 41-51, 2000

Lentz, Polli, Wring, Humphreys and Polli; Influence of Passive Permeability on Apparent P-glycoprotein Kinetics; Pharmaceutical Research; Vol.17 No.12, 2000

Leslie, Deeley and Cole; Toxicological relevance of the multidrug resistance protein 1, MRP1 (ABCC1) and related transporters; Toxicology, Vol. 167, 3-23, 2001

Leuenberger; Martin: Physikalische Pharmazie; 4. Auflage, 2002

Liag, Chessic and Yazdanian; Evaluation of an Accelerated Caco-2 Cell Permeability Modell; Journal of Pharmaceutical Sciences, Vol. 89 No.3,336-345, 2000

Lin; Drug-drug interaction mediated by inhibition and induction of P-glycoprotein; Advanced Drug Delivery Reviews, Vol.55, 53-81; 2003

Lo and Huag, Effects of Sodium Desoxycholate and Sodium Caprate on the Intestinal Caco-2 Cell Layers and Everted Gut Sacs of Rats; Biochemical Pharmacology, Vol.59, 665-672, 2000

Lo, Hsu and Huang; Comparison of Effects of Surfactants with other MDR Reversing Agents on Intracellular Uptake of Epirubicin in Caco-2 Cell Line; Anticancer Research, Vol. 18, 3005-3010, 1998

Lo; Relationships between the hydrophilic-lipophilic balance values of pharmaceutical excipients and their multidrug resistance modulating effect in Caco-2 cells and rat intestines; Journal of Controlled Release, Vol. 90, 37-48, 2003

Loe and Sharom; Interaction of multidrug-resistant Chinese hamster ovary cells with amphiphiles; British Journal of Cancer, Vol. 68, 342-351, 1993

Loo, Clarke; Nonylphenol ethoxylate, but not nonylphenol, are substrates of the human multidrug resistance P-glycoprotein; Biochem. Biophys. Res. Communication ; Vol. 24(72), 478-480, 1998

## **M**

Madara and Trier; Functional Morphology of the Mucosa of the Small Intestine; Physiology of the Gastrointestinal Tract, Chapter 44; 1987

Makhey, Guo, Norris, Hu, Yan and Sinko; Characterization of the Regional Intestinal Kinetics of Drug Efflux in Rat and Human Intestine and in Caco-2 Cells; Pharmaceutical Research, Vol.15 No.8, 110-1167,1998

Martinez and Amidon; A Mechanistic Approach to Understanding the Factors Affecting Drug Absorption: A Review of Fundamentals; Journal of Clinical Pharmacology, Vol. 42, 620-643, 2002

Michael, Verbesserung der intestinalen Resorption von Peptidwirkstoffen mit Hilfe von Gallensäuren, insbesondere Chylsarcosin, Dissertation Universität Heidelberg, 2000

Miller , Masareeuw, Henson and Karnaky; Excretory transport of xenobiotics by dofish shark rectal gland tubules; American Journal of Physiology, Vol.275, R697-R705, 1998

Miller, Batrakova and Kabanov; Inhibition of Multidrug Resistance-Associated Protein (MRP) Functional Activity with Pluronic Block Copolymers; Pharmaceutical Research, Vol.16 No.3, 396-401, 1999

Miller, Batrakova, Waltner, Alakhov and Kabanov; Interaction of Pluronic Block Copolymers with Brain Microvessel Endothelial Cells: Evidence of Two Pathways for Drug Absorption; Bioconjugate Chemistry, Vol. 8, 649-65, 1997

Misra, Ganesh, Shahiwala and Shah; Drug Delivery to the Central Nervous System: a Review; Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences; Vol. 6 No.2, 252-273, 2003

## **N**

Nerurkar, Burton and Borchardt; The Use of Surfactants to Enhance the Permeability of Peptides through Caco-2 Cells by Inhibition of an Apically Localized Efflux System; *Pharmaceutical Research*, Vol. 13 No.4, 528-534, 1996

Nerurkar, Ho, Burton, Vidmar and Borchardt; Mechanistic Roles of Neutral Surfactants on Concurrent Polarized and Passive Membrane Transport of a Model Peptide in Caco-2 Cells; *Journal of Pharmaceutical Sciences*, Vol.86 No.7, 813-821, 1997

Nobmann; Isolierte Gehirn-Kapillaren als IN Vitro-Modell der Blut-Hirn-Schranke; Dissertation Universität Heidelberg; 2001

Nordan-Zuo, Ling, Liu and Gorges; Effects of Nonionic Detergents on P-Glycoprotein Drug Binding and Reversal of Multidrug Resistance; *Cancer Research*, Vol. 53, 5994-6000, 1993

## **O**

Orlowski, Selosse, Boudon, Micoud, Mir, Belerhadek and Garrigos; Effects of detergents on p-glycoprotein ATPase activity: differences in perturbations of basal and verapamil-dependent activities; *Cancer Biochem. Biophys.*, Vol.16, 85-111, 1998

## **P**

Pelkonen, Boobis and Gundert-Remy; In vitro prediction of gastrointestinal absorption and bioavailability: an experts' meeting report; *European Journal of Clinical Pharmacology*, Vol. 57, 621-629, 2001

Pogue, Pitts, Myeck, Sloboda, Wilmot, Brandsema and O'Hara; InVivo Fluorescence Monitoring as an Assay for Cellular Damage in Photodynamic Therapy; *Photochemistry and Photobiology*; Vol. 74 No. 6, 817-824; 2001

Proulx; Structure-function relationships in intestinal brush border membrane ; *Biochimica et Biophysica Acta*, Vol. 1071, 255-271, 1991

## **R**

Rege, Kao and Polli; Effects of nonionic surfactants on membrane transport in Caco-2 cell monolayers; *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, Vol.16, 237-246, 2002

Regev, Assaraf and Eytan; Membrane fluidization by ether, other anesthetics, and certain agents abolishes P-glycoprotein ATPase activity and modulates efflux from multidrug-resistant cells; *European Journal of Biochemistry*, Vol. 259, 18-24, 1999

Rischin, Webster, Milard, Linahan, Toner, Woolett, Morton and Bishop; Cremophor pharmacokinetics in patients receiving 3-, 6-, and 24-hour infusions of paclitaxel; *Journal of the National Cancer Institute*, Vol.88 (18), 1297-1301, 1996

Romsicki and Sharom; The Membrane Lipid Environment Modulates Drug Interactions with the P-glycoprotein Multidrug Transporter; *Biochemistry*; Vol.38, 6887-6896, 1999

Rothen-Rutishauser, Braun, Günthert and Wunderli-Allenspach; Formation of Multilayers in the Caco-2 Cell Culture Modell: A Confocal Laser Scanning Microscopy Study; *Pharmaceutical Research*, Vol.17 No.4, 460-465, 2000

## **S**

Saha and Kou; Effect of solubilizing excipients on permeation of poorly water-soluble compounds across Caco-2 cell monolayers; *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, Vol. 50, 403-411, 2000

Schinkel and Jonker; Mammalian drug efflux transporters of the ATP binding cassette family: an overview; *Advanced Drug Delivery Reviews*, Vol. 55, 3-29, 2003

Schinkel; P-Glycoprotein, a gatekeeper in the blood-brain barrier; *Advanced Drug Delivery Reviews*, Vol. 36, 179-194; 1999

Seelig; A general pattern for substrate recognition by P-glycoprotein; *European Journal of Biochemistry* Vol.25, 252-261, 1998

Sinicrope, Dudeja, Bissonnette, Safa and Brasitus; Modulation of P-glycoprotein-mediated Drug Transport by Alterations in Lipid Fluidity of Rat Liver Canalicular Membrane Vesicles; *The Journal of Biological Chemistry*, Vol.267 No.35; 24995-25002, 1992

Sparreboom, Verweij, van der Burg, Loos, Brouwer, Vigano, Locateli, de Vos, Nooter, Stoter and Gianni; Disposition of Cremophor EL in humans limits the potential for modulation of the multidrug resistance phenotype in vivo; *Clinical Cancer Research*, Vol.4(8), 193-1942, 1998



Suzuki and Sugiyama; Role of metabolic enzymes and efflux transporters in the absorption of drugs from the small intestine; European Journal of Pharmaceutical Sciences, Vol.12, 3-12, 2000

Swenson, Milisen and Curatolo; Intestinal Permeability Enhancement: Efficacy, Acute Local Toxicity and Reversibility; Pharmaceutical Research, Vol.11 No.8, 1132-1142, 1994

## T

Tapalensuu, Törnholm, Lindberg, Einarsson, Sjöquist, Melhus, Garberg, Sjöström, Lundgren and Artursson; Correlation of Gene Expression of Ten Efflux Proteins of ATP-Binding Cassette Transporter Family in Normal Human Jejunum and in Human Intestinal Epithelial Caco-2 Cell Monolayers; The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics, Vol. 299 No.1, 164-171, 2001

Tavelin, Grasjö, Taipalensuu, Ocklind and Artursson; Applications of Epithelial Culture in Studies of Drug Transport; Methods in Molecular Biology, Vol.188, 233-273, 2000

Thews, Vaupel und Mutschler; Anatomie, Physiologie; Pathophysiologie des Menschen; 5. Auflage 1999

Tsukita, Furuse and Itoh; Multifunctional Strands in Tight Junctions; Molecular Cell Biology, Vol. 2, 285-293, 2001

Tsukita, Furuse and Itoh; Structural and signalling molecules come together at tight junctions; Current Opinion in Cell Biology, Vol. 11, 628-633, 1999

## V

van Hoogdalem, de Boer and Breimer; Intestinal Drug Enhancement: An Overview; Pharmac. Ther. Vol. 44, 407-443, 1989

van Tellingen; The importance of drug-transporting P-glycoproteins in toxicology; Toxicology Letters, Vol. 120, 31-41, 2001

Venne, Li, Mandeville, Kabanov and Alakhov; Hypersensitizing Effect of Pluronic L61 on Cytotoxic Activity Transport, and Subcellular Distribution of Doxorubicin in Multiple Drug-resistant Cells; Cancer Research, Vol. 56, 3626-3629, 1996

Voigt; Pharmazeutische Technologie; 9. Auflage, 2000

## **W**

Walgren, Karnaky, Lindenmayer and Walle; Efflux of Flavonoid Quercetin 4'- $\beta$ -Glucoside across Human intestinal Caco-2 Cell Monolayers by Apical Multidrug Resistance-Associated Protein-2; The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics, Vol. 294 No.3, 830-836, 2000

Walter and Kissel; Heterogeneity in the human intestinal cell line Caco-2 leads to differences in transepithelial transport; European Journal of Pharmaceutical Sciences, Vol.3, 215-230, 1995

Watanabe, Nakayama, Naito, Oh-hara, Itoh and Tsuruo; Cremophor EL reversed multidrug resistance in vitro but not in tumor-bearing mouse models; Anticancer Research, Vol.7(8), 825-832, 1996

Webster, Linsenmeyer, Millward, Morton, Bishop and Woodcock; Measurement of Cremophor EL following taxol: plasma level sufficient to reverse drug exclusion mediated by the multidrug-resistant phenotype; Journal of the National Institute of Cancer, Vol. 85(20), 1685-1690, 1993

Woodcock, Jefferson, Linsenmeyer, Crowther, Chojnowski, Williams and Bertocello; Reversal of the multidrug resistant phenotype with Cremophor EL, a common vehicle for water-insoluble vitamins and drugs; Cancer Research, Vol. 50 No. 14, 4199-4203, 1990

Woodcock, Linsenmeyer, Chojnowski, Kriegler, Nink, Webster and Sawyer; Reversal of Multidrug Resistance by Surfactants; British Journal of Cancer, Vol. 66(1), 62-68, 1992

## **X**

Xia and Onyuskel; Mechanistic Studies on Surfactant-Induced Membrane Permeability Enhancement; Pharmaceutical Research, Vol.17 No.5, 612-618, 2000

## **Y**

Yamashita, Fujiwara and Hishada; The "Latent Membrane Permeability" Concept: QSPR Analysis of Inter/Intralaboratorically Variable Permeability; J. Chem. Inf. Sci., Vol.42 408-413, 2002

Yamazaki, Neway, Ohe, I-Wu, Rowe, Hochman, Chiba and Lin; In Vitro Substrate Identification Studies for P-glycoprotein-Mediated Transport: Species Difference and Predictability of in Vivo Results; The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics, Vol.296, 723-735, 2001,

## **Z**

Zhang, Bachmeier and Miller; In Vitro and In Vivo Models for assessing drug efflux transporter activity; Advanced Drug Delivery Reviews, Vol. 55,31-51, 2003

Zhang, Jackson and Burt; Determination of surfactant critical micelle concentration by a novel fluorescence depolarization technique; Journal of Biochemical and Biophysical Methods, Vol. 37, 150-154, 1996