

# **INAUGURAL-DISSERTATION**

zur

Erlangung der Doktorwürde

der

Naturwissenschaftlich-Mathematischen Gesamtfakultät

der

Ruprecht-Karls-Universität

Heidelberg

vorgelegt von

Apothekerin Susanne Michael

aus Saarbrücken

Tag der mündlichen Prüfung: 15. Dezember 2000

**VERBESSERUNG DER INTESTINALEN  
RESORPTION VON PEPTIDWIRKSTOFFEN MIT  
HILFE VON GALLENÄUREN, INSBESONDERE  
CHOLYLSARCOSIN**

Gutachter:

Prof. Dr. Gert Fricker  
Prof. Dr. Helga Möller

für meine Eltern  
und meine Großmutter, Antonia Hoffmann

„Das schönste Glück des denkenden Menschen ist, das Erforschliche erforscht zu haben und  
das Unerforschliche zu verehren“  
Johann Wolfgang von Goethe (1749-1832)

Die vorliegende Arbeit wurde am Institut für Pharmazeutische Technologie und Biopharmazie der Ruprecht-Karls-Universität Heidelberg angefertigt.

Die Langmuir-Adam-Trog Experimente und die Anisotropiemessungen wurden bei Herrn Prof. Dr. A. Fahr am Institut für Pharmazeutische Technologie und Biopharmazie der Philipps-Universität Marburg durchgeführt.

Herrn Prof. Dr. Fricker danke ich für die Überlassung des interessanten Themas, für seine stete Ansprechbarkeit, für die wertvollen Anregungen und für das Gewähren von ausreichendem wissenschaftlichen Freiraum zum selbständigen Arbeiten.

Besonders danke ich ihm für die tatkräftige Hilfe bei den Tierversuchen.

Herrn Prof. Dr. Fahr danke ich für die freundliche Aufnahme in seinem Arbeitskreis und die stete Bereitschaft zur Diskussion.

Frau Prof. Dr. Möller danke ich für das Anfertigen des zweiten Gutachtens.

Frau Dr. Dillmann-Marschner danke ich besonders für ihre stete Ansprechbarkeit und Hilfe bei Fragen und Problemen.

Die Arbeit wurde größtenteils von der Deutschen Forschungsgemeinschaft finanziert (FR 1211/4-1 und FR 1211/4-2).

Ich danke der Firma Novartis, Basel, Schweiz für die Schenkung von Octreotid und der Firma Falk, Freiburg für die Schenkung von Gallensäuren.

Darüber hinaus danke ich allen, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben:

- Frau Kristina Müller für die Einweisung in die Geheimnisse des Langmuir Trogs und für viele nette Stunden bei Bier und Wein
- Allen Mitgliedern des Arbeitskreis Fahr und Kissel für die freundliche Aufnahme und für ihre Hilfsbereitschaft.
- Frau Stephanie Nobmann, meiner Kollegin und Nachbarin, für ihre Unterstützung bei den Messungen am konfokalen Mikroskop, für ihre Freundschaft und für die vielen schönen Stunden, die wir zusammen verbracht haben.
- Herrn Dr. Marc „hero“ Thöle für die Einweisung im Umgang mit Zellkulturen, Eichgeraden, Fluoreszenzmessgeräten und unzähligen anderen technischen Geräten.
- Frau Claudia Graeff für ihre Begleitung nach New Orleans und die guten Gespräche und Ratschläge in allen Lebenslagen.
- Frau Katrin Kaelkert für ihre Hilfsbereitschaft beim spontanen Backen von größeren Mengen Zwiebelkuchen und für die schöne Zeit in Berlin.
- Herrn Karl Werner für die Betreuung meines privaten Kleintierzoos, für Taxifahrten zum Flughafen, für zahlreiche Heimwerkerdienste, für seine Freundschaft und für seine Hilfsbereitschaft.
- Herrn Björn Bauer für seine Bemühungen, in unseren Arbeitskreis vielleicht doch noch „Zucht und Ordnung“ zu bringen.
- Herrn Christoph „Shorty“ Groebel, unseren EDV-Experten, ohne den ich wahrscheinlich meinen Verstand verloren hätte.
- Herrn Dr. Frank Lintz für die vielen lustigen Stunden im Kafferaum.
- Herrn Jörg Linder, der immer dafür gesorgt, dass es nicht langweilig wurde.
- Herrn Markus Greulich für seine Ruhe und seine Unterstützung bei zahlreichen „Pipettierorgien“.
- Den Herren und Damen aus dem „Ghetto“ Frau Anne Kunze, Herrn Tilo Schönbrodt, Frau Birte Huth für die Spieleabende und sonstigen gesellschaftlichen Veranstaltungen. Tilo

außerdem für die lebensnotwendige Unterweisung im Umgang mit dem Beckmann-Thermometer.

- Herrn Carsten Baehr für die Hilfe beim Verfassen von Dokumenten in englischer Sprache.
- Frau Stefanie Schmitt für ihre stets gute Laune.
- Allen Mitgliedern des Arbeitskreis Ludwig für die freundliche Aufnahme bei Grillfesten, Feuerzangenbowlen und für meinen Spitznamen „Sumi“.
- Herrn Dr. Martin Bultmann für Kartentricks, Tanzveranstaltungen und für die netten Gesprächen bei der Betreuung von Praktika.
- Unserem ehemaligen „Mobbing-Beauftragten“, Herrn Dr. Tilman Rock, der mir gezeigt hat, daß das Leben manchmal grausam ist.
- Den ehemaligen Kollegen allen voran Herrn Dr. Günter van Almsick für die schöne, gemeinsame Zeit am Institut und die tatkräftige Unterstützung in Forschung und Alltag.
- Ganz besonderer Dank geht an meine liebe Freundin Sabine Bucké für die Aufnahme in ihre WG in Marburg, die Unterstützung bei den Anisotropiemessungen, für die vielen schönen Stunden und Urlaube und dafür, daß sie immer für mich da ist.
- Meinen Eltern, die mir das Studium ermöglicht haben und ohne deren Unterstützung diese Arbeit nicht entstanden wäre. Außerdem für die unermüdliche Suche nach Rechtschreibfehlern in dieser Arbeit, sogar im Urlaub.
- Besonders danke ich meinem Freund Jörg für seine seelische und moralische Unterstützung beim Entstehen dieses Werkes, für das Ertragen meiner Frustanfalle und für das nicht immer ganz einfache Korrekturlesen dieser Arbeit.

**Teile dieser Arbeit wurden vorgetragen oder veröffentlicht:**

S. Michael, M. Thöle, R. Dillmann, A. Fahr, J. Drewe, G. Fricker  
„Improvement of intestinal peptide absorption by a synthetic bile acid derivative, cholylsarcosine“  
European Journal of Pharmaceutical Sciences, 10 (2), 2000, 133-140

S. Michael, J. Drewe, G. Fricker  
”Improvement of intestinal peptide absorption by a synthetic bile salt – cholylsarcosine”  
Poster für Pharmakologietagung in Mainz

S. Michael, K. Müller, A. Fahr, G. Fricker  
”Increased peptide absorption by a synthetic bile salt derivative, cholylsarcosine”  
Poster für AAPS in New Orleans

S. Michael, K. Müller, A. Fahr, G. Fricker  
”Absorption enhancement of peptide by cholylsarcosine, a synthetic bile salt derivative”  
Poster für APV in Berlin

**Weitere Veröffentlichungen:**

H. Gutmann, G. Fricker, M. Török, S. Michael, Ch. Beglinger, J. Drewe  
”Evidence for different ABC-Transporters in CaCo-2 cells modulating drug uptake”  
Pharm. Res. 16 1999, 402 ff.





---

|  |           |
|--|-----------|
| <b>1 EINLEITUNG</b>  | <b>1</b>  |
| <b>1.1 GRUNDLAGEN DES ABSORPTIONSVORGANGS IN VIVO</b>            | <b>1</b>  |
| 1.1.1 ANATOMIE DES DÜNNDARMS                                     | 1         |
| 1.1.2 ABSORPTIONSBARRIEREN UND TRANSPORTPROZESSE IM DÜNNDARM     | 2         |
| 1.1.2.1 Absorptionsbarrieren auf zellulärer Ebene                | 2         |
| 1.1.2.2 Funktionelle Absorptionsbarrieren                        | 2         |
| 1.1.2.3 Enzymatische Absorptionsbarrieren                        | 3         |
| 1.1.2.4 Transportprozesse  | 3         |
| 1.1.3 DIE GASTROINTESTINALE MUCUSSCHICHT                         | 4         |
| 1.1.3.1 Zusammensetzung und Eigenschaften des Mucus              | 4         |
| 1.1.3.2 Die Mucusschicht als Barriere für den Wirkstofftransport | 4         |
| <b>1.2 ABSORPTIONSMODELLE</b>                                    | <b>5</b>  |
| 1.2.1 <i>IN-VITRO</i> - MODELLE                                  | 5         |
| 1.2.1.1 Physikalische Modelle                                    | 5         |
| 1.2.1.2 Biophysikalische Modelle                                 | 5         |
| 1.2.1.3 Biologische Modelle                                      | 7         |
| 1.2.1.4 Mucusdiffusionsmodelle                                   | 9         |
| 1.2.2 <i>IN-SITU</i> - UND <i>IN-VIVO</i> - MODELLE              | 9         |
| <b>1.3 ABSORPTIONSENHANCER</b>                                   | <b>10</b> |
| 1.3.1 EINTEILUNG DER ABSORPTIONSENHANCER                         | 10        |
| 1.3.2 WIRKUNGSWEISEN UND TOXIZITÄT VON ABSORPTIONSENHANCERN      | 11        |
| 1.3.3 KRITISCHE MIZELLBILDUNGSKONZENTRATION (CMC)                | 11        |
| <b>1.4 GALLENSÄUREN</b>  | <b>12</b> |
| 1.4.1 VORKOMMEN UND AUFGABEN IM ORGANISMUS                       | 12        |
| 1.4.2 PRIMÄRE UND SEKUNDÄRE GALLENSÄUREN                         | 14        |
| 1.4.3 GALLENSÄUREN ALS NATÜRLICHE SURFACTANTS                    | 14        |
| 1.4.4 GALLENSÄUREN ALS RESORPTIONSENHANCER                       | 15        |
| 1.4.5 TOXIZITÄT  | 16        |
| 1.4.6 SYNTHETISCHE GALLENSÄUREN                                  | 16        |
| <b>1.5 MODELLPEPTIDE</b>   | <b>17</b> |
| 1.5.1 OCTREOTID  | 17        |
| 1.5.2 DESMOPRESSIN   | 18        |
| <b>1.6 ZIELSETZUNG</b>   | <b>19</b> |
| <br>   |           |
| <b>2 MATERIALIEN UND METHODEN</b>                                | <b>20</b> |
| <br>   |           |
| <b>2.1 SUBSTANZEN</b>  | <b>20</b> |
| 2.1.1 CHEMIKALIEN UND REAGENZIEN                                 | 20        |
| 2.1.2 GALLENSALZLÖSUNGEN   | 28        |
| 2.1.3 LÖSUNGEN DER MODELLPEPTIDE                                 | 28        |
| 2.1.4 LÖSUNGEN DER PARAZELLULÄREN MARKER                         | 28        |
| 2.1.5 CARBOXYFLUORESZEINLÖSUNG                                   | 28        |
| <b>2.2 GERÄTE UND MATERIALIEN</b>                                | <b>29</b> |
| 2.2.1 FLUORESZENZMIKROSKOP                                       | 29        |
| 2.2.2 KONFOKALE LASERMIKROSKOPIE                                 | 29        |
| 2.2.3 WEITERE GERÄTE UND MATERIALIEN                             | 29        |
| <b>2.3 ZELLKULTUR</b>  | <b>31</b> |

|             |  |           |
|-------------|--|-----------|
| 2.3.1       | AUFTAUEN UND AUSSÄEN DER CaCo-2 ZELLEN   | 31        |
| 2.3.2       | KULTIVIERUNG DER ZELLEN  | 31        |
| 2.3.3       | PASSAGIEREN DER ZELLEN   | 32        |
| 2.3.4       | EINFRIEREN DER ZELLEN  | 32        |
| 2.3.5       | CHARAKTERISIERUNG DER ZELLEN   | 32        |
| 2.3.5.1     | Zellwachstum und Erscheinungsbild  | 32        |
| 2.3.5.2     | Bestimmung des transepithelialen Widerstandes  | 32        |
| 2.3.5.3     | Bestimmung der Diffusion von parazellulären Markern durch den Zellmonolayer              | 33        |
| <b>2.4</b>  | <b>TRANSPORTEXPIMENTE</b>  | <b>33</b> |
| 2.4.1       | ALLGEMEINE VERSUCHSDURCHFÜHRUNG  | 33        |
| 2.4.2       | TRANSPORTEXPIMENTE MIT FLUORESCENZMARKIERTEN SUBSTANZEN                                  | 34        |
| 2.4.3       | TRANSPORTEXPIMENTE MIT ISOTOPENMARKIERTEN SUBSTANZEN                                     | 34        |
| 2.4.4       | AUSWERTUNG DER MEßERGEBNISSE   | 35        |
| <b>2.5</b>  | <b>TOXIZITÄTSUNTERSUCHUNGEN</b>  | <b>36</b> |
| 2.5.1       | BESTIMMUNG DER LACTATDEHYDROGENASE-AKTIVITÄT   | 36        |
| 2.5.2       | BESTIMMUNG DER AKTIVITÄT MITOCHONDRIALER DEHYDROGENASEN                                  | 38        |
| 2.5.3       | MIKROSKOPISCHE TOXIZITÄTSUNTERSUCHUNGEN  | 39        |
| 2.5.4       | TRYPANBLAUFÄRBUNG  | 39        |
| <b>2.6</b>  | <b>MONOLAYEREXPERIMENTE MIT DER LANGMUIR-ADAM-FILMWAAGE</b>                              | <b>39</b> |
| <b>2.7</b>  | <b>IN-SITU- ABSORPTIONSVERSUCHE AN RATTEN</b>  | <b>41</b> |
| <b>2.8</b>  | <b>VERSUCHE MIT HEXADECANOYLAMINOFUORESCZEIN</b>   | <b>42</b> |
| 2.8.1       | FLUORESCENZMESSUNGEN   | 42        |
| 2.8.2       | KONFOKALE LASERMIKROSKOPIE   | 42        |
| <b>2.9</b>  | <b>ANFÄRBUNG DES AKTIN-FILAMENTS MIT PHALLOIDIN-FITC</b>                                 | <b>43</b> |
| <b>2.10</b> | <b>AUFNAHMEVERSUCHE MIT NBD-OCTREOTID</b>  | <b>44</b> |
| <b>2.11</b> | <b>MUCUSDIFFUSIONSEXPERIMENTE</b>  | <b>44</b> |
| 2.11.1      | MUCUSISOLIERUNG  | 44        |
| 2.11.2      | VERSUCHSDURCHFÜHRUNG   | 45        |
| 2.11.3      | AUSWERTUNG   | 46        |
| <b>2.12</b> | <b>ANISOTROPIEMESSUNGEN</b>  | <b>47</b> |
| 2.12.1      | HERSTELLUNG DER LIPOSOMEN  | 47        |
| 2.12.2      | ANISOTROPIEMESSUNGEN   | 47        |
| <b>3</b>    | <b>ERGEBNISSE UND DISKUSSION</b>   | <b>49</b> |
| <b>3.1</b>  | <b>LÖSLICHKEIT DER GALLENSALZE IN VERSCHIEDENEN PUFFERN</b>                              | <b>49</b> |
| <b>3.2</b>  | <b>TOXIZITÄTSUNTERSUCHUNGEN</b>  | <b>50</b> |
| 3.2.1       | LACTATDEHYDROGENASE AKTIVITÄT NACH GALLENSALZINKUBATION                                  | 50        |
| 3.2.2       | AKTIVITÄT MITOCHONDRIALER DEHYDROGENASEN NACH GALLENSALZINKUBATION                       | 55        |
| 3.2.3       | TRYPANBLAUFÄRBUNG NACH GALLENSALZINKUBATION  | 57        |
| 3.2.4       | MIKROSKOPISCHE TOXIZITÄTSUNTERSUCHUNGEN  | 58        |
| <b>3.3</b>  | <b>ANFÄRBUNG DES AKTIN-FILAMENTS IN CaCo-2 ZELLEN NACH GALLENSALZINKUBATION</b>          | <b>60</b> |
| <b>3.4</b>  | <b>TRANSPORTEXPIMENT MIT CaCo-2 ZELLEN</b>   | <b>65</b> |
| 3.4.1       | DURCHGANG VON OCTREOTID IN AN- UND ABWESENHEIT VON GALLENSALZEN                          | 65        |
| 3.4.2       | DURCHGANG VON DESMOPRESSIN IN AN- UND ABWESENHEIT VON GALLENSALZEN                       | 68        |
| 3.4.3       | AUFNAHMEVERSUCHE MIT NBD-OCTREOTID   | 70        |
| <b>3.5</b>  | <b>BEEINFLUSSUNG DES PARAZELLULÄREN TRANSPORTWEGS IN CaCo-2 ZELLEN DURCH GALLENSALZE</b> | <b>75</b> |
| 3.5.1       | BEEINFLUSSUNG DES TRANSEPITHELIALEN WIDERSTANDES DURCH GALLENSALZE                       | 75        |

|   |                   |
|---|-------------------|
| <b>Inhaltsverzeichnis</b>   | <b>III</b>        |
| 3.5.2 TRANSPORT VON FITC-DEXTRAN 4000 IN AN- UND ABWESENHEIT VON GALLENSALZEN   | 77                |
| <b>3.6 INTERAKTION VON GALLENSALZEN MIT LIPIDEN IN DER APICALEN MEMBRAN VON CACO-2 ZELLEN</b>   | <b>80</b>         |
| 3.6.1 FLUORESZENZASSAY MIT HDAF INKUBIERTEN CA-CO-2 MONOLAYERN  | 80                |
| 3.6.2 UNTERSUCHUNG HDAF-INKUBIERTER CACO-2 MONOLAYER IM KONFOKALEN MIKROSKOP  | 82                |
| <b>3.7 INTERAKTIONEN VON GALLENSALZEN MIT KÜNSTLICHEN LIPIDMEMBRANEN - DPH-FLUORESZENZ-ANISOTROPIE MESSUNGEN AN UNILAMELLAREN LIPOSOMEN</b>     | <b>85</b>         |
| <b>3.8 UNTERSUCHUNG DES EINBAUS VON OCTREOTID IN AN- UND ABWESENHEIT VON GALLENSALZEN IN DOPC-MONOLAYER MIT HILFE DER LANGMUIR-TROG-TECHNIK</b> | <b>87</b>         |
| <b>3.9 BEEINFLUSSUNG DER INTERTESTINALEN MUCUSSCHICHT DURCH GALLENSALZE</b>   | <b>93</b>         |
| <b>3.10 IN-SITU- ABSORPTIONSVERSUCHE AN RATTEN</b>  | <b>97</b>         |
| 3.10.1 ABSORPTION VON DESMOPRESSIN IN RATTEN IN AN- UND ABWESENHEIT VON GALLENSALZEN  | 97                |
| 3.10.2 ABSORPTION VON OCTREOTID IN RATTEN IN AN- UND ABWESENHEIT VON GALLENSALZEN   | 99                |
| <b><u>4 ZUSAMMENFASSUNG UND AUSBLICK</u></b>  | <b><u>100</u></b> |
| <b><u>5 ANHANG</u></b>  | <b><u>102</u></b> |
| <b><u>6 LITERATURVERZEICHNIS</u></b>  | <b><u>116</u></b> |

**Abkürzungen**

|                 |  |
|-----------------|--|
| Å               | Ångström   |
| Å <sup>2</sup>  | Quadrat- Ångström  |
| A               | Fläche   |
| Abb.            | Abbildung  |
| AUC             | area under the curve   |
| Brj®            | Bridge, Emulgatoren aus der Reihe der Polyoxyethylenfettalkoholether |
| BSA             | Rinder-Serumalbumin  |
| γ               | Gamma, Oberflächenspannung   |
| c               | Konzentration  |
| C               | Kohlenstoff  |
| <sup>14</sup> C | Radioisotop Kohlenstoff 14   |
| Ca              | Kalzium  |
| CA              | Cholsäure  |
| CaCo-2          | Zelllinie, Karzinoma Kolon   |
| CDCA            | Chenodesoxycholsäure   |
| CDCA-Na         | Na-Chenodesoxycholat   |
| CF              | 5(6)-Carboxyfluoreszein  |
| cm              | Zentimeter   |
| cm <sup>2</sup> | Quadratcentimeter  |
| CMC             | kritische Mizellbildungskonzentration                                |
| CMpH            | kritischer Mizellbildungs pH-Wert                                    |
| CMT             | kritische Mizellbildungstemperatur                                   |
| cos             | cosinus  |
| cpm             | counts per minute  |
| CS              | Cholylsarcosin   |
| CS-Na           | Na-Sarcosincholat  |
| Δ               | Delta, Differenz   |
| d               | Tag  |
| D               | D-Konfiguration von Aminosäuren                                      |
| DKFZ            | Deutsches Krebs Forschungszentrum                                    |
| DMAC            | N,N-Dimethylacetamid   |
| DMEM            | Dulbecco`s modified Eagle Medium                                     |
| DMPC            | Dimyristoyl-phosphatidylcholin                                       |
| DMSO            | Dimethylsulfoxid   |
| DNS             | Desoxyribonukleinsäure   |
| DOC             | Desoxycholsäure  |
| DOPC            | Dioleoyl-phosphatidylcholin  |
| DOSS            | Natriumsulfosuccinat   |
| DPH             | Diphenylhexatrien  |
| EDTA            | Ethylendiamintetraessigsäure   |
| ELISA           | enzyme linked immuno sedimented assay                                |
| et al.          | Und Andere   |
| FD-X            | FITC-Dextran (Molekulargewicht X.000)                                |
| FITC            | Fluoreszeinisothiocyanat   |
| FKS             | fetales Kälberserum  |
| g               | Gramm  |
| g               | Erdbeschleunigung  |

|                   |  |
|-------------------|--|
| GIT               | Gastrointestinaltrakt  |
| GLUT              | passives Glucose-Transportprotein ( <i>glucose transporter</i> )       |
| h                 | Stunde   |
| <sup>3</sup> H    | Radioisotop Wasserstoff 3, Tritium                                     |
| HBSS              | Pufferlösung nach Hank pH 7,4 ( <i>Hank's balanced salt solution</i> ) |
| HDAF              | 5-Hexadecanoylaminofluoreszein   |
| HEPES B           | 10 mMol HEPES-Puffer   |
| HPLC              | high pressure liquid chromatography                                    |
| HT29              | Zelllinie aus dem Kolon  |
| i.j.              | intrajejunal   |
| i.v.              | intravenös   |
| K                 | Kalium   |
| kDa               | Kilodalton   |
| λ                 | Lambda, Wellenlänge  |
| L                 | L-Konfiguration von Aminosäuren  |
| LDH               | Lactatdehydrogenase  |
| logP              | logarithmierte Form des Wasser-Octanol-Verteilungskoeffizienten        |
| LUV               | große, unilamellare Vesikel ( <i>large unilamellar vesicles</i> )      |
| μ                 | Mikro  |
| μCi               | Mikrocurie   |
| μl                | Mikroliter   |
| m                 | Masse  |
| m                 | Meter  |
| m <sup>2</sup>    | Quadratmeter   |
| ml                | Milliliter   |
| MBq               | Megabecquerel  |
| MEM               | Minimalmedium ( <i>minimal essential medium</i> )                      |
| mg                | Milligramm   |
| Mg                | Magnesium  |
| MICB              | McIlvaine Zitratpuffer pH 6  |
| Min               | Minute   |
| mmol              | Millimol   |
| mMol              | Millimolarh <sup>0</sup>   |
| mN                | Millinewton  |
| MRP               | <i>multidrug resistance associated protein</i>                         |
| MTT               | (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazoliumbromid           |
| MWCO              | molecular weight cutoff, Molekulargewichtsausschlußgrenze              |
| n                 | Anzahl   |
| N                 | normal   |
| N                 | Stickstoff   |
| Na                | Natrium  |
| NAD <sup>+</sup>  | Nikotinamidadenindinukleotid (reduzierte Form)                         |
| HADH              | Nikotinamidadenindinukleotid (oxidierte Form)                          |
| NADPH             | Nikotinamidadenindinukleotidphosphat (reduzierte Form)                 |
| NADP <sup>+</sup> | Nikotinamidadenindinukleotidphosphat (oxidierte Form)                  |
| NBD               | 7-Nitrobenz-2-Oxa-1,3-Diazol   |
| nm                | Nanometer  |
| nmol              | Nanomol  |
| Ω                 | Ohm, Einheit des elektrischen Widerstandes                             |
| O                 | Sauerstoff   |
| π                 | pi, Oberflächendruck   |

|                  |  |
|------------------|--|
| p.a.             | für die Analyse  |
| P <sub>app</sub> | apparenter Permeabilitätskoeffizient   |
| PBS              | isotonischer Phosphatpuffer pH 7,4 ( <i>phosphate buffered saline</i> )          |
| PC               | Phosphatidylcholin   |
| PEG              | Polyethylenglykol  |
| pGP              | p-Glykoprotein   |
| pH               | pH-Wert  |
| pks              | logarithmierte Säurekonstante  |
| pmol             | Picomol  |
| r                | Gleichgewichtsanisotropie  |
| RIA              | Radioimmunoassay   |
| RNS              | Ribonukleinsäure   |
| S                | Standardabweichung vom Mittelwert  |
| S rel.           | Relative Standardabweichung  |
| s.               | siehe  |
| Sec              | Sekunden   |
| SDS              | Natriumdodecylsulfat   |
| SUV              | kleine, unilamellare Vesikel ( <i>small unilamellar vesicles</i> )               |
| t                | Zeit   |
| T <sub>c</sub>   | Phasenübergangstemperatur  |
| TDHF             | Natriumtaurodihydrofusidat   |
| TEER             | transendothelialer Widerstand ( <i>transendothelial electrical resistance</i> )  |
| TP               | Transportpuffer pH 7,4   |
| U                | units, Einheiten   |
| UDCA             | Ursodesoxycholsäure  |
| UDCA-Na          | Na-Ursodesoxycholol  |
| Upm              | Umdrehungen pro Minute   |
| V                | Volumen  |
| VIP              | vasoactive intestinal peptide  |
| VIPom            | VIP produzierendes Inselzelladenom   |
| VLDL             | very low density lipoprotein   |
| WST-1            | 4-[3-(4-iodophenyl)-2-(4-nitrophenyl)-2H-5-tetrazolio]-<br>1,3-benzen-disulfonat |
| X                | - faches Konzentration   |
| zB.              | Zum Beispiel   |
| %                | Prozent  |
| °                | Grad   |
| °C               | Grad Celsius   |
| (+)              | rechtsdrehend  |
| (-)              | linksdrehend   |
| Ø                | Durchmesser  |

**Dreibuchstabenkode der Aminosäuren:**

|     |                |
|-----|----------------|
| Ala | Alanin         |
| Arg | Arginin        |
| Asn | Asparagin      |
| Asp | Asparaginsäure |
| Cys | Cystein        |
| Gln | Glutamin       |
| Glu | Glutaminsäure  |
| Gly | Glycin         |
| His | Histidin       |
| Ile | Isoleucin      |
| Leu | Leucin         |
| Lys | Lysin          |
| Met | Methionin      |
| Phe | Phenylalanin   |
| Pro | Prolin         |
| Ser | Serin          |
| Thr | Threonin       |
| Trp | Tryptophan     |
| Tyr | Tyrosin        |
| Val | Valin          |

# 1 EINLEITUNG

Der weitaus größte Teil der auf dem Markt befindlichen Arzneistoffe wird oral appliziert. Der Dünndarm ist der natürliche Aufnahmeort für Nährstoffe. Hier wird auch ein großer Teil der oral verabreichten Wirkstoffe absorbiert. Als Darreichungsform für die Anwendung per os sind Tabletten oder Kapseln üblich. Ein großer Vorteil dieser Arzneiformen ist die gute Compliance der Patienten im Gegensatz zu den parenteralen Applikationsformen.

Für die orale Absorption bisher kaum zugänglich sind die Peptidhormone. Vertreter dieser Gruppe sind: Hypothalamus- und Hypophysenhormone wie Vasopressin, Oxytocin, Buserelin, Somatostatin, Prolaktin oder Wachstumshormon sowie Calcitonin und Insulin. Insulin muß subcutan verabreicht werden, da es aus dem Magen-Darm-Trakt praktisch nicht aufgenommen wird. Insulin nach oraler Gabe im ausreichenden Maße bioverfügbar zu machen, würde für den *Diabetes*-Patienten eine deutliche Verbesserung der Lebensqualität bedeuten. *Diabetes mellitus* ist die häufigste und zugleich bedeutendste Stoffwechselstörung. In der Bundesrepublik Deutschland sind davon 2 – 3 % der Bevölkerung betroffen [1]. Die Entwicklung einer oral applizierbaren Insulinform beinhaltet ein beträchtliches Marktpotential.

## 1.1 Grundlagen des Absorptionsvorgangs *in vivo*

Unter Absorption wird im folgenden die Aufnahme von Wirkstoffen aus dem Darmlumen über das Dünndarmepithel in die Blutbahn verstanden.

### 1.1.1 Anatomie des Dünndarms

Der Dünndarm besteht aus drei aufeinanderfolgenden Abschnitten: dem Duodenum, in das Bauchspeicheldrüse und Gallengang münden, dem Jejunum und schließlich dem Ileum. Insgesamt hat er eine Länge von etwa 3 m [2].

Die Dünndarmschleimhaut hat aufgrund ihrer speziellen Struktur eine Oberfläche von 200 m<sup>2</sup>. Die zirkuläre Auffaltung der Schleimhaut, die sog. Kerckringschen Falten, die sich darauf befindenden fingerförmigen Darmzotten und die Mikrovilli der Enterozyten führen zu einer 600-fachen Oberflächenvergrößerung der Dünndarmschleimhaut.

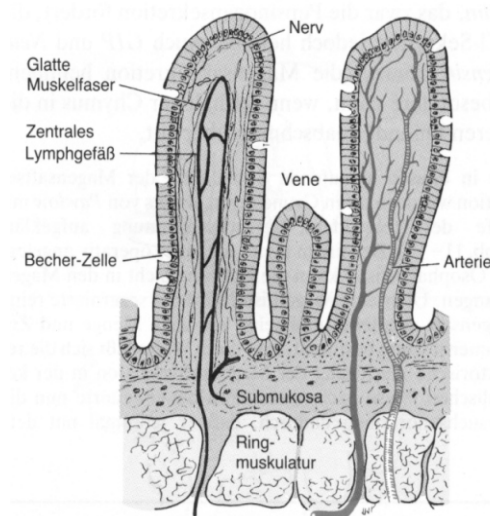


Abb. 1 Aufbau der Darmzotten in halbschematischer Darstellung [2]



## 1.1.2 Absorptionsbarrieren und Transportprozesse im Dünndarm

### 1.1.2.1 Absorptionsbarrieren auf zellulärer Ebene

Um aus dem Lumen ins Blut aufgenommen werden zu können, muß ein Wirkstoff im Dünndarm mehrere Diffusionschichten überwinden. Die erste Schicht ist der sogenannte *unstirred water layer* oder Mucusschicht (etwa 500 µm dick) [3,4]. Darauf folgt die *Glykokalix*, die hauptsächlich aus Glykoproteinen besteht und im Gegensatz zur Mucusschicht integraler Bestandteil der Mikrovillimembran ist (etwa 500 nm) [5,6]. Anschließend muß die apikale Membran der Mikrovilli-Zellen mit etwa 10 nm Dicke überwunden werden. Es folgen das Zytoplasma der Enterozyten (etwa 28 µm), die basolaterale Membran (etwa 8 nm), die Basalmembran (etwa 30 nm), der Raum zwischen Basalmembran und venöser Kapillare (etwa 0,5 µm) und schließlich das Membranfenster der venösen Kapillare ( 2-4 nm).

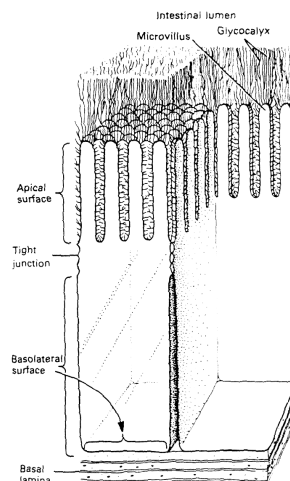


Abb. 2 Schematische Darstellung von Enterozyten [7]

Die Absorptionsbarrieren im Dünndarm sind die apikale Enterozytenmembran, die Mucusschicht und die *tight junctions*.

Zwischen einzelnen Enterozyten bestehen als Grenze zwischen apikalen und basolateralen Zellbereichen enge Zell-Zell Kontakte, die *tight junctions* oder *zonulae occludentes*. [8] Die *tight junctions* haben zwei Funktionen: Sie kontrollieren als eine Art „Tor“ die Diffusion von Ionen und Stoffen aus dem Darmlumen. Desweiteren trennen sie als eine Art „Zaun“ für Membranproteine und Lipide den apikalen vom basolateralen Bereich der Zelle und sorgen für ihre charakteristische Polarisierung. Der ungefähre Abstand der Zellmembranen im Bereich der *zonulae occludentes* beträgt im Darm 12 Å. Nur Moleküle mit kleineren Molmassen wie Disaccharide oder EDTA und Ionen können diese „Poren“ passieren [9].

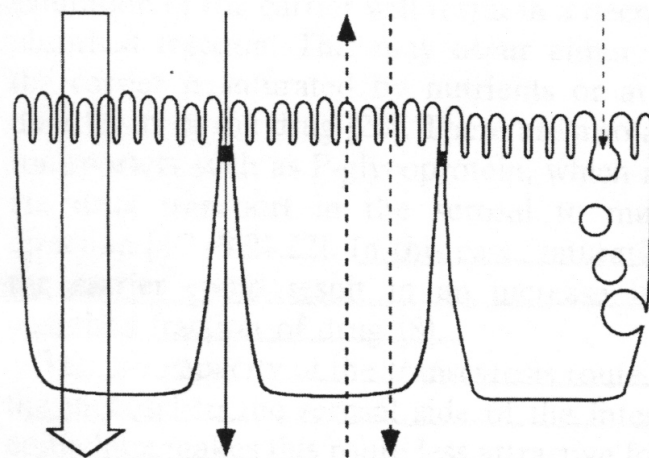
### 1.1.2.2 Funktionelle Absorptionsbarrieren

In den apikalen Membranen der Epi- bzw. Endothelien einzelner Gewebe sind Efflux-Pumpen verankert. Diese sind Transportproteine, die Substanzen unter direktem Energieverbrauch aktiv aus dem Zytoplasma ins Darmlumen pumpen. Die bekanntesten Vertreter dieser Efflux-Pumpen, P-Glykoprotein und MRP<sub>2</sub> wurden auch in den Enterozyten nachgewiesen [10,11]. Sie scheinen auch für die Resorption von Peptiden, unter anderem Octreotid und Cyclosporin A, eine limitierende Rolle zu spielen. [11].

### 1.1.2.3 Enzymatische Absorptionsbarrieren

Im Gastrointestinaltrakt befindet sich eine Vielzahl von Enzymen, die Nahrungsbestandteile in kleinere resorbierbare Einheiten zerlegen. Für die Absorption von Peptidwirkstoffen stellen Peptidasen ein großes Problem dar. Durch enzymatischen Abbau verlieren diese Wirkstoffe ihre Wirksamkeit. In den Zellen sind ebenfalls einige metabolisierende Enzyme, wie Zytochrom P-450-Isoformen und Peptidasen, vorhanden [12].

### 1.1.2.4 Transportprozesse



transzellulär parazellulär Carrier-vermittelt Endozytose/Transzytose

Abb. 3 schematische Darstellung der Transportprozesse im Dünndarmepithel [13]

Transzelluläre Diffusion:

Die Plasmamembran und damit auch die Mikrovillimembran besteht aus einer Lipiddoppelschicht, in die Proteine ein- oder aufgelagert sind. Für den Stoffdurchtritt stehen zwei prinzipiell unterschiedliche Strukturen zur Verfügung: Die Lipidschicht zur Aufnahme lipophiler Stoffe und die wassergefüllten Poren für die Penetration hydrophiler Substanzen. Die Absorption über die Enterozytenmembran ist für lipophile Substanzen der bevorzugte Transportweg: Die Oberfläche der Microvilli ist mehr als 1000-mal größer als die des parazellulären Transportweges [13]

### Parazelluläre Diffusion:

Hydrophile Moleküle, zu denen auch die Peptide zählen, können nur im geringen Ausmaß transzellulär absorbiert werden. Sie werden über den parazellulären Transportweg, das heißt durch die *tight junctions* aufgenommen. Die Diffusion hängt hier entscheidend von der Molekülgröße, der Ladung und der Hydrophilie der Substanz ab [14,15,17].

### Carrier-vermittelte oder erleichterte Diffusion:

Für einige hydrophile Substanzen existieren im Dünndarm Carrier-Systeme. Substrate dieser Transportproteine sind vor allem Nahrungsbestandteile wie Glucose oder Aminosäuren. Der Dipeptid-Transporter schleust neben Produkten der Eiweißverdauung auch Peptidantibiotika, z.B. einige Cephalosporine, durch die Membran [12].

### Endozytose/Transzytose:

Unter Endozytose versteht man die Internalisierung von extrazellulären Partikeln oder Flüssigkeiten durch Membranvesikel. Pinozytose meint speziell die Endozytose von Flüssigkeiten, Phagozytose die Internalisierung größerer Partikel durch spezialisierte Zellen. Unter Transzytose versteht man den Transport eines Vesikels mit seinem Inhalt (flüssig oder partikulär) durch die Zelle. An der gegenüberliegenden Zelloberfläche wird der eingeschlossene Stoff wieder unverändert ausgeschleust [16].

## 1.1.3 Die gastrointestinale Mucusschicht

### 1.1.3.1 Zusammensetzung und Eigenschaften des Mucus

Die Hauptaufgabe der gastrointestinalen Mucusschicht ist der Schutz des Epithels vor Selbstverdauung und Magensäure. Die Mucusschicht erleichtert außerdem die Passage des Nahrungsbreis wie eine „Rutsche“.

Der Mucus ist ein viskoelastisches Gel. Er besteht zu 95% aus Wasser, außerdem aus Glykoproteinen, abgeschilferten Zellen, Proteinen und Elektrolyten. Obwohl die Glykoproteine nur 2-3% des Mucus ausmachen, sind sie für die speziellen Eigenschaften und die Struktur des Mucus verantwortlich.

### 1.1.3.2 Die Mucusschicht als Barriere für den Wirkstofftransport

Die Mucusschicht bildet auf dem Dünndarmepithel eine wässrige Absorptionsbarriere, die sogenannte *unstirred water layer*. Sie stellt eine hochquellfähige Glykoprotein-Gelschicht dar, die mit Wirkstoffmolekülen Wechselwirkungen eingehen kann und damit den reinen Diffusionsprozeß verlangsamt [18]. Diese Wechselwirkungen sind pH-abhängig aber nicht elektrostatischer Natur. Ein hydrophiles Molekül kann durch die wässrige Mucusphase ohne Wechselwirkung mit dem Glykoproteingerüst diffundieren. Die Diffusion wird dabei nur durch die Molekülgröße beeinflusst. Ein lipophiler Wirkstoff verteilt sich - abhängig vom Grad seiner Lipophilie - eher in die nicht-wässrige Mucusphase. Bestimmte Molekülstrukturen des Wirkstoffes können dabei über Wasserstoffbrückenbindungen oder hydrophobe Wechselwirkungen mit Mucusbestandteilen interagieren [19].

## 1.2 Absorptionmodelle

### 1.2.1 *In-vitro*- Modelle

#### 1.2.1.1 Physikalische Modelle

Die passive Absorption einer Substanz durch eine Biomembran hängt von drei physikochemischen Eigenschaften ab: der Lipophilie, der Polartität und der Molekülgröße der Substanz [20]. Die Lipophilie einer Substanz kann mit Hilfe des Octanol-Wasser-Verteilungskoeffizienten bestimmt werden. [24]. Dieser Koeffizient ermittelt die Verteilung des Wirkstoffs zwischen Wasser und n-Octanol bei pH 7,4 und simuliert damit auch das Eindringen des Wirkstoffes in die Biomembran. Angegeben wird der Verteilungskoeffizient in seiner logarithmierten Form als  $\log P$ . Substanzen, die gut absorbiert werden haben, einen  $\log P$  von 1-3 [21,22,23]. Wird ein  $\log P$  von 4 überschritten, sinkt die Permeabilität *in vivo* ab. Solche Substanzen können aufgrund ihrer hohen Lipophilie nur schwer durch das hydrophile Darmlumen zum Epithel diffundieren [25]. Substanzen mit einem  $\log D$  kleiner 0 sind hydrophil und permeieren schlecht in die Membran.

#### 1.2.1.2 Biophysikalische Modelle

Die **Langmuir-Adam-Oberflächenwaage** oder kurz der Langmuir-Trog ist ein gängiges Modell, um Monolayer an der Wasser-Luft-Grenzfläche zu untersuchen. Die Eigenschaften dieser Monolayer ähneln denen von Biomembranen.

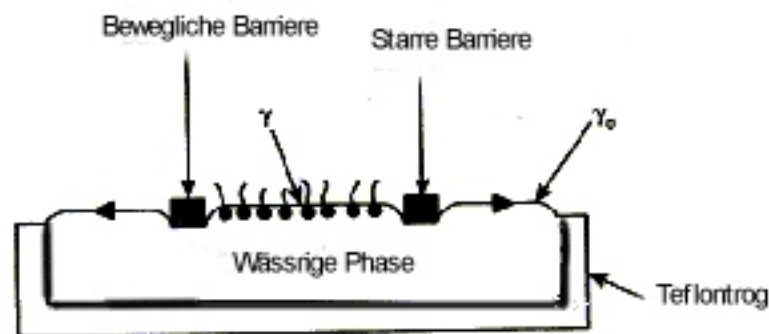


Abb. 4 Schematische Darstellung einer Langmuir-Adam-Oberflächenwaage [26]

Dabei werden in einem mit Wasser gefülltem Teflontrog in Wasser praktisch unlösliche oberflächenaktive Substanzen in einem leicht verdampfbaren Lösungsmittel auf die Wasseroberfläche aufgebracht. Das Lösungsmittel verdunstet und die amphiphilen Moleküle bilden einen Monolayer auf der Wasseroberfläche. Dieser Monolayer bildet sich zwischen zwei Teflon-Barrieren aus. Je nach Meßprinzip sind eine oder beide der Barrieren beweglich. Der Monolayer hat eine geringere Oberflächenspannung ( $\gamma$ ) als das reine Wasser ( $\gamma_0 = 72,8$  mN/m) außerhalb der Barrieren. Dadurch entsteht ein Oberflächendruck ( $\pi$ ), der auf die Barrieren in Richtung der reinen Wasseroberfläche wirkt. Dieser Druck wird entweder als Kraft pro Länge der unbeweglichen Barriere über einen mechanisch befestigten, kalibrierten Torsionsdraht oder mit Hilfe einer Wilhelmy-Waage gemessen. Für den Oberflächendruck gilt folgende Gleichung:

$$\pi = \gamma_0 - \gamma$$

In dem Monolayer nimmt jedes Teilchen einen bestimmten Raum ein. Sind die Barrieren maximal expandiert, nimmt jedes einzelne Molekül den größtmöglichen zur Verfügung stehenden Raum ein das heißt, die interpartikulären Wechselwirkungen sind gering. Fährt man die Barrieren kontinuierlich zusammen, so werden die Teilchen immer dichter zusammengeschoben. Es kommt zu Wechselwirkungen, die die Oberflächenspannung des Monolayers ( $\gamma$ ) weiter senken. Dadurch steigt der Oberflächendruck  $\pi$ . Irgendwann richten die Teilchen sich parallel zueinander aus. An diesem Punkt erreicht die Oberflächenspannung ein Minimum und der Druck ein Maximum. Fährt man die Barrieren noch weiter zusammen, kollabiert der Monolayer und die Oberflächenspannung steigt wieder an.

Mit Hilfe des Langmuir –Trops können auch Aussagen über das Adsorptionsverhalten von Peptiden an Lipidmonolayer gemacht werden. Dabei wird ein Lipid auf die Wasser- oder Pufferoberfläche aufgespreitet. Es bildet sich ein Monolayer. In die Wasser-oder Pufferphase (Subphase) wird dann eine Peptidlösung injiziert. Werden die Peptidmoleküle an den Monolayer adsorbiert oder gar in ihn inkorporiert, sinkt die Oberflächenspannung des Monolayers ab und es resultiert ein steigender Druck  $\pi$ . Das Ausmaß und die Geschwindigkeit der Druckänderung hängt dabei von der Struktur und Konformation des Peptidmoleküls ab.

Natürliche Membranen sind keine Monolayer sondern Bilayer. Um die aus Monolayer-Studien erhaltenen Erkenntnisse mit natürlichen Bilayer-Membranen vergleichen zu können, muß man den Oberflächendruck von Biomembranen kennen. Zu beachten ist, daß mit dem Langmuir-Trog die Wasser-Luft-Grenzfläche untersucht wird. Biomembranen dagegen befinden sich an einer Wasser-Öl-Grenzfläche. Es kann nur ein Bereich angegeben werden, in dem sich der Oberflächendruck natürlicher Bilayer bewegt: 30-50 mN/m [27,28,29].

Adsorptionen und Interaktionen von Molekülen oder Liposomen mit Biomembranen können im sogenannten *constant-pressure-mode* untersucht werden. Dabei wird wie oben beschrieben ein Lipidmonolayer aufgespreitet. Der Oberflächendruck wird während des gesamten Experiments konstant gehalten. Dieser Druck sollte dem eines natürlichen Bilayers ähnlich sein, also auch im Bereich von 30-50mN/m liegen. Wird unter einen solchen Monolayer ein Peptid injiziert und interagiert dieses mit der Lipidschicht, so kommt es zu einer Flächenvergrößerung des Lipidfilms, das heißt die Barrieren des Troges fahren auseinander. Die Flächenvergrößerung stellt ein Maß für die Bindung des Peptids an oder in den Lipidmonolayer dar. Es gilt folgende Gleichung:

$$X_b = n_p/n_L = (\Delta A/A) (A_L/A_P) \quad [119]$$

$X_b$ : Ausmaß der Peptidbindung

$N_p$ : Anzahl Peptidmoleküle

$N_L$ : Anzahl Lipidmoleküle

$A$ : Fläche des reinen Lipidmonolayers

$\Delta A$ : Flächenzuwachs nach Peptidinjektion

$A_L$ : Fläche eines Lipidmoleküls [ $\text{\AA}^2$ ]

$A_P$ : Fläche eines Peptidmoleküls [ $\text{\AA}^2$ ]

Kennt man das Ausmaß der Peptidbindung, kann man die von dem Peptidmolekül im Monolayer eingenommene Fläche bestimmen und erhält dadurch einen Hinweis über die Art, wie sich das Peptid im Monolayer einbaut [30].

Veränderungen in Biomembranen können auch mit Hilfe von **Fluoreszenz Anisotropiemessungen** untersucht werden. Regt man eine fluoreszierende Probe mit polarisiertem Licht an, so ist auch das von dieser Probe ausgestrahlte Licht polarisiert. Diese Polarisierung ist das Ergebnis der Photoselektion des Fluorophors, welche dessen Orientierung im Verhältnis zu der Richtung der Anregung entspricht. Die Messung der Polarisierung oder Anisotropiemessung gibt Aufschluß darüber, in welchem Winkel ein Fluorophor zwischen Absorption und darauffolgender Emission eines Photons verschoben wird. Diese Verschiebung hängt dabei von Art und Ausmaß der Rotationsbewegung dieses Fluorophors während des Bestehens des angeregten Zustands ab. Die Rotationsbewegung wiederum wird von der Viskosität des Lösungsmittels und der Größe und Form der die Bewegung verursachenden Substanz beeinflusst. Für einen in einem bestimmten Lösungsmittel gelösten Fluorophor hängt das Ausmaß der Rotationsbewegung von den Kräften ab, die die Viskosität des Lösungsmittel auf das Fluorophor ausübt. Das heißt: ändert sich die Viskosität des Lösungsmittel, so wird sich dies in einer Änderung der Fluoreszenz-Anisotropie bemerkbar machen. Insetiert man ein Fluorophor in eine Membran zB. eine Liposomenmembran, können durch Anisotropiemessungen die interne Membranviskosität oder die Effekte der einzelnen Membranbestandteile auf die Phasenübergangstemperatur bestimmt und untersucht werden.

### 1.2.1.3 Biologische Modelle

#### Zellen und Zellkulturen

Enterozyten sind polare Zellen. Apikale und basolaterale Membrandomänen stellen unterschiedliche Zellorganellen dar. Die Zellen haben eine säulenartige Form. In Suspension runden sich die Zellen ab und verlieren innerhalb kurzer Zeit ihre Polarität. Aus diesem Grund eignen sich suspendierte Enterozyten nicht als Absorptionsmodell des Dünndarms. Zellkulturen oder Zelllinien bilden unter Kulturbedingungen Monolayer aus und können darüber hinaus unbegrenzt gezüchtet werden. Menschliche Adenokarzinom-Zelllinien stellen die bisher beste Quelle für intestinale Epithelkulturen dar.

Nach ihrem Vermögen in Kultur auszudifferenzieren, können sie in vier Kategorien unterteilt werden [31,32].

|            |   |
|------------|---|
| Gruppe I   | spontane Differenzierung der Zellen, die charakterisiert wird durch eine Organisation der Zellen zu einem polarisierten Monolayer mit speziellen Transportproteinen und durch die Bildung einer Bürstensaummembran mit Enzymausstattung |
| Gruppe II  | differenzierte und undifferenzierte Zellen. Differenzierung ist durch Änderung der Standard-Kulturbedingungen induzierbar   |
| Gruppe III | polarisierte Monolayer mit <i>tight junctions</i> aber ohne Bürstensaummembran  |
| Gruppe IV  | undifferenzierte, unpolarisierte Multilayer   |

Als Modell für den intestinalen Transport kommen nur Linien der Gruppen I und II in Frage. Vertreter der Gruppe I ist die CaCo-2 Zelllinie, und als Vertreter der Gruppe II sei HT29 genannt

## CaCo-2 Zelllinie

Im Dünndarm selbst kommen sowohl bei Menschen als auch bei Versuchstieren so gut wie keine Tumoren vor. Dies erklärt, warum es derzeit keine Zelllinien aus Dünndarmgewebe gibt [33]. Die CaCo-2 Zelllinie stammt aus menschlichem Dickdarmtumorgewebe eines männlichen 72 jährigen Menschen kaukasischer Rasse [34,35]. Der Karyotyp ist hypertetraploid.

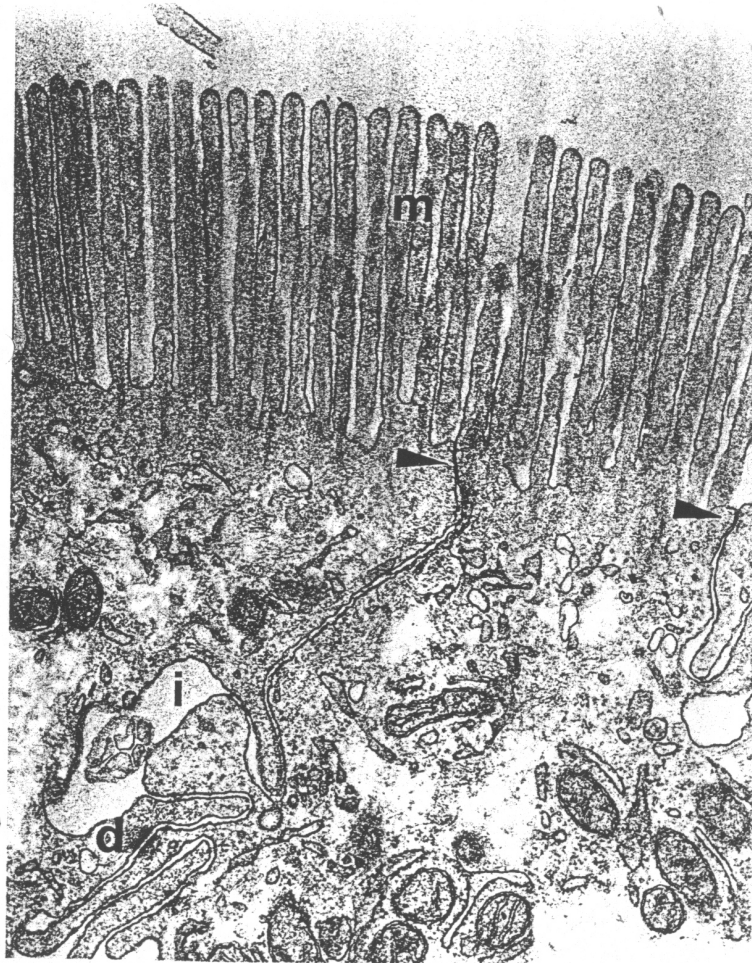


Abb. 5 Querschnitt durch den apikalen Teil eines CaCo-2 Monolayers  
M = Mikrovilli; i= interzellulärer Raum; d= Desmosomen  
Pfeile=tight junctions [36]

CaCo-2 Zellen haben eine säulenförmige Gestalt, die der der Enterozyten ähnelt. Sie besitzen eine gut ausgebildete Bürstensaummembran und *tight junctions*. Die *tight junctions* sind verhältnismäßig dicht. Der transepitheliale Widerstand ist mit  $300\Omega/\text{cm}^2$  [36] vergleichsweise hoch und ähnelt eher dem des Kolonepithels [37]. Einige charakteristische Enzyme der Bürstensaummembran werden auch in CaCo-2 Zellen exprimiert. In postkonfluenten Monolayern konnten Sukrase, Isomaltase, Lactase, Dipeptidylaminotransferase, Aminopeptidase und Peptidasen identifiziert werden [38,39,40].

CaCo-2 Monolayer haben kein einheitliches Erscheinungsbild. Sie sind morphologisch sehr heterogen. Man findet Zellen mit dichten Bürstensaum und solche, die fast keine Mikrovilli aufweisen. Insgesamt schwankt die Dichte der Mikrovilli pro  $\mu\text{m}$  apikale Oberfläche [41].

Vachon und Beaulieu finden drei abgegrenzte Wachstumsphasen: Phase 1 – der subkonfluente Monolayer ist homogen aber noch undifferenziert; Phase 2 – an Tag 0-20 nach

Erreichen der Konfluenz ist der Monolayer heterogen differenziert; Phase 3 – nach mehr als 30 Tagen nach Erreichen der Konfluenz ist der Monolayer homogen polarisiert und differenziert [42]. CaCo-2 Zellen sind reine absorptive Zellen, das heißt sie produzieren und sezernieren keinen Mucus im Gegensatz zu den HT29 Zellen.

CaCo-2 Zellen exprimieren verschiedene aktive dünndarmspezifische Transporter und Carrier: zum Beispiel den Di/Tripeptidtransporter [43,44] und den Gallensäure-Transporter [45]. Außerdem konnten in der apikalen Membran p-Glykoprotein und MRP<sub>2</sub> nachgewiesen werden [46,47,48].

Züchtet man CaCo-2 Zellen auf Nitrozellulose- oder Polycarbonatfiltern an, bilden sie konfluente Monolayer mit *tight junctions* zwischen benachbarten Zellen, die dem Dünndarmepithel stark ähneln. Sie differenzieren und polarisieren unter Kulturbedingungen spontan ohne Zusatz spezieller Induktoren [49,50].

Die CaCo-2 Zellkultur ist gegenwärtig das am besten charakterisierte und am häufigsten angewandte Modell für Absorptionsstudien unter den gängigen Zelllinien [51]. Übereinstimmung herrscht in der Literatur über den Wert des CaCo-2-Zellmodells für die Bestimmung der passiven Absorption von Wirkstoffen. In verschiedenen Studien wurden die in CaCo-2 Zellen gefundenen Werte mit Daten aus Tierversuchen oder Humanstudien verglichen und eine sehr gute Korrelation gefunden [52,53,54,55,56,57,58,59]. Weitere Vorteile des CaCo-2 Modells sind zudem der geringe Wirkstoffbedarf und die gute Standardisierbarkeit. Aktive Transportprozesse verlangen eine genaue Charakterisierung der beteiligten Transporter und deren Funktion. Dann liefert das CaCo-2 Modell auch hier gute Ergebnisse [60]. Insgesamt ist das CaCo-2 Zellkulturmodell ein gutes *Screening* System, um die Permeabilität neuer Substanzen vorherzusagen, und hilft damit, die Zahl der Tierversuche zu verringern.

#### 1.2.1.4 Mucosdiffusionsmodelle

Um den Einfluß der Mucusschicht auf die Absorption zu untersuchen, sind verschiedene Diffusions- oder Dialysesysteme entwickelt worden.

Turner et al. [61] entwickelten ein Membranmodell, bei welchem sich nativer Schweinemagenmucus zwischen zwei Polycarbonatmembranen befindet. Die 1mm dicke Mucusschicht trennt zwei Kompartimente, die mit konstanter Rührfrequenz gerührt werden. Cheema et al. [62] bedienen sich eines Kapillarsystems, bei dem sich der Mucus mit dem zu untersuchenden Stoff in einem 2 cm langen Kapillarsystem befindet, dessen Enden an beiden Seiten mit einer Membran verschlossen sind. Die Substanz diffundiert dann aus dem Mucus in eine gerührte Lösung. Verwendet wird auch hier Schweinemagenmucus.

Das Mucosdiffusionsmodell von Nimmerfall und Rosenthaler [63] verwendet Intestinalmucus. Es handelt sich hierbei um ein Dreikompartimentmodell, in welchem sich eine 500 µm dicke Mucusschicht befindet. Dies entspricht der Dicke der physiologischen Mucusschicht. Die mit diesem Modell ermittelten Massenflüsse korrelieren mit *in vivo* Daten aus Tierversuchen.

#### 1.2.2 *In-situ*- und *in-vivo*- Modelle

*In-situ* Modelle simulieren die Absorption von Wirkstoffen an narkotisierten Versuchstieren, zumeist Ratten. Im Gegensatz dazu werden *in vivo* Studien immer an unnarkotisierten



Versuchstieren oder Probanden durchgeführt. Zumeist handelt es sich dabei um Bioverfügbarkeitsstudien.

*In-situ* und ganz besonders *in vivo* Modelle können die tatsächlichen Vorgänge im Magen-Darm-Trakt in seiner Gesamtheit, daß heißt unter Berücksichtigung aller Barrieren und physiologischen Gegebenheiten wiederspiegeln, arbeiten aber trotzdem unter standardisierten Bedingungen. Bei den in den vorangegangenen Abschnitten genannten Modellen wurden dagegen immer nur einzelne Aspekte des Absorptionsprozesses berücksichtigt.

Bei den klassischen *in-situ* Modellen unterscheidet man Perfusionsmodelle des Dünndarms und Perfusionsmodelle der Gefäße.

Bioverfügbarkeitsstudien an Kleintieren, wie zum Beispiel Ratten, können auch unter *in-situ* Bedingungen durchgeführt werden. Dabei wird der narkotisierten Ratte entweder die Substanz per Schlundsonde verabreicht oder direkt in den Darm gespritzt. In bestimmten Zeitintervallen werden Blutproben aus der Schwanzvene oder der Halsvene entnommen.

Üblich ist allerdings, mit unnarkotisierten Tieren bzw. Probanden, das heißt unter *in vivo* Bedingungen zu arbeiten [64].

### 1.3 Absorptionenhancer

Ob Wirkstoffe gut oder schlecht absorbiert werden, hängt entscheidend von Moleküleigenschaften ab wie:

- der Lipophilie bzw. Hydrophilie des Moleküls,
- dem Molekulargewicht,
- der Ladung des Moleküls,
- der pH-Stabilität,
- der Empfindlichkeit gegenüber abbauenden Enzymen und
- der Affinität des Moleküls gegenüber den apikalen Effluxpumpen

Um die Wirkstoffabsorption zu verbessern, können einerseits chemische Veränderungen am Wirkstoffmolekül, wie Erhöhung der Lipophilie, Schutz vor enzymatischem Abbau oder Ausnutzung des Prodrugprinzips vorgenommen werden, oder es können dem Wirkstoff Absorptionenhancer zugesetzt werden.

Absorptionenhancer ermöglichen oder erleichtern die Aufnahme des Wirkstoffmoleküls durch das Darmepithel in den Blutkreislauf. Im weiteren Sinne werden auch Enzyminhibitoren wie  $\beta$ -Lactamase-Inhibitoren oder andere Proteaseinhibitoren zu den Absorptionenhancern gezählt [65].

#### 1.3.1 Einteilung der Absorptionenhancer

Die Absorptionenhancer können unter Berücksichtigung der chemischen Struktur grob in fünf Gruppen eingeteilt werden [65]:

- Chelatoren
- Tenside
- Gallensäuren
- Fettsäuren
- Nicht oberflächenaktive Substanzen

### 1.3.2 Wirkungsweisen und Toxizität von Absorptionenhancern

Absorptionenhancer verbessern oder ermöglichen die Aufnahme eines Wirkstoffes in den Blutkreislauf durch das Darmepithel je nach ihren Moleküleigenschaften und Strukturen nach unterschiedlichen Mechanismen.

Mögliche Wirkprinzipien sind dabei:

- Herabsetzung der Viskosität oder Elastizität der Mucusschicht durch Veränderung der rheologischen Eigenschaften des Mucogels
- Erleichterung des transzellulären Transports durch Erhöhung der Fluidität der Lipiddoppelschicht oder durch Interaktionen mit Protein- oder Lipidbestandteilen der Membranen.
- Erleichterung des parazellulären Transports durch Öffnen der *tight junctions* hervorgerufen durch Komplexierung von  $\text{Ca}^{2+}$  Ionen oder durch Interaktion mit Makromolekülen im Bereich der *tight junctions*.
- Umgehung der enzymatischen Barriere durch Inaktivierung metabolisierender Enzyme.
- Erhöhung der thermodynamischen Aktivität der Wirkstoffe [65].

Der absorptionsverbessernden Wirkung der einzelnen Enhancer liegen zumeist verschiedene Wirkprinzipien zugrunde.

Die meisten Absorptionenhancer weisen eine erhöhte Toxizität für das Dünndarmepithel auf. Je wirkungsvoller eine Substanz die Aufnahme eines Wirkstoffes verbessert, desto höher ist in den meisten Fällen auch ihre Toxizität. Dabei kommt es zum Verlust der Mikrovilli bis hin zu einer teilweisen Ablösung des Epithels.

### 1.3.3 Kritische Mizellbildungskonzentration (CMC)

Ein großer Teil der in der Literatur beschriebenen Resorptionenhancer und die im Rahmen dieser Dissertation untersuchten Gallensalze sind oberflächenaktive Substanzen. Für oberflächenaktive Substanzen ist die kritische Mizellbildungskonzentration eine wichtige Kenngröße.

Gibt man kleine Mengen löslicher amphiphiler Moleküle in Wasser, dann löst sich ein Teil als Monomer. Der andere Teil bildet einen Monolayer an der Wasser-Luft-Grenzfläche. Die Moleküle des Monolayers stehen dabei im Gleichgewicht mit den gelösten Monomeren. Aus jeder Monomerenkonzentration resultiert eine bestimmte Oberflächenspannung. Wenn die Monomerenkonzentration einen kritischen Wert erreicht, beginnt mit jedem weiteren zugesetzten Amphiphilmolekül die Bildung von Aggregaten den sogenannten Mizellen.

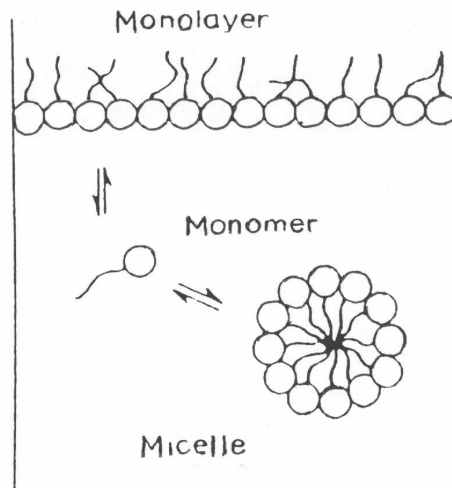


Abb.6: Schematische Darstellung der Mizellbildung [129]

Mizellen werden definiert als thermodynamisch stabile kolloidale Aggregate, die von amphiphilen Molekülen spontan über einen engen, definierten Konzentrationsbereich, der sogenannten kritischen Mizellbildungskonzentration (CMC), und bei einer Temperatur über der kritischen Mizellbildungstemperatur (CMT) gebildet werden [66]. Unterhalb der CMT bildet das Tensidmolekül unlösliche Kristalle. Die CMT üblicher nichtionischer Tenside und Gallensäuren liegt unterhalb 0°C. Bei der Mizellbildung ionischer Verbindungen spielt auch der pH-Wert der Lösung eine Rolle. Der CMpH beschreibt einen engen pH-Bereich unterhalb dem Detergentien in einer bestimmten Konzentration als unlösliche Verbindungen vorliegen und oberhalb dem diese gelöst spontan Mizellen bilden.

Die CMC eines Tensids ist umso niedriger, je hydrophober das Molekül ist. Verzweigungen in der hydrophoben Kette oder Doppelbindungen erhöhen die Lipophilie und erniedrigen die CMC. Die hydrophoben Molekülbereiche befinden sich im Inneren der Mizelle. Die hydrophilen Anteile ragen aus ihr heraus. Durch elektrostatische Abstoßungen zwischen den hydrophilen Kopfgruppen kann die Aggregation erschwert werden. Daher haben ionische Tenside meist eine höhere CMC als nichtionische.

Einfluß auf die CMC haben neben Temperatur und Molekülstruktur auch die Ionenstärke des Wassers, der pH-Wert und Lösungsmittel, wie z.B. Alkohol. Elektrolyte und Substanzen, die die Struktur des Wasser brechen, zum Beispiel Harnstoff, erniedrigen die CMC.

Die Anzahl der Moleküle, die sich zu Mizellen aggregieren, ist abhängig vom betrachteten Tensid und unterliegt auch dort geringen Schwankungen. Sie reicht von 2 bis zu 200 Molekülen. Nichtionische Tenside haben zumeist eine niedrige CMC und hohe Aggregationszahlen, wohingegen ionische Tenside hohe CMC und niedrige Aggregationszahlen aufweisen [66].

Die CMC kann auf verschiedene Arten bestimmt werden. Die gebräuchlichsten sind: konzentrationsabhängige Messung der Oberflächenspannung, der Leitfähigkeit oder der Lichtbrechung.

## 1.4 Gallensäuren

### 1.4.1 Vorkommen und Aufgaben im Organismus

Die Gallensäuren als Bestandteil der Gallenflüssigkeit werden in der Leber aus Cholesterol gebildet. Die menschliche Leber sezerniert innerhalb 24 Stunden 500-1000ml Gallenflüssigkeit. Beim Menschen wird die in der Leber gebildete Lebergalle in der

Gallenblase gesammelt. Die Gallensäuren machen mit etwa 7,5% nach Wasser den zweitgrößten Bestandteil der Blasengalle aus. Weitere wichtige Gallenbestandteile sind Phospholipide (Lecithin), Cholesterin und Gallenfarbstoffe.

Galle ist dem Blutplasma annähernd isoton, der pH-Wert liegt zwischen 7,4 und 8,5.

Zusammensetzung des Gallensalzpool des Menschen nach [67]:

| Gallensalz        | Poolgröße [mg] | Anteilige Umsatz-Rate [d] | Tägliche Neusynthese [mg] |
|-------------------|----------------|---------------------------|---------------------------|
| Cholat            | 500-1500       | 0.2-0.5                   | 180-360                   |
| Desoxycholot      | 200-1000       | 0.2-0.3                   |                           |
| Chenodesoxycholot | 500-1400       | 0.2-0.3                   | 100-250                   |
| Lithocholat       | 50-100         | 1.0                       |                           |
| Gesamt            | 1250-4000      |                           | 280-610                   |

Gallensäuren und Phospholipide bilden in der Gallenflüssigkeit gemischte Mizellen, die das unlösliche Cholesterin solubilisieren. Das physiologische Gewichtsverhältnis ist dabei: Cholesterin:Phospholipid:Gallensäure = 1:3:15-20.

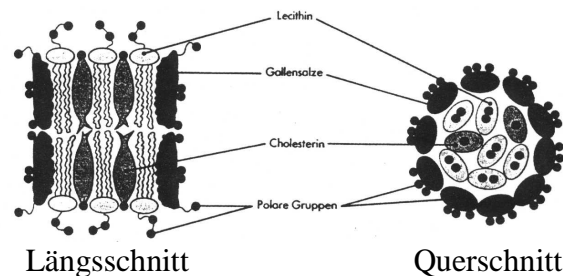


Abb. 7: Schematische Darstellung einer Mischmizelle aus Gallensalz, Cholesterin und Lecithin [68]

Die Gallensäuren sind amphiphile, oberflächenaktive Substanzen. Ihre Hauptaufgabe im Organismus ist die Solubilisierung von Nahrungsfetten. Dabei werden sie zunächst an die Oberfläche von Triglyceriden adsorbiert und bilden mit Hilfe der Phospholipide und Cholesterin stabile Emulsionen, die dann in gemischte Mizellen übergehen. Fettabbauende Enzyme aus der Bauchspeicheldrüse (Lipasen) zerlegen die Triglyceride in Fettsäuren und Monoglyceride. Phospholipide, Cholesterin, Monoglyceride und Gallensäuren bilden gemischte Mizellen und diffundieren an die Darmwände. Die Mizellen erleichtern den Diffusionsprozeß und ermöglichen den Transport der Nahrungsfette durch die *unstirred-water-layer* an die Enterozytenoberfläche. Dort werden die Nahrungsfette in Chylomikronen und VLDL gespeichert und über die Lymphe weitertransportiert. Gallensäuren, Cholesterin und Phospholipide werden wieder in das Darmlumen abgegeben. Auf diese Art ist der Gallensäurepool in der Lage, ein 25-faches seines Gewichts an Nahrungsfett zu transportieren. Der Transport fettlöslicher Vitamine erfolgt auf demselben Wege.

Gallensäuren aktivieren zusätzlich die Pankreaslipase und die Cholesterinesterase und fördern damit den enzymatischen Aufschluß der Nahrungslipide. Ferner regen sie die Gallensekretion durch die Leber an. Mit der Gallenflüssigkeit werden zahlreiche Medikamente, Gifte, Schwermetalle, Bilirubin und Hormonmetabolite in den Intestinaltrakt ausgeschieden. Die Galle trägt also auch zu Entgiftung des Organismus bei [69].

### 1.4.2 Primäre und sekundäre Gallensäuren

Cholsäure und Chenodesoxycholsäure sind primäre Gallensäuren, die in der Leber aus Cholesterol gebildet werden. Das Grundgerüst der natürlichen Gallensäuren ist die 5 $\beta$ -Cholansäure. Die Ringe A und B des Grundgerüsts sind bei Gallensäuren gewöhnlich cis verknüpft. Das Wasserstoffatom an C4 ist dadurch axial angeordnet. Die natürlichen Gallensäuren sind Mono-, Di- oder Trihydroxyderivate dieses Cholansäuregerüsts. Sekundäre Gallensäuren wie Deoxy- und Lithocholsäure sind bakterielle Abbauprodukte der primären Gallensäuren [70]. Cholsäure und Chenodesoxycholsäure werden im Darm bakteriell dekonjugiert und an C7 zu Desoxy- bzw. Lithocholsäure dehydroxiliert.

### 1.4.3 Gallensäuren als natürliche Surfactants

Die Hauptaufgabe der Gallensäuren im Organismus ist die Solubilisierung von Nahrungslipiden. Gallensäuren sind natürliche Amphiphile. Das Molekül besitzt eine polare und eine apolare Seite. Aufgrund ihres amphiphilen Charakters sind sie oberflächenaktiv und bilden oberhalb ihrer CMC Mizellen. Gallensäuremizellen unterscheiden sich deutlich von denen der ionischen oder nichtionischen Tenside: die Zusammenlagerung zu Aggregaten erstreckt sich über einen Konzentrationsbereich, eine definierte CMC gibt es nicht. Die Aggregationszahl der Gallensäuremizellen schwankt von 2-9. Wahrscheinlich assoziieren die Moleküle, indem sie sich mit ihren hydrophoben Bereichen Rücken an Rücken zusammenlagern und die hydrophilen Teile nach außen strecken. Diese sogenannten primären Mizellen können sich weiter zu sekundären Mizellen assoziieren. Die genaue Struktur dieser sekundären Mizellen ist nicht bekannt [71].

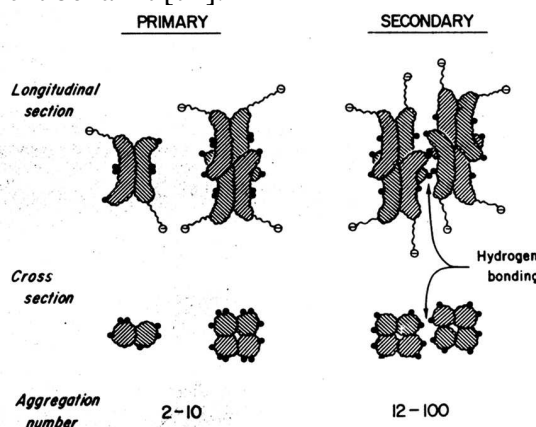


Abb. 8: Wahrscheinliche Struktur primärer und sekundärer Gallensalmizellen nach [71]

Für die CMC und die Tenseigenschaften spielt die Struktur der Gallensäure eine große Rolle. Dihydroxygallensäuren wie Desoxycholsäure und Chenodesoxycholsäure haben aufgrund ihrer größeren Lipophilie eine niedrigere CMC als Trihydroxygallensäuren wie Cholsäure. Der Einfluß der Lipophilie auf die CMC wird besonders deutlich, vergleicht man Urso- und Chenodesoxycholsäure. Diese unterscheiden sich nur in der Konfiguration der OH-Gruppe an C7. Bei Ursodesoxycholsäure ist diese  $\beta$ -konfiguriert, was das Molekül hydrophiler macht. Daraus resultiert eine zweimal höhere CMC.

Konjugation mit Taurin oder Glycin hat keinen direkten Einfluß auf die CMC. Durch die Erniedrigung des pKs der jeweiligen Säure wird der pH-Bereich erweitert, in dem die Gallensäure als Anion gelöst vorliegt. Unkonjugierte Gallensäuren fallen bei pH-Werten um 7

als freie Säuren aus. Das heißt: konjugierte Gallensäuren können über einen weiten pH-Bereich Mizellen bilden.

| Gallensäure              | OH-Gruppen                          | Löslichkeit in Wasser [ $\mu\text{M}$ ] * | CMC in Wasser [mM] | pks  |
|--------------------------|-------------------------------------|---|--------------------|------|
| Lithocholat              | 3 $\alpha$                          | 0.05                                      |                    | 5.03 |
| Desoxycholot             | 3 $\alpha$ ,12 $\alpha$             | 28  | 10                 | 5.3  |
| Glycodesoxycholot        | 3 $\alpha$ ,12 $\alpha$             | 6   | 6                  | 4.69 |
| Taurodesoxycholot        | 3 $\alpha$ ,12 $\alpha$             |   | 6                  | 1.93 |
| Chenodesoxycholot (CDCA) | 3 $\alpha$ ,7 $\alpha$              | 27  | 9                  | 5.88 |
| Glyco-CDCA               | 3 $\alpha$ ,7 $\alpha$              | 7   | 6                  | 4.23 |
| Tauro-CDCA               | 3 $\alpha$ ,7 $\alpha$              |   | 7                  |      |
| Ursodesoxycholot (UDCA)  | 3 $\alpha$ ,7 $\beta$               | 9   | 19                 | 5.08 |
| Glyco-UDCA               | 3 $\alpha$ ,7 $\beta$               | 3   | 12                 |      |
| Tauro-UDCA               | 3 $\alpha$ ,7 $\beta$               |   | 8                  |      |
| Cholat                   | 3 $\alpha$ ,7 $\alpha$ ,12 $\alpha$ | 273                                       | 13                 | 4.98 |
| Glycocholot              | 3 $\alpha$ ,7 $\alpha$ ,12 $\alpha$ | 32  | 12                 | 3.95 |
| Taurocholot              | 3 $\alpha$ ,7 $\alpha$ ,12 $\alpha$ |   | 10                 | 1.85 |

Physikochemische Eigenschaften natürlicher Gallensäuren [72].

\*: Die Löslichkeit der unkonjugierten Gallensäuren wurde bei pH 3 bestimmt, die der Glycinkonjugate bei pH 2. Das heißt, die Werte in der Tabelle stellen die Löslichkeit der freien Säure dar. Die Löslichkeit der Taurinkonjugate konnte nicht bestimmt werden. [73]

#### 1.4.4 Gallensäuren als Resorptionsenhancer

Zahlreiche Studien haben gezeigt, daß Gallensalze in Konzentrationen unterhalb ihrer CMC die Membranpermeabilität erhöhen und in höheren Konzentrationen zur einem Aufreißen der Membran und Solubilisation ihrer Bestandteile führen.

Im Unterschied zu anderen Detergentzien werden Proteine dabei nicht denaturiert [66,74]. Gallensalze wie Chenodesoxycholot, Desoxycholot, Ursodesoxycholot, Cholat und Taurocholot sind in zahlreichen Studien als Resorptionsenhancer eingesetzt worden [75,76,77,78,79,80,81,82,83].

Dabei hat sich gezeigt, daß Monohydroxygallensalze (Lithocholat) bessere Resorptionsenhancer sind als Dihydroxygallensalze (Chenodesoxycholot, Desoxycholot) und diese wiederum bessere Enhancer sind als Trihydroxygallensalze (Cholat), daß aber die Toxizität für das Epithel die gleiche Reihenfolge aufweist. Ein Gallensalz ist ein um so besserer Resorptionsenhancer, je hydrophober das Molekül ist. Ursodesoxycholot ist aufgrund seiner höheren Hydrophilie (s. 1.4.1.3) ein deutlich schlechterer Enhancer als Chenodesoxycholot. Konjugation mit Taurin oder Glycin erhöht ebenfalls die Hydrophilie des Moleküls und verringert die aufnahmeverbessernde Wirkung.

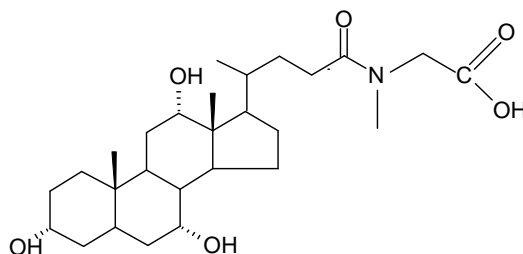
### 1.4.5 Toxizität

Chenodesoxycholat und Ursodesoxycholat werden in Dosen bis zu 1g/Tag zur medikamentösen Auflösung von Gallensteinen verabreicht. Die häufigste Nebenwirkung ist Diarrhoe, die in der Therapie mit CDCA bei 50% der Patienten auftritt. CDCA verhindert die Wasserrückresorption im Colon und induziert Wasser- und Elektrolytsekretion [84]. Die im Tierversuch beobachtete Hepatotoxizität konnte beim Menschen nicht nachgewiesen werden. Konzentrationsabhängig und abhängig von der Hydrophobizität des Moleküls verhindern Gallensalze die Rückresorption von Wasser und Elektrolyten (vor allem  $\text{Na}^+$ ) [85,86,87,88,89,90]. Gallensäuren, allen voran die sekundären Gallensäuren Litho- und Desoxycholsäure, werden als Kokarzinogene angesehen. Lithocholsäure erwies sich im Tierversuch als mutagen [91,25]. Das Auftreten von Karzinomen des Kolons steht in Verbindung mit Nahrung, die reich an tierischen Fetten ist. Diese führt wiederum zu einer erhöhten Gallensäuresekretion. Dadurch werden vermehrt sekundären Gallensäuren mit kokarzinogenen Potential gebildet. Durch die schädigende Wirkung dieser Gallensäure auf das Kolonepithel kommt es zu vermehrter Zellproliferation und Mutationen in diesem Gewebe. Fettreiche Kost verlangsamt die Magen-Darm-Passage des Nahrungsbreis. Das Kolonepithel ist damit dem schädigendem Einfluß der Gallensalze länger ausgesetzt [92]. Darüber hinaus schädigen Gallensalze wie CDCA und DOC nachweislich die DNS und fördern damit Mutationen im Kolongewebe [93].

### 1.4.6 Synthetische Gallensäuren

Maßgeblich für die Toxizität der Gallensalze ist neben der Lipophilie des Moleküls vor allem die Bildung sekundärer Gallensalze durch bakteriellen Abbau. Deshalb ist ein Bestreben bei der Entwicklung synthetischer Gallensäuren, das Molekül gegen bakteriellen Abbau zu schützen. Konjugierte Gallensalze sind keine Substrate der bakteriellen  $7\alpha$ -Dehydroxylase [94]. Bestimmte intestinale Bakterienstämme sind in der Lage, die Amidbindung der Seitenkette aufzulösen und Gallensäuren zu dekonjugieren. Eine synthetische Gallensäure sollte somit eine sterisch geschützte Amidbindung in der Seitenkette aufweisen, um so gegen bakteriellen Abbau geschützt zu sein.

**Cholylsarcosin**, ein Konjugat der Choläure mit Sarcosin (N-Methylglycin) verfügt über eine sterisch geschützte Seitenkette und wird nicht bakteriell dekonjugiert oder  $7\alpha$ -dehydroxyliert, bildet also keine sekundären Gallensalze.



Strukturformel Cholylsarcosin

Entwickelt wurde es zur Gallensäuresubstitutionstherapie bei Fettmalabsorptionsyndrom aufgrund von Mangel an natürlichen Gallensäuren.

Cholylsarcosin (CS) mit einer CMC von 11 mmol/l und einem pks-Wert von 3.7 hat ähnliche Eigenschaften wie Glycocholat, eine natürliche Gallensäure. Es fördert die Lipolyse und hat eine vergleichbare Kapazität, Nahrungsfette zu solubilisieren. Im Colon verursacht es keine Wasser- oder Elektrolytsekretion. Es ist nicht hepatotoxisch. Es solubilisiert Cholesterol in der Galle und hat dabei eine ähnliche Kapazität wie Taurocholat [95,96,97,98,99].

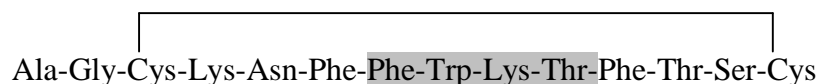
Cholylsarcosin ist in seinen physikochemischen und physiologischen Eigenschaften den natürlichen Konjugaten der Cholsäure sehr ähnlich. Seine resorptionsverbessernden Eigenschaften sind noch nicht untersucht worden.

## 1.5 Modellpeptide

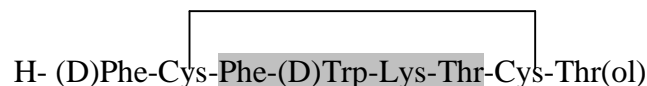
Für die Resorptionsversuche wurden zwei therapeutisch relevante Peptide eingesetzt, nämlich das Somatostatinanalogon Octreotid und das Vasopressinanalogon Desmopressin.

### 1.5.1 Octreotid

Octreotid ist ein Analogon des Hypothalamus-Hormons Somatostatin. Es ist im Gegensatz zu diesem weitgehend inert gegen proteinmetabolisierende Enzyme.



Somatostatin



Octreotid

Octreotid ist ein cyclisches Octapeptid mit einem Molekulargewicht von 1019 Dalton. Seine formale Ladung beträgt +2. Es bindet an neutrale und negativ geladene Membranen [103].

Es stellt eine Abwandlung des aktiven Zentrums Phe-Trp-Lys-Thr des nativen Somatostatin dar. Somatostatin bewirkt in der Hypophyse eine Unterdrückung der Wachstumshormonsekretion. Darüber hinaus hemmt es die glucosestimulierte Ausschüttung von Insulin. Durch die strukturelle Veränderung weist Octreotid eine höhere Selektivität für die Wachstumshormonhemmung auf. Erst in hohen Dosen kommt es zusätzlich zu einer Beeinflussung der Insulinsekretion. Octreotid hat eine deutlich längere Plasmahalbwertszeit von 90 min nach i.v. Infusion als Somatostatin mit 2 min [100]. Octreotid wird im Gastrointestinaltrakt resorbiert. Die Bioverfügbarkeit im Menschen liegt bei 0,3%. Die oral erreichbare Bioverfügbarkeit ist allerdings zu gering, um therapeutische Effekte zu erzielen [101,102]. Octreotid ist als Sandostatin® in parenteralen Formulierungen auf dem Markt.

Somatostatin und Octreotid haben ein breites Wirkungsspektrums. Sie wirken sowohl auf das neuroendokrine System als auch im Gastrointestinaltrakt.

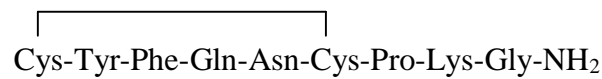


### 1.5.2 Desmopressin

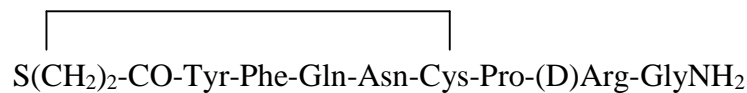
Desmopressin ist ein Analog des Hypophysenhinterlappenhormons Vasopressin oder Adiuretin. Es wurde in den 60er Jahren von einer tschechischen Arbeitsgruppe entwickelt [104].



natürliches Arginin-Vasopressin



natürliches Lysin-Vasopressin



Desmopressin ( 1-desamino-8-D-arginin-vasopressin)

Die natürliche Aufgabe des Vasopressin besteht darin, die Harnkonzentrierung in der Niere durch Rückresorption von Wasser zu fördern. Dafür sind geringe Dosen erforderlich. In höheren Dosen bewirkt es eine Kontraktion sämtlicher glatter Muskeln. Dadurch kommt es zu einer Erhöhung des Blutdrucks, Steigerung der Darmperistaltik und einem erhöhten Tonus der Gallen- und Harnwege. Zusätzlich stimuliert es über einen unbekanntenen Mechanismus die Bildung des Blutgerinnungsfaktor VIII.

Desmopressin ist aufgrund seiner strukturellen Veränderungen weitgehend inert gegen proteolytische Enzyme und hat damit eine höhere Plasmahalbwertszeit [105]. Außerdem weist es eine größere Selektivität im Hinblick auf die antidiuretische Wirkung auf. Es hat nahezu keine Wirkung auf die glatte Muskulatur und damit auf den Blutdruck. Lysin- und Argininvasopressin haben ein Antidiurese/Vasopression - Verhältnis von 1. Desmopressin von 79 in niedrigen Dosen und 2500-4500 in höheren Dosen [106].

Desmopressin kann nasal und oral verabreicht werden [107]. Die Bioverfügbarkeit nach oraler Gabe liegt bei 0,19% , bei nasaler Applikation bei 3-4%. Die Wirkung hält 12 Stunden an. Klinisch wird Desmopressin zur Behandlung von Diabetes insipidus und seit kurzen auch bei leichten Fällen von Hämophilie A eingesetzt. Auf dem Markt ist Desmopressin als Tablette, parenterale Zubereitung und Nasenspray (Minirin®).

## 1.6 Zielsetzung

Ziel dieser Dissertation ist es zu untersuchen, ob Cholylsarcosin, eine synthetische Gallensäure, als Resorptionsenhancer für die Aufnahme von Peptidwirkstoffen aus dem Gastrointestinaltrakt geeignet ist.

An CaCo-2 Zellen soll die Permeabilität von Modellpeptiden in An- und Abwesenheit von Cholylsarcosin bestimmt werden.

Im Tierversuch sollte die Bioverfügbarkeit von Modellpeptiden mit und ohne Gallensalzzusatz bestimmt werden.

Vergleichend dazu sollen natürliche Gallensalze wie Chenodesoxycholol, Ursodesoxycholol und Taurocholol auf ihre resorptionsverbessernden Eigenschaften untersucht werden.

Ein weiterer Schwerpunkt liegt in der Untersuchung der Zytotoxizität von Cholylsarcosin und natürlicher Gallensalzen an CaCo-2 Zellen mit Hilfe geeigneter Methoden.

Schließlich sollen Untersuchungen zum Wirkungsmechanismus der Gallensalze durchgeführt werden. Dazu soll

der Einfluß der Gallensalze auf den parazellulären Transportweg

Interaktionen der Peptide und Gallensalze mit Modellmembranen im Langmuir-Adam-Trog

der Einfluß der Gallensalze auf den Ordnungszustand der epithelialen Zellmembran

der Einfluß der Gallensalze auf die Wirkstoffdiffusion durch die intestinale Mucusschicht untersucht werden.

Abschließend soll das resorptionsverbessernde Potential der einzelnen Gallensalze und deren Toxizität im Hinblick auf einen möglichen Einsatz in der Pharmakotherapie beurteilt werden.

Als Modellpeptide werden Octreotid und Desmopressin ausgewählt.

## 2 MATERIALIEN UND METHODEN

### 2.1 Substanzen

#### 2.1.1 Chemikalien und Reagenzien

In Tabelle 2.1 und 2.2 sind alle in Rahmen dieser Dissertation verwendeten Chemikalien, Puffer und Medien aufgelistet.

**Tabelle 2.1:** Chemikalien und Reagenzien

| Bez.  | Substanz                                     | Qualität                  | Hersteller                               |
|---|--|---------------------------|--|
| [ <sup>14</sup> C] Octreotid                    |  | .                         | Novartis, Basel, (CH)                    |
| [ <sup>14</sup> C] PEG 4000                     | Polyethylenglykol 4000                       | 1,85 MBq/ml<br>50 µCi/ml  | Amersham Pharmacia Biotech               |
| Ameisensäure                                    |  | p. a.                     | Merck, Darmstadt (D)                     |
| Arginin-8-[tyrosyl- <sup>3</sup> H]-vasopressin |  | 9,25 MBq/ml<br>250 µCi/ml | Amersham, Braunschweig, (D),             |
| BSA   | Albumin aus Rinderserum                      |                           | Fluka, Buchs (CH)                        |
| C <sub>2</sub> H <sub>5</sub> OH                | Ethanol 96%                                  |                           | Theoretikum, Heidelberg (D)              |
| CaCl <sub>2</sub> × 2 H <sub>2</sub> O          | Calciumchlorid-dihydrat                      | p.a.                      | Riedel de Haen, Seelze (D)               |
| Carboxyfluorescein-Na                           | 5-Carboxyfluoreszein                         | 99%                       | Sigma, Deideshofen (D)                   |
| CH <sub>3</sub> COOH                            | Essigsäure                                   | p. a.                     | Merck, Darmstadt (D)                     |
| Chenodesoxycholsäure                            |  | p.a.                      | Falk Freiburg i. B. (D)                  |
| Chloroform                                      |  | p. a.                     | Merck, Darmstadt (D)                     |
| Cholylsarcosin-Na                               |  | p.a.                      | Diamalt, München (D)                     |
| Desmopressinacetat                              | [deamino-Cys-D-Arg8]-Vasopressinacetat       |                           | Sigma, Deideshofen (D)                   |
| DMPC  | DL-α-Dimyristoylphosphatidylcholin           |                           | Avanti Polar Lipids, Alabaster (Al, USA) |
| DMSO  | Dimethylsulfoxid                             | p. a.                     | J.T. Baker, Deventer (NL)                |
| DOPC  | 1,2-Dioleoyl-SN-glycero-3-phosphatidylcholin |                           | Avanti Polar Lipids, Alabaster (Al, USA) |
| DPH   | 1,6-Diphenylhexatrien                        |                           | Sigma, Deideshofen (D)                   |

| <b>Bez.</b>   | <b>Substanz</b>                                 | <b>Qualität</b>                           | <b>Hersteller</b>                       |
|---|---|---|---|
| Dulbecco`s Modified Eagle Medium (1X) mit GLUTAMAX™ | Zusammensetzung s. Tab. 2.2                     | für die Zellkultur, steril                | Gibco Life Technologies, Karlsruhe (D)  |
| EDTA  | Ethylendiamin-tetraessigsäure                   | p. a.                                     | Merck, Darmstadt (D)                    |
| FD 70   | Fluoreszeinisothiocyanat-Dextran 70000          |   | Sigma, Deisenhofen (D)                  |
| FD-4  | Fluoreszeinisothiocyanat-Dextran 4000           |   | Sigma, Deisenhofen (D)                  |
| FKS   | Fötale Kälberserum                              | EG zugelassen, für die Zellkultur, steril | Gibco, Karlsruhe (D)                    |
| Glucose   | D(+)-Glucose                                    | für Biochemie                             | Merck, Darmstadt (D)                    |
| Glutaraldehyd                                       | Glutaraldehyd 25%                               | p. a.                                     | Merck, Darmstadt (D)                    |
| Glycerin  | Glycerin 85%                                    | Ph. Eur.                                  | Theoretikum, Heidelberg (D)             |
| HDAF  | 5-hexadecanoyl-aminofluorescein                 |   | Molecular Probes MoBiTec, Göttingen (D) |
| Helmanex  | Tensidlösung                                    |   | Helma, München (D)                      |
| HEPES   | 4-(2-Hydroxyethyl)-piperazin-1-ethansulfonsäure | Pufferqualität                            | Applichem, Darmstadt (D)                |
| Isopropylalkohol                                    |   | p. a.                                     | Theoretikum, Heidelberg (D)             |
| $K_2HPO_4 \times 3 H_2O$                            | Dikaliumhydrogenphosphat-trihydrat              | p.a.                                      | Merck, Darmstadt (D)                    |
| KCl   | Kaliumchlorid                                   | p.a.                                      | Ferak, Berlin (D)                       |
| $KH_2PO_4$  | Kaliumdihydrogenphosphat                        | p.a.                                      | Gerbu, Gaiberg (D)                      |
| LDH (LD-L)  | Enzym- Assay                                    |   | Sigma Diagnostics, Deideshofen (D)      |
| LDH-Enzym   | Lactatdehydrogenase aus Rinderherz              | 1000U/ml                                  | Sigma Diagnostics, Deideshofen (D)      |
| L-Glutamin DMEM (100X)                              | für L-Glutamin 200mM = 29,2 mg/ml               | für die Zellkultur, steril                | Gibco Life Technologies, Karlsruhe (D)  |
| Methanol  |   | p. a.                                     | Theoretikum, Heidelberg (D)             |
| $MgCl_2 \times 6 H_2O$                              | Magnesiumchlorid-hexahydrat                     | p.a                                       | J.T. Baker, Deventer (NL)               |
| $Na_2HPO_4 \times 2 H_2O$                           | Di-Natriumhydrogenphosphat-dihydrat             | p.a.                                      | Riedel de Haen, Seelze (D)              |

| <b>Bez.</b>                             | <b>Substanz</b>  | <b>Qualität</b>            | <b>Hersteller</b>                               |
|---|--|----------------------------|---|
| NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>        | Natrium-dihydrogenphosphat   | p.a.                       | Riedel de Haen<br>Seelze (D)                    |
| NaCl                                    | Natriumchlorid   | p.a                        | J.T. Baker,<br>Deventer (NL)                    |
| NaHCO <sub>3</sub>                      | Natriumhydrogen-carbonat   | für Zellkultur             | Sigma, Deisenhofen (D)                          |
| Natrium-Taurocholat                     |  | 97%                        | Sigma, Deideshofen (D)                          |
| Natrium-Ursodesoxycholat                |  | 97%                        | Calbiochem,<br>Bad Soden (D)                    |
| Natriumazid                             |  |                            | Riedel de Haen,<br>Seelze (D)                   |
| Natrium-Chenodesoxycholat               |  | 97%                        | Sigma, Deideshofen (D)                          |
| Natriumcholat                           |  | 98%                        | Fluka,Buchs (CH)                                |
| Natrium-Pyruvat<br>MEM 100 mM           | Natirumpyruvat   | für die Zellkultur, steril | Gibso Life Technologies,<br>Karlsruhe (D)       |
| Natriumziträt                           |  |                            | Sigma, Deideshofen (D)                          |
| NBD-Octreotid                           | Octreotid NBD gelabelt   |                            | Novartis, Basel (CH)                            |
| Nembutal                                | Pentobarbital-Na<br>50 mg/ml   | USP                        | Abbot, North Chicago,<br>IL (USA)               |
| Nichtessentielle Aminosäuren MEM (100X) | Zusammensetzung s. Tab. 2.2  | für die Zellkultur, steril | Gibso Life Technologies,<br>Karlsruhe (D)       |
| Octreotid                               |  | p.a.                       | Novartis, Basel, (CH)                           |
| Paraformaldehyd                         |  | p.a.                       | Merck, Darmstadt (D)                            |
| Penicillin-Streptomycin                 | Penicillin 10000 IU/mL<br>Streptomycin 10000 UG/mL   | steril                     | Gibco Life Technologies,<br>Karlsruhe (D)       |
| Phalloidin-FITC                         | Phallotoxin gelabelt<br>FITC   |                            | Sigma, Deideshofen (D)                          |
| PreMix WST-1                            | 4-[3-(4-iodophenyl)-2-(4-nitrophenyl)-2H-5-tetrazolio]-1,3-benzendisulfonat (WST-1) und NAD <sup>+</sup> | steril                     | TaKaRa Biomedicals,<br>Grennevilliers (F)       |
| Propidiumiodid                          |  | 95%                        | Sigma, Deisenhofen (D)                          |
| Protein-Assay II                        |  |                            | Biorad, München (D)                             |
| Puragel                                 | Gelatine   |                            | Rousselot, SKW<br>Biosystems,<br>Düsseldorf (D) |
| Reinstwasser                            | Wasser<br>Reinstwasseranlage   | aus                        | Hauseigene Anlage                               |

| <b>Bez.</b>               | <b>Substanz</b>                               | <b>Qualität</b>            | <b>Hersteller</b>                      |
|---------------------------|---|----------------------------|--|
| Saccharose                |   | p.a.                       | Sigma, Deideshofen (D)                 |
| Triton <sup>®</sup> X-100 |   |                            | Merck, Darmstadt (D)                   |
| Trypanblau                |   | 70%                        | Sigma, Deideshofen (D)                 |
| Trypsin-EDTA (10X)        | 0,5 g Trypsin (1:250)<br>0,2 g EDTA pro Liter | für die Zellkultur, steril | Gibco Life Technologies, Karlsruhe (D) |
| Ultima Gold               | Szintillationscocktail                        |                            | Packard, Groningen (NL)                |
| Ursodesoxycholsäure       |   | p.a.                       | Falk, Freiburg i. B.(D)                |
| Vectashield <sup>®</sup>  | Eindeckmedium für<br>Fluoreszenzmikroskopie   |                            | Linaris, Wertheim-Bettingen (D)        |
| Wasser                    | bidestilliertes Wasser                        |                            | hauseigene Destille                    |
| Zitronensäure-Monohydrat  |   |                            | Sigma, Deideshofen (D)                 |

**Tabelle 2.2:** Medien und Pufferlösungen

| <b>Bezeichnung</b>               | <b>Abk.</b> | <b>Zusammensetzung</b>                               |         |        |
|----------------------------------|-------------|--|---------|--------|
| Dulbecco`s modified Eagle Medium | DMEM        | CaCl <sub>2</sub> *2 H <sub>2</sub> O                | 264 mg  |        |
|                                  |             | Fe(NO <sub>3</sub> )*9 H <sub>2</sub> O              | 0,1 mg  |        |
|                                  |             | KCl  | 400 mg  |        |
|                                  |             | MgSO <sub>4</sub> *7 H <sub>2</sub> O                | 200 mg  |        |
|                                  |             | NaCl   | 6400 mg |        |
|                                  |             | NaHCO <sub>3</sub>                                   | 3700 mg |        |
|                                  |             | NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> *2 H <sub>2</sub> O | 141 mg  |        |
|                                  |             | D-Glucose  | 4500 mg |        |
|                                  |             | Phenolrot  | 15 mg   |        |
|                                  |             | L-Arginin HCl  | 84 mg   |        |
|                                  |             | L-Cystin   | 48 mg   |        |
|                                  |             | L-Alanyl-L-Glutamin                                  | 862 mg  |        |
|                                  |             | Glycin   | 30 mg   |        |
|                                  |             | L-Histidin-HCl                                       | 42 mg   |        |
|                                  |             | L-Isoleucin  | 105 mg  |        |
|                                  |             | L-Leucin   | 105 mg  |        |
|                                  |             | L-Lysin HCl  | 146 mg  |        |
|                                  |             | L-Methionin  | 30 mg   |        |
|                                  |             | L-Phenylalanin                                       | 66 mg   |        |
|                                  |             | L-Serin  | 42 mg   |        |
|                                  |             | L-Threonin   | 95 mg   |        |
|                                  |             | L-Thryptophan  | 16 mg   |        |
|                                  |             | L-Tyrosin  | 72 mg   |        |
| L-Valin                          | 94 mg       |  |         |        |
| Vitamine                         | 31,6 mg     |  |         |        |
| Wasser                           | ad          | 1000 ml  |         |        |
| Einfriermedium für CaCo-2 Zellen | CaCo-2      | Dulbecco`s modified Eagle Medium mit GLUTAMAX®       | 133 ml  |        |
|                                  |             | Nichtessentielle Aminosäuren                         | 1,75 ml |        |
|                                  |             | L-Glutamin   | 1,75 ml |        |
|                                  |             | Na-Pyruvat   | 1,75 ml |        |
|                                  |             | Penicillin-Streptomycin <sup>1</sup>                 | 1,75 ml |        |
|                                  |             | Fetales Kälberserum                                  | 50 ml   |        |
|                                  |             | DMSO   | ad      | 250 ml |
|                                  |             | Essigsäure 3 N                                       |         |        |
|                                  | Essigsäure  | 18 g   |         |        |
|                                  | Wasser      | ad   | 100 ml  |        |

| <b>Bezeichnung</b>   | <b>Abk.</b>          | <b>Zusammensetzung</b>                              |         |           |
|--|----------------------|---|---------|-----------|
| <i>Hank's balanced salt solution</i><br>pH 7,4   | HBSS                 | NaCl  |         | 8,0 g     |
|  |                      | KCl   |         | 0,4 g     |
|  |                      | KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>                     |         | 0,06 g    |
|  |                      | NaHPO <sub>4</sub>                                  |         | 0,05 g    |
|  |                      | Glucose   |         | 1,0 g     |
|  |                      | MgCl <sub>2</sub> × 6 H <sub>2</sub> O <sup>4</sup> |         | 0,25 g    |
|  |                      | CaCl <sub>2</sub> × 2 H <sub>2</sub> O <sup>5</sup> |         | 0,21 g    |
|  |                      | Wasser <sup>6</sup>                                 | ad      | 1000 ml   |
| <i>Hank's balanced salt solution</i><br>pH 7,4; Ca <sup>2+</sup> -, Mg <sup>2+</sup> -frei | HBSS Ca-/Mg-<br>frei | NaCl  |         | 8,0 g     |
|  |                      | KCl   |         | 0,4 g     |
|  |                      | KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>                     |         | 0,06 g    |
|  |                      | NaHPO <sub>4</sub>                                  |         | 0,05 g    |
|  |                      | Glucose   |         | 1,0 g     |
|  |                      | Wasser <sup>6</sup>                                 | ad      | 1000 ml   |
|  |                      | <sup>1</sup> HEPES-Puffer 10mM<br>pH 7,4            | HEPES B | NaCl      |
| HEPES freie Säure  |                      |   |         | 1,19 g    |
| Reinstwasser <sup>3</sup>  | ad                   |   |         | 500 ml    |
| Kaliumphosphat-Puffer<br>50 mM, pH 7,4   |                      | K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>                     |         | 7,05 g    |
|  |                      | KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>                     |         | 1,29 g    |
|  |                      | Wasser bidest.                                      | ad      | 1000 ml   |
| LDH Reagenz  | LDH-R                | Lactat  |         | 50,0 mMol |
|  |                      | NAD+  |         | 7,0 mMol  |
|  |                      | Puffer pH 8,9                                       | ad      | 20,0 ml   |
|  |                      | Natriumazid   |         | 0,5 %     |
| Mc-Ilvaine Zitrat-Puffer pH6   | MICB                 | Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>                    |         | 6,148 g   |
|  |                      | Zitronensäure-Monohydrat                            |         | 2,110 g   |
|  |                      | Gelatine  |         | 1,5 g     |
|  |                      | Natriumazid   |         | 0,15 g    |
|  |                      | Wasser bidest. <sup>2</sup>                         | ad      | 1000 ml   |
| Natriumphosphat-Puffer<br>50 mM, pH 7,4  |                      | Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>                    |         | 5,75 g    |
|  |                      | NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>                    |         | 1,14 g    |
|  |                      | Wasser  | ad      | 1000 ml   |

<sup>1</sup> Die Bestandteile werden mit einem Meßzylinder abgemessen und in eine autoklavierte Glasflasche sterilfiltriert. Das sterile Kälberserum und gegebenenfalls DMSO werden anschließend aseptisch zugesetzt.

<sup>2</sup> Die Gelatine wird auf wenig ca. 50°C heißes Wasser aufgestreut und quellen gelassen. Die übrigen Bestandteile werden in 90% der Wassermenge gelöst. Dann wird die Gelatinelösung hinzugegeben und der pH-Wert mit 1N NaOH oder 1N HCl eingestellt.

<sup>3</sup> Die Substanzen werden eingewogen und in 90% der Wassermenge gelöst. Danach wird der pH-Wert mit 1N NaOH oder 1N HCl eingestellt.



| <b>Bezeichnung</b>            | <b>Abk.</b> | <b>Zusammensetzung</b>                                |            |
|-------------------------------|-------------|---|------------|
| Nichtessentielle Aminosäuren  | MEM         | L-Alanin  | 890 mg     |
|                               |             | L-Asparagin   | 1320 mg    |
|                               |             | L-Asparaginsäure                                      | 1330 mg    |
|                               |             | L-Glutaminsäure                                       | 1470 mg    |
|                               |             | Glycin  | 750 mg     |
|                               |             | L-Prolin  | 1150 mg    |
|                               |             | L-Serin   | 1050 mg    |
|                               |             | Wasser  | ad 1000 ml |
| Phosphatpuffer pH 7,4         | PBS         | NaCl  | 8,00 g     |
|                               |             | KCl   | 0,20 g     |
|                               |             | Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> × 2 H <sub>2</sub> O | 1,44 g     |
|                               |             | KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>                       | 0,20 g     |
|                               |             | Wasser <sup>6</sup>                                   | ad 1000 ml |
|                               |             |   |            |
| Physiologische Kochsalzlösung |             | NaCl  | 4,5 g      |
|                               |             | Wasser bidest.  | ad 500 ml  |
| Proteinfixierlösung           |             | Paraformaldehyd                                       | 3 g        |
|                               |             | Glutaraldehyd (25%)                                   | 0,4 ml     |
|                               |             | Saccharose  | 3,4 g      |
|                               |             | PBS   | Ad 100 ml  |
| Transportpuffer pH 7,4        | TP          | NaCl  | 8,3 g      |
|                               |             | KCl   | 0,23 g     |
|                               |             | K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> × 3 H <sub>2</sub> O  | 0,34 g     |
|                               |             | HEPES   | 2,4 g      |
|                               |             | D-Glucose   | 0,72 g     |
|                               |             | MgCl <sub>2</sub> × 6 H <sub>2</sub> O <sup>4</sup>   | 0,25 g     |
|                               |             | CaCl <sub>2</sub> × 2 H <sub>2</sub> O <sup>52</sup>  | 0,21 g     |
|                               |             | Wasser <sup>6</sup>                                   | ad 1000 ml |
| Triton® X 100 Lösung 1 %      |             | Triton® X 100   | 1 g        |
|                               |             | TP <sup>7</sup>                                       | ad 100 ml  |
| Trypanblau Lösung 0,4%        |             | Trypanblau  | 0,4 g      |
|                               |             | PBS   | ad 100 ml  |

<sup>4</sup> erst nach Einstellen des pH-Werts zugeben

<sup>5</sup> erst nach dem Mg-Salz zugeben.

<sup>6</sup> zunächst in 90% der Wassermenge lösen; pH Wert mit 1N NaOH oder 1N HCl auf angegebenen Wert einstellen.

<sup>7</sup> Triton X 100 unter ständigem Rühren in TP lösen, geg. leicht erhitzen

| <b>Bezeichnung</b>                    | <b>Abk.</b> | <b>Zusammensetzung</b>                             |           |
|---------------------------------------|-------------|--|-----------|
| Zellkulturmedium für<br>CaCo-2 Zellen |             | Dulbecco`s modiefied Eagle<br>Medium mit GLUTAMAX® | 380 ml    |
|                                       |             | Nichtessentielle<br>Aminosäuren                    | 5 ml      |
|                                       |             | L-Glutamin   | 5 ml      |
|                                       |             | Na-Pyruvat   | 5 ml      |
|                                       |             | Penicillin-Streptomycin <sup>1</sup>               | 5 ml      |
|                                       |             | Fötale Kälberseum                                  | ad 500 ml |
| Zitratpuffer 2%                       |             | Natirumzitat                                       | 2 g       |
|                                       |             | 0,9% Kochsalzlösung                                | ad 100 ml |

In Tierversuchen wurden männliche Wistar Ratten eingesetzt. Diese wurden von der Firma Boehringer Ingelheim, Ingelheim (D) bezogen.

### **2.1.2 Gallensalzlösungen**

Alle Gallensalze, die im Rahmen dieser Dissertation untersucht wurden, wurden in Form ihrer Na-Salze verwendet. Im einzelnen: Ursodesoxycholat-Na, Chenodesoxycholat-Na, Taurocholat-Na, Sarcosincholat-Na und im Rahmen von Vorversuchen Cholat-Na. Die jeweiligen Lösungen wurden mit HEPES B in der gewünschten Konzentration hergestellt.

### **2.1.3 Lösungen der Modellpeptide**

Octreotid und Desmopressin wurden in Form ihrer Acetatsalze eingesetzt. Die jeweiligen Lösungen wurden entweder mit Transportpuffer TP oder HEPES B in der gewünschten Konzentration hergestellt. Für die Transportversuche an den CaCo-2 Zellen und die Tierversuche wurde zusätzlich der jeweilige Wirkstoff als radioaktiver Tracer zugegeben (12 nM). Die Lösungen wurden aufgrund der geringen hydrolytischen Stabilität der Peptide vor jedem Experiment frisch angesetzt.

### **2.1.4 Lösungen der parazellulären Marker**

Als parazelluläre Marker wurden FITC-Dextran 4000 und C<sub>14</sub> PEG 4000 eingesetzt. FITC-Dextran 4000 wurde als 50 µM-Lösung in HEPES B hergestellt. C<sub>14</sub> PEG 4000 wurde als 0,5%-ige Lösung in Transportpuffer hergestellt. Dies entspricht einer Radioaktivität von 3 µCi/well.

### **2.1.5 Carboxyfluoreszeinlösung**

Carboxyfluoreszein wurde als Modellschubstanz für die Mucusdiffusion eingesetzt. Verwendet wurde eine 1 µM Lösung in Mc Ilvaine-Zitrat-Puffer.

## 2.2 Geräte und Materialien

### 2.2.1 Fluoreszenzmikroskop

Als Fluoreszenzmikroskop kam ein Leitz Dialux 22 Mikroskop (Leica Mikrosysteme, Bensheim (D)) mit folgender Ausstattung zum Einsatz:

- Phasenkontrasteinrichtung
- Objektive  $10\times / 0,30$ ;  $40\times / 1,3$  Öl;  $100\times / 1,25$  Öl
- Fluoreszenz-Auflichtilluminator 3- $\lambda$ -Ploemopak mit Blau- und Grünfilter

Die Erfassung der Bilddaten erfolgte mit Hilfe der digitalen Kamera Sensicam (PCO, Kehlheim (D)), die mit einem HRP060-CMT Adapter (Diagnostic Instruments, Sterling Heights (USA)) auf den Fototubus des Mikroskops aufgesetzt wurde. Die Steuerung der Kamera und Sicherung des Bildmaterials erfolgte mit einem handelsüblichen PC unter Verwendung der zur Kamera gehörenden Interfacekarte und Steuerungssoftware. Die weitere Bildbearbeitung erfolgte mit den Programmen Scion Image (Scion, Maryland (USA)) sowie Corel Photo-Paint 7 (Corel, Ottawa (CA)).

### 2.2.2 Konfokale Lasermikroskopie

Als konfokales Lasermikroskop wurde das Leica Mikroskop DM IRBE (Leica Mikrosysteme, Bensheim (D)) verwendet. Die Ausstattung dieses Invertmikroskops umfasste:

- Phasenkontrasteinrichtung
- Objektive  $20\times / 0,4$  ;  $40\times / 1,25$  Öl ;  $63\times / 1,32$  Öl ;  $63\times / 1,0$  W
- luftgekühlter Argon/Krypton-Laser

Die Steuerung des Mikroskops erfolgte mit der Software TCS-NT (Leica Mikrosysteme, Bensheim (D)). Die generierten Fluoreszenzbilder und –serien wurden mit den Programmen Scion Image (Scion, Maryland (USA)) sowie Corel Photo-Paint 7 (Corel, Ottawa (CA)) weiterbearbeitet.

### 2.2.3 Weitere Geräte und Materialien

Alle übrigen verwendeten Geräte und Materialien sind in Tabelle 2.3 aufgelistet.

**Tabelle 0.3:** Verwendete Geräte und Materialien

| Geräte und Materialien  | Hersteller/Lieferant            |
|---|---------------------------------|
| 0,2 $\mu\text{m}$ Filtriereinheiten Steritop <sup>®</sup>     | Millipore, Eschborn (D)         |
| Autoklav (119 l)  | Deutsch und Neumann, Berlin (D) |
| Black Microstrips für Fluoroskan                              | Labsystems, Frankfurt (D)       |
| Brutschrank Cytoperm <sup>®</sup> 2                           | Heraeus, Hanau (D)              |
| Deckglaskammern   | Nunc, Wiesbaden (D)             |
| Dialysenmembran, regenerierte Zellulose MWCO 10 000           | Diachema, München (D)           |
| Einwegpipetten (2, 5, 10, 25 ml)                              | Corning-Costar, Bodenheim (D)   |
| Elisa Reader 2550 EIA   | Bio Rad, München (D)            |
| Extruder Liposofast <sup>®</sup>                              | Avestin, Ottawa (CA)            |
| Fluoreszenz-Mikrotiterplattenleser Fluoroskan <sup>®</sup> II | BioConcept, Allschwil (CH)      |
| Flüssigszintillationszähler 1409                              | Wallac, Freiburg (D)            |

| <b>Geräte und Materialien</b>                                     | <b>Hersteller/Lieferant</b>               |
|---|---|
| Glasperlen (Ø 2 mm)   | Bender und Hobein, Karlsruhe (D)          |
| Gleichgewichtsdialyseapparatur                                    | Dianorm, München (D)                      |
| Halbmikroküvetten, Kunststoff                                     | Sarstedt, Ulm (D)                         |
| Halbmikroosmometer  | Knauer, Berlin (D)                        |
| Invertmikroskop   | Zeiss, Oberkochen (D)                     |
| Kryoaufbewahrungsbehälter Cryomed                                 | Migge Neolab, Heidelberg (D)              |
| Kryoröhrchen  | Greiner, Frickenhausen (D)                |
| Kühlthermostat K/F3   | Haake, Karlsruhe (D)                      |
| Kulturschalen (6-, 12-, 24-, 96-well)                             | Corning-Costar, Bodenheim (D)             |
| Kulturschalen mit Filtereinsätzen (Transwell <sup>®</sup> -clear) | Corning-Costar, Bodenheim (D)             |
| Langmuir-Adam-Filmwaage   | Riegler und Kirstein, Wiesbaden (D)       |
| LS 50 B Luminezenz-Spektrometer                                   | Perkin Elmer,<br>Rodgau-Jügesheim (D)     |
| Mastersizer 2000  | Malvern, Herrenberg (D)                   |
| Mikrofuge E <sup>TM</sup>   | Beckman, München (D)                      |
| Objektträgerkammern, chamber slides                               | Nunc, Wiesbaden (D)                       |
| Pasteurpipetten   | WU, Mainz (D)                             |
| pH-Elektrode GATionode <sup>®</sup> IJ                            | Gamma-Analysentechnik,<br>Bremerhaven (D) |
| pH-Meter  | Orion Research, Beverly (USA)             |
| Pipetten für Wechselspitzen                                       | Labsystems, Frankfurt (D)                 |
| Pipettierhilfen (Pipetboy <sup>®</sup> , Acuboy <sup>®</sup> )    | Integra Biosciences, Fernwald (D)         |
| PlastiPak Einmalspritzen  | Becton Dickinson, Heidelberg (D)          |
| Reaktionsgefäße 1,5 ml  | Sarstedt, Ulm (D)                         |
| Reinstwasseranlage USF Seral                                      | USF Elga Seral, Ransbach-<br>Baumbach (D) |
| Rotavapor <sup>®</sup> R  | Büchi, Flawil (CH)                        |
| Schlauchpumpe   | Ismatec, Zürich (CH)                      |
| Schüttelwasserbad   | Renggli, Rotkreuz (CH)                    |
| Spektralphotometer Beckman DU 640                                 | Beckman, München (D)                      |
| Spritzenvorsatzfilter Minisart <sup>®</sup> N                     | Sartorius, Göttingen (D)                  |
| Sterican Einmalkanülen  | Braun, Melsungen (D)                      |
| Sterilwerkbänke, horizontaler u. vertikaler Luftstrom             | CEAG, Dortmund (D)                        |
| Szintillationsvial Pony Vial                                      | Packard, Groningen (NL)                   |
| Thermomixer   | Eppendorf, Hamburg (D)                    |
| Trockenschrank  | Heraeus, Hanau (D)                        |
| Vakuum-Controller CVC2  | Vacuubrand, Wertheim (D)                  |
| Vakuumpumpe MZ 2C   | Vacuubrand, Wertheim (D)                  |
| Vortex-Mischer  | Bender und Hobein, Karlsruhe (D)          |
| Wasserbadkreisschüttler   | Infors, Bottmingen (CH)                   |

| <b>Geräte und Materialien</b>   | <b>Hersteller/Lieferant</b>   |
|---|-------------------------------|
| Whatman Filterpapier No. 1  | Whatman, Maidstone (UK)x      |
| Widerstandsmeßgerät Millicell <sup>®</sup> -ERS                       | Millipore, Eschborn (D)       |
| Zellkulturflaschen (75cm <sup>2</sup> )                               | Costar Corning, Bodenheim (D) |
| Zentrifuge Labofuge <sup>®</sup> GL mit Zytocentrifugations-Einsätzen | Heraeus, Hanau (D)            |
| Zentrifugen Typ J21C und Typ J6C                                      | Beckman, München (D)          |
| Zentrifugenröhrchen 15 ml PP und 50 ml PP                             | Greiner, Frickenhausen (D)    |

## 2.3 Zellkultur

Die verwendeten CaCo-2 Zellen stammen aus dem Deutschen Krebs Forschungszentrum, DKFZ, in Heidelberg. Sie wurden ausgehend von der Passage 51 bis zur Passage 67 kultiviert und für Versuche verwendet. Die Kulturbedingungen, wie die Dichte, mit der die Zellen ausgesät werden, die Wachstumsphase und die Passagezahl spielen für die Transporteigenschaften eine große Rolle. Die Expression bestimmter Transporter hängt direkt von Wachstumsphase und Passagezahl ab [108]. Dies läßt annehmen, daß das Passagieren der Zellen zu einem Verlust an phenotypischer Stabilität führt. Im Rahmen dieser Dissertation wurden die Zellen daher nur über ein Spanne von 15 Passagen für Experimente eingesetzt.

### 2.3.1 Auftauen und Aussäen der CaCo-2 Zellen

Die CaCo-2 Zellen wurden in Kryoröhrchen ( ca. 1 Million Zellen pro Röhrchen) in flüssigem Stickstoff gelagert. Ein Röhrchen wurde entnommen und im Schüttelwasserbad bei 37°C schnell aufgetaut und der Inhalt wurde sofort in ein Zentrifugationsgefäß überführt. Das Kryoröhrchen wurde mit der 5-fachen Menge Zellkulturmedium in das Zentrifugationsgefäß ausgepült. Die Zellsuspension wurde dann 5 min mit 600 g zentrifugiert. Nach der Zentrifugation wurde das Medium mittels Pasteurpipette und Vakuumpumpe vorsichtig über dem Zellpellet abgesaugt.

Das Pellet wurde schließlich in 30 ml Zellkulturmedium vorsichtig resuspendiert.

Die so entstandene Zellsuspension wurde auf zwei Zellkulturflaschen verteilt und im Brutschrank bei 37°C, 5% CO<sub>2</sub> und 95% Luftfeuchtigkeit kultiviert.

Alle Arbeiten mit den Zellen wurden unter aseptischen Bedingungen in einer sterilen Werkbank durchgeführt. Die benötigten Geräte und Lösungen wurden zuvor durch geeignete Maßnahmen sterilisiert (autoklaviert, steriltfiltriert, sterile Einmalartikel). Für die Herstellung der Puffer wurde nur frisch hergestelltes bidestilliertes Wasser verwendet.

### 2.3.2 Kultivierung der Zellen

Die Zellen wurden jeweils montags, mittwochs und freitags gefüttert. Dazu wurde das alte Medium mit einer Pasteurpipette und Vakuumpumpe entfernt und durch frisches ersetzt.

Beim Entfernen des Mediums wurde dieses zunächst aus dem basolateralen und dann aus dem apicalen Kompartiment abgesaugt. Frisches Medium wurde zuerst apical, dann basolateral aufgegeben. Durch diese Vorgehensweise kann ein Ablösen des Zellmonolayers durch hydrostatische Effekte verhindert werden.

### 2.3.3 Passagieren der Zellen

Die Zellen wurden bis zum Erreichen einer 90%igen Konfluenz in Zellkulturflaschen angezchtet.

Zum Passagieren wurde das Zellkulturmedium entfernt und die Zellen mit 15 ml HBSS-Ca- und-Mg-frei pro Flasche gewaschen. In jede Flasche wurden 10 ml Trypsin-EDTA pipettiert. Die Zellen wurden dann für 15 min im Brutschrank inkubiert. Nach 15 min hatten sich die Zellen von dem Flaschenboden abgelöst. Restliche noch anhaftende Zellen wurden durch leichtes Klopfen der Flasche auf die Werkbank abgelöst. Die Zellsuspension wurde mit 600 g für 5 min zentrifugiert. Die Trypsin-Lösung über dem Zellpellet wurde vorsichtig abgesaugt und das Pellet in 10 ml Medium resuspendiert. 100  $\mu$ l dieser Suspension wurden mit 200  $\mu$ l Trypanblaulösung 0,4% versetzt, gemischt und in einer Neubauerzählkammer gezählt. Für Versuche wurden die Zellen mit einer Dichte von 65000 Zellen pro  $\text{cm}^2$  in die jeweilige Kulturschale oder auf Filtern ausgesät. Zur weiteren Anzucht wurde pro Kulturflasche 1 Million Zellen ausgesät. Die Kulturschalen oder Filter wurden vor dem Aussäen nicht vorbehandelt.

### 2.3.4 Einfrieren der Zellen

Zum Anlegen eines Zellstocks wurde in regelmäßigen Abständen Zellen eingefroren. Dazu wurden 1 Million Zellen mit 1 ml Einfriermedium suspendiert und dieses sofort im  $-70^\circ\text{C}$  Kühlschranks eingefroren. Nach 24 Stunden wurden die Kryoröhrchen aus dem Tiefkühlschranks in flüssigen Stickstoff überführt und dort gelagert.

### 2.3.5 Charakterisierung der Zellen

#### 2.3.5.1 Zellwachstum und Erscheinungsbild

Das Zellwachstum und Erscheinungsbild der Zellen wurde nach dem Aussäen, bei jedem Mediumswechsel und vor den Experimenten durch Betrachten der Kulturgefäße mit einem inversen Mikroskop beurteilt.

#### 2.3.5.2 Bestimmung des transepithelialen Widerstandes

Vor den Transportexperimenten wurde der transepitheliale Widerstand des auf Filtern angezchteten Zellmonolayers mit dem Millicell®-ERS-Gerät bestimmt. Dazu wurde das Zellkulturmedium entfernt, und die Zellen wurden mit Transportpuffer gewaschen. Das Elektrodensystem bestand aus zwei Elektrodenhaltern, die jeweils eine Silber-/Silberchlorid-Elektrode zur Messung der Spannung und eine Silberelektrode zur Messung der Stromstärke aufwiesen. Ein Elektrodenhalter war um 2,5 mm länger ausgeführt, was eine Verletzung des Zellmonolayers verhindert. Aus dem gemessenen Strom- und Spannungswerten ermittelte das Meßgerät den Widerstand in Ohm. Von dem so erhaltenem Wert wurde der Blindwert (Widerstand der Filter ohne Zellen) abgezogen und dann mit der Filterfläche multipliziert. Das Ergebnis gibt den Widerstand des reinen Zellmonolayers in  $\Omega \cdot \text{cm}^2$  an.

In Zusammenarbeit mit anderen Forschungseinrichtungen (Zentrallabor der Deutschen Apotheker, Across Barriers) wurde festgelegt, dass der transepitheliale Widerstand ein

Minimum von  $160 \Omega \cdot \text{cm}^2$  aufweisen sollte. Filtereinsätze, die diesen Wert unterschritten, wurden vor dem Transportexperiment verworfen.

### 2.3.5.3 Bestimmung der Diffusion von parazellulären Markern durch den Zellmonolayer

Zusätzlich zur Messung des transepithelialen Widerstandes wurde vor den Transportexperimenten der prozentuale Durchgang von parazellulären Markern durch den Zellmonolayer bestimmt.

Verwendet wurden FITC Dextran 4000 und [ $^{14}\text{C}$ ] Polyethylenglykol 4000.

Nach Absprache mit oben genannten Forschungseinrichtungen durfte der Durchgang einen Wert von 1% pro Stunde nicht überschreiten.

## 2.4 Transportexperimente

### 2.4.1 Allgemeine Versuchsdurchführung

Die Transportexperimente wurden in Transwell® clear-Kulturschalen mit 12 Filtereinsätzen durchgeführt. Der Zellmonolayer wurde dabei auf einem transparenten Polyesterfilter mit  $1,1 \text{ cm}^2$  Durchmesser und einer Porenweite von  $0,4 \mu\text{m}$  angezüchtet und mindestens 21 Tage lang kultiviert.

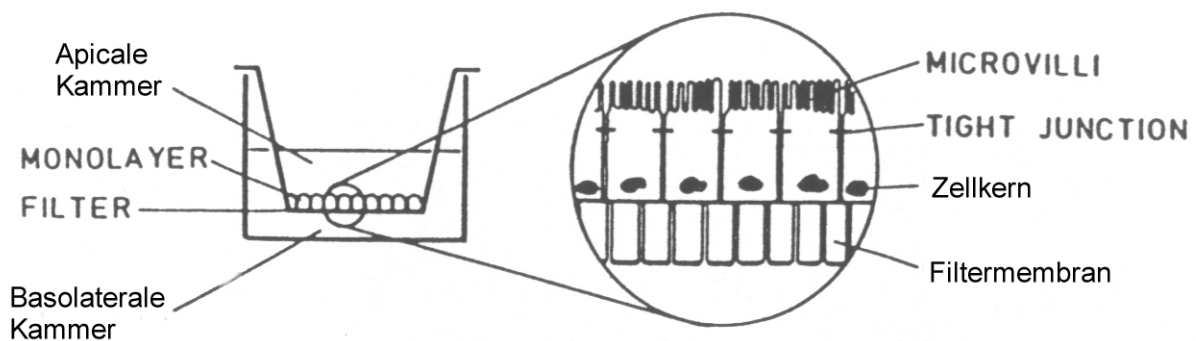


Abb. 2.1: CaCo-2 Zellen auf Filtern angezüchtet [36]

Vor dem Experiment wurde der Zellmonolayer zweimal mit  $37^\circ\text{C}$  warmem Transportpuffer gewaschen und eine halbe Stunde im Brutschrank inkubiert. Der TP wurde dann aus dem Donorkompartiment vollständig durch Absaugen mit einer Pasteurpipette entfernt und durch  $500 \mu\text{l}$  einer ebenfalls auf  $37^\circ\text{C}$  vorgewärmten Testlösung ersetzt. In eine 12-well Kulturschale wurde pro well  $1 \text{ ml}$   $37^\circ\text{C}$  warmer Transportpuffer als Akzeptorphase pipettiert. Mit dem Umsetzen der Filter mit der Testlösung in diese 12-well Kulturschale wurde das Experiment gestartet. Die Schale wurde auf einem Thermomixer plaziert und mit  $500 \text{ upm}$  bei einem Orbit von  $3 \text{ mm}$  während des gesamten Experiments kreisförmig geschüttelt. Durch das Schütteln wurde eine gleichmäßige Durchmischung der Akzeptorphase über den Versuchszeitraum gewährleistet. Das gesamte Experiment wurde in einem auf  $37^\circ\text{C}$  temperierten Trockenschrank durchgeführt. Nach 15, 30, 45, 60, 75 und 90 Minuten wurden  $100$  oder  $200 \mu\text{l}$  Probe aus der Akzeptorkammer entnommen und durch dieselbe Menge vorgewärmten Transportpuffer ersetzt.



### 2.4.2 Transportexperimente mit fluoreszenzmarkierten Substanzen

Wurden Transportexperimente mit fluoreszenzmarkierten Substanzen durchgeführt, wurde zu jedem Zeitpunkt 200 µl Probe entnommen und diese durch 200µl vorgewärmten Transportpuffer ersetzt. Die Proben wurden direkt in eine schwarze Mikrotiterplatte pipettiert und nach Beendigung des Experiments mit dem Fluoreszenzlesegerät Fluoroskan II vermessen. Die Messung gegen Blindwerte erfolgte mit folgenden Einstellungen:

|                  |   |
|------------------|---|
| Filter Set       | 2 (FITC; $\lambda_{\text{ex}}= 485$ , $\lambda_{\text{em}}=538$ ) |
| Integration Time | 2   |
| Temperatur       | Ambient   |
| Scale            | Absolute scale  |
| Calculation      | No calculation  |

Für die Auswertung der Meßergebnisse wurde eine Verdünnungsreihe der Testsubstanz hergestellt und parallel vermessen.

### 2.4.3 Transportexperimente mit isotoopenmarkierten Substanzen

Wurden Transportexperimente mit isotoopenmarkierten Substanzen durchgeführt, wurde zu jedem Zeitpunkt 100 µl Probe entnommen und durch 100 µl vorgewärmten Transportpuffer ersetzt. Die Proben wurden in ein Szintillationsvial pipettiert, mit 5 ml Szintillationscocktail aufgefüllt und über Nacht im Kühlschrank gelagert. Am nächsten Tag wurden sie in einem

Flüssigszintillationszähler, Wallac 1409 vermessen. Die Messungen erfolgten mit folgender Geräteeinstellung:

Für tritiummarkierte Substanzen:

|               |                        |
|---------------|------------------------|
| Protocol      | 4 Proto4 H3            |
| Counting mode | cpm                    |
| Counting time | 60                     |
| Repeats       | 1                      |
| Cycles        | 1                      |
| Replicates    | 1                      |
| 2 sima %      | 0,01                   |
| Minimum cpm   | 0,00 checking time: 10 |
| Spectrum      | beta                   |

Für C14 markierte Substanzen wurde mit Protocol 6 (6 Proto6C14) gemessen. Alle übrigen Einstellungen wurden beibehalten.

Der Wallac Flüssigszintillationszähler hat eine Effektivität von 68%  $^3\text{H}$  und 96%  $^{14}\text{C}$ . Count Abweichungen in 24h weniger als 0,2%.

Für die Auswertung der Meßergebnisse wurden Standards der Testsubstanzen in definierter Konzentration hergestellt und parallel vermessen.

#### 2.4.4 Auswertung der Meßergebnisse

Die erhaltenen Meßdaten stellen den Anteil der Testsubstanz, der pro Zeiteinheit in das Akzeptormedium diffundierte, dar. Aus ihnen konnte die jeweilige Konzentration der Testsubstanz pro Zeiteinheit im Akzeptormedium berechnet werden. Ab der zweiten Probenentnahme mußte dabei die Verdünnung durch den ergänzten Puffer berücksichtigt werden:

$$cn_{\text{korr}} = \frac{cn \times V_{\text{gesamt}} + \sum_{i=0}^{n-1} ci \times V_{\text{probe}}}{V_{\text{gesamt}}}$$

|                      |   |   |
|----------------------|---|---|
| $c_{n \text{ korr}}$ | korrigierte Konzentration bei Probenentnahme n; $n > 1$ | [ $\mu\text{g/ml}$ ] oder [ $\mu\text{mo/ml}$ ] |
| $c_n$                | Konzentration bei Probenentnahme                        | [ $\mu\text{g/ml}$ ] oder [ $\mu\text{mo/ml}$ ] |
| $V_{\text{gesamt}}$  | Gesamtvolumen des Akzeptorkompartiments                 | [ml]  |
| $V_{\text{Probe}}$   | Probenvolumen   | [ml]  |

Aus den korrigierten Konzentrationen wurde dann der Anteil an Testsubstanz (in %), der zum jeweiligen Zeitpunkt vom Donor in den Akzeptor diffundierte, berechnet:

$$T_n = \frac{cn_{\text{korr}}}{C_o} \times 100$$

|       |  |  |
|-------|--|--|
| $T_n$ | transportierter Anteil zum Zeitpunkt n   | [%]  |
| $C_o$ | Konzentration im Donor bei Versuchbeginn | [ $\mu\text{g/ml}$ ] oder [ $\mu\text{mol/ml}$ ] |

Als weitere Größe zur Charakterisierung der Transportrate wurde der apparente Permeabilitätskoeffizient berechnet:

$$P_{app} = \frac{cn_{korr} \times V_{gesamt}}{t} \times \frac{1}{A} \times \frac{1}{C_0}$$

|           |                                      |                    |
|-----------|--------------------------------------|--------------------|
| $P_{app}$ | apparenter Permeabilitätskoeffizient | [cm/s]             |
| $t$       | Zeit                                 | [s]                |
| $A$       | Fläche des Filters                   | [cm <sup>2</sup> ] |

## 2.5 Toxizitätsuntersuchungen

Folgende Enzymassays wurden durchgeführt:

- Lactatdehydrogenase-Bestimmung im apicalen Puffer nach Gallensalzinkubation an CaCo-2 Zellen
- Bestimmung der mitochondrialen Aktivität der CaCo-2 Zellen nach Gallensalzinkubation durch WST-1 Assay.

### 2.5.1 Bestimmung der Lactatdehydrogenase-Aktivität

Die Lactatdehydrogenase (LDH) ist ein zytoplasmatisches Enzym, das im Rahmen der Glykolyse folgende Gleichgewichtsreaktion:



katalysiert.

Wird die Zelle zerstört, wird LDH aus dem Zytoplasma freigesetzt. Es kann im Blut oder im Medium nachgewiesen werden. In der Medizindiagnostik ist LDH ein wichtiges Markerenzym bei Schädigungen des Herzmuskel durch Myokardinfarkt oder bei Hepatitis. Sowohl  $\text{NADH H}^+$  als auch  $\text{NAD}^+$  haben im UV-Bereich bei 260 nm ein Absorptionsmaximum. Die reduzierte Form  $\text{NADH H}^+$  weist ein weiteres bei 340 nm auf. Photometrische Messungen bei 340 nm zeigen je nach Substrat eine LDH-abhängige Absorptionsverstärkung oder -verminderung.

In dem Enzymassay untersucht man die Umwandlung von Lactat zu Pyruvat. Diese Reaktion hat einige analytische Vorteile gegenüber der Hinreaktion :

- Lineare Reaktionsraten
- Reproduzierbarkeit von 1,3 %
- Keine Blank-Aktivität
- Haltbarkeit des Reagens von über 6 Monaten [144].

Zur Bestimmung der LDH-Aktivität im apicalen Puffer wurden CaCo-2 Zellen in 24-well Kulturschalen ausgesät und bis zur Konfluenz gezüchtet. Das Medium wurde mit Pasteurpipette und Vakuumpumpe vorsichtig abgesaugt und die Zellen wurden insgesamt dreimal mit 37°C warmen HEPES B gewaschen. Danach wurde in jedes well 500 µl Probe pipettiert und die Kulturschale im Brutschrank inkubiert. Untersucht wurden die Gallensalze, UDCA-Na, CDCA-Na, CS-Na und TC-Na in verschiedenen Konzentrationen, sowie Triton®X 100 0,1% als Positiv- und HEPES B Puffer als Negativkontrolle. Nach 30, 60 und 90 min wurden pro well 100 µl Probe gezogen. Die Proben wurden bis zur Messung bei 4°C aufbewahrt. Zur photometrischen Bestimmung der LDH-Aktivität wurde ein Enzymkit der Fa. Sigma (Deideshofen, (D)) verwendet. Das lyophilisierte LDH-Reagenz wurde vorschriftsmäßig mit Wasser bidest rekonstituiert. Die im Kühlschrank gelagerten Proben wurden zunächst in einer Eppendorfzentrifuge scharf zentrifugiert. Dann wurden sie mittels eines Eppendorf-Thermomixers auf 25°C temperiert. Vermessen wurde in einem UV-Spektrometer Beckmann DU 640 gegen Wasser als Blank. Ein Milliliter des ebenfalls auf 25°C temperierten LDH-Reagenz wurden in eine Halbmikroküvette gegeben und mit 50 µl Probe versetzt. Nach Mischen durch vorsichtiges Kippen wurde diese bei 340 nm vermessen. Dieser Wert wurde als INITIAL A bezeichnet. Die Küvette wurde im Photometer belassen und nach exakt 60 Sekunden erneut vermessen. Dieser Wert wurde als FINAL A bezeichnet. FINAL A minus INITIAL A ergab die Absorptionsänderung pro Minute ( ΔA).

Die LDH-Aktivität berechnet sich aus ΔA:

$$LDH\text{Aktivität}(U/l) = \frac{\Delta A / \text{min} \times TV \times 1000}{\epsilon \times SV \times LP}$$

|           |   |
|-----------|---|
| ε pro min | Molarer Absorptionskoeffizient von NADH H <sup>+</sup> bei 340 nm= 6,22*10 <sup>3</sup> |
| TV        | Gesamtvolumen des Reaktionsgemisches (1,05 ml)  |
| SV        | Probenvolumen (0,05 ml)   |
| 6,22      | millimolar Absorptionsfähigkeit von NADH H <sup>+</sup> bei 340 nm                      |
| LP        | Schichtdicke (1 cm)   |
| 1000      | Umrechnung der Einheiten pro ml in Einheiten pro l                                      |

$$LDH\text{Aktivität}(U/l) = \frac{\Delta A_{\text{pro min}} \times 1,05 \times 1000}{6,22 \times 0,05}$$

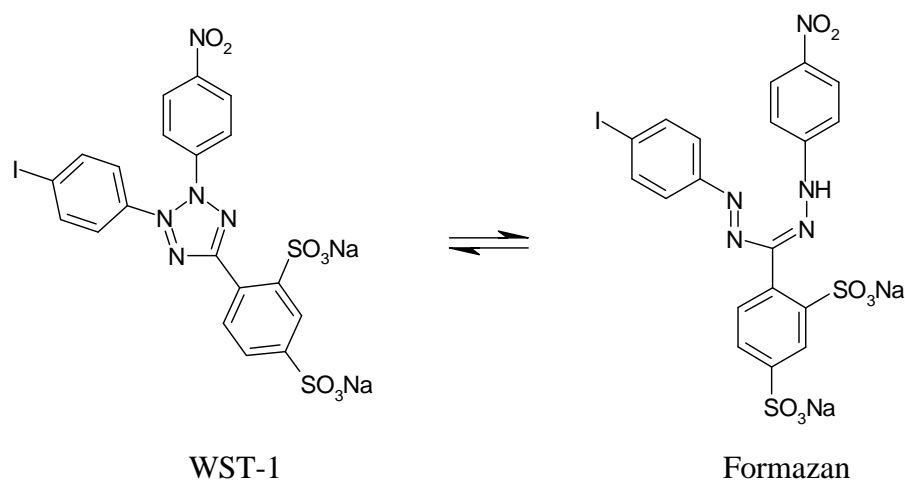
$$= \Delta A_{\text{pro min}} * 3376$$

Unter einer LDH Aktivitätseinheit, U, versteht man jene Enzymmenge, die unter den Meßbedingungen die Bildung von einem Mikromol NADH H<sup>+</sup> pro Minute katalysiert. Die LDH-Aktivität der mit Triton® X 100 inkubierten Zellen wurde als 100% Toxizität gewertet. Alle anderen Aktivitäten wurden darauf bezogen und das Ergebnis als Toxizität in Prozent angegeben.

### 2.5.2 Bestimmung der Aktivität mitochondrialer Dehydrogenasen

Die Mitochondrien der Zellen enthalten in ihrem Inneren Enzyme der Atmungskette, des Zitratzyklus, des Fettabbaus und der oxidativen Phosphorylierung. Sie stellen damit die für Proliferation und Zellviabilität wichtigen „Kraftwerke“ der Zelle dar, in dem Energie gewonnen wird. Durch die Bestimmung der Aktivität mitochondrialer Dehydrogenasen kann die Zellviabilität untersucht werden.

Der Bestimmung liegt folgende Umsetzung zu Grunde:



4-[3-(4-iodophenyl)-2-(4-nitrophenyl)-2H-5-tetrazolio]-1,3-benzen-disulfonat (WST-1)

und NAD<sup>+</sup> werden unter Katalyse mitochondrialer Dehydrogenasen zu dem entsprechenden Formazan und NADH H<sup>+</sup> umgesetzt. Das entstandene Formazan ist dunkelrot gefärbt und hat ein Absorptionsmaximum von 440 nm. Der Vorteil von WST-1 gegenüber dem früher gebräuchlichen MTT-Assay ist die Wasserlöslichkeit des gebildeten Formazans [109,110]. Zur Bestimmung der Dehydrogenase-Aktivität wurden Zellen in einer 96-well Kulturschale ausgesät und bis zur Konfluenz gezüchtet. Zu Beginn des Versuchs wurde das Medium mit Pasteurpipette und Vakuumpumpe entfernt. Die Zellen wurden dreimal mit 37°C warmen HEPES B Puffer gewaschen. 200 µl der vorgewärmten Testlösungen wurden auftragen und

die Kulturschale dann im Brutschrank für 90 Minuten inkubiert. Getestet wurden UDCA-Na, CDCA-Na, CS-Na und TC-Na in verschiedenen Konzentrationen, sowie Triton® X 100 0,1% als Negativ- und HEPES B als Positivkontrolle. Nach der Inkubation wurde in jedes well 20 µl Premix WST-1 pipettiert und die Kulturschale weiter im Brutschrank inkubiert. Nach 30 min, 1, 2, 3 und 4 Stunden wurde die Kulturschale im Elisa-Reader mit dem 450 nm Filter vermessen. Als Blank wurde eine 96-well Platte ohne Zellen vermessen, in die pro well 200 µl HEPES B und 20 µl Premix WST-1 pipettiert wurden. Aus diesen gemessenen Werten wurde ein Mittelwert gebildet, um den die Meßergebnisse korrigiert wurden. Die Viabilität der Negativkontrolle wurde als 100% bewertet und die anderen Werte darauf bezogen.

### **2.5.3 Mikroskopische Toxizitätsuntersuchungen**

Zusätzlich zu den Enzymassays wurden die Zellen nach Gallensalzinkubation unter dem Fluoreszenzmikroskop (Fa. Leica) im Durchlicht betrachtet. Dazu wurden die Zellen in 6-well Kulturschalen bis zur Konfluenz gezüchtet. Das Medium wurde abgenommen, und die Zellen wurden mit 37°C warmem TP dreimal gewaschen. Danach wurden 3 ml der jeweiligen Gallensalz-Lösung auf die Zellen gegeben und die Kulturschalen wurden eine halbe Stunde im Brutschrank inkubiert. Anschließend wurden die Zellen unter dem Mikroskop mit dem 40 x Objektiv betrachtet und mit der angeschlossenen digitalen Kamera fotografiert.

### **2.5.4 Trypanblaufärbung**

Der Farbstoff Trypanblau färbt ausschließlich tote Zellen an.

Die Zellen wurden in Silikonkammern auf Objektträgern bis zur Konfluenz kultiviert. Das Medium wurde abgesaugt und die Zellen wurden dreimal mit 37°C warmem TP gewaschen. 400 µl Testlösung wurde in jede Kammer pipettiert und die Objektträger eine Stunde im Brutschrank inkubiert. Die Testlösungen wurden abgesaugt und die Zellen wurden mit TP gewaschen. 400 µl 0,4% Trypanblaulösung wurde in jede Kammer pipettiert. Nach exakt einer Minute wurde die Trypanblaulösung wieder abgesaugt. Trypanblaulösung wirkt schädigend auf die Zellen, daher sollte die Einwirkzeit exakt eingehalten werden. Die angefärbten Monolayer wurden unter dem inversen Mikroskop mit 40 x Objektiv betrachtet. Ein Ausschnitt des Monolayers wurde ausgezählt und nach folgendem Schema bewertet: weniger als 1% der Zellen sind blau angefärbt; 1-10%; 10-30%, 30-50%; 50-80% und mehr als 80% der Zellen sind gefärbt. Untersucht wurden CDCA-Na, UDCA-Na, TC-Na und CS-Na in unterschiedlichen Konzentrationen in HEPES B sowie TP als Kontrolle.

## **2.6 Monolayerexperimente mit der Langmuir-Adam-Filmwaage**

Die Messungen an der Langmuir-Adam-Filmwaage wurden in Marburg am Institut für Pharmazeutische Technologie und Biopharmazie durchgeführt. Zum Einsatz kamen zwei verschiedene Teflontröge: Der Normtrog mit einer Fläche von 196,5 cm<sup>2</sup> bei vollständig expandierten Barrieren und einem Volumen von 85 ml und zum zweiten der Biotrog mit einer maximalen Oberfläche von 41 cm<sup>2</sup> und einem Volumen von 41 ml. Druck und Barrierenbewegung konnten über ein an den Trog angeschlossenes Potentiometer gesteuert

werden. Alle Daten wurden gleichzeitig mit einem an das Potentiometer angeschlossenen Computer aufgezeichnet. Die Entwicklung von Druck und Monolayerfläche konnte auf dem Monitor verfolgt werden. Die Oberflächenspannung wurde mittels einer Wilhelmy-Waage gemessen. Die Wilhelmy-Waage ist eine elektronische Mikrowaage mit einer Sensitivität kleiner als 0,1 mN/m. Der Oberflächendruck wird dabei mittels eines horizontal in die molekülbedeckte Oberfläche eintauchenden Filterpapiers (Whatman No 1, ca 2,1 \* 0,3 cm) gemessen. Durch den Oberflächendruck wird auf das Filterpapier eine Kompressionskraft ausgeübt. Je größer die Oberflächenspannung, desto mehr Kraft wird benötigt, um das Filterpapier aus der Oberfläche zu ziehen. Vor jeder Messung wird der Oberflächendruck auf 0 mN/m eingestellt. Die Höhe des Filterpapiers wird mittels einer optischen Einheit bestimmt. Veränderungen in der Eintauchtiefe des Filterpapiers werden registriert und in den Oberflächendruck umgerechnet. Die Experimente wurden im *constant-pressure-mode* durchgeführt. Der Druck wurde bei 25 mN/m über die gesamte Versuchszeit konstant gehalten. Um Einbaueffekte deutlicher erkennbar zu machen, wurde ein niedrigerer Druck als der theoretische Druck der Phospholipiddoppelschichten von 30 mN/m eingestellt. Das Ausmaß der Einlagerung von Molekülen hängt vom Druck des Monolayers ab. Es ist um so geringer, je größer der Druck des Monolayers ist. In Anlehnung an [76] wurden die Experimente wie folgt durchgeführt:

Vor jedem Experiment wurde der Trog mit einer verdünnten Tensidlösung (Helmanex) gefüllt. Nach kurzer Einwirkzeit wurde diese mittels einer Absaugvorrichtung entfernt. Der Trog wurde solange mit Reinstwasser nachgespült bis sich bei maximalen Zusammenfahren der Barrieren kein Druckaufbau mehr bemerkbar machte. Danach wurde HEPES B als Subphase eingefüllt und im Trog auf 25°C mittels eines an den Trog angeschlossenen Wasserbad temperiert. Der Oberflächendruck wurde dann auf 0 mN/m über das Potentiometer abgeglichen. Auf die Oberfläche der Subphase wurde nun bei expandierten Barrieren ca. 5 µl einer DOPC-Lösung in Chloroform (Konzentration: 0,805 Mol) aufgetragen. Dies geschah mittels einer Hamilton-Spritze die vorsichtig auf die Oberfläche der Subphase aufgesetzt wurde. Besonders zu beachten war dabei, daß das Lipid nicht in die Subphase abtauchte sondern einen Film an der Pufferoberfläche bildete. Nach kurzer Wartezeit, in der das Chloroform abdampfte, wurden die Barrieren mit einer konstanten Geschwindigkeit von 1 cm/min zusammengefahren. Der Druckanstieg und die Isotherme wurde auf dem Bildschirm beobachtet. Nachdem ein Druck von 25 mN/m erreicht war, wurde die Barrierenbewegung automatisch gestoppt. Der Monolayer sollte jetzt eine Fläche von 40 cm<sup>2</sup> (Normtrog) bzw. 30 cm<sup>2</sup> (Biotrog) haben. Gegebenenfalls mußte zusätzlich mit einer Hamilton Spritze DOPC-Lösung aufgebracht werden oder durch vorsichtiges Saugen auf der Pufferoberfläche DOPC Moleküle abgesaugt werden. War der DOPC-Monolayer bei einem Druck von 25 mN/m auf 40 bzw. 30 cm<sup>2</sup> komprimiert worden, wurde nach kurzer Wartezeit mittels einer speziellen Hamilton-Spritze mit gebogener Kanüle Gallensalz oder Octreotid-Lösung in die Subphase gespritzt. Dabei wurde die Testlösung direkt unter die Barrieren injiziert. Nach kurzer Zeit konnte eine Vergrößerung der Monolayeroberfläche durch Auseinanderfahren der Barrieren beobachtet werden. Das Einstellen eines Gleichgewichtes ohne weitere Oberflächenveränderung wurde abgewartet. Dann wurde Octreotidlösung unter den mit Gallensalz vorbehandelten Monolayer gespritzt. Auch hier wurde die Einstellung eines Gleichgewichtes abgewartet. Die Daten für Zeit, Oberfläche und Druck wurden kontinuierlich aufgenommen und konnten dann mit Microsoft Excel® ausgewertet werden. Octreotid wurde bei allen Messungen so injiziert, daß eine Konzentration von 20 µMol in der Subphase erreicht wurde. UDCA-Na und CDCA-Na wurden jeweils mit einer Konzentration von 2 µMol, TC-Na und CS-Na sowohl mit 2 als auch mit 20 µMol injiziert.

## 2.7 *In-situ*- Absorptionsversuche an Ratten

Verwendet wurden männliche Wistar Ratten mit einem Gewicht von ca. 250 g.

Einen Tag vor dem Experiment wurden die Tiere nicht mehr gefüttert, erhielten aber freien Zugang zu Wasser. Die Ratten wurden durch Injektion von 0,2 ml einer 5% Pentobarbital-Lösung in den Bauchraum anästhesiert. Danach wurde das Peritoneum durch einen Medianschnitt eröffnet. Der Darm wurde vorsichtig aus dem Bauchraum herausgezogen, und 100 µg Desmopressin + 85 ng [Tyrosyl-3,5 (n)-<sup>3</sup>H] Vasopressin-[Arg] in 0,5 ml 0,9% Kochsalzlösung mit und ohne Gallensalzzusatz wurden direkt in das Jejunum, 5-6-cm distal des Treitzchen Ligaments injiziert. Der Darm wurde wieder in den Bauchraum zurückverlegt und der Schnitt mit Zellstoff bedeckt. Nach 10, 30, 60, 240, 180 und 300 min wurden durch Punktierung der vena jugularis ca. 250 µl Blut entnommen. Zuvor wurde das Fell im Halsbereich der Ratten entfernt. Die Blutproben wurden mit 20 µl Zitratpuffer 2% versetzt und in einer Mikrofuge bei 10000 g 5 min zentrifugiert. Das Plasma wurde abpipettiert, in Szintillationsvials gegeben und sofort mit 5 ml Szintillationscocktail versetzt. Die Proben wurden über Nacht im Kühlschrank gelagert und am nächsten Tag im Flüssigszintillationszähler vermessen. Geräteeinstellung s. 2.4.3. Während des Versuches wurde darauf geachtet, daß keines der Versuchstiere aus der Narkose erwachte. Gegebenenfalls wurde Pentobarbital nachinjiziert. Aus den Blutspiegelkurven wurde mittels der Trapezregel die *area under the curve* (AUC) berechnet.

Um die Absorptionseffizienz zu bestimmen wurde in einem weiteren Experiment drei Kontrollratten Desmopressin in der gleichen Konzentration i.v. injiziert und entsprechend Blutproben entnommen. Die Absorptionseffizienz berechnete sich nach:

$$[\%] \text{ Absorptionseffizienz} = \frac{AUC_{i.j.} \times \text{dosis}_{i.v.}}{AUC_{i.v.} \times \text{dosis}_{i.j.}} \times 100$$

|            |   |         |
|------------|---|---------|
| AUC i.j.   | AUC nach intrajejunaler Applikation               |         |
| AUC i.v.   | AUC nach intravenöser Injektion                   |         |
| Dosis i.j. | bei intrajejunaler Applikation verabreichte Dosis | [Mol/l] |
| Dosis i.v. | bei intravenöser Applikation verabreichte Dosis   | [Mol/l] |



## 2.8 Versuche mit Hexadecanoylaminofluoreszeïn

Um den Einfluß der verschiedenen Gallensalze auf Membranlipide zu untersuchen, wurde ein fluoreszenzmarkiertes Lipid in die apicale Membran von CaCo-2 Zellen inseriert. Nach Gallensalzinkubation wurde die Fluoreszenz im apicalen Medium und die Restfluoreszenz in dem Zellmonolayer gemessen. Außerdem wurden die Zellmonolayer nach Gallensalzinkubation fixiert und unter dem konfokalen Lasermikroskop betrachtet.

### 2.8.1 Fluoreszenzmessungen

In Anlehnung an [111] wurde eine Stammlösung von 50 mg 5-(N-hexadecanoyl)-aminofluoreszeïn (HDAF) in 100 ml 96% Ethanol hergestellt. 250 µl dieser Stammlösung wurden mit 250 ml TP verdünnt. Die so erhaltene Lösung hatte somit eine HDAF Konzentration von 0,5 µg/ml und enthielt insgesamt 0,1% Ethanol. Da der Fluoroskan die Fluoreszenz in Mikrotiterplatten von oben mißt, spielt die Oberflächenspannung der Proben eine große Rolle für die Meßgenauigkeit. Aus diesem Grund wurde zusätzlich 0,5% (m/v) BSA in die verdünnte HDAF Stammlösung gegeben. CaCo-2 Zellen wurden in 24-well Kulturschalen bis zur Konfluenz kultiviert. Das Medium wurde mittels Pasteurpipette und Vakuumpumpe entfernt und die Zellen wurden dreimal mit 37°C warmem TP gewaschen. In jedes well wurden dann 500 µl der verdünnten HDAF Stammlösung pipettiert und die Schalen 5 min im Brutschrank inkubiert. In dieser Zeit inserierte sich das fluoreszenzmarkierte Lipid in die apicale Membran. Nach 5 min wurde die HDAF Lösung abgesaugt, und die Zellen wurden dreimal mit 37°C warmem TP gewaschen. Anschließend wurden 500 µl Gallensalzlösung in HEPES B auf die Zellen pipettiert. Untersucht wurden CDCA-Na, UDCA-Na, TC-Na und CS-Na in unterschiedlichen Konzentrationen, sowie TP als Kontrolle. Die Schalen wurden erneut im Brutschrank inkubiert und nach 5 und 30 min jeweils 200 µl der apicalen Lösung als Probe entnommen. Nach 30 min wurden die Testlösungen abgesaugt und die Zellen gründlich mindestens dreimal mit 37°C warmem TP gewaschen. In jedes well wurde dann 1 ml Triton® X 100 1% in TP pipettiert und die Kulturschalen wurden für 1 Stunde in einen 65°C warmen Trockenschrank gestellt. In dieser Zeit lysierten die Zellen vollständig. Nach 1 Stunde wurde aus jedem well 200 µl Probe gezogen und alle Proben im Fluoroskan in Mikrotiterplatten vermessen (Geräteeinstellung wie in 2.4.2). Gemessen wurde mit dem FITC-Filter. Anregungs- und Emissionswellenlänge liegen für HDAF bei 497 bzw 519 nm. Verschiedene Verdünnungen der Stammlösung wurden zusammen mit den Proben als Eichwerte vermessen. Aus dieser Eichgerade wurde die Konzentration von HDAF in den Proben errechnet. Die Fluoreszenz wurde einmal als aus den Zellmonolayer gelöstes Lipid im apicalen Medium bestimmt und einmal als Restfluoreszenz in den Zellen nach Lyse durch Triton® X 100 Einwirkung.

### 2.8.2 Konfokale Lasermikroskopie

Zellen wurden 21 Tage auf Transwell® clear Filtern angezüchtet. Das Medium wurde abgesaugt und die Zellen dreimal mit 37°C warmem TP gewaschen. In jedes well wurde dann apical 500 µl HDAF Lösung, 0,5 µg/ml pipettiert. In diesem Fall wurde kein BSA zugesetzt. Basolateral wurde jeweils 1 ml TP aufgegeben. Die Platten wurden 5 min im Brutschrank inkubiert. Danach wurde die HDAF-Lösung abgesaugt. Die Zellen wurden dreimal mit 37°C

warmem TP gewaschen. 500 µl Gallensalzlösung unterschiedlicher Konzentrationen in HEPES B oder TP als Kontrolle wurden auf die Filter gegeben. Die Platten wurden erneut für 5 min im Brutschrank inkubiert. Nach 5 min wurden die Testlösungen entfernt. Die Zellen wurden dreimal gewaschen und der Puffer wurde dann vollständig aus dem basolateralen und apicalen Kompartiment entfernt. Die Filter wurden vorsichtig mit einem Skalpell ausgeschnitten und jeweils zwei wurden auf einen Objektträger gelegt. Auf die Filter wurde jeweils ein Tropfen Vectashield® gegeben, um ein Ausbleichen der Fluoreszenz zu verhindern. Über jeden Filter wurden Deckgläschen gelegt und diese von oben mit am Rand aufgetragenem transparentem Nagellack auf den Objektträgern fixiert. Die so präparierten Objektträger wurden bis zur ihrer Untersuchung in Alufolie eingeschlagen. Die Präparate wurden mit einem konfokalen Lasermikroskop mit dem 63 x Wasserobjektiv betrachtet.

## 2.9 Anfärbung des Aktin-Filaments mit Phalloidin-FITC

Um den Einfluß verschiedener Gallensalzlösungen auf das Aktingerüst von CaCo-2 Zellen zu untersuchen, wurde das Aktinfilament vor und nach Gallensalzkubation mit Phalloidin-FITC angefärbt. Um die einzelnen Zellen besser unterscheiden zu können, wurden zusätzlich die Kerne mit Propidiumiodid angefärbt.

Herstellung einer Phalloidin-FITC Stammlösung:

Die Stammlösung sollte 200 U/ml entsprechend 6,6 µM Phalloidin-FITC enthalten. Dazu wurden 100 µg Phalloidin-FITC in 12 ml Methanol gelöst. Die Stocklösung wurde zu je 100 µl aliquotisiert und bei -20°C eingefroren.

Herstellung der Propidiumiodid Stammlösung:

1 mg Propidiumiodid wurden in 1ml Methanol gelöst. Diese Ausgangslösung wurde dann 1:10 mit TP verdünnt.

Herstellung der Phalloidin-FITC/Propidiumiodid Färbelösung:

125 µl der Phalloidin-FITC Stammlösung und 500 µl der Propidiumiodid Stammlösung wurden ad 5 ml mit TP verdünnt. Das bedeutete eine 1:40 Verdünnung der Phalloidin-FITC Stammlösung und eine weitere 1:10 Verdünnung der Propidiumiodid Stammlösung.

Die Zellen wurden auf Transwell® clear Filtern 21 Tage angezchtet. Das Medium wurde abgenommen. Die Zellen wurden dreimal mit 37°C warmem TP gewaschen. Apical wurden jeweils 500 µl Testlösung (Gallensalze unterschiedlicher Konzentrationen in HEPES B) bzw. 500 µl Kontrolle (TP) aufgegeben. Basolateral wurde jeweils 1 ml TP eingefüllt. Die Kulturschalen wurden ein halbe Stunde im Brutschrank inkubiert. Danach wurden Test- und Kontrolllösungen entfernt. Die Zellen wurden dreimal mit TP gewaschen. In jedes well wurden apical 150 µl Proteifixierlösung, bestehend aus Paraformaldehyd und Glutaraldehyd, pipettiert. Die basolateralen Kompartimente wurden zuvor vollständig entleert. Die Fixierlösung wurde für 25 min bei Raumtemperatur auf den Zellen belassen und dann wieder abgesaugt. Die Zellen wurden dreimal mit TP gewaschen. In jedes well wurde dann apical 150 µl Triton® X 100 1% in TP pipettiert und die Kulturschalen für 5 min in ein Eisbad gestellt. Die Triton® X 100 -Lösung wurde abgesaugt und die Zellen erneut dreimal mit TP gewaschen. In jedes well wurden jetzt 200 µl der Phalloidin-FITC/Propidiumiodid Färbelösung pipettiert und bei Raumtemperatur 25 min inkubiert. Danach wurden die Zellen dreimal mit TP gewaschen und der Puffer anschließend vollständig von den Filtern entfernt. Die Filter wurden vorsichtig mit einem Skalpell ausgeschnitten und jeweils zwei auf einen Objektträger plziert. Auf jeden Filter wurde dann ein Tropfen Vectashield® gegeben und diese dann mit einem Deckgläschen bedeckt. Die Deckgläschen wurden mit am Rande

aufgetragenem transparentem Nagellack auf dem Objektträger fixiert. Die Präparate wurden zum Schutze der Fluoreszenz vor Ausbleichen in Alufolie eingeschlagen. Die Filter wurden unter dem konfokalen Mikroskop mit einem 63 x Wasser Objektiv betrachtet und mit einer angeschlossenen digitalen Kamera fotografiert.

## **2.10 Aufnahmeversuche mit NBD-Octreotid**

Um die Aufnahme von Octreotid in CaCo-2 Zellen mit und ohne Gallensalze zu veranschaulichen, wurden die Zellen mit NBD-Octreotid inkubiert und anschließend mit dem konfokalen Mikroskop betrachtet.

Herstellung der NBD-Octreotid Stammlösung:

NBD-Octreotid wurde zu 1 mMol in Wasser bidest gelöst. Die Lösung wurde zur Lagerung tiefgefroren.

Die Zellen wurden 21 Tage auf Transwell® clear Filtern kultiviert. Das Medium wurde abgenommen und die Zellen dreimal mit 37°C warmem TP gewaschen. In jedes well wurde apical 500 µl Testlösung (Gallensalzlösung in TP) bzw Kontrolllösung (TP) pipettiert. Zusätzlich wurde in jedes well 2,5 µl der NBD-Octreotid Stammlösung pipettiert, so daß eine Endkonzentration von 5 µMol auf den Zellen erzielt wurde. Die Kulturschalen wurden 1 Stunde im Brutschrank inkubiert. Danach wurden die Test- und Kontrollösungen entfernt und die Zellen dreimal mit TP gewaschen. Der Puffer wurde anschließend vollständig von den Filtern entfernt. Die Filter wurden vorsichtig mit einem Skalpell ausgeschnitten und jeweils zwei auf einen Objektträger plaziert. Auf jeden Filter wurde dann ein Tropfen Vectashield® gegeben und diese dann mit einem Deckgläschen bedeckt. Die Deckgläschen wurden mit am Rande aufgetragenem transparentem Nagellack auf dem Objektträger fixiert. Die Präparate wurden zum Schutze der Fluoreszenz vor Ausbleichen in Alufolie eingeschlagen. Die Filter wurden unter dem konfokalen Mikroskop mit dem 63 x Wasser Objektiv betrachtet und mit einer angeschlossenen digitalen Kamera fotografiert.

## **2.11 Mucsdiffusionsexperimente**

Der Einfluß von verschiedenen Gallensalzen auf die Diffusion durch die intestinale Mucusschicht wurde am Mucsdiffusionsmodell nach Nimmerfall und Rosenthaler [63], optimiert von Matthes [112], untersucht.

### **2.11.1 Mucisolierung**

Es wurde nativer Schweindarmmucus für die Diffusionsexperimente verwendet.

Die Därme stammten aus dem Schlachthof Mannheim. Es wurden 3 m Dünndarm ab Magen von frisch geschlachteten Schweinen eingesetzt. Bis zum Beginn der Mucisolierung wurden diese in Eis gekühlt. Zunächst wurden die Därme äußerlich gewaschen und mit eiskaltem Wasser mehrmals durchgespült, um vorhandene Nahrungsreste zu entfernen. Dann wurde der erste Meter ab Pylorus verworfen, so daß nur noch das Jejunum übrigblieb. Dieses wurde in 15 cm lange Stücke geschnitten. Der in jedem Stück vorhandene Schleim wurde mittels einem eisgekühlten Objektträger auf einer ebenfalls eisgekühlten Glasplatte ausgedrückt. Das Mucusfeuchtgewicht pro Dünndarm betrug zwischen 10 und 20 g. Die Mucusausbeuten der einzelnen Därme wurden vereinigt und als Mucuscharge bezeichnet. Der Schleim wurde in 10 g Portionen in Schnappdeckelgläsern tiefgefroren.

Durch Tiefgefrieren und Auftauen werden die natürlichen Eigenschaften des Mucugels nicht verändert [112].

### 5.11.2 Versuchsdurchführung

Als Puffer wurde der nicht toxische McIlvaine Zitratpuffer (MICB) gewählt. Er deckt einen pH-Bereich von 3,00 bis 7,80 ab. Die Ionenstärke wurde auf 0,1 mol/l, der pH-Wert auf 6,00 eingestellt. Dieser pH-Wert liegt zwischen dem gemessenen pH-Wert von Schweinemucus mit pH 6,6 und dem sogenannten virtuellen pH 5,3 der Mucosoberfläche [113]. Der Zusatz von Gelatine sollte die Absorption des Wirkstoffs an die Teflonoberflächen verhindern. Natriumazid diente der Konservierung des Puffers. Zur Untersuchung der Diffusion wurde die Gleichgewichtsdialyseapparatur der Fa. Dianorm benutzt. Diese Apparatur ist mit einem Drehzahlregler ausgestattet und besteht aus je 4 Zellblöcken mit 4 Dialysezellen aus Teflon pro Block. Dieses Gerät wurde während der Versuche in ein mit einem Thermostaten versehenes, mit Wasser gefülltes Glasgefäß eingehängt. Das Wasser wurde auf 37°C temperiert. Eine Dialysezelle bestand aus drei Kompartimenten. Jedes Einzelkompartiment erfaßte ein Volumen von 1 ml (Makro 1-GD). Zwischen die einzelnen Kompartimente wurde eine Dialysemembran aus regenerierter Zellulose mit 63 mm  $\varnothing$ , einem Molekülmassenausschluß von 10000 und einer Dicke von 9,5  $\mu\text{m}$  gelegt. Der Öffnungsdurchmesser der Einzelkompartimente betrug 4,5 cm<sup>2</sup>.

Die Membranen wurden wie vom Hersteller empfohlen vorbehandelt:

- Vorwaschen mit destilliertem Wasser (15 min)
- Einlegen der Membranen in 25-30% Ethanol für maximal 10 min
- Auswaschen mit destilliertem Wasser für 20 min
- Quellen bzw. Sättigen der Membranen in MICB für 15 min

Da der Durchmesser der Membranen für die Dialysezellen zu groß war und sie so über diese hinausgeragt hätten, wurde ein Kreis von ca. 5,3 cm<sup>2</sup> ausgeschnitten und dieser dann über die Öffnungen der Einzelzellen gelegt. Die Dialysezellen wurden wie folgt zusammengesetzt und befüllt:

- Das Donorkompartiment wurde mit einer zugeschnittenen Membran verschlossen
- In das Zwischenkompartiment wurde frischer oder bei 37°C aufgetauter Mucus mittels einer Plastikeinmalpipette luftblasenfrei eingefüllt. Pro Dialysezelle kamen 5 g Mucus zum Einsatz
- Die zweite Öffnung des Zwischenkompartiments wurde mit einer zugeschnittenen Membran verschlossen
- Das Akzeptorkompartiment wurde auf das Zwischenkompartiment aufgesetzt
- Die fertige Dialysezelle wurde in den Zellblock gelegt. Zwischen die einzelnen Dialysezellen wurde ein Abstandhalter eingesetzt. Der Zellblock wurde verschraubt, so daß die Dialysezellen fest verschlossen waren und kein Wasser eindringen konnte.
- In jedem Einzelkompartiment befanden sich drei kleine Bohrungen, über die das jeweilige Kompartiment mittels einer Einwegspritze mit Kanüle befüllt werden konnte. Diese Bohrungen konnten mit Stopfen dicht verschlossen werden.
- Zur Befüllung des Donor- bzw Akzeptorkompartiments wurde durch eine der Bohrung 1 ml Lösung eingefüllt und die Bohrung dann verschlossen. An der gegenüberliegenden Seite dieser Bohrung befanden sich zwei weitere. Durch eine von diesen Bohrungen wurde solange Lösung eingefüllt, bis diese an der gegenüberliegenden Seite wieder austrat. Anschließend wurden beide Bohrungen verschlossen.

Nachdem alle Dialysezellen befüllt, und alle Zellblöcke in das Gerät eingesetzt worden waren, wurde dieses in das temperierte Wasser eingehängt. Durch schonende Rotation von

12 Upm um eine Achse senkrecht zur Membran wurden die Lösungen während des gesamten Versuchs hinreichend durchmischt. Zu bestimmten Zeitpunkten wurden aus den Akzeptorkompartimenten Proben von ca. 500 µl entnommen. Pro Zeitpunkt (15, 30, 45 und 60 min) wurde jeweils eine Dialysezelle verwendet. Für die Bilanzierungsuntersuchungen wurden ebensolche Proben auch aus dem Donorkompartiment entnommen. Als Modellwirkstoff kam Carboxyfluoreszein in MICB zum Einsatz. Die Proben wurden in Mikrotiterplatten mit dem Fluroskan vermessen (Geräteeinstellung s. 2.4.2). Anregungs- und Emissionswellenlänge für Carboxyfluoreszein liegen bei 492 bzw. 518 nm. Gemessen wurde mit dem FITC-Filter. Zunächst wurde die Diffusion von Carboxyfluoreszein mit und ohne Gallensalze durch MICB-Puffer untersucht (Nullwertexperimente). Dazu wurde statt Mucus Puffer in das Zwischenkompartiment gefüllt. In einer zweiten Versuchsreihe wurde dann die Diffusion von Carboxyfluoreszein durch Mucus bei An- und Abwesenheit von Gallensalzen untersucht. Mucus enthält unter anderem auch Farbstoffe, vermutlich aus Resten von Galle. Während der Dialyse traten Farbstoffmoleküle in das Akzeptorkompartiment über. Die Lösung wies daher eine gelbliche Färbung auf. Diese Färbung störte die Fluorezenzmessung, daher wurde eine Dialyse ohne Carboxyfluoreszein durch Mucus durchgeführt. Die gemessenen Werte wurden gemittelt und von den Meßwerten der Probelösungen abgezogen.

### 2.11.3 Auswertung

Bei Diffusionsvorgängen *in vivo* herrschen zumeist *sink*-Bedingungen. Das hier vorgestellte Mucusdiffusionsmodell ist ein geschlossenes System. *Sink*-Bedingungen können hier nur in dem Bereich angenommen werden, in dem noch kein Gleichgewicht erreicht wurde. In [112] wurde gezeigt, daß ein Gleichgewicht erst nach zwei bis vier Stunden Dialysierzeit erreicht wird. Daher wurde die Dialyse nach einer Stunde abgebrochen und die Konzentration in Donor- und Akzeptorkompartiment bestimmt. Aus den erhaltenen Daten wurde der Massenfluß errechnet. Der Massenfluß wird als Massenänderung pro Zeiteinheit im dritten Kompartiment definiert.

$$\text{Massenfluß} = \frac{\text{Massenänderung}}{\text{Zeit}} = \frac{dm}{dt} \text{ [mg/h]}$$

Dazu wurde die Konzentration von Carboxyfluoreszein im Akzeptor nach einer Stunde Dialyse bestimmt. Der so bestimmte Massenfluß schließt *lag time* Effekte der einzelnen Wirkstoffe ein. Unter *lag time* ist dabei die Zeit zu verstehen, nach der ein gewisser kinetischer Prozeß einsetzt. Der relative Massenfluß bezieht den Massenfluß auf die Anfangsmasse des diffundierten Stoffes. Er gibt an, wieviel Prozent der Ausgangsmasse pro Zeiteinheit in den Akzeptor diffundieren:

$$\text{relativerMassenfluß} = \frac{dm/mo}{dt} \times 100 \text{ [%/h]}$$

|    |  |      |
|----|--|------|
| dm | Massenänderung im Akzeptorkompartiment | [mg] |
| mo | Aufangsmasse im Donorkompartiment      | [mg] |
| t  | Zeit                                   | [h]  |

Für die Nullwertexperimente wurden entsprechend der Massenfluß und der relative Massenfluß berechnet. Da der Massenfluß in den Nullwertexperimenten wirkstoffabhängig ist, kann der relative Massenfluß eines Wirkstoffs auf seinen Nullwert bezogen werden.

Der korrigierte relative Massenfluß errechnet sich:

$$\text{korrigierter relativer Massenfluß} = \frac{\text{relativer Massenfluß mit Mucus}}{\text{relativer Massenfluß ohne Mucus}} \times 100 [\%]$$

## 2.12 Anisotropiemessungen

Um den Einfluß verschiedener Gallensalze auf den Ordnungszustand in Biomembranen zu untersuchen, wurden Anisotropiemessungen durchgeführt. Diese Messungen wurden am Institut für Pharmazeutische Technologie und Biopharmazie in Marburg vorgenommen.

### 2.12.1 Herstellung der Liposomen

1 ml einer bei  $-20^{\circ}\text{C}$  gelagerten DMPC-Lösung (18,25 mg /ml Chloroform) wurde in einen Rundkolben pipettiert und mit ungefähr 10 ml Chloroform versetzt. Diese Lösung wurde am Rotavapor® bei  $35^{\circ}\text{C}$  im Vakuum abrotiert bis das Lipid einen gleichmäßigen Film am Kolbenboden gebildet hatte und das Chloroform vollständig verdampft war. Der Film wurde danach im Vakuumtrockenschrank eine Stunde bei  $35^{\circ}\text{C}$  getrocknet, um Chloroformreste zu entfernen. Anschließend wurde 1 ml HEPES B in den Kolben gegeben, 5 Glasperlen zugefügt und der Film durch langsame Drehbewegung des Rotavapors abgeschabt. Auf diese Art entstanden im Kolben spontan multilamellare Vesikel aus DMPC. Um daraus unilamellare Vesikel möglichst einheitlicher Größe zu machen, wurde die Lösung 21 mal durch eine Membran mit 200 nm Porenweite mit Hilfe eines Liposofast Extruder ® extrudiert. Die so hergestellten DMPC-Liposomen wurden in einem Autosizer vermessen.

### 2.12.2 Anisotropiemessungen

100  $\mu\text{l}$  der hergestellten Liposomen wurden mit 36  $\mu\text{l}$  einer 0,01 Mol DPH-Löung versetzt und eine halbe Stunde bei Zimmertemperatur unter Lichtausschluß inkubiert.

10  $\mu\text{l}$  der mit DPH inkubierten Liposomen wurden mit 3 ml HEPES B oder Testlösung (Gallensalz oder Triton® X 100 Lösung in HEPES B) versetzt, mit einer Eppendorfpipette kurz gemischt und sofort im Lumineszenz-Spektrometer vermessen.

Folgende Messeinstellungen wurden benutzt:

|                   |  |
|-------------------|--|
| Number of flasher | 10   |
| Duration          | 10 sec   |
| Gf-Factor         | 1,401  |
| Slit              | 5  |
| Anregungs-wheel   | Pos 1 vertikaler Filter<br>Pos 3 horizontaler Filter                         |
| Emissions-wheel   | Pos 1 vertikaler Filte<br>Pos 3 horizontaler Filter                          |
| DPH               | $\lambda_{\text{ex}} = 336 \text{ nm}; \lambda_{\text{em}} = 430 \text{ nm}$ |

Die Messungen wurden mit einem an das Spektrometer angeschlossenen Computer verfolgt und aufgezeichnet (Software: FL WinLab Vers. 2.01).

---

Die pro Messung für  $r$  erhaltenen Werte wurden gemittelt. Jede Messung wurde dreimal wiederholt. Die Meßreihe wurde einmal bei 10 °C und einmal bei 37°C aufgenommen. Der Küvettenraum wurde dabei über ein angeschlossenes Wasserbad temperiert.

### 3 ERGEBNISSE UND DISKUSSION

#### 3.1 Löslichkeit der Gallensalze in verschiedenen Puffern

Gallensäuren, nicht aber ihre Salze, werden als polare Lipide Klasse I klassifiziert [114], das heißt, sie sind unlösliche, nicht quellfähige Amphiphile. Im Gegensatz dazu sind die Natriumsalze der Gallensäuren wasserlöslich und aggregieren spontan zu Mizellen.

Im Rahmen dieser Dissertation wurden zwei nichtkonjugierte Gallensalze, namentlich die Na-Salze von CDCA und UDCA sowie ein Taurinkonjugat und ein Sarcosinkonjugat der Cholsäure untersucht. Die Löslichkeit dieser Gallensalze weicht stark voneinander ab. Während TC bei nahezu allen pH-Werten löslich ist, liegen die CMpH-Werte (s. dazu Seite 12) für CDCA bei 6,7 und für UDCA bei 8,0. Das heißt bei dem physiologischen pH-Wert des Darms fallen sowohl CDCA als auch UDCA als freie Säuren aus. Gallensäuren bilden mit  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen schwerlösliche Verbindungen. Unter physiologischen Bedingungen kommt es allerdings kaum zum Ausfallen von Ca-Salzen der Gallensäuren. Dies hat mehrere Gründe: Natürliche Gallensäuren liegen zumeist als Glycin oder Taurinkonjugate vor. Taurin-Konjugate bilden überhaupt keine schwerlöslichen Ca-Salze, Glycin-Konjugate in untergeordnetem Maße [115]. Außerdem wird die Gallensalzaktivität durch Mizellbildung und die Aktivität der Ca-Ionen wiederum durch deren Bindung an diese Gallensalz-Mizellen herabgesetzt. Die Präzipitation von Ca-Gallensäuren-Salzen geht zudem sehr langsam vonstatten und führt eher zur Bildung eines metastabilen Gels als zu einem kristallinen Niederschlag [115].

Für die nachfolgenden Experimente sollte ein Puffer als Lösungsmittel für die Gallensalze gewählt werden, in dem diese in den erforderlichen Konzentrationen bei einem pH von 7,4 vollständig gelöst vorliegen. Folgende Puffer wurden untersucht:

Kaliumphosphat-Puffer 50 mMol ; Natriumphosphat-Puffer 50 mMol; Zellkulturmedium serumfrei, HBSS; Transportpuffer; physiologische Kochsalzlösung, HEPES 10 mM; der pH-Wert wurde außer bei Kochsalzlösung auf 7,4 eingestellt.

Ergebnis der Untersuchung:

| Puffer  | CDCA-Na |        | UDCA-Na |        | CS-Na | TC-Na |
|---|---------|--------|---------|--------|-------|-------|
|   | 23 mM   | 2,3 mM | 23 mM   | 5,8 mM |       |       |
| K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> /KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> -Puffer<br>50 mMol   | -       | -      | -       | -      | +     | +     |
| NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> /Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> -Puffer<br>50 mMol | +       | +      | -       | -      | +     | +     |
| Zellkulturmedium, serumfrei   | -       | -      | -       | -      | -     | +     |
| HBSS  | -       | -      | -       | -      | -     | +     |
| Transportpuffer   | -       | -      | -       | -      | -     | +     |
| Physiologische Kochsalz-<br>lösung  | +       | +      | -       | +      | +     | +     |
| HEPES 10 mM   | +       | +      | -       | +      | +     | +     |

: Gallensalz löste sich nicht vollständig; + : Gallensalz löste sich vollständig



Transportpuffer, HBSS und Zellkulturmedium enthalten Kalziumsalze (ca. 0,2%, 50 mM). Bis auf Taurocholat löste sich keine der untersuchten Gallensalze in diesen Medien. Charakteristisch für UDCA-Na war die Entstehung einer anscheinend klaren Lösung, aus der sich nach einigen Stunden ein Niederschlag bildete. Kaliumsalze schienen die Löslichkeit von UDCA-Na und CDCA-Na negativ zu beeinflussen. In der Literatur wurden hierzu keine Angaben gefunden. Na-Ionen erniedrigen die CMC der Gallensalzen aufgrund einer Erhöhung der Ionenstärke in der Lösung [116]. Alle Gallensalze lösten sich vollständig in HEPES B. Die Lösungen blieben auch über Stunden stabil. Die Ergebnisse der Lösungsversuche entsprachen im allgemeinen den Erwartungen und deckten sich mit den Angaben in der Literatur. Als Puffer zur Herstellung der Gallensalzlösungen wurde für die nachfolgenden Experimente somit HEPES 10 mM pH 7,4 (HEPES B) gewählt.

Anmerkung: Es wurden nur die Konzentrationen an Gallensalzen untersucht, die auch später in den Experimenten eingesetzt werden sollten. Es wurde also keine Löslichkeit im eigentlichen Sinne in den einzelnen Puffern bestimmt.

## 3.2 Toxizitätsuntersuchungen

Gallensalze sind physiologische Bestandteile des Darmlumens. Sie liegen unter physiologischen Bedingungen im Darm als Mischmizellen mit Phospholipiden und Cholesterol vor. In diesen Mizellen ist die Toxizität der Gallensalze stark erniedrigt.

Daher wurde ihr Einsatz als Resorptionsenhancer lange als unbedenklich angesehen. Aufgrund ihrer oberflächenaktiven Eigenschaften führen sie in Tierversuchen allerdings zu lokalen Irritationen und Schädigungen des Epithels (Verkürzung oder Fehlen der Mikrovilli, Zerstörung von Zellorganellen). Diese Schädigungen sind um so größer je hydrophober die Gallensäure ist, wobei Konjugation mit Taurin oder Glycin diesen Effekt abmildert [117]. Die Schäden erwiesen sich als reversibel.

Im Folgenden wird die Zytotoxizität von CS-Na, TC-Na, CDCA-Na und UDCA-Na am CaCo-2 Zellmodell untersucht.

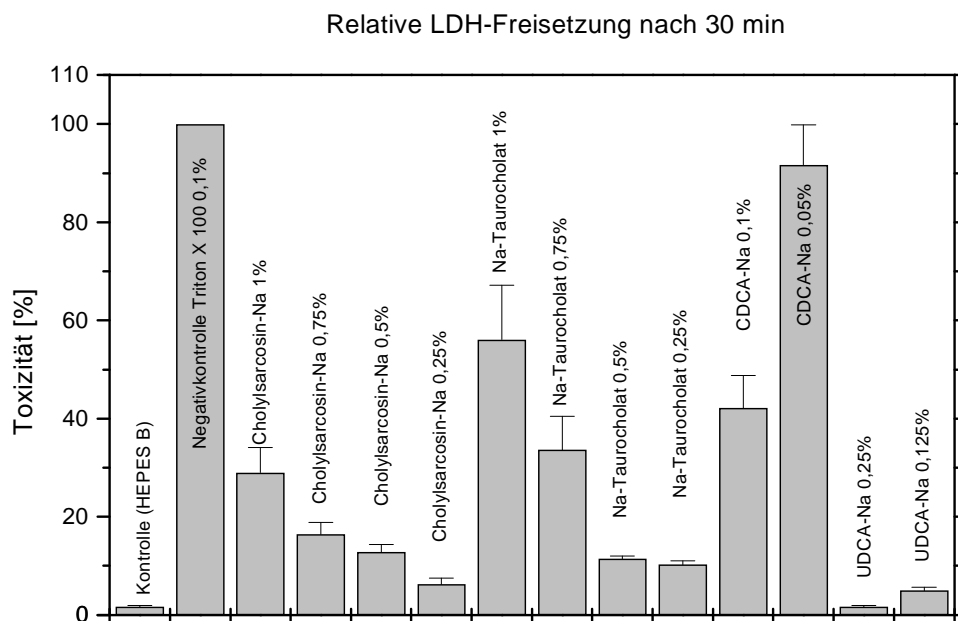
### 3.2.1 Lactatdehydrogenase Aktivität nach Gallensalzinkubation

Zunächst wurden alle Gallensalze als 1% und 0,5% Lösungen in HEPES B Puffer untersucht. Wie in Kapitel 3.1 dargelegt, ließ die geringe Löslichkeit von UDCA-Na es nicht zu, eine 1% Lösung herzustellen. Weiterhin wurde festgestellt, daß CDCA-Na in Konzentrationen höher als 0,1% die Zellen in kürzester Zeit vollständig lysiert (mikroskopische Kontrolle s. Kapitel 3.2.3). Dabei entsteht ein viskoser, gelartiger Schleim aus Protein und anderen Zellbestandteilen. Alle nachfolgenden Experimente wurden mit 0,1 und 0,05% CDCA-Na Lösungen durchgeführt. In UDCA-Na Lösungen in Konzentrationen über 0,25% bildete sich auf den Zellen ein hochviskoses Gel. Eine gleichzeitige Lyse der Zellen wie bei CDCA-Na war allerdings nicht festzustellen. Vermutlich handelt es sich bei diesem Gel um ein metastabiles Kalziumsalz. UDCA-Na wurde in allen nachfolgenden Experimenten als 0,25 und 0,1% Lösung in HEPES B untersucht.

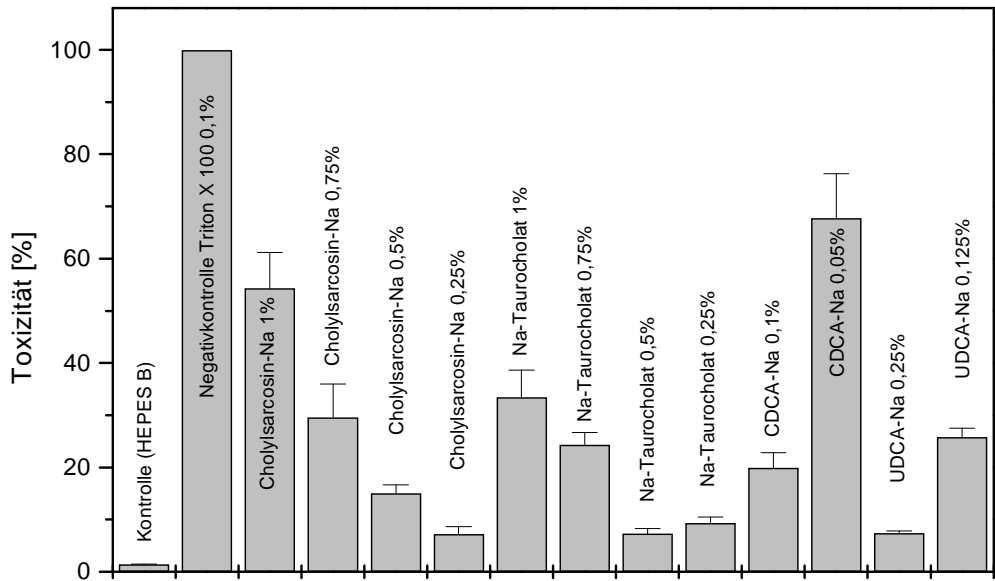
Konzentrationen der untersuchten Gallensalzlösungen in HEPES B:

| Gallensalz        | Konzentration [% m/v] | Konzentration [mM] |
|-------------------|-----------------------|--------------------|
| Cholylsarcosin-Na | 1                     | 20                 |
|                   | 0,75                  | 15                 |
|                   | 0,5                   | 10                 |
|                   | 0,25                  | 5                  |
| Na-Taurocholat    | 1                     | 18,6               |
|                   | 0,75                  | 14                 |
|                   | 0,5                   | 9,3                |
| Na-Taurocholat    | 0,25                  | 4,6                |
| CDCA-Na           | 0,1                   | 2,3                |
|                   | 0,05                  | 1,2                |
| UDCA-Na           | 0,25                  | 5,8                |
|                   | 0,1                   | 2,3                |

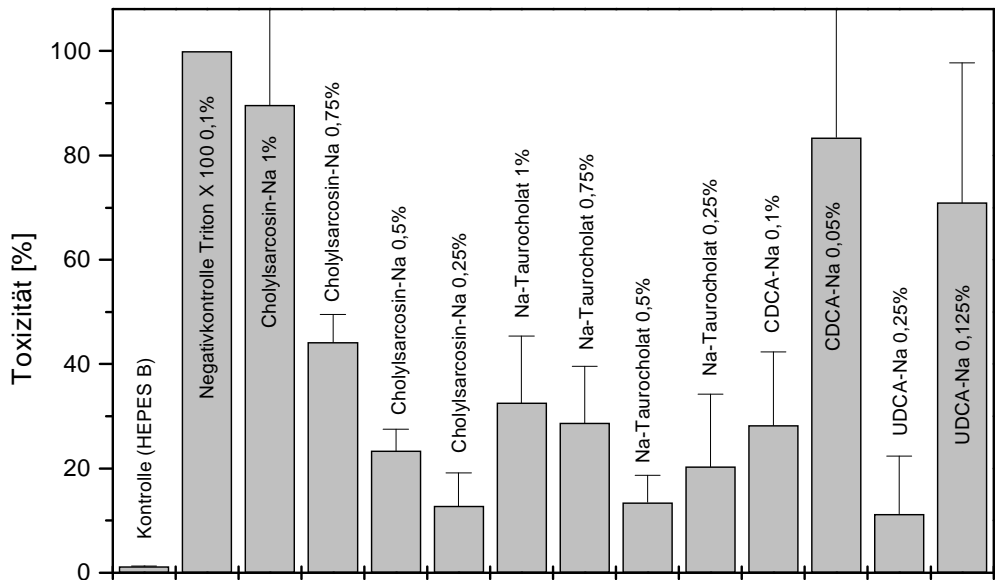
Die relative LDH-Freisetzung nach 30, 60 und 90 min ist in den folgenden Graphen dargestellt:



Relative LDH-Freisetzung nach 60 min



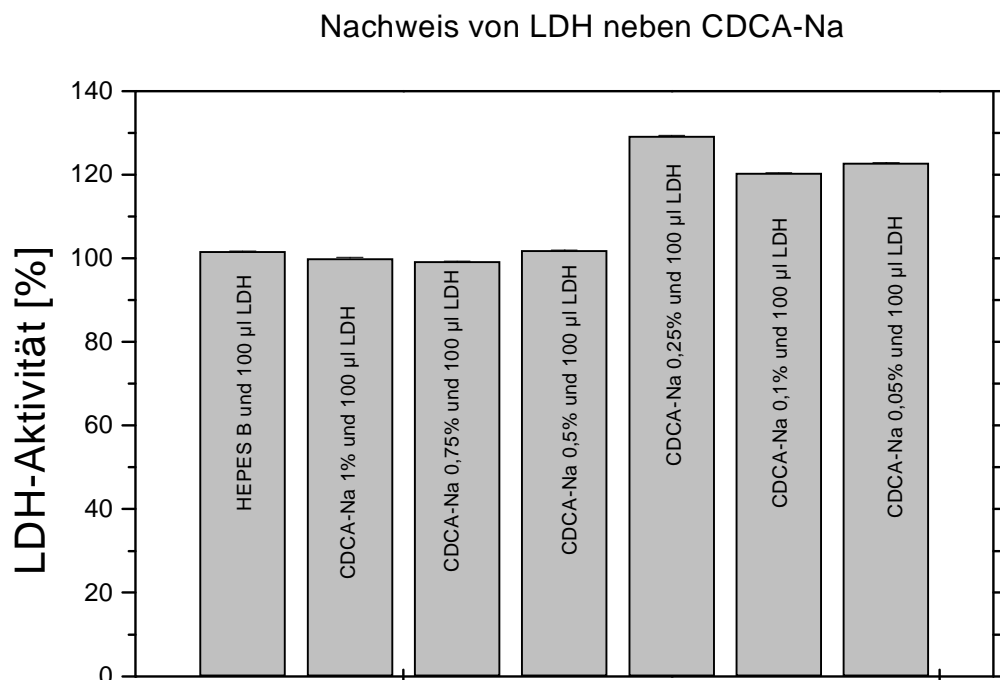
Relative LDH-Freisetzung nach 90 min



Von Triton® X 100 ist bekannt, daß es Zellen in einer Konzentration von 0,1% vollständig lysiert [26]. Daher wurde die nach Triton® X 100 im apicalen Medium gemessene LDH-Aktivität als 100% Toxizität bewertet. HEPES B als Kontrolle hatte erwartungsgemäß eine vernachlässigbare Toxizität. Diese ist wahrscheinlich eher auf Schädigung beim Waschen der Zellen als auf die Auswirkung von HEPES B zurückzuführen.

Die Toxizität von CS-Na ist nach 30 min im Vergleich zu TC-Na niedrig, steigt aber innerhalb der nächsten Stunde kontinuierlich an und ist nach 90 min deutlich höher, als die von TC-Na. Betrachtet man die Toxizität von TC-Na, so stellt man eine umgekehrte Entwicklung fest. Die Toxizität von TC-Na hatte nach 30 min bereits ihren höchsten Wert erreicht. Innerhalb der nächsten halben Stunde sinkt sie um die Hälfte. Daraus kann geschlossen werden, daß die toxischen Auswirkungen, die von TC-Na auf die Zellen ausgeübt werden, schnell in ihrer vollen Wirkung auftreten. Bei CS-Na hingegen setzt die Schädigung viel langsamer ein. CS-Na zeigt in seiner 0,75 % Lösung zu jedem Zeitpunkt eine geringere Toxizität als TC-Na in derselben Konzentration. Die 0,5 und 0,25% Lösungen von TC-Na und CS-Na verursachen nur noch geringfügige Schädigungen. Die untersuchte Konzentration von CDCA-Na ist um den Faktor 10 niedriger als die Konzentrationen von TC- und CS-Na. Die Zytotoxizität von CDCA-Na dagegen ist zu allen Zeitpunkten höher, als die von TC-Na und CS-Na. Rahman und Billington [118] kamen zu demselben Ergebnis. Die toxischen Auswirkungen der UDCA-Na Lösungen auf die Zellen ist gering. Nach 90 min ist auch hier ein Anstieg der Toxizität zu beobachten.

Betrachtet man die Toxizität von CDCA-Na und UDCA-Na, fällt auf, daß die niedrigere Konzentration eine höhere Toxizität zu haben scheint. Ausgehend von der Annahme, daß CDCA-Na durch seine stark lysierende Wirkung LDH inaktiviert, wurden jeweils 100 µl LDH-Enzym mit CDCA-Na Lösungen verschiedener Konzentrationen eine Stunde inkubiert. Das Ergebnis zeigt:



Das LDH-Enzym ist vollständig in jeder CDCA-Na-Lösung nachweisbar und wird somit nicht inaktiviert. Nach dieser Feststellung erscheinen die Ergebnisse des LDH-Assay unstimmg. Mikroskopisch konnte nachgewiesen werden, daß CDCA-Na 0,1% die Zellen stärker schädigt als in 0,05% Lösung (s. dazu Kapitel 3.4). Es erscheint unlogisch, daß eine niedrigere Konzentration eine höhere Toxizität haben soll. Eine mögliche Erklärung für dieses Phänomen könnte in einer Diffusionsbehinderung des Enzym durch den auf den Zellen haftenden Schleim liegen: Nach der Inkubation von 0,1% CDCA-Na Lösung werden die Zellen stärker geschädigt als durch eine 0,05 % Lösung. Der auf den Zellen haftende Schleim behindert die Diffusion von LDH in den apicalen Puffern. Es ist dadurch nur ein Teil des freigesetzten Enzyms nachweisbar. Triton® X 100 führt zu einer vollständigen Lyse der Zellen. Das Auftreten eines gelartigen Schleims konnte nicht beobachtet werden. Der LDH-Assay liefert hier vernünftige Ergebnisse. Es wurde versucht, durch Verdünnung oder Extraktion, Enzym aus dem Zellschleim freizusetzen. Eine geeignete Methode wurde nicht gefunden. Der LDH-Assay alleine liefert keine befriedigende Einschätzung der Zytotoxizität. Daher wurden weitere Untersuchungen durchgeführt ( s. Kapitel 3.2.2 bis 3.2.4)

Die Frage, ob Gallensalze nur in Konzentrationen oberhalb der CMC ( CMC der untersuchten Gallensäuren s. Kapitel 1.4.1.3 und 1.4.2.4) toxische Auswirkungen auf die Zellen haben, kann nicht allgemeingültig für alle untersuchten Gallensalze beantwortet werden. TC-Na und CS-Na zeigen in Konzentrationen unterhalb ihrer CMC (0,5 und 0,25%) eine deutlich geringere Toxizität. Deutliche Schädigungen der Zellen verbunden mit der Freisetzung von LDH werden von CS-Na und TC-Na nur in Konzentrationen oberhalb der CMC verursacht. Dabei kommt es zu einer mizellaren Solubilisation von Membranbestandteilen, die in niedrigeren Konzentrationen zur Bildung von Membranporen führt. Durch diese Poren kann LDH austreten. In submizellaren Konzentrationen lagern sich TC-Na- und CS-Na- Monomere lediglich in die Membranen ein, ohne das Entstehen von Poren zu verursachen. Werner [119] untersuchte im Rahmen ihrer Dissertation die Zytotoxizität von TC-Na in verschiedenen Konzentrationen. Auch sie stellte fest, das TC-Na nur in Konzentrationen oberhalb der CMC zu deutlichen Zellschäden führt. Ruetz et al fanden, daß TC-Na Phosphatidylcholin aus Zellmembranen extrahieren kann. Dabei entstehen keine Poren im Bilayer. PC senkt die CMC von TC-Na auf 200 µM. Andere Phosphatidylverbindungen haben diesen Effekt nicht [120]. CDCA-Na und UDCA-Na wurden nur in Konzentrationen unterhalb ihrer CMC untersucht. Bei CDCA-Na konnte dennoch eine deutliche Toxizität für die Zellen nachgewiesen werden. Schölmerich et al. [121] fanden ebenfalls eine erhöhte Toxizität von CDCA-Na und Desoxycholat-Na in submizellaren Lösungen. Als Erklärung wird angeführt, daß unkonjugierte, hydrophobe Gallensalze in die Zellen aufgenommen werden und dort direkt den Zellkern, das Zytoplasma oder die Mitochondrien schädigen. Während TC und CS-Na lediglich in die Zellmembran eingebaut werden, permeiert das hydrophobere CDCA-Na in die Zelle hinein. Schiff et al. [122] untersuchten den aktiven und passiven Transport von Gallensalzen in Dünndarm und Kolon. Sie fanden, daß der Permeabilitätskoeffizient der passiven Diffusion durch Hydroxylgruppen um den Faktor 3,4, durch Konjugation mit Glycin um den Faktor 6,8 und durch Konjugation mit Taurin um den Faktor 8,1 verringert wird. Die anionischen Gallensalze diffundieren gemäß dieser Reihenfolge noch einmal deutlich langsamer. Die Affinität für den aktiven Transporter hingegen verhält sich umgekehrt: Trihydroxygallensäuren haben eine größere Affinität zu dem Transporter als Dihydroxygallensäuren.

Die deutlich geringere Toxizität von UDCA-Na resultiert sowohl aus der höheren Hydrophilie gegenüber CDCA-Na, die das Permeieren in die Zelle erschwert, als auch der deutlich höheren CMC von 19 mM.

Nach der Untersuchung der LDH-Freisetzung kann für die Toxizität der getesteten Gallensalze folgende Reihenfolge aufgestellt werden:

Chenodesoxycholol >> Taurocholol  $\geq$  Sarcosincholol >> Ursodesoxycholol

Entsprechend den in der Literatur gefundenen Angaben, weist das Dihydroxygallensalz CDCA-Na eine deutlich größere Toxizität als die Trihydroxygallensalze auf [92,121,123,124,125].

Insgesamt erweist sich der LDH-Assay zur Untersuchung der Zytotoxizität von Gallensalzen nicht als uneingeschränkt geeignet. Für die Trihydroxygallensalze konnten nachvollziehbare Ergebnisse erzielt werden. Die Untersuchung von CDCA-Na lieferte dagegen widersprüchliche Resultate.

### 3.2.2 Aktivität mitochondrialer Dehydrogenasen nach Gallensalzinkubation

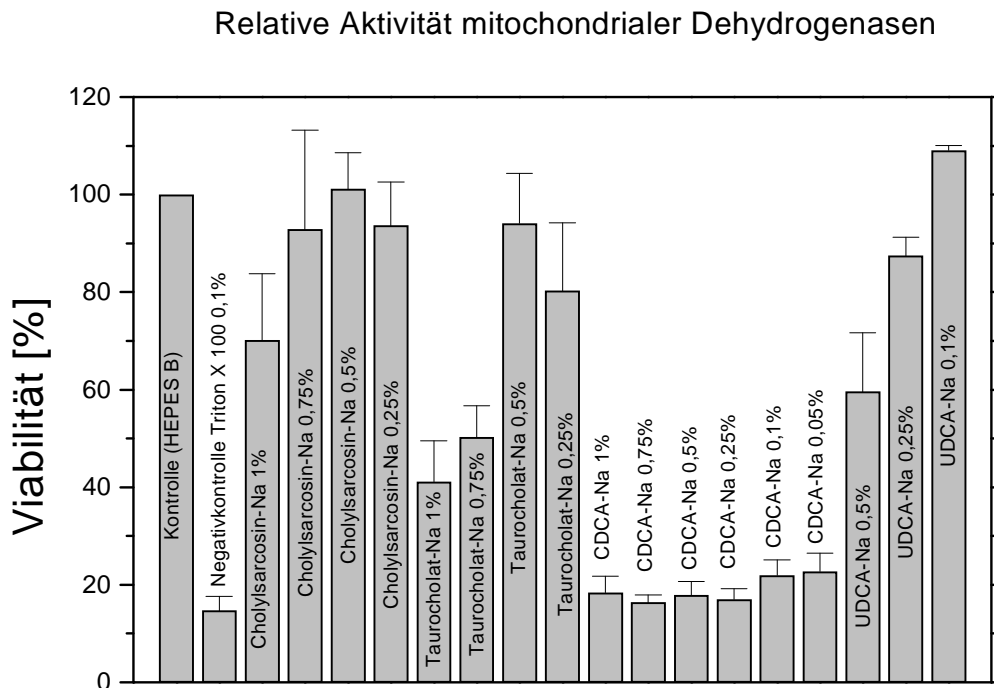
Die Aktivität der mitochondrialen Dehydrogenasen wurde mittels WST-1 Assay untersucht. Mitochondrien sind besonders empfindlich gegenüber Gallensalzen. Sie sind das erste Zellorganell, das nach Gallensalzinkubation geschädigt wird [126,127,128]. Der WST-1-Assay ist somit ein empfindlicher Toxizitätstest.

Die vollständige Umsetzung von WST-1 zu dem dunkelroten Formazan kann sich über einen Zeitraum von bis zu 4 Stunden erstrecken. Daher wurden die Mikrotiterplatten zunächst nach 30, 60, 120, 180 und 240 Minuten vermessen. Dabei wurde festgestellt, daß sich bereits nach einer halben Stunde Inkubationzeit WST-1 vollständig umgesetzt hatte. Nach dieser Zeit blieben die Meßergebnisse konstant.

Die Gallensalze wurden in folgenden Konzentrationen untersucht:

| Gallensalz        | Konzentration [% m/v] | Konzentration [mM] |
|-------------------|-----------------------|--------------------|
| Cholylsarcosin-Na | 1                     | 20                 |
|                   | 0,75                  | 15                 |
|                   | 0,5                   | 10                 |
|                   | 0,25                  | 5                  |
| Na-Taurocholol    | 1                     | 18,6               |
|                   | 0,75                  | 14                 |
|                   | 0,5                   | 9,3                |
|                   | 0,25                  | 4,6                |
| CDCA-Na           | 1                     | 23                 |
|                   | 0,75                  | 17,4               |
|                   | 0,5                   | 12                 |
|                   | 0,25                  | 6                  |
|                   | 0,1                   | 2,3                |
|                   | 0,05                  | 1,2                |
| UDCA-Na           | 0,5                   | 12                 |
|                   | 0,25                  | 6                  |
|                   | 0,1                   | 2,3                |

Ergebnis der Messungen:



HEPES B verursachte nur eine vernachlässigbare Freisetzung von LDH in das apicale Medium (s. Kapitel 3.2.1). Daher wurde die Viabilität der CaCo-2 Zellen nach Inkubation mit HEPES B als 100% bewertet.

Nach Inkubation mit Triton®X 100 0,1% sinkt die Viabilität der Zellen auf 15%.

CS-Na weist gegenüber den Ergebnissen des LDH-Assays eine geringere Toxizität auf. Die Zellen werden deutlich weniger geschädigt als durch TC-Na. TC-Na führt in 1 und 0,75% Lösung zu einem deutlichen Rückgang der Zellviabilität. In 0,5 und 0,25% Lösung ist die Viabilität kaum herabgesetzt. TC-Na und CS-Na führen auch hier nur in Konzentrationen oberhalb der CMC zu nennenswerten Zellschäden.

CDCA-Na führt zu ähnlichen Ergebnissen wie Triton® X 100. In Konzentrationen oberhalb von 0,1% sinkt die Viabilität auf 17%. In 0,1%ig und 0,05%ig Lösung steigt die Viabilität leicht auf 22% an.

UDCA-Na zeigt nur in 0,5% Lösung eine deutlich verminderte Zellviabilität. In den niedrigeren Konzentrationen werden die Zellen kaum geschädigt.

Die Ergebnisse des WST-1 Assays zeigen, daß höhere Konzentrationen an CDCA-Na auch eine höhere Toxizität aufweisen. Damit wird die Vermutung bestätigt, daß die widersprüchlichen Ergebnisse des LDH-Assays durch eine behinderte Diffusion des LDH-Enzyms aus dem Zellschleim erklärt werden können, bestätigt. Die Messung der Aktivität der mitochondrialen Dehydrogenasen beruht auf einer Farbreaktion. Diese wird durch den auftretenden Zellschleim nicht beeinträchtigt. Nach diesen Ergebnissen erscheint der WST-1-Test geeigneter, um die Zytotoxizität von Gallensalzen zu untersuchen, als der LDH-Assay.

### 3.2.3 Trypanblaufärbung nach Gallensalzinkubation

Die Monolayer wurden nach Gallensalzinkubation mit Trypanblau angefärbt.

Die Trypanblaufärbung ist kein empfindlicher Toxizitätstest. Zellen können bereits geschädigt sein, obwohl die Zellmembran noch in der Lage, die Diffusion von Trypanblau in die Zelle zu verhindern [129]. Ein Ausschnitt der Monolayer (ca. 100 Zellen) wurde ausgezählt und halbquantitativ ausgewertet.

Ergebnis:

| Gallensalz        | Konzentration in HEPES B [%] | Ergebnis der Auszählung der Anzahl gefärbter Zellen |
|-------------------|------------------------------|---|
| Kontrolle (TP)    |                              | < 1 %   |
| Taurocholat-Na    | 1                            | 10-30 %   |
|                   | 0,75                         | 1-10 %  |
|                   | 0,5                          | 1-10 %  |
|                   | 0,25                         | < 1 %   |
| Cholylsarcosin-Na | 1                            | 10-30 %   |
|                   | 0,75                         | 1-10 %  |
|                   | 0,5                          | 1-10 %  |
|                   | 0,25                         | < 1 %   |
| CDCA-Na           | 1                            | > 80 %  |
|                   | 0,75                         | > 80 %  |
|                   | 0,5                          | > 80 %  |
|                   | 0,25                         | > 80 %  |
|                   | 0,1                          | > 80 %  |
|                   | 0,05                         | 50-80 %   |
| UDCA-Na           | 0,5                          | 10-30 %   |
|                   | 0,25                         | 1-10 %  |
|                   | 0,1                          | 1-10 %  |

CDCA-Na führte in Konzentrationen über 0,1% zu einer vollständigen Lyse der Zellen.

Die Ergebnisse stehen mit den Ergebnissen aus Kapitel 3.2.1 und 3.2.2 in Einklang.

Gaull und Wright [130] untersuchten mittels Trypanblaufärbung 15 Gallensalzlösungen in einer Konzentration von 500  $\mu\text{M}$ . CDCA-Na reduzierte die Zellviabilität nach einer Stunde auf 15%, während TC-Na und UDCA-Na in dieser Konzentration keine toxischen Auswirkungen hatten.



### 3.2.4 Mikroskopische Toxizitätsuntersuchungen

Die Zellen wurden nach Gallensalzinkubation mikroskopisch betrachtet. Mit Ausnahme nach der Inkubation mit CDCA-Na ließen sich nur geringfügige Schäden erkennen. Es bildeten sich kleinere Löcher im Monolayer. Vereinzelt konnten aufgequollene Zellen ausgemacht werden. Im Gegensatz dazu lysierte CDCA-Na in Konzentrationen über 0,1% die Zellen innerhalb kürzester Zeit nahezu vollständig. Nach Inkubation mit CDCA-Na 1%, 0,5 und 0,1%; CS-Na 1%, HEPES B und Triton X 100 0,1% wurden Aufnahmen mit der digitalen Kamera gemacht.

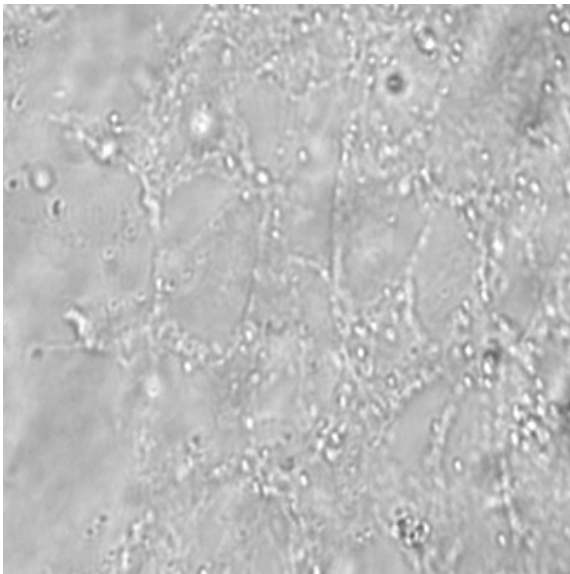


Abb. 3.2.1: CaCo-2 Zellen nach 30 min Inkubation mit CDCA-Na 0,1%

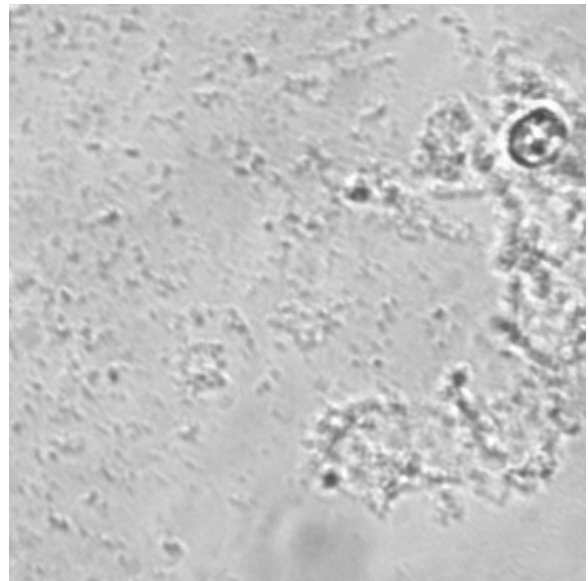


Abb. 3.2.2: CaCo-2 Zellen nach 30 min Inkubation mit CDCA-Na 0,5%

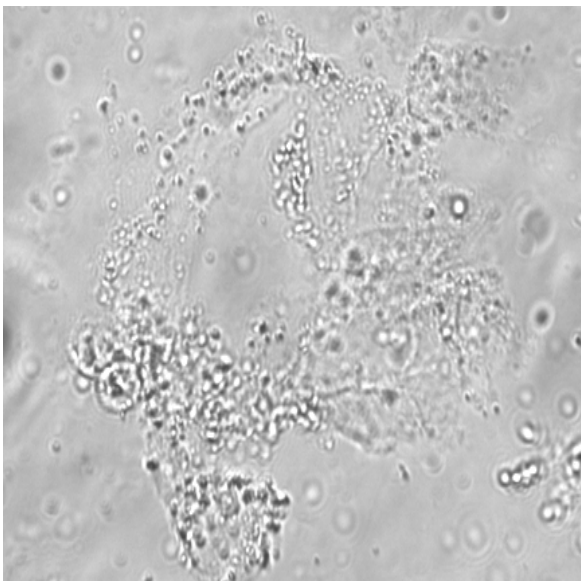


Abb. 3.2.3: CaCo-2 Zellen nach 30 min Inkubation mit CDCA-Na 1%

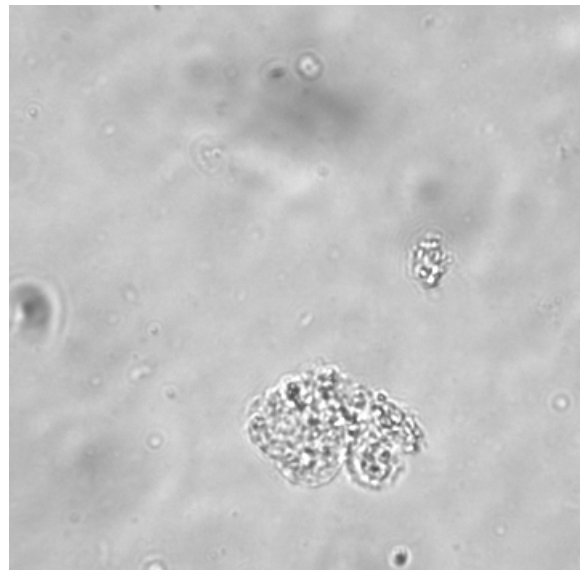


Abb. 3.2.4: CaCo-2 Zellen nach 30 min Inkubation mit Triton® X 100 0,1%

Die Aufnahmen zeigen nur nach Inkubation mit CDCA-Na 0,1% zelluläre Strukturen. Allerdings ist auch hier ist der Monolayer stark geschädigt. In Abb. 3.2.1 und 3.2.2 erkennt man Bereiche mit undeutlichen diffusen Zellbestandteilen, während in Abb. 3.2.4 die Zellen vollständig aufgelöst sind. Die Aufnahmen zeigen deutlich, daß Triton® X 100 und CDCA-Na die Zellstruktur vollständig zerstören; doch während Triton® X 100 Zellen nahezu rückstandsfrei auflöst, bleibt bei CDCA-Na ein Schleim aus Zellbestandteilen und Proteinen zurück.

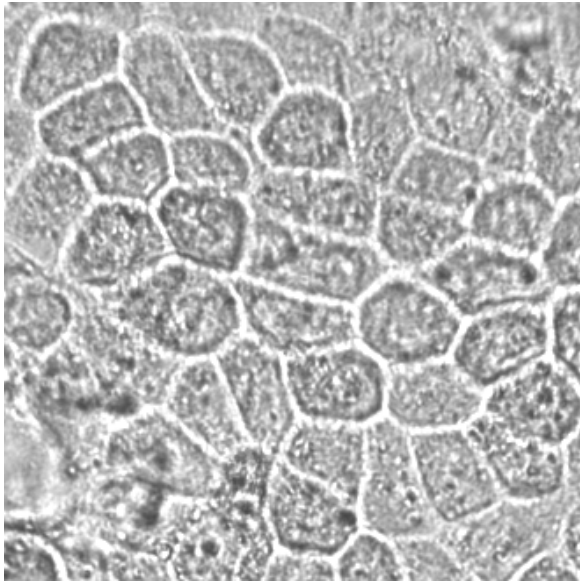


Abb. 3.2.5: CaCo-2 Zellen nach 30 min  
Inkubation mit CS-Na 1%

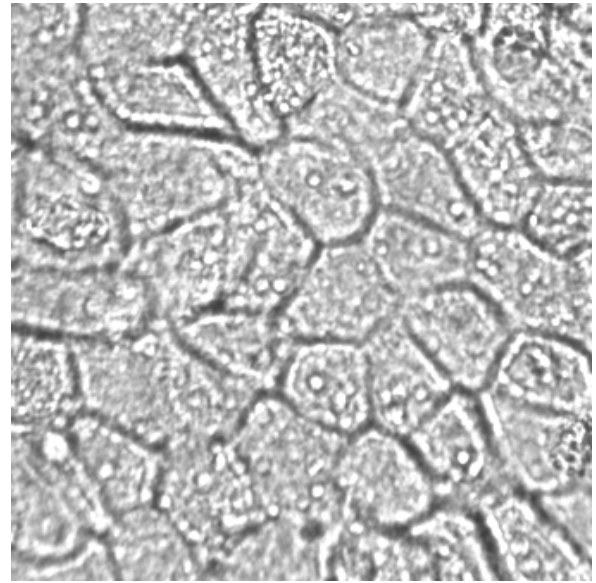


Abb. 3.2.6: CaCo-2 Zellen nach 30 min  
Inkubation mit HEPES B

In Abb. 3.2.5 sind keine morphologischen Veränderungen festzustellen. Die mikroskopische Betrachtung kann nur drastische Schäden am Zellmonolayer aufdecken. Nach Inkubation mit TC-Na und UDCA-Na ergaben sich ähnliche Bilder wie Abb. 3.2.5 und 3.2.6.

Fazit der Toxizitätsuntersuchungen:

CDCA-Na zeigte in den vorangegangenen Toxizitätsuntersuchungen in Übereinstimmung mit der Literatur die größte Zytotoxizität. TC-Na erwies sich als etwas toxischer als CS-Na, was so nicht unbedingt zu erwarten war. Beide Gallensalze sind Konjugate der Cholsäure. Die physikochemischen Eigenschaften unterscheiden sich nur wenig. Die Toxizität von UDCA-Na erwies sich erwartungsgemäß als sehr gering.

Der WST-1-Test ist zur Untersuchung der Zytotoxizität von Gallensalzen dem LDH-Assay vorzuziehen. Die Gallensalze können hier in hohen Konzentrationen untersucht werden, ohne den Test zu stören. Zu bedenken ist, daß die Toxizität der Gallensalzlösungen nur *in-vitro* am CaCo-2 Zellkulturmodell untersucht wurde. Die Membran des Darms ist *in vivo* wesentlich resistenter gegen toxische Einflüsse als Zellkulturen [72, 131]. Desweiteren liegen Gallensalze *in vivo* in Mischmizellen mit Cholesterol und PC vor, wodurch die Toxizität der Gallensalze modifiziert wird. Es gibt verschiedene Beispiele, in denen Resorptionsenhancer in Tierversuchen nebenwirkungsfrei eingesetzt wurden, an CaCo-2 Zellen dagegen deutlich zytotoxische Auswirkungen zeigten. Wahrscheinlich verfügt das intakte Gewebe über Abwehrmechanismen gegenüber Traumen, die in Zellkulturen nicht vorhanden sind. Außerdem fehlt im CaCo-2 Modell die schützende Mucusschicht. Trotzdem ist das

Zellkulturmodell ein geeignetes Mittel, um eine erste Klassifizierung von Substanzen durchzuführen [72].

### 3.3 Anfärbung des Aktin-Filaments in CaCo-2 Zellen nach Gallensalzinkubation

Phalloidin-FITC färbt in nM Konzentration selektiv F-Aktin an. Es bindet dabei an große und kleine Filamente in einem stöchiometrischen Verhältnis von ein Molekül Phalloidin pro Aktin-Untereinheit in Muskel- und Nichtmuskelzellen. G-Aktin Monomere werden nicht gebunden. Unspezifische Bindungen wie sie bei Färbungen mit Antikörpern auftreten, sind vernachlässigbar [132].

Propidiumiodid, ein Phenanthridin-Interkalator, bindet in einem stöchiometrischen Verhältnis von 1 Farbstoffmolekül pro 4-5 Basenpaare sowohl an DNS als auch an RNS. Durch die Interkalation von DNS bzw. RNS wird die Fluoreszenz von Propidiumiodid um ein 20-30-faches verstärkt. Die Anregungswellenlänge verschiebt sich dabei um 30-40 nm nach rot und die Emissionswellenlänge um 15 nm nach blau.

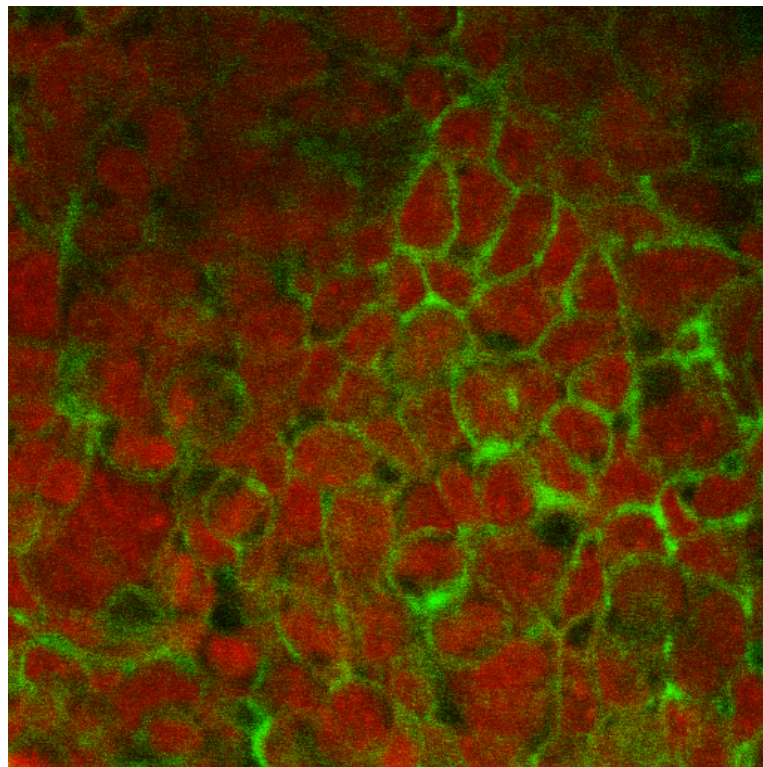


Abb. 3.3.1: CaCo-2 Zellen nach Inkubation mit HEPES B

Das das Zytosol durchziehende Aktin-Filament ist grün angefärbt. Den meisten Raum nehmen die rot angefärbten Kerne ein. Die Zellen in den dunkleren Bereichen der Aufnahme liegen in einer anderen optischen Ebene und sind nicht scharf fokussiert.

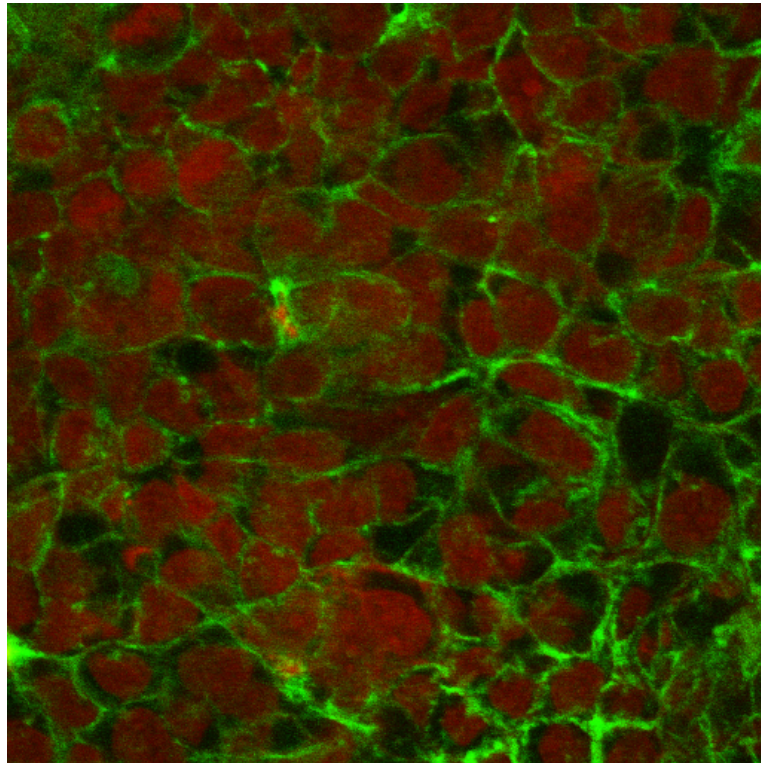


Abb. 3.3.2: CaCo-2 Zellen nach Inkubation mit CS-Na 1%

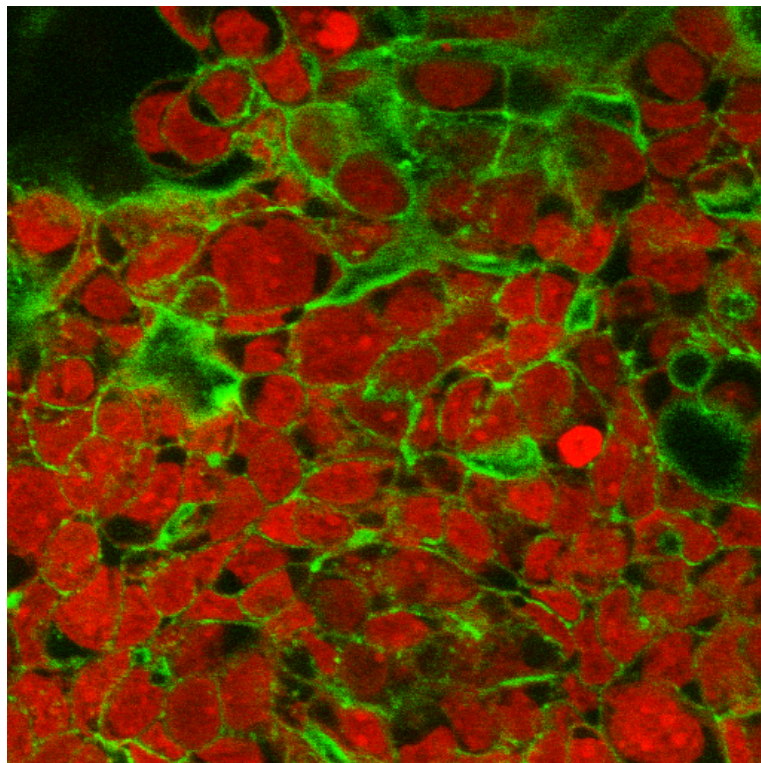


Abb. 3.3.3: CaCo-2 Zellen nach Inkubation mit CS-Na 0,5%

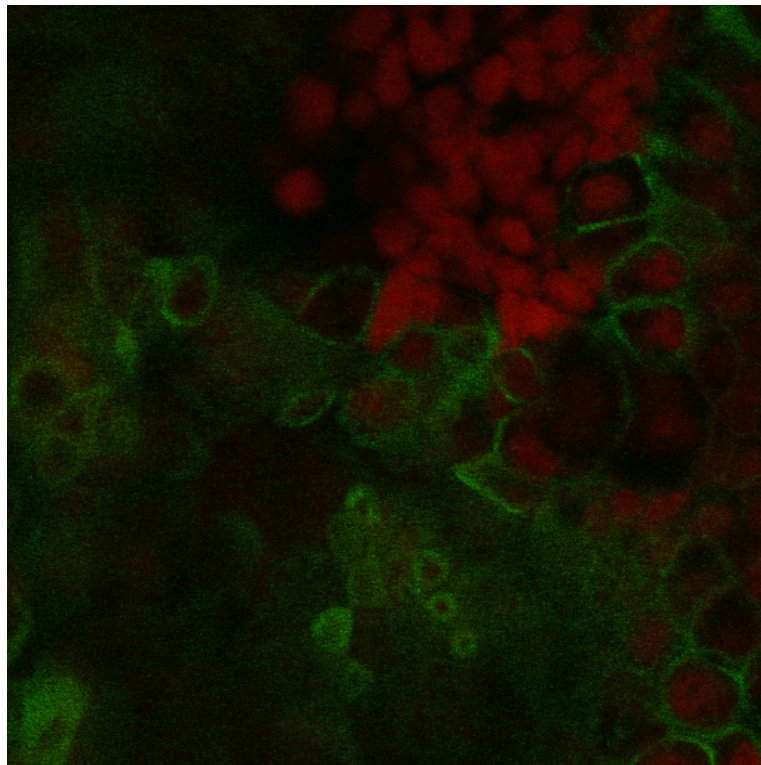


Abb. 3.3.4: CaCo-2 Zellen nach Inkubation mit TC-Na 1%

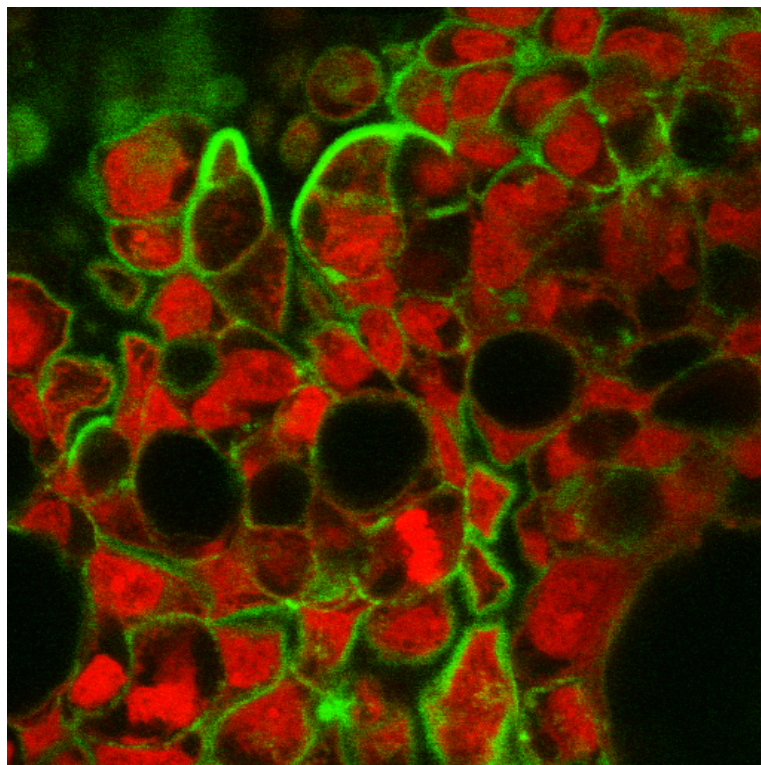


Abb. 3.3.5: CaCo-2 Zellen nach Inkubation mit TC-Na 0,5%

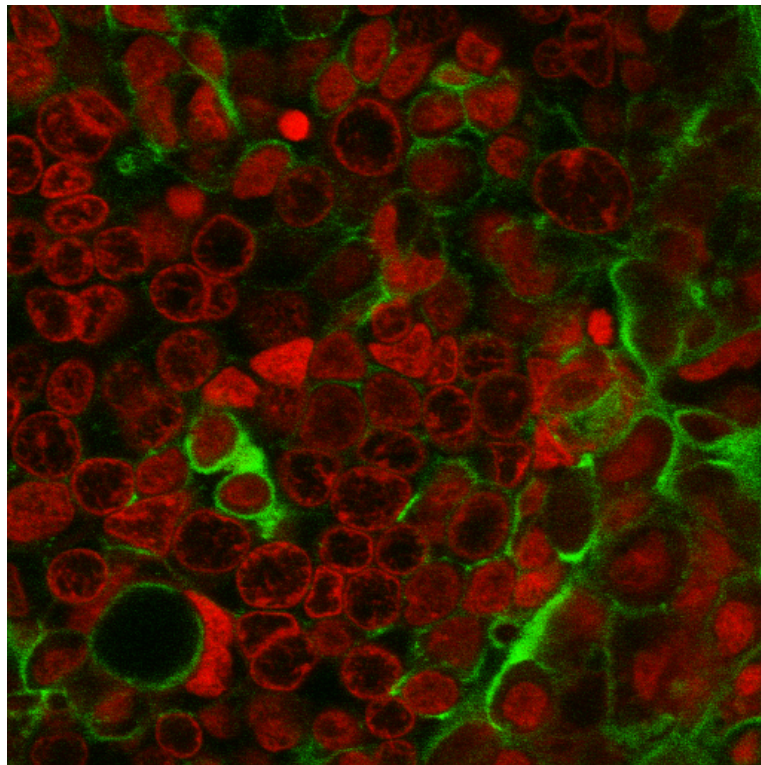


Abb. 3.3.6: CaCo-2 Zellen nach Inkubation mit CDCA-Na 0,1%

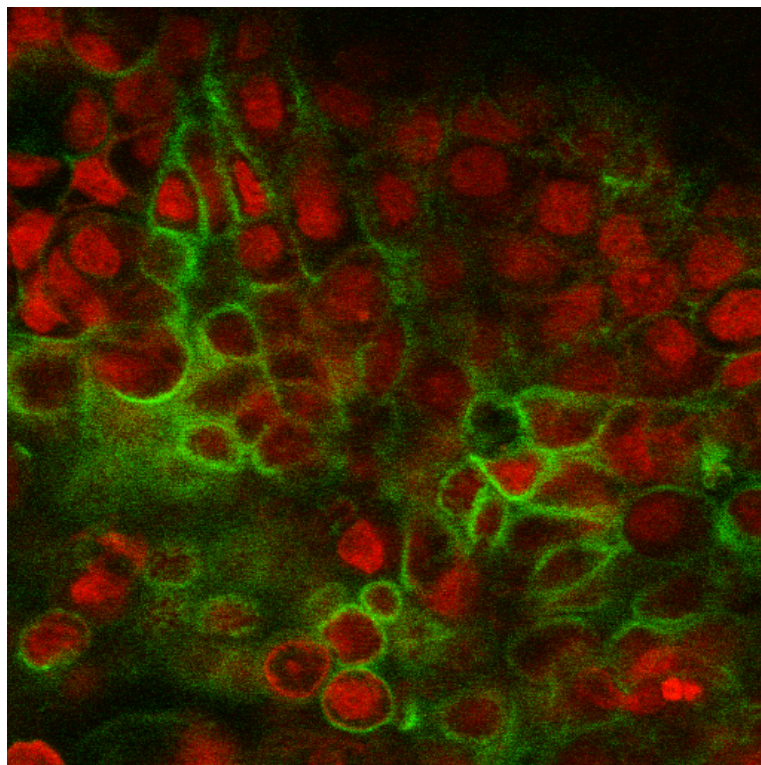


Abb. 3.3.7: CaCo-2 Zellen nach Inkubation mit CDCA-Na 0,05%

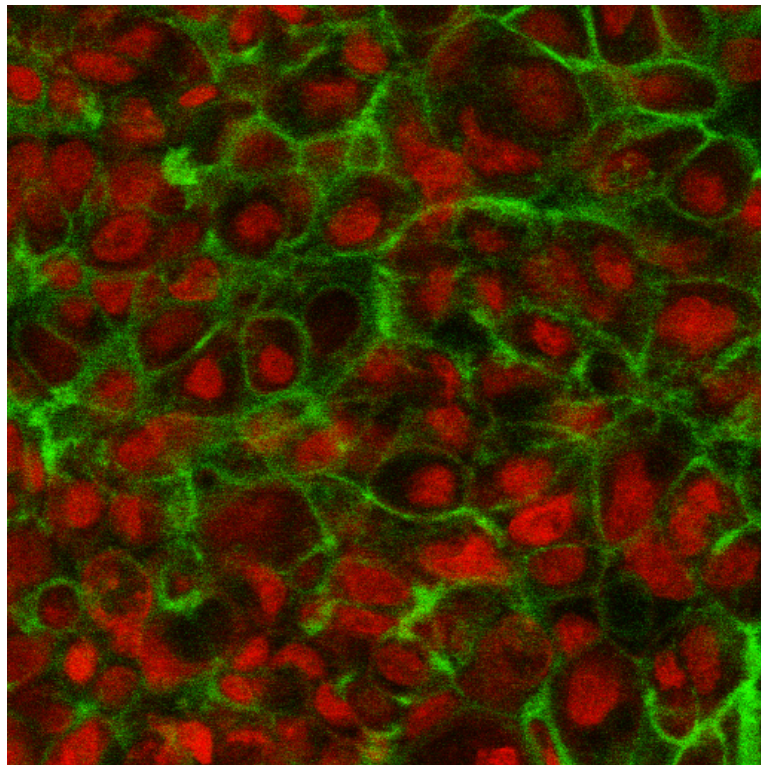


Abb. 3.3.8: CaCo-2 Zellen nach Inkubation mit UDCA-Na 0,25%

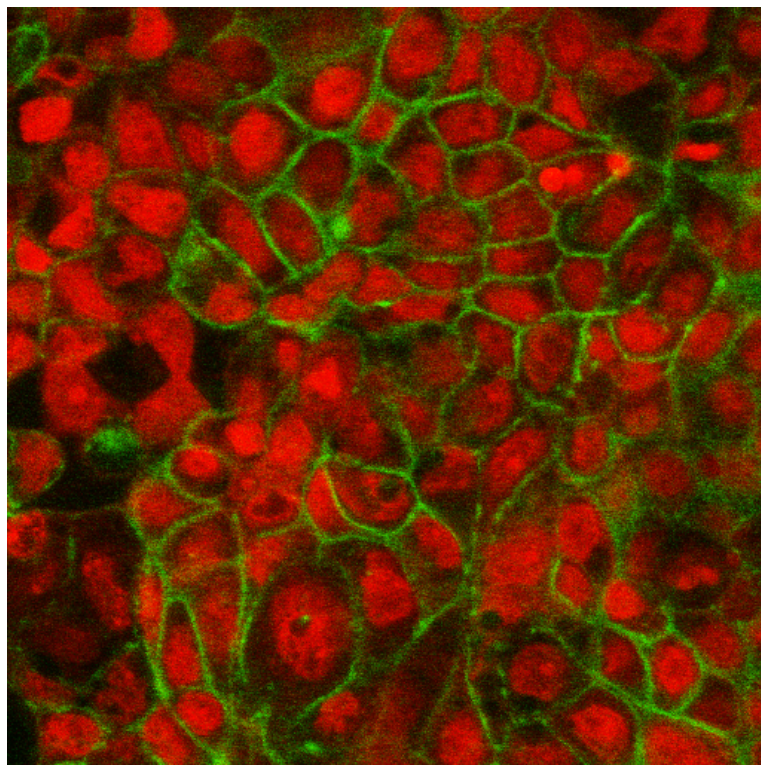


Abb. 3.3.9: CaCo-2 Zellen nach Inkubation mit UDCA-Na 0,1%

Nach Inkubation mit CS-Na bleibt das Aktin-Filament intakt. Die Aufnahmen ähneln denen mit HEPES B vorinkubierten Zellen. Ähnlich verhält es sich mit UDCA-Na. Auch hier sind intakte Zellen mit einem den Zellkern umspannenden Filament zu erkennen.

TC-Na greift in 1% Lösung das Aktin-Filament an und löst es teilweise auf. Dieses Ergebnis deckt sich mit [119]. Nach Inkubation mit 0,5% TC-Na sind keine Schädigungen festzustellen. In Abb. 3.3.6 wird deutlich, daß CDCA-Na nicht nur das Aktin-Filament zerstört, sondern auch die Zellkerne stark angreift. Die Zellkerne sind nicht mehr gleichmäßig rot gefärbt, sondern wirken löchrig. Die rot angefärbten Nukleinsäuren laufen an den Kernrändern zusammen. Mit CDCA-Na 0,05% ist dieser Effekt nicht mehr so deutlich erkennbar. Diese Aufnahmen unterstützen die in Abschnitt 3.2 aufgestellte Hypothese, daß CDCA-Na in submizellarer Konzentration in die Zellen permeiert und Zellorganellen schädigt. Das Aktinfilament ist ein Hauptbestandteil des Zytoskletts. Es ist mit den *tight junctions* verbunden [133]. Epithelzellen werden unterhalb ihrer Bürstensaummembran von einem Aktin-Myosin-Band durchzogen, das die Zelle vollständig umgibt. Dieses Band ist im Bereich der *zonulae apparentes* mit der seitlichen Membran verbunden. Die Kontraktion des perijunctionalen Aktin-Filaments spielt eine Rolle bei der physiologischen Regulation der *tight junctions*: Behandelt man Zellen mit Cytochalasin, eine Substanz, die spezifisch mit dem Zytoskelett interagiert, ist eine Abnahme des transepithelialen Widerstands festzustellen. Dies wurde auch mit verschiedenen anderen Substanzen, die eine Kondensation des Aktinfilaments bewirken, beobachtet [134,135,136]. Wie vorangegangen gezeigt, beeinflussen bestimmte Gallensalze das Aktinfilament und damit die Integrität des Zytoskletts. Es ist zu vermuten, daß dies auch zu einer Öffnung der *tight junctions* führt. Gallensalze erleichtern dadurch die parazelluläre, passive Diffusion von Wirkstoffen.

### 3.4 Transportexperiment mit CaCo-2 Zellen

#### 3.4.1 Durchgang von Octreotid in An- und Abwesenheit von Gallensalzen

[<sup>14</sup>C]-Octreotid wurde in einer Konzentration von durchschnittlich 2 µg/ml auf die Zellen gegeben. In vivo hat Octreotid eine orale Bioverfügbarkeit von 0,3% im Menschen. Fricker et al. [76] fanden in CaCo-2 Zellen einen Durchgang von 2,5 % nach 120 min.

CS-Na und TC-Na wurden als 1%ige und 0,5%ige Lösung zugesetzt. CDCA-Na konnte nur als maximal 0,1%ige Lösung eingesetzt werden. In höheren Konzentrationen führte der aus den Zellen durch CDCA-Na Einwirkung gebildete fädige Schleim zu einer starken Behinderung des Diffusionsprozesses. Octreotid konnte den auf dem Filter haftenden Schleim nicht passieren. UDCA-Na wurde als 0,25 und 0,1% Lösung untersucht. Beide Konzentrationen liegen unterhalb der CMC:



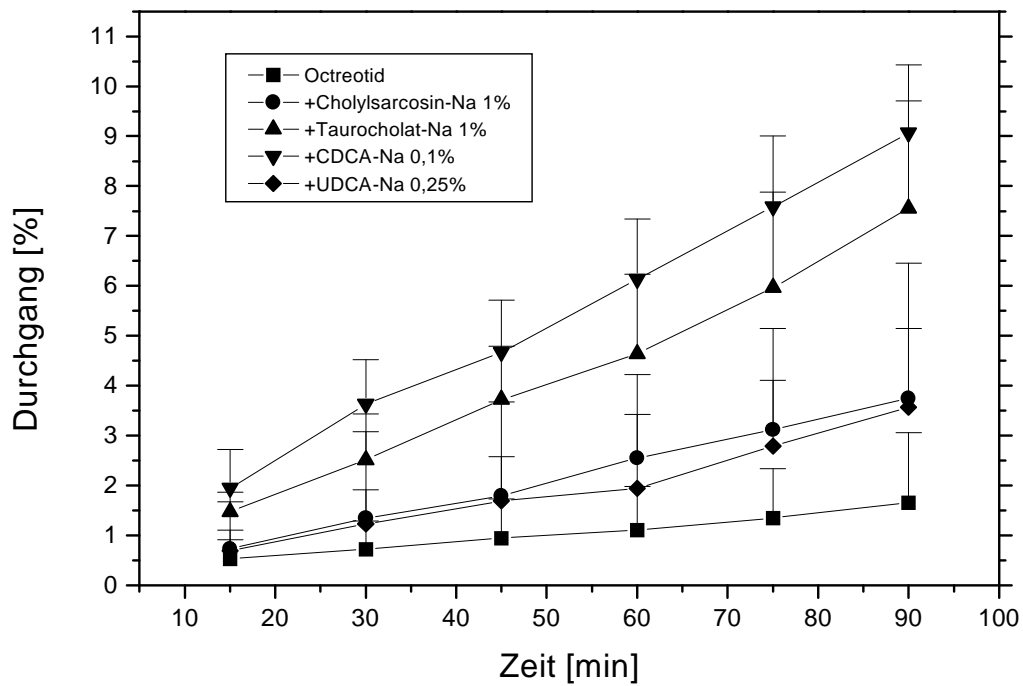


Abb. 3.4.1.: Durchgang im Verhältnis zur eingesetzten Dosis an Octreotid über 90 min in An- und Abwesenheit von Gallensalzlösungen

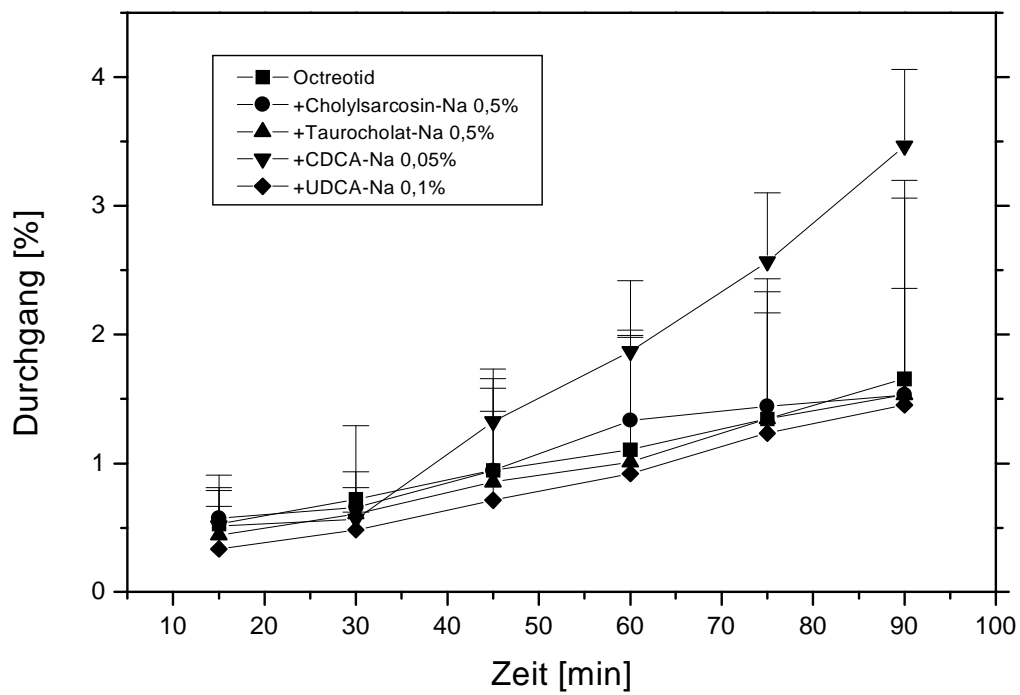


Abb. 3.4.2: Durchgang im Verhältnis zur eingesetzten Dosis von Octreotid in An- und Abwesenheit von Gallensalze über 90 min.

Der Durchgang von Octreotid ohne Gallensalzzusatz beträgt durchschnittlich 1,7% nach 100 min. Der apparente Permeabilitätskoeffizient liegt bei durchschnittlich  $1.45 \cdot 10^{-6}$  cm/sec. Er ist vergleichbar mit dem Papp des Parazellulärmarkers PEG 4000 von  $1.98 \cdot 10^{-6}$ . Nachfolgende Tabelle listet die Permeabilitätskoeffizienten von Octreotid mit und ohne Gallensalzzusatz auf.

| Transportierte Lösungen     | Papp [cm/sec]                 | Enhanceraktivität |
|-----------------------------|-------------------------------|-------------------|
| Octreotid                   | $1.45 \pm 0.72 \cdot 10^{-6}$ | 1                 |
| Octreotid und 1% CS-Na      | $3.27 \pm 1.98 \cdot 10^{-6}$ | 2.3               |
| Octreotid und 0,5% CS-Na    | $1.96 \pm 0.59 \cdot 10^{-6}$ | 1.4               |
| Octreotid und 1% TC-Na      | $6.38 \pm 1.76 \cdot 10^{-6}$ | 4.4               |
| Octreotid und 0,5% TC-Na    | $1.73 \pm 0.41 \cdot 10^{-6}$ | 1.2               |
| Octreotid und CDCA-Na 0,1%  | $8.03 \pm 3.33 \cdot 10^{-6}$ | 5.5               |
| Octreotid und CDCA-Na 0,05% | $2.44 \pm 1.51 \cdot 10^{-6}$ | 1.7               |
| Octreotid und UDCA-Na 0,25% | $1.27 \pm 0.6 \cdot 10^{-6}$  | 0.88              |
| Octreotid und UDCA-Na 0,1%  | $1.41 \pm 0.61 \cdot 10^{-6}$ | 0.97              |

Die Enhanceraktivität gibt an, um ein wievielfaches die Permeabilität eines Wirkstoffes durch einen zugesetzten Resorptionenhancer verbessert wird.

Die Ergebnisse zeigen, daß die Enhanceraktivität konzentrationsabhängig ist. Die Aktivitäten korrelieren mit den Ergebnissen der Toxizitätsuntersuchungen. Die Gallensalze, die die höchste Zytotoxizität aufweisen, zeigen auch die stärkste Permeabilitätsverbesserung. Der niedrige Papp von Octreotid spricht für eine Aufnahme über die *tight junctions*. Die Enhanceraktivität von TC-Na 1% ist fast doppelt so hoch wie die von CS-Na 1%. Eine Erklärung dafür ist die unterschiedlich stark ausgeprägte Wirkung auf die *tight junctions*: TC-Na 1% beeinflusst im Gegensatz zu CS-Na 1% die Integrität des Aktin-Filamentes und begünstigt damit eine Diffusion durch die *tight junctions*.

CDCA-Na hat die höchste Enhanceraktivität. Es permeiert in submizellaren Konzentrationen aufgrund seiner Lipophilie durch die Zellmembran in die Zelle. Hier interagiert es sowohl mit dem Aktin-Filament (s. 3.3) als auch mit Ca-Ionen. Beides führt zu einem Öffnen der *tight junctions*.

Aus den Ergebnissen der Transportstudien mit Octreotid wurde folgende Reihenfolge aufgestellt:

CDCA-Na >> TC-Na >> CS-Na >>>>>UDCA-Na

### 3.4.2 Durchgang von Desmopressin in An- und Abwesenheit von Gallensalzen

Desmopressin wurde als ein weiteres Modellpeptid eingesetzt, um die oben aufgestellte Reihenfolge zu überprüfen. Es ist zu erwarten, daß die permeabilitätsverbessernde Wirkung von Gallensalzen in hohem Maße von dem eingesetzten Wirkstoff abhängt. Kimura et al. [83] fanden folgenden Zusammenhang: die Permeabilität von hydrophilen Wirkstoffen wird durch Gallensalze verbessert. Für die Enhancereigenschaften ist Struktur und Lipophilie des Moleküls sowie Stabilität und Größe der Gallensalmizellen entscheidend. Der Hauptangriffsort der Gallensalze sind die *tight junctions*. Als Mechanismus wird Ca-Komplexierung durch die Gallensalmizellen angeführt. Der Durchgang lipophiler Wirkstoffe, die die Membran *per se* gut permeieren können, wird durch Gallensalze eher verschlechtert. Dies wird mit einem Verlust an thermodynamischer Aktivität durch Einschluß in die Mizellen erklärt. Lipophile Substanzen werden fest in das lipophile Innere der Mizellen eingeschlossen, während hydrophile Substanzen locker zwischen die hydrophilen Molekülbereiche inseriert werden.

Desmopressin hat *in-vivo* eine orale Bioverfügbarkeit von 0,19%. Es wurde in einer Konzentration von 1,128 mMol/ml eingesetzt. Die Gallensalze wurden in denselben Konzentrationen wie in 3.4.1 untersucht.

| Transportierte Lösungen        | Papp [cm/sec]                 | Enhanceraktivität |
|--------------------------------|-------------------------------|-------------------|
| Desmopressin                   | $5.00 \pm 1.73 \cdot 10^{-6}$ | 1                 |
| Desmopressin und 1% CS-Na      | $5.69 \pm 1.76 \cdot 10^{-6}$ | 1.14              |
| Desmopressin und 0,5% CS-Na    | $4.09 \pm 1.04 \cdot 10^{-6}$ | 0.82              |
| Desmopressin und 1% TC-Na      | $11.2 \pm 3.18 \cdot 10^{-6}$ | 2.24              |
| Desmopressin und 0,5% TC-Na    | $4.84 \pm 1.71 \cdot 10^{-6}$ | 0.97              |
| Desmopressin und CDCA-Na 0,1%  | $26 \pm 8.34 \cdot 10^{-6}$   | 5.2               |
| Desmopressin und CDCA-Na 0,05% | $7.54 \pm 1.36 \cdot 10^{-6}$ | 1.51              |
| Desmopressin und UDCA-Na 0,25% | $8.15 \pm 2.04 \cdot 10^{-6}$ | 1.5               |
| Desmopressin und UDCA-Na 0,1%  | $6.1 \pm 1.18 \cdot 10^{-6}$  | 1.2               |

Die Enhanceraktivität ist auch hier konzentrationsabhängig.

Der Papp von Desmopressin ist mit  $5 \cdot 10^{-6}$  etwas höher als der Papp des Parazellulärmakers PEG 4000 mit  $1.98 \cdot 10^{-6}$ . Lundin et al. [137] fanden in CaCo-2 Zellen einen kleineren Papp, vergleichbar mit dem von PEG 4000. Desmopressin wird als hydrophiles Molekül mit einem Octanol-Wasser-Verteilungskoeffizienten von  $\log P = -1.95$  bevorzugt parazellulär transportiert. Da der Papp in den vorliegenden Experimenten höher ist, als der des Parazellulärmakers, könnte auf einen aktiven Transport durch den Monolayer geschlossen werden. Dies widerspricht Lundin et al. [137,138]: In Studien an Zellen und Ratten wurden keine Anzeichen für einen aktiven Transport oder Endozytose gefunden. Vergleicht man die Enhanceraktivitäten der Gallensalze bei Desmopressin und Octreotid, fällt auf, daß die Gallensalze den Transport von Octreotid deutlicher verbessern als den von Desmopressin. Lediglich CDCA-Na weist in beiden Fällen dieselbe Enhanceraktivität auf. Alleine durch den unterschiedlichen Einfluß der Gallensalze auf das Aktin-Filament bzw. die *tight junctions* kann dieser Unterschied nicht erklärt werden. Fricker et al. [139,76] fanden Anzeichen, daß Octreotid auch transzellulär aufgenommen wird. Um hierüber Aufschluß zu erhalten wird nachfolgend die Aufnahme von NBD-Octreotid in CaCo-2 Monolayer unter dem konfokalen Lasermikroskop betrachtet.

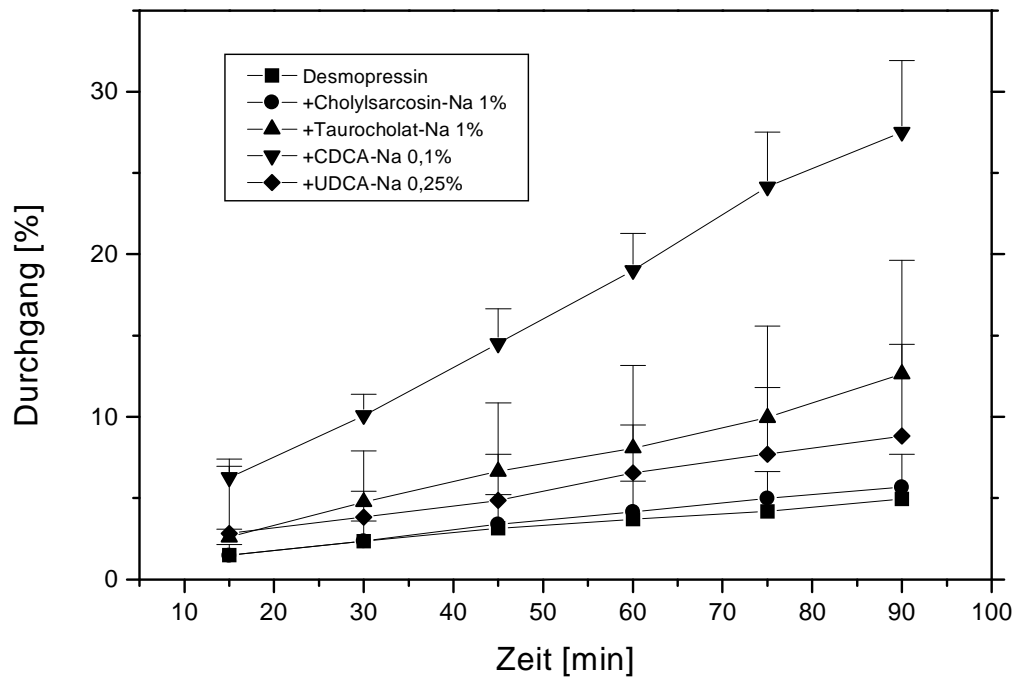


Abb. 3.4.3: Durchgang in Bezug auf die eingesetzte Dosis von Desmopressin in 90 min in An- und Abwesenheit von Gallensalzen

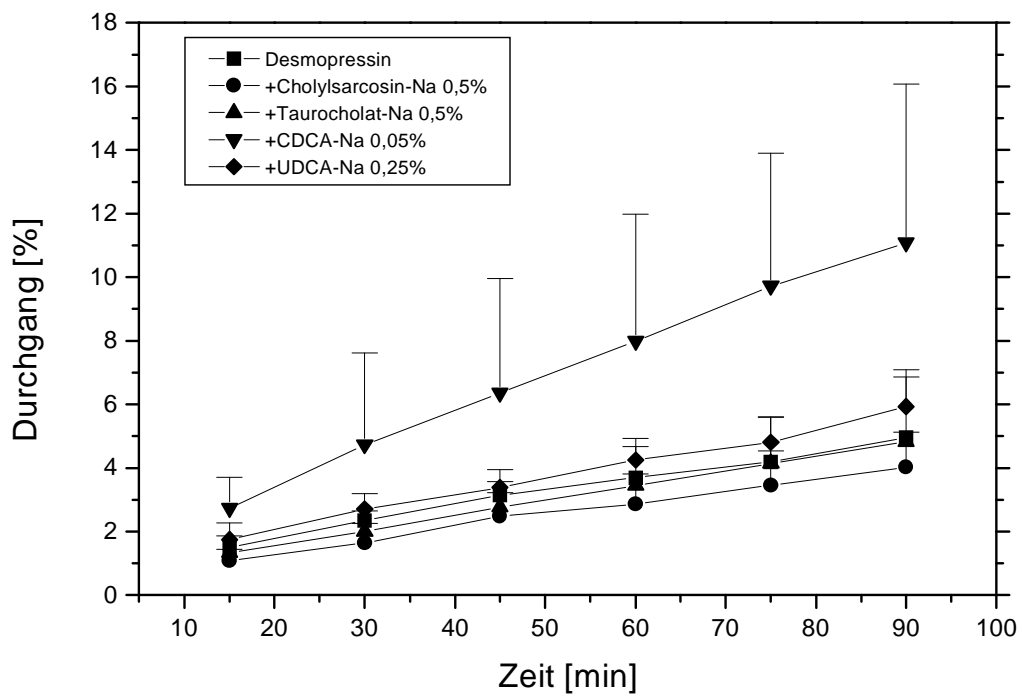


Abb. 3.4.4: Durchgang in Bezug auf die eingesetzte Dosis von Desmopressin in 90 min in An- und Abwesenheit von Gallensalzen

Obwohl die Effekte in den Transportexperimenten mit Desmopressin nicht so deutlich zu Tage treten, wird die in Abschnitt 3.4.1 aufgestellte Reihenfolge weitgehend bestätigt. UDCA-Na und CS-Na führen hier allerdings zu einer ähnlichen Transportverbesserung.

CDCA-Na >> TC-Na >> CS-Na = UDCA-Na

### 3.4.3 Aufnahmeversuche mit NBD-Octreotid

Das fluoreszierendes 7-Nitrobenz-2-Oxa-1,3-Diazol (NBD)-Derivat von Octreotid wurde eingesetzt, um die Aufnahme in die Zellen in An- und Abwesenheit verschiedener Gallensäuren darzustellen.

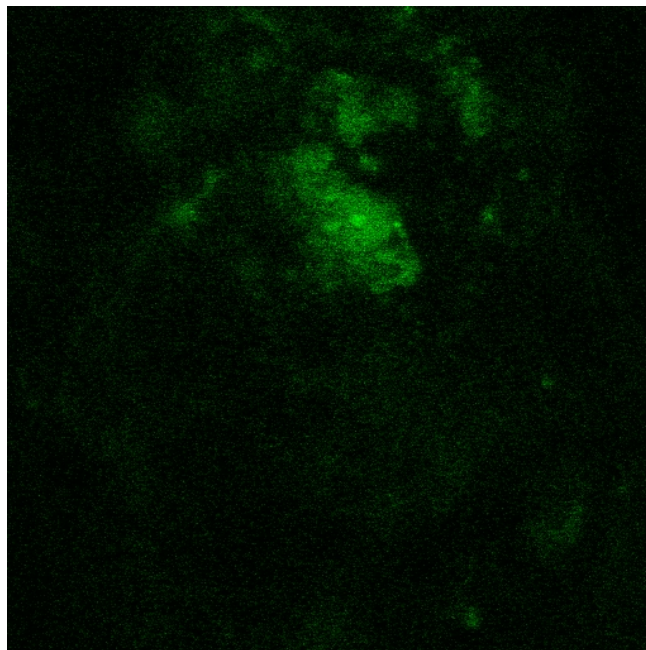


Abb. 3.4.5: CaCo-2 Zellen nach Inkubation mit NBD-Octreotid und HEPES B

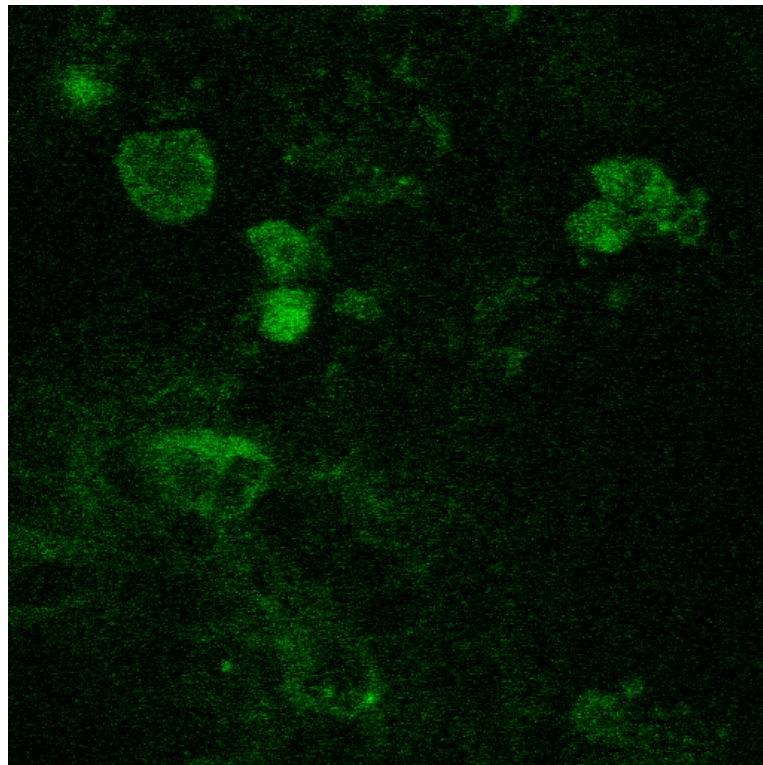


Abb. 3.4.6: CaCo-2 Zellen nach Inkubation mit NBD-Octreotid und CS-Na 1%

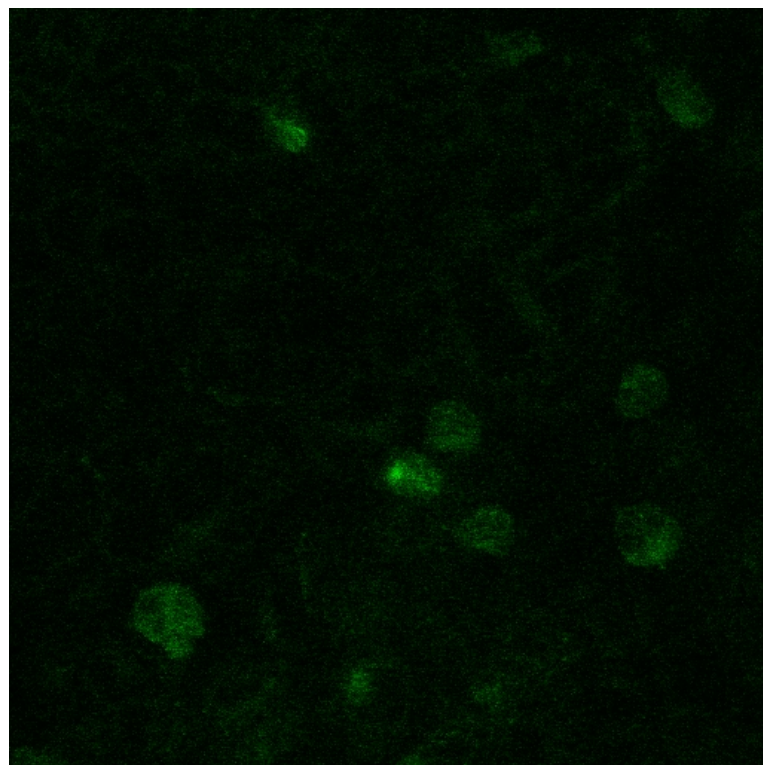


Abb. 3.4.7: CaCo-2 Zellen nach Inkubation mit NBD-Octreotid und CS-Na 0,5%

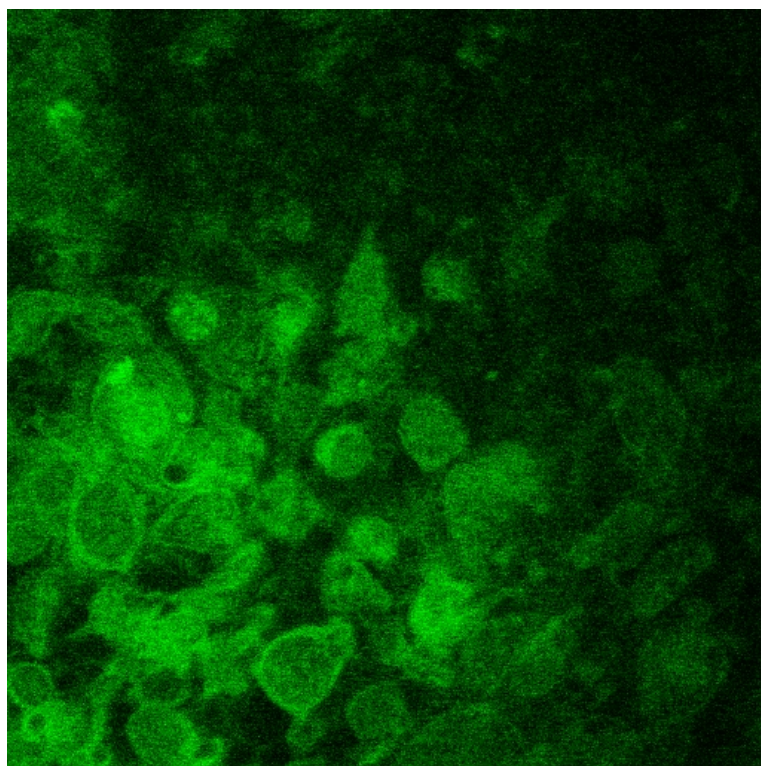


Abb. 3.4.8: CaCo-2 Zellen nach Inkubation mit NBD-Octreotid und TC-Na 1%

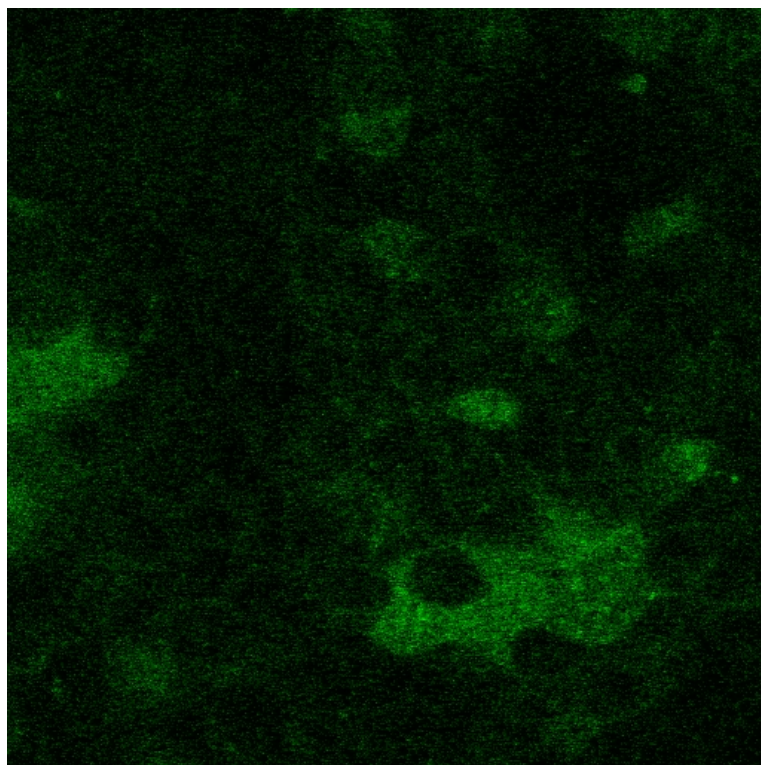


Abb. 3.4.9: CaCo-2 Zellen nach Inkubation mit NBD-Octreotid und TC-Na 0,5%

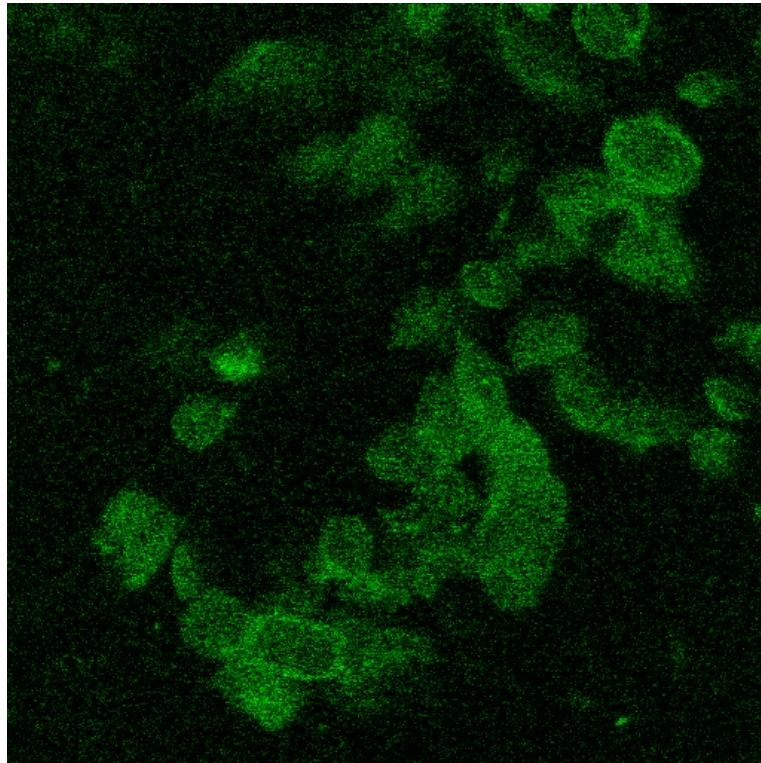


Abb. 3.4.11: CaCo-2 Zellen nach Inkubation mit NBD-Octreotid und CDCA-Na 0,1%

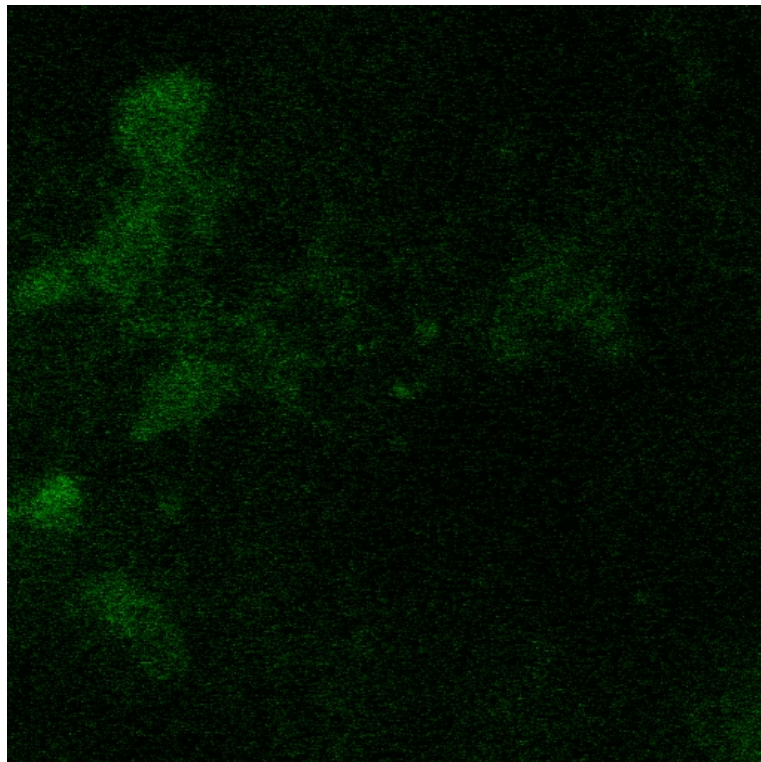


Abb. 3.4.13: CaCo-2 Zellen nach Inkubation mit NBD-Octreotid und UDCA-Na 0,25%



Die Aufnahmen lassen einen grün-fluoreszierenden Rand um die Zellen erkennen. Ob die Fluoreszenz hauptsächlich in den *tight junctions* lokalisiert ist, oder auf eine Einlagerung von Octreotid in die Zellmembran oder eine Aufnahme in das Zytoplasma zurückzuführen ist, ist nicht zu erkennen. Der größte Raum in der CaCo-2-Zelle wird zudem von dem Zellkern eingenommen. Zytoplasma und Zellmembran nehmen nur sehr wenig Raum ein. Die Aufnahmen sprechen weder deutlich für eine transzelluläre Diffusion von Octreotid durch den Monolayer noch widerlegen sie diese. In Abb. 3.4.8 und 3.4.11 ist eine schwache Fluoreszenz in den Zellen im Bereich des Zellkerns erkennbar. Dies beweist allerdings nicht unbedingt eine transzelluläre Aufnahme von Octreotid in die Zellen. Sie könnte auch auf die höhere Toxizität von CDCA-Na und TC-Na für die Zellen zurückzuführen sein.

### 3.5 Beeinflussung des parazellulären Transportwegs in CaCo-2 Zellen durch Gallensalze

Der Hauptangriffsort der Gallensalze sind die *tight junctions*. Durch Interaktion mit dem Aktin-Filament und durch mizellare Bindung von Ca-Ionen werden die *zonulae occludentes* erweitert. Dies führt zu einer erleichterten Diffusion von hydrophilen Molekülen.

#### 3.5.1 Beeinflussung des transepithelialen Widerstandes durch Gallensalze

Der transepitheliale elektrische Widerstand (TEER) ist ein Maß für die Dichtigkeit von Geweben und Zellmonolayern. In CaCo-2 Monolayern beträgt er ungefähr  $300 \Omega \cdot \text{cm}^2$ . Eine Öffnung der *tight junctions* führt zu einem Abfall des TEER.

Die nachfolgenden Abbildungen zeigen die prozentuale Abnahme des TEER über 90 min. Die 100%-Werte lagen zwischen  $269$  und  $455 \Omega \cdot \text{cm}^2$ .

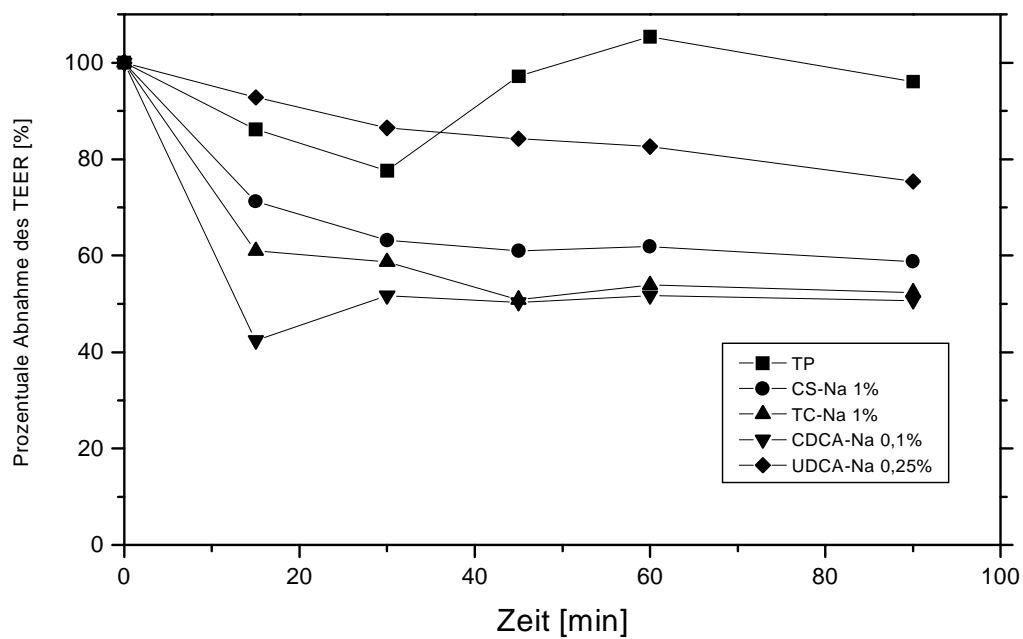


Abb. 3.5.1: Entwicklung des TEER über 90 min. Die Zellen wurden mit Puffer oder Gallensalzen inkubiert.

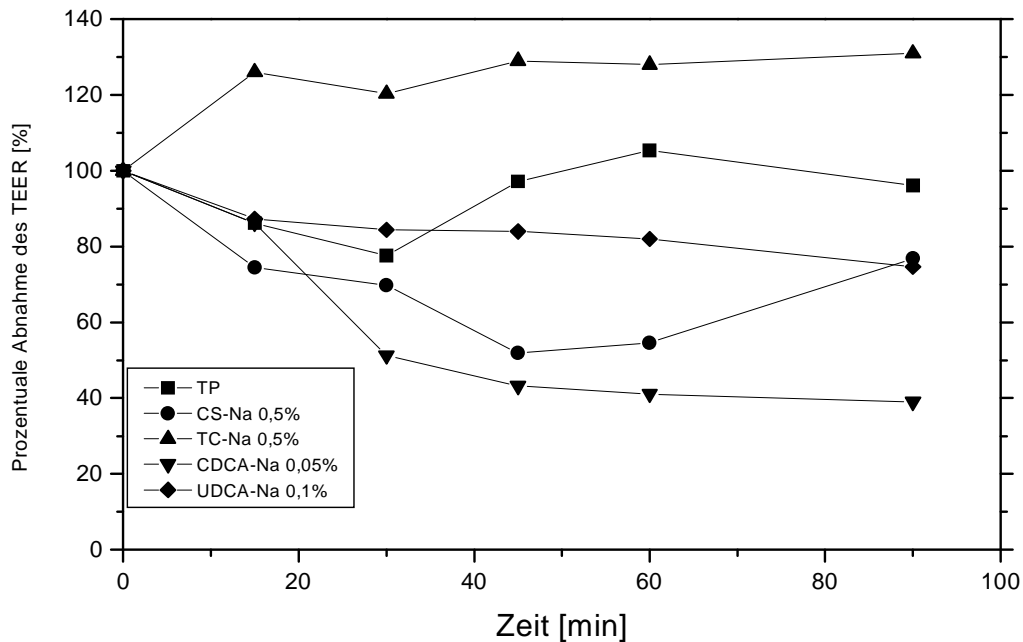
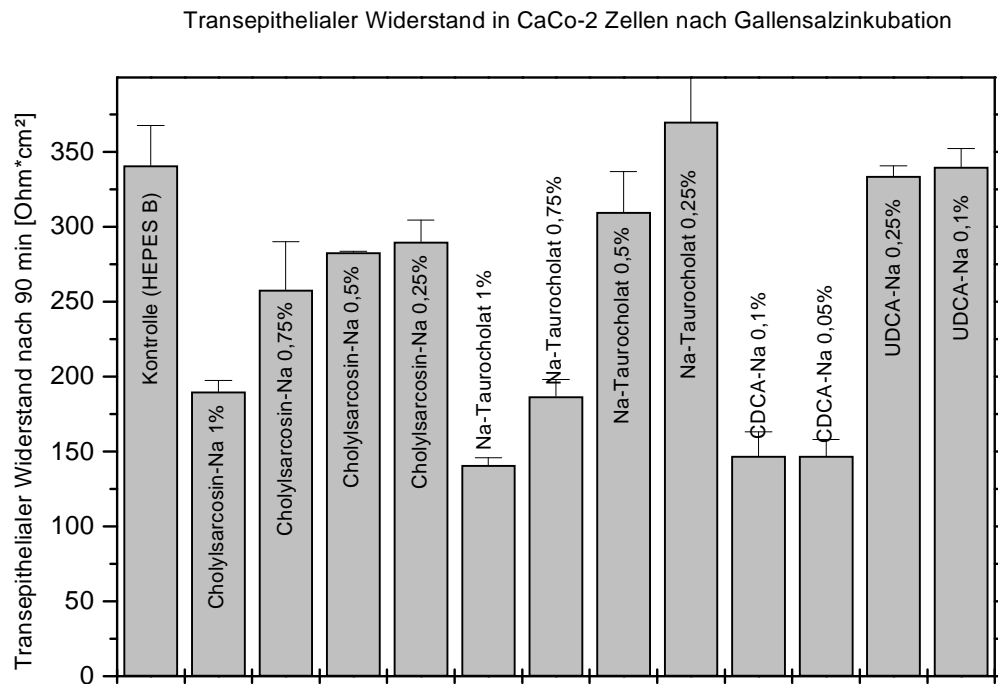


Abb. 3.5.2: Entwicklung des TEER über 90 min. Die Zellen wurden mit Puffer oder Gallensalzen inkubiert.

Der Monolayer wurde über den gesamten Zeitraum mit Gallensalzlösungen oder Puffer inkubiert. HEPES B zeigt einen relativ konstanten Wert von  $330 \Omega \cdot \text{cm}^2$ . Der kurze Abfall nach 30 min wird durch das Waschen der Zellen hervorgerufen. UDCA-Na beeinflusst den TEER nur geringfügig, ebenso TC-Na und CS-Na 0,5%. CS-Na und TC-Na 1% und beide Konzentrationen von CDCA-Na hingegen führen zu einem deutlichen Abfall des Widerstandes in der Reihenfolge:

$$\text{CDCA-Na} > \text{TC-Na} > \text{CS-Na} \gg \gg \text{UDCA-Na}$$

Das Ergebnis spricht für eine konzentrationsabhängige Öffnung der *tight junctions* durch Gallensalzinkubation.



Das Diagramm zeigt den TEER des Zellmonolayer nach 90 min Inkubation mit Gallensalzlösungen unterschiedlicher Konzentration. Es wird deutlich, daß TC-Na und CS-Na nur in Konzentrationen oberhalb der CMC (0,5%) zu einem Abfall des TEER des Monolayers führen. Um die Integrität der *tight junctions* zu beeinflussen, ist offenbar die Anwesenheit von TC-Na und CS-Na Mizellen erforderlich. CDCA-Na öffnet dagegen auch in submizellaren Konzentrationen den parazellulären Transportweg. Die Ergebnisse bestätigen die in 3.2 und 3.4 gewonnenen Erkenntnisse. Die Öffnung der *tight junctions* und die Beeinflussung der Integrität des Monolayers durch Gallensalze ist ein reversibler Prozeß. Nach Entfernen der Gallensalzlösungen und einstündiger Inkubation der Zellen mit HEPES B im Brutschrank, stieg der TEER wieder auf  $300 \Omega \cdot \text{cm}^2$  an.

### 3.5.2 Transport von FITC-Dextran 4000 in An- und Abwesenheit von Gallensalzen

Um die Annahme zu erhärten, Gallensalze erleichtern die passive Diffusion durch die *tight junctions*, wurde der Effekt auf den Transport eines parazellulären Markers, FITC-Dextran 4000, durch CaCo-2 Zellen untersucht.

FITC-Dextran wurde in einer Konzentration von  $196 \mu\text{g}/100\text{ml}$  auf die Zellen gegeben. Die Konzentrationen der untersuchten Gallensalzlösungen entsprachen denen aus den Transportexperimenten mit den Modellpeptiden.

| Transportierte Lösungen             | Papp [cm/sec]                  | Enhanceraktivität |
|-------------------------------------|--------------------------------|-------------------|
| FITC-Dextran 4000                   | $3.97 \pm 2.48 \cdot 10^{-8}$  | 1                 |
| FITC-Dextran 4000 und 1% CS-Na      | $18.4 \pm 0.42 \cdot 10^{-8}$  | 4.6               |
| FITC-Dextran 4000 und 0,5% CS-Na    | $3.58 \pm 0.016 \cdot 10^{-8}$ | 0.9               |
| FITC-Dextran 4000 und 1% TC-Na      | $30.4 \pm 2.97 \cdot 10^{-8}$  | 7.7               |
| FITC-Dextran 4000 und 0,5% TC-Na    | $5.26 \pm 0.24 \cdot 10^{-8}$  | 1.3               |
| FITC-Dextran 4000 und CDCA-Na 0,1%  | $40.7 \pm 2.26 \cdot 10^{-8}$  | 10.3              |
| FITC-Dextran 4000 und CDCA-Na 0,05% | $10.8 \pm 2.7 \cdot 10^{-8}$   | 2.7               |
| FITC-Dextran 4000 und UDCA-Na 0,25% | $1.9 \pm 0.01 \cdot 10^{-8}$   | 0.5               |
| FITC-Dextran 4000 und UDCA-Na 0,1%  | $1.36 \pm 0.01 \cdot 10^{-8}$  | 0.3               |

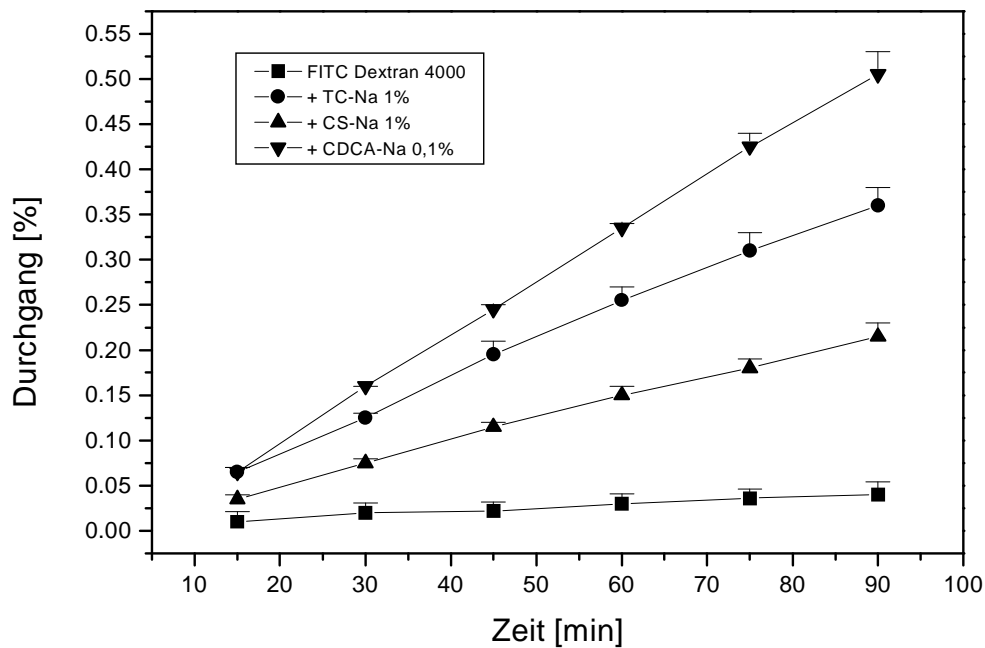


Abb. 3.5.3: Durchgang in Bezug auf die eingesetzte Dosis von FITC-Dextran 4000 über 100 min in An- und Abwesenheit von Gallensalzen

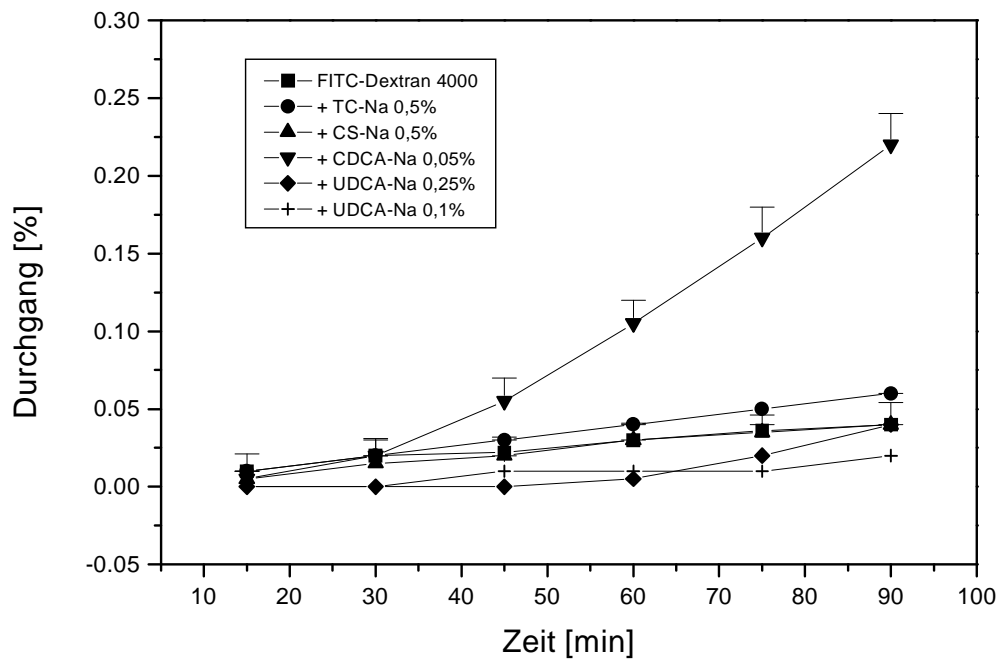


Abb. 3.5.4: Durchgang in Bezug auf die eingesetzte Dosis von FITC-Dextran 4000 über 100 min in An- und Abwesenheit von Gallensalzen

Diese Ergebnisse beweisen, daß die untersuchten Gallensalze konzentrationsabhängig die parazelluläre Diffusion von Molekülen verbessern. Dabei wird folgende Reihenfolge aufgestellt:

CDCA-Na >> TC-Na >> CS-Na >>>>> UDCA-Na

Diesselbe Reihenfolge wurde bereits nach den Transportexperimenten mit Octreotid und Desmopressin aufgestellt. Das Ausmaß der Transportverbesserung trat in den vorangegangenen Untersuchungen allerdings nicht so deutlich zu Tage. Insbesondere CS-Na zeigte dort nicht so große Effekte wie mit FITC-Dextran 4000.

Abschließend kann an dieser Stelle festgestellt werden, daß *in-vitro* ein deutlicher Unterschied im Hinblick auf Transportverbesserung bei den Gallensalzen festzustellen ist. Desweiteren scheint die Beeinflussung des parazellulären Transportwegs eine wesentlicher Wirkmechanismus zu sein. Freel et al. [140] stellten in ihren Experimenten fest, daß Dihydroxygallensalze, speziell Taurochenodesoxycholat, schon in geringen Konzentrationen die *tight junctions* öffnen.

### 3.6 Interaktion von Gallensalzen mit Lipiden in der apicalen Membran von CaCo-2 Zellen

Nachdem nachgewiesen werden konnte, daß Gallensalze die Diffusion durch die *tight junctions* erleichtern können, soll im nachfolgenden gezeigt werden, daß Gallensalze mit Membranbestandteilen interagieren.

#### 3.6.1 Fluoreszenzassay mit HDAF inkubierten Ca-Co-2 Monolayern

5-(N-Hexadecanoyl)-aminofluoreszein (HDAF) ist ein fluoreszenzmarkiertes Lipid, das sich in die äußere Lipidschicht der apicalen Membran einlagert [141].

Die Zellen wurden mit HDAF inkubiert, wobei sich HDAF in die apicale Membran einlagerte. Nach Inkubation mit verschiedenen Gallensalzen wurde das apicale Medium vermessen. Leider wurde die Fluoreszenz der Proben durch die verschiedenen Gallensalze verschieden stark beeinflusst, so daß keine übereinstimmenden Ergebnisse erzielt werden konnten. Die Oberflächenspannung in den verschiedenen Gallensalzlösungen unterscheidet sich auch nach Zugabe von BSA stark. Nach einer halben Stunde wurden die Zellen mit Triton® X 100 lysiert und das Lysat vermessen. Diese Messungen ergaben reproduzierbare Ergebnisse.

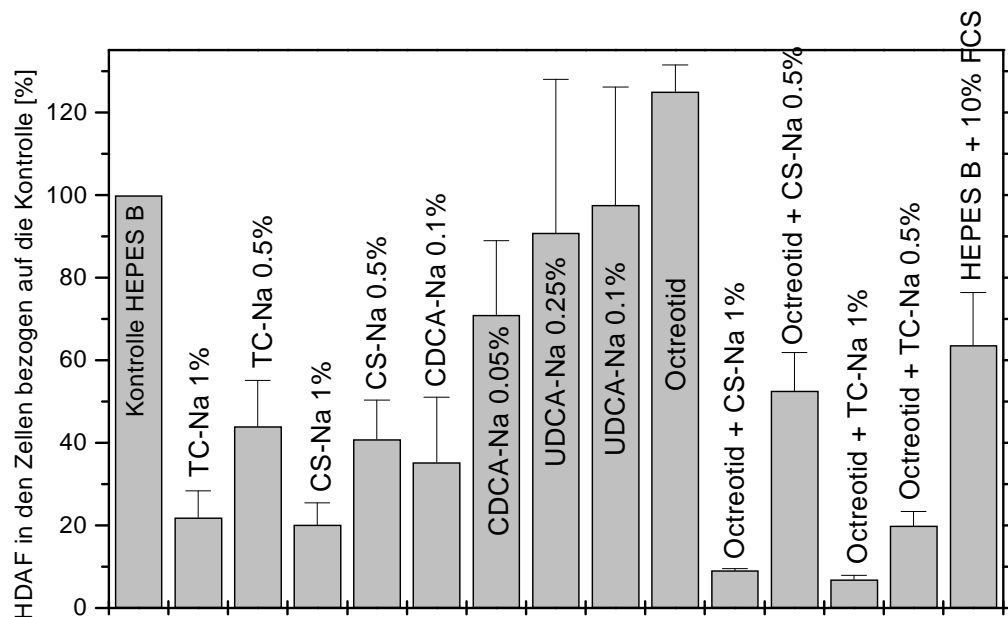


Abb. 3.6.1: In den Zellen verbleibende Fluoreszenz nach Lyse bezogen auf die Kontrolle. Die Zellen wurden zuvor mit unterschiedlichen Gallensalzlösungen inkubiert.

In den mit HEPES B inkubierten Zellen wurde eine hohe Fluoreszenz nach Lyse gefunden. Daher wurde der gemessene Wert als 100% Fluoreszenz bewertet. Nach Inkubation mit Octreotid wurde kein Fluoreszenzverlust in den Zellen gemessen. UDCA-Na und CDCA-Na 0,05% führten nur zu einer geringen Fluoreszenzniedrigung. Fötales Kälberserum (FKS) interagiert mit der Zellmembran. Es kann offensichtlich Membranbestandteile solubilisieren.

Dies stimmt mit den Untersuchungen von Hurni et al. [111] überein. Für Zellkulturversuche sollten deshalb nur serumfreie Medien verwendet werden.

TC-Na und CS-Na führten zu einem konzentrationsabhängigen Verlust an Fluoreszenz. In derselben Größenordnung bewegte sich der von CDCA-Na 0,1% verursachte Verlust. All diese Ergebnisse deuten daraufhin, daß Gallensalze konzentrationsabhängig Membranbestandteile aus der apicalen Membran entfernen können. Dadurch wird der Ordnungszustand des Bilayer verändert und die transzelluläre Diffusion erleichtert.

Es wurde bereits darauf hingewiesen, daß das Ausmaß der Transportverbesserung nicht nur von dem Gallensalz sondern auch von dem eingesetzten Wirkstoff abhängt. Ob die Beeinflussung der transzellulären Diffusion durch Gallensalze für ein gegebenes Molekül eine Rolle spielt, hängt von dessen physikochemischen Eigenschaften ab. Eine hydrophile Substanz wird, wenn ein aktiver Transport ausgeschlossen werden kann, eher über die parazelluläre Transportroute diffundieren. Für Desmopressin kann sowohl ein aktiver als auch ein transzellulärer Transport ausgeschlossen werden. Die Beeinflussung der Membran dürfte in diesem Zusammenhang von untergeordneter Bedeutung sein. Dafür spricht auch, daß CS-Na, TC-Na und CDCA-Na im Fluoreszenzassay mit HDAF ähnliche Resultate zeigen, wohingegen sie den Transport von Desmopressin unterschiedlich stark beeinflussen. Der Transport von Octreotid wurde stärker von den Gallensalzen beeinflusst als der von Desmopressin. Der Permeabilitätskoeffizient von Octreotid spricht nicht für eine transzelluläre Diffusion durch das Epithel (s. auch 3.4.1). Aus den Ergebnissen des Fluoreszenzassays ist ersichtlich, daß Octreotid alleine kein HDAF aus der Membran zu lösen vermag. Inkubiert man die Zellen allerdings mit Octreotid und Gallensalzen so findet man eine Verstärkung der Gallensalzwirkung. Möglicherweise lagert sich Octreotid in die Zellmembran ein, ohne selbst Bestandteile herauszulösen, aber so, daß ein Eindringen von Gallensalzen erleichtert wird. In Langmuir Trog Experimenten konnte gezeigt werden, daß Octreotid in Membranen eingelagert wird [103,142,143]. Zu diesem Punkt wurden auch eigene Untersuchungen durchgeführt. Dazu verweise ich auf Kapitel 3.8. Im Inneren der Zelle interagieren die Gallensalze dann mit dem Zytosklett oder mit Ca-Ionen und öffnen dadurch die *tight junctions*. Diese Annahme wäre ein Erklärung für den unterschiedlich starken Effekt von TC-Na und CS-Na auf den Transport von Octreotid im Gegensatz zu Desmopressin.

An dieser Stelle kann festgestellt werden: Gallensalze interagieren mit Membranbestandteilen. Dieser Effekt ist konzentrationsabhängig. In niedrigeren Konzentrationen werden Lipide aus Membranen solubilisiert, in höheren Konzentrationen kommt es zu Solubilisation der gesamten Membran [145,66]. Für die im Rahmen dieser Doktorarbeit untersuchten Peptide spielt transzelluläre Resorption keine Rolle. Interessant ist der Synergismus zwischen Octreotid und Gallensalzen.



### 3.6.2 Untersuchung HDAF-inkubierter CaCo-2 Monolayer im konfokalen Mikroskop

Zusätzlich zu dem Fluoreszenzassay wurden die CaCo-2 Monolayer nach Inkubation mit HDAF und Gallensalzlösungen unter dem konfokalen Mikroskop betrachtet.

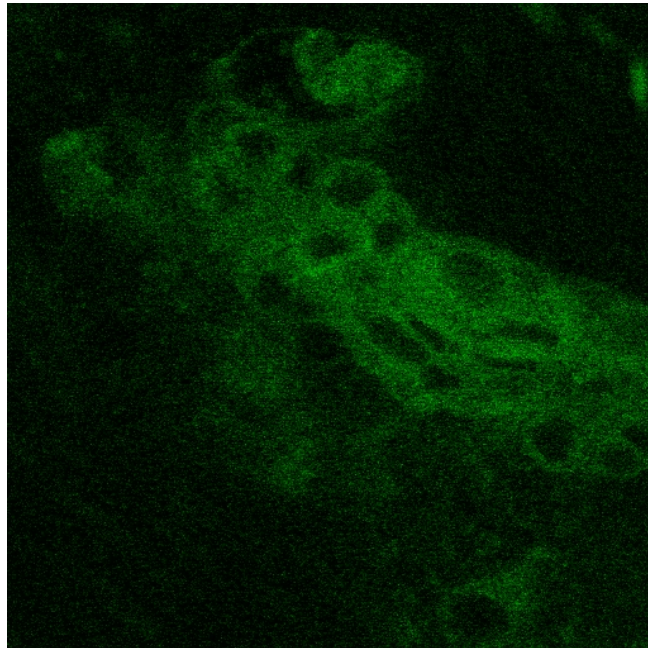


Abb. 3.6.2: HDAF-markierter Monolayer nach Inkubation mit HEPES B

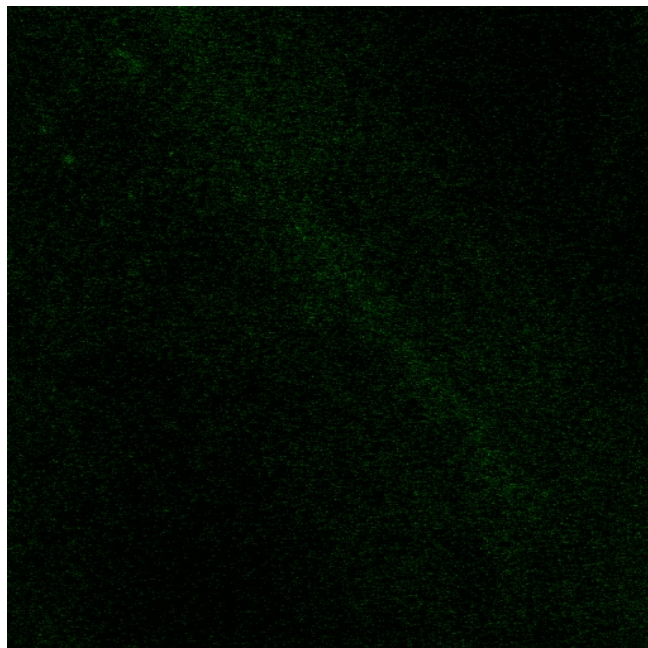


Abb. 3.6.3: HDAF-markierter Monolayer nach Inkubation mit CS-Na 1%

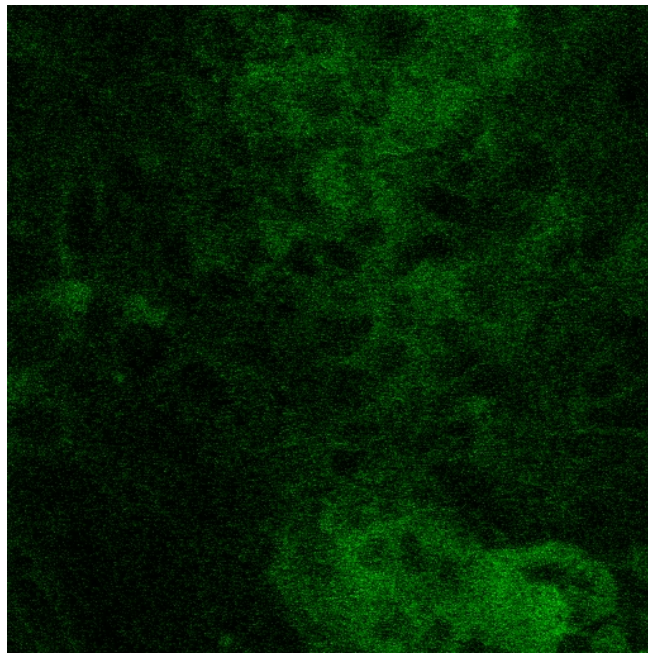


Abb. 3.6.4: HDAF-markierter Monolayer nach Inkubation mit CS-Na 0.5%

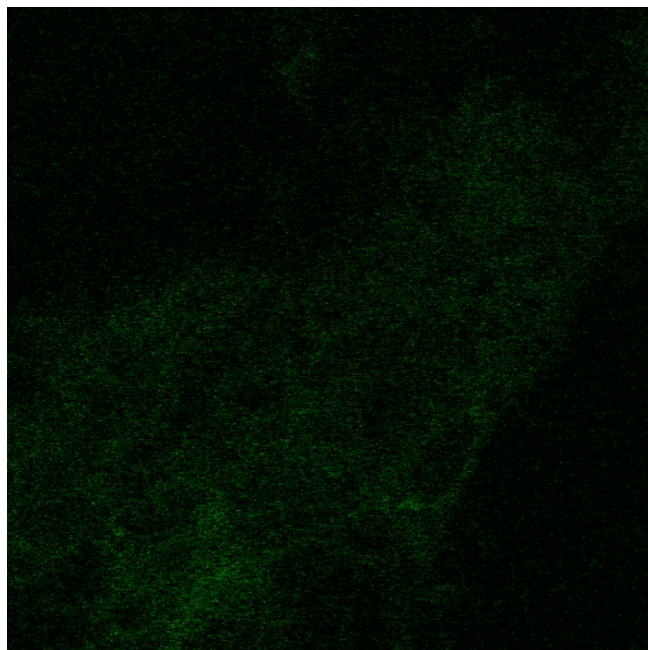


Abb. 3.6.5: HDAF-markierter Monolayer nach Inkubation mit TC-Na 1%

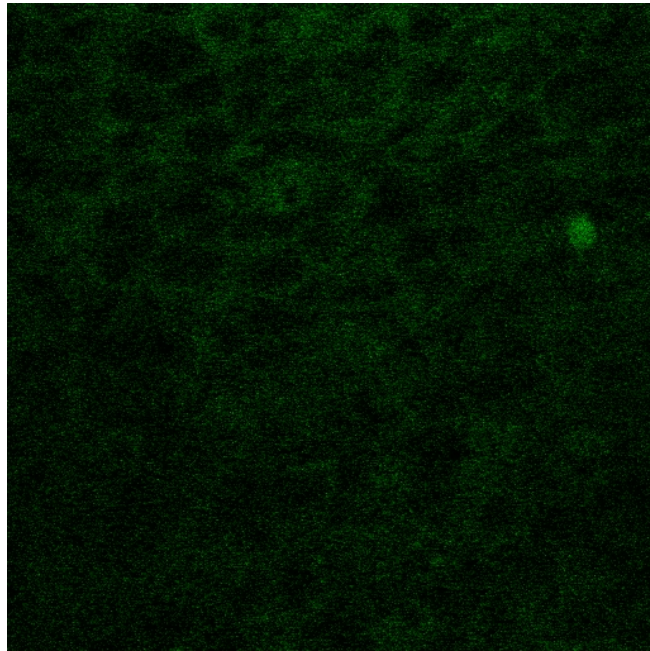


Abb. 3.6.6: HDACF-markierter Monolayer nach Inkubation mit TC-Na 0,5%

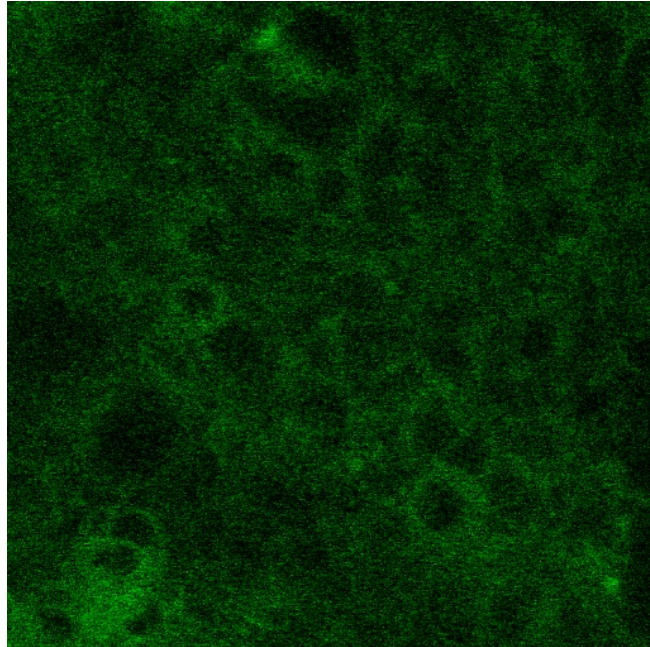


Abb. 3.6.7: HDACF-markierter Monolayer nach Inkubation mit CDCA-Na 0,1%

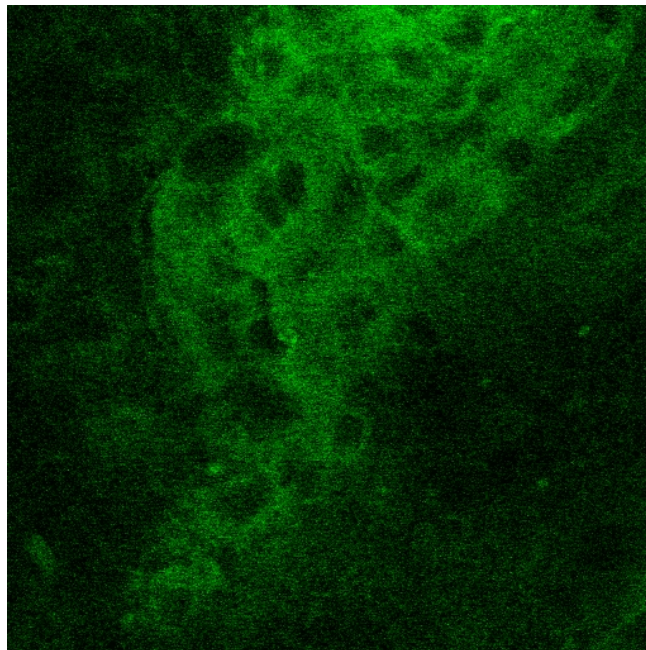


Abb. 3.6.8: HDAF-markierter Monolayer nach Inkubation mit UDCA-Na 0,25%

Die Abbildungen zeigen, daß Gallensalze konzentrationsabhängig HDAF aus den Membranen herauslösen. Der nur mit HEPES B behandelte Monolayer läßt die Einlagerung des fluoreszenzmarkierten Lipids sehr gut erkennen. Die Aufnahme nach Inkubation mit UDCA-Na 0,25% ähnelt der Kontrolle. UDCA-Na solubilisiert erwartungsgemäß HDAF nicht. Bei TC-Na und CS-Na sieht man deutliche Unterschiede zwischen den Aufnahmen nach Behandlung mit der 1% oder der 0,5% Lösung. Auch dies ist zu erwarten, da in der 0,5% Lösung keine Gallensalzmizellen zur Solubilisierung von HDAF vorhanden sind. Die untersuchte Konzentration von CDCA-Na liegt ebenfalls unterhalb der CMC. Im Vergleich zu TC-Na und CS-Na 1% sind die Zellmembranen nach Inkubation mit CDCA-Na 0,1% deutlich stärker gefärbt.

### 3.7 Interaktionen von Gallensalzen mit künstlichen Lipidmembranen - DPH-Fluoreszenz-Anisotropie Messungen an unilamellaren Liposomen

Der Einfluß von Gallensalzen auf den Ordnungszustand in Membranen, sollte mit Hilfe von Fluoreszenz-Anisotropiemessungen untersucht werden. Als Fluorophor wird bei der Untersuchung von Biomembranen hauptsächlich Diphenylhexatrien (DPH) eingesetzt. Absorptions- und Emissionsdipol sind im DPH-Molekül annähernd parallel angeordnet. DPH wird in Biomembranen oder Liposomen eingebaut. Verändert man die Zusammensetzung der Membran zum Beispiel durch die Einwirkung einer Substanz, die Membranbestandteile solubilisieren kann, so wird sich dies in einer deutlich veränderten Fluoreszenzanisotropie manifestieren. Für die Anisotropie  $r$  in verdünnten, glasartigen Lösungen gilt:

$$r = \frac{2}{5} \times \left( \frac{3 \cos 2\alpha - 1}{2} \right)$$

Die Formel besagt, daß die beobachtete Anisotropie ein Produkt des Verlust an Anisotropie resultierend aus einerseits der Photoselektion (2/5) und andererseits der Verschiebung des Dipols in einem bestimmten Winkel ist. Für DPH beträgt dieser Wert in einer verdünnten glasartigen Lösung 0,39 und entspricht einem Winkel von  $7,4^\circ$ . Die gemessenen Anisotropiewerte müssen stets zwischen  $-0,2 < r < 0,4$  liegen. Alle anderen Werte entspringen der Messung von Artefakten.

Untersucht wurde der Einfluß von CS-Na, TC-Na, CDCA-Na 1% und CDCA-Na und UDCA-Na 0,5% außerdem von Octreotid und als Kontrolle HEPES B. Die Experimente wurden bei  $10^\circ\text{C}$  und  $37^\circ\text{C}$  vorgenommen. Die Phasenübergangstemperatur von DMPC liegt bei  $35^\circ\text{C}$ . Die Phasenübergangstemperatur  $T_c$  ist die geringst mögliche Temperatur, bei der Wasser zwischen die Lipidschichten eindringen kann. Oberhalb dieser Temperatur befinden sich die Kohlenwasserstoffketten in einem geschmolzenen beweglichen Zustand. Unterhalb dieser Temperatur ordnen sie sich in dichter Packung an. Die Anisotropie wird aufgrund des geordneten Zustand unterhalb der Phasenübergangstemperatur bei  $10^\circ\text{C}$  hoch sein und bei  $37^\circ\text{C}$  deutlich abfallen. Es ist zu erwarten, daß die Auswirkung der Gallensalzinkubation bei  $10^\circ\text{C}$  deutlicher zu Tage tritt als bei  $37^\circ\text{C}$ .

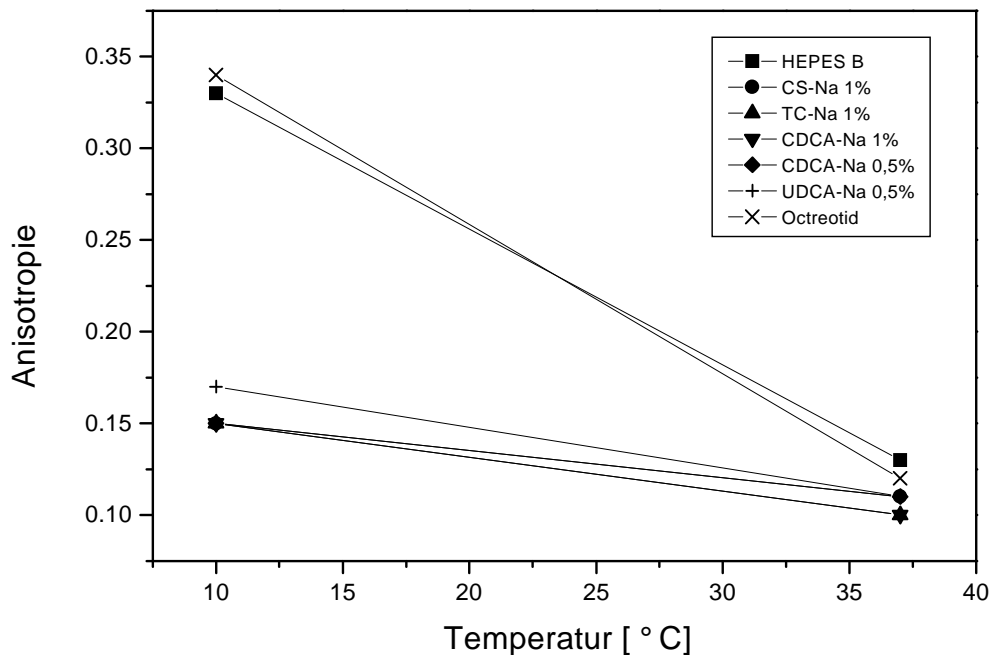


Abb. 3.7.1: Entwicklung der Anisotropie von DMPC-Membranen nach Inkubation mit Gallensalzen und bei unterschiedlichen Temperaturen

Die Abbildung zeigt erwartungsgemäß, den höheren Ordnungszustand der Membran im Kontrollexperiment mit HEPES B bei  $10^\circ\text{C}$ . Nach Erhöhen der Temperatur auf  $37^\circ\text{C}$  fällt die Anisotropie deutlich ab. Die Kohlenwasserstoffketten sind geschmolzen und können sich innerhalb der Membran bewegen. Octreotid hat keinen Einfluß auf den Ordnungszustand der DMPC Membranen. Wie erwartet tritt der Effekt der Gallensalzlösungen bei  $10^\circ\text{C}$  deutlicher zu Tage. Die Kohlenwasserstoffketten sind nach Gallensalzinkubation deutlich beweglicher. Die resultierenden Anisotropiewerte ähneln denen bei  $37^\circ\text{C}$ . Die Gallensalze befinden sich in den Experimenten oberhalb ihrer CMC. Es ist davon auszugehen, daß in dieser Konzentration, gemischte Mizellen aus Gallensalzen und Membranlipiden entstehen. Dafür sprechen auch die gemessenen Anisotropiewerte: Bei  $37^\circ\text{C}$  sind diese für die untersuchten Gallensalze und die

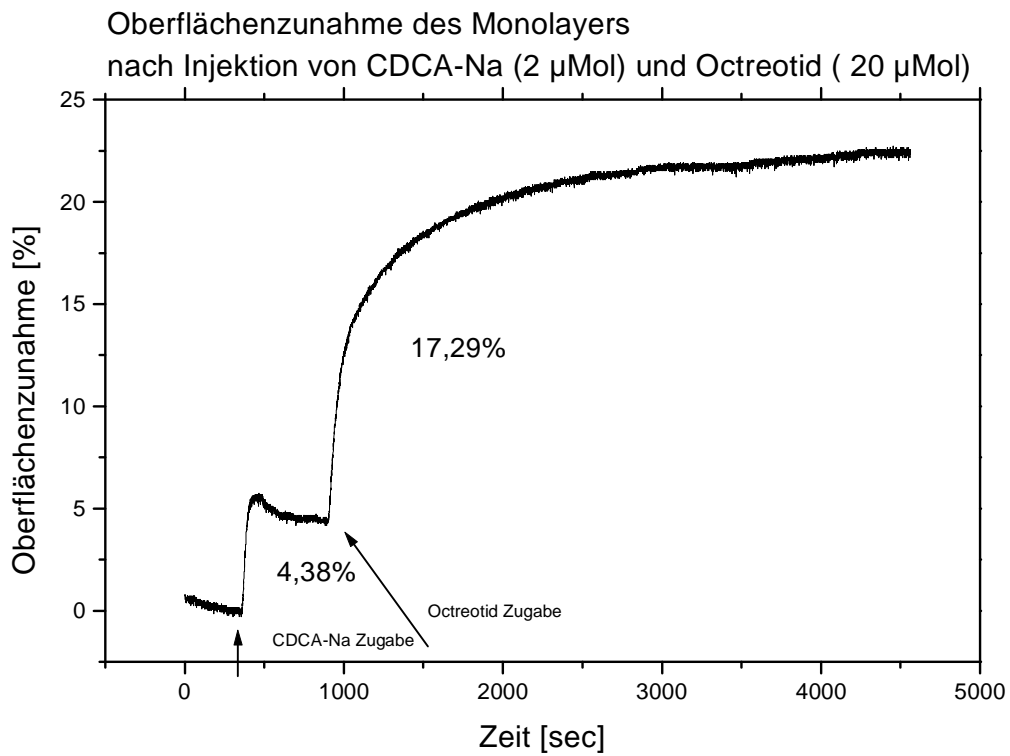
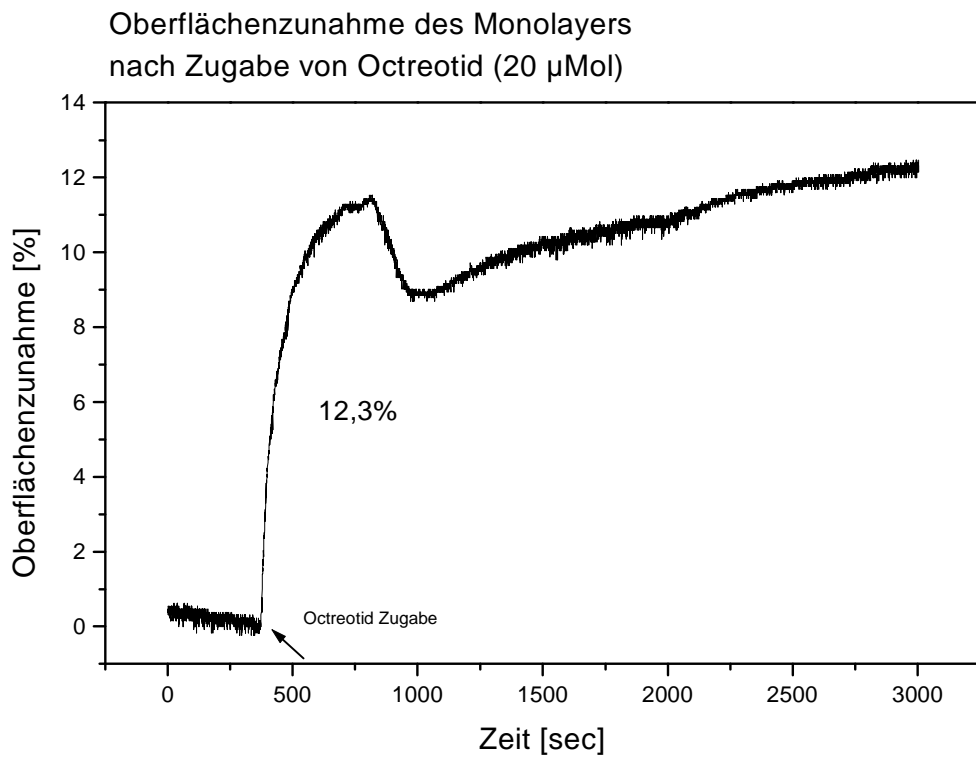
Kontrollexperimente annähernd gleich. In den Gallensalzmischmizellen herrscht offensichtlich ein Ordnungszustand, der dem der Membran oberhalb der Phasenübergangstemperatur ähnelt. Nach Inkubation mit UDCA-Na weisen die Proben verglichen mit den anderen Gallensalzen eine höhere Anisotropie, also eine geringere Beweglichkeit des Fluoreszenzfarbstoffes, DPH, auf. Dieses Phänomen wurde auch von Schubert und Schmidt [146] beschrieben: Gemischte Mizellen mit UDCA-Na weisen einen höheren Ordnungszustand auf als Mizellen mit Gallensalzen, die an C7 eine  $\alpha$ -ständigen OH-Gruppe aufweisen. Die Ergebnisse zeigen, daß Gallensalze Lipidmembranen solubilisieren. Die gebildeten gemischten Mizellen haben einen ähnlichen Anisotropiewert wie Lipidmembranen oberhalb der Phasenübergangstemperatur.

### **3.8 Untersuchung des Einbaus von Octreotid in An- und Abwesenheit von Gallensalzen in DOPC-Monolayer mit Hilfe der Langmuir-Trog-Technik**

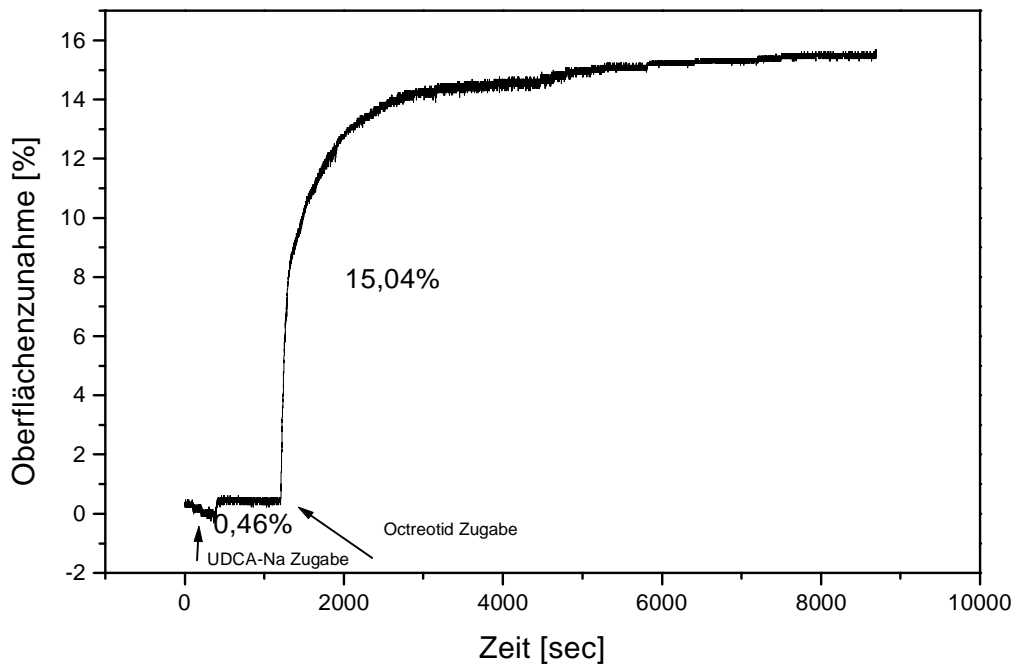
Der Langmuir-Trog untersucht Vorgänge an der Luft-Wasser-Grenzfläche. Dadurch kann das Verhalten von Lipiddoppelschichten simuliert werden. Eine Korrelation von Mono- und Bilayerverhalten läßt sich mathematisch nachweisen. [147,148].

Die vorangegangenen Experimente und verschiedene Literaturstellen weisen auf einen Einbau von Octreotid in Zellmembranen hin. Fricker et al. [149] zeigten die Aufnahme von intaktem fluoreszenzmarkiertem Octreotid in Dünndarmepithelzellen von Ratten. Beschiaschvili und Seelig [30] untersuchten Octreotid in Langmuir-Trog-Experimenten. Die Ergebnisse zeigten eine Interkalation des Peptids zwischen Lipidmoleküle. Weiterführende Experimente legten nahe, daß Octreotid sich zu 60-70% im Bereich der Lipidkopfgruppen einlagert und nur ein geringer Anteil bis in das Innere der Lipidschicht vordringt. In den nachfolgenden Experimenten wurden die Gallensalze in Konzentrationen von 2 bzw. 20  $\mu\text{Mol}$  untersucht. Diese Konzentrationen liegen deutlich unterhalb der CMC. Die niedrigen Konzentrationen waren erforderlich, um unnatürliche Veränderungen in der Monolayerstruktur zu verhindern [76]. Aufgrund der geringen Löslichkeit von UDCA-Na und einem raschen Zusammenbruch des Monolayers nach Inkubation mit höheren Konzentrationen von CDCA-Na, konnten diese Gallensalze nur als 2  $\mu\text{Mol}$  Lösungen eingesetzt werden. Fahey et al. [150] untersuchten die Isothermen von POPC-Monolayer mit unterschiedlichen Anteilen an Gallensäuren (0- 100 mol%). Zusätzlich wurde dem Monolayer Cholesterol beigemischt. In Abwesenheit von Cholesterol führten alle untersuchten Gallensäuren zu einer Kondensation des Monolayers. Dies machte sich in einem erhöhten Kollapsdruck bemerkbar. Hydrophobe Gallensäuren erhöhten dabei diesen Druck stärker als die hydrophileren. Die Autoren kommen zu der Schlußfolgerung, daß sich Gallensäuren und Gallensalze mit der langen Achse des Steroidgerüsts parallel zur Wasser-Luft-Grenzfläche in den Monolayer einlagern.

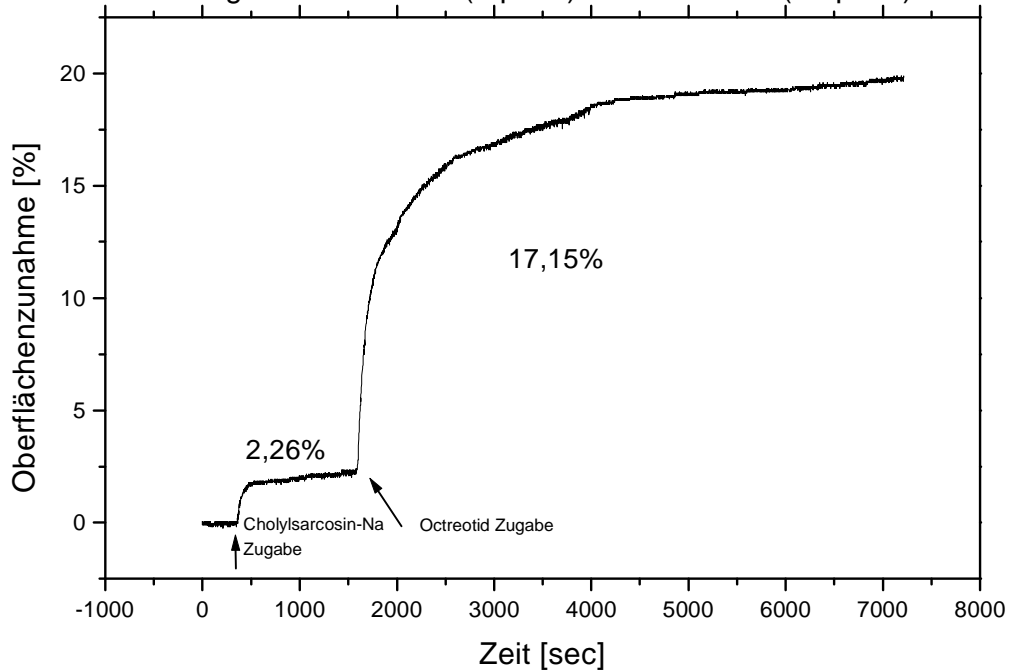
Ergebnisse der Einbauexperimente:



Oberflächenzunahme des Monolayers  
nach Zugabe von UDCA-Na (2  $\mu$ Mol) und Octreotid (20  $\mu$ Mol)

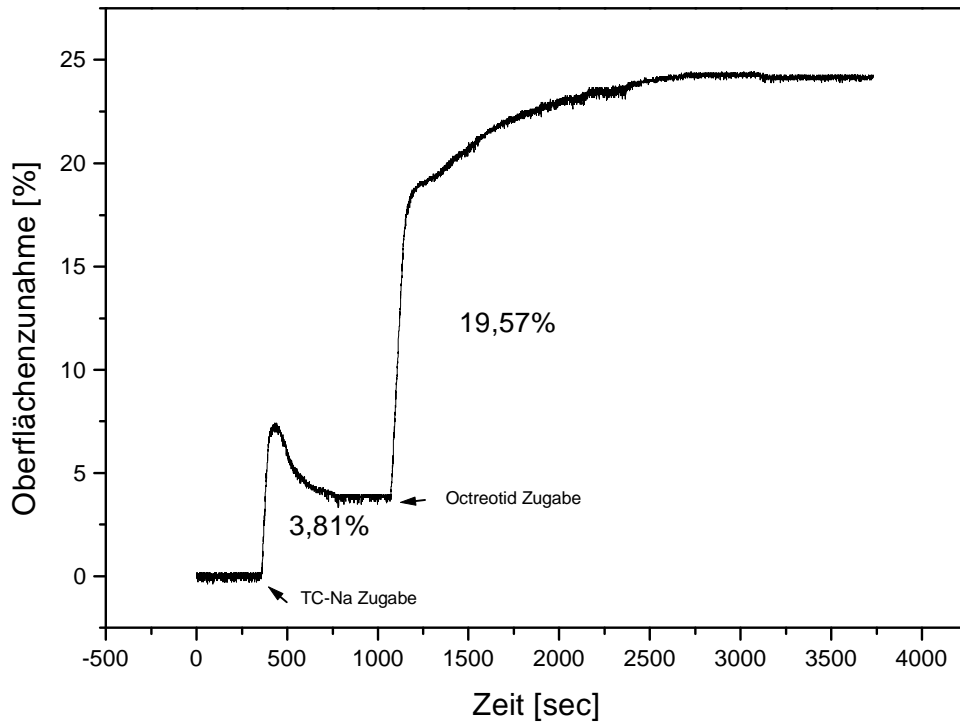


Oberflächenzunahme des Monolayers  
nach Zugabe von CS-Na (2  $\mu$ Mol) und Octreotid (20  $\mu$ Mol)

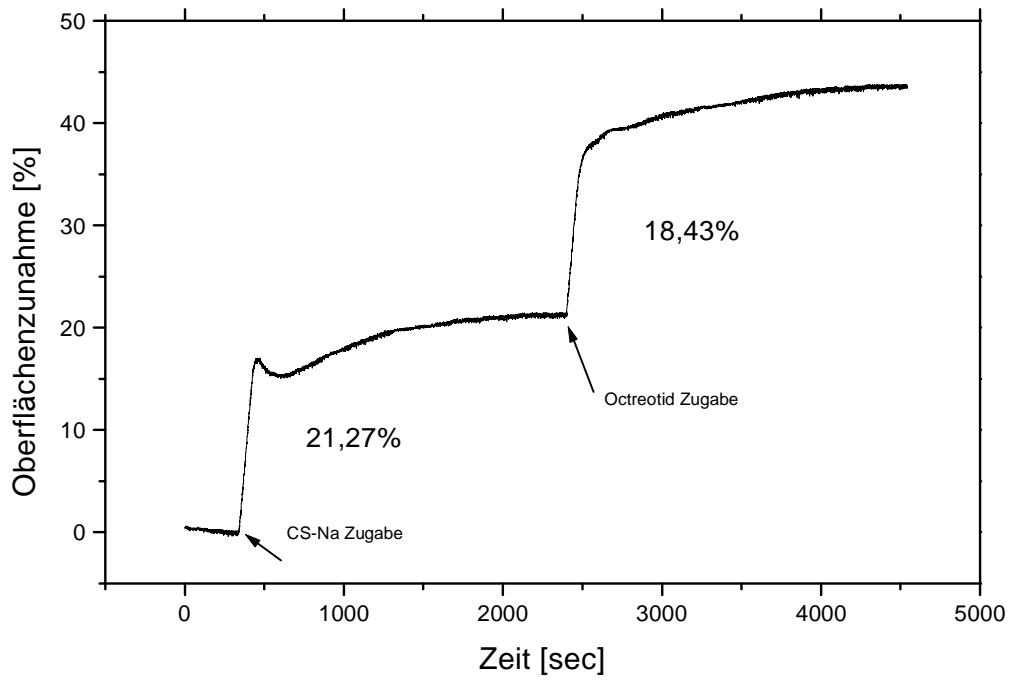


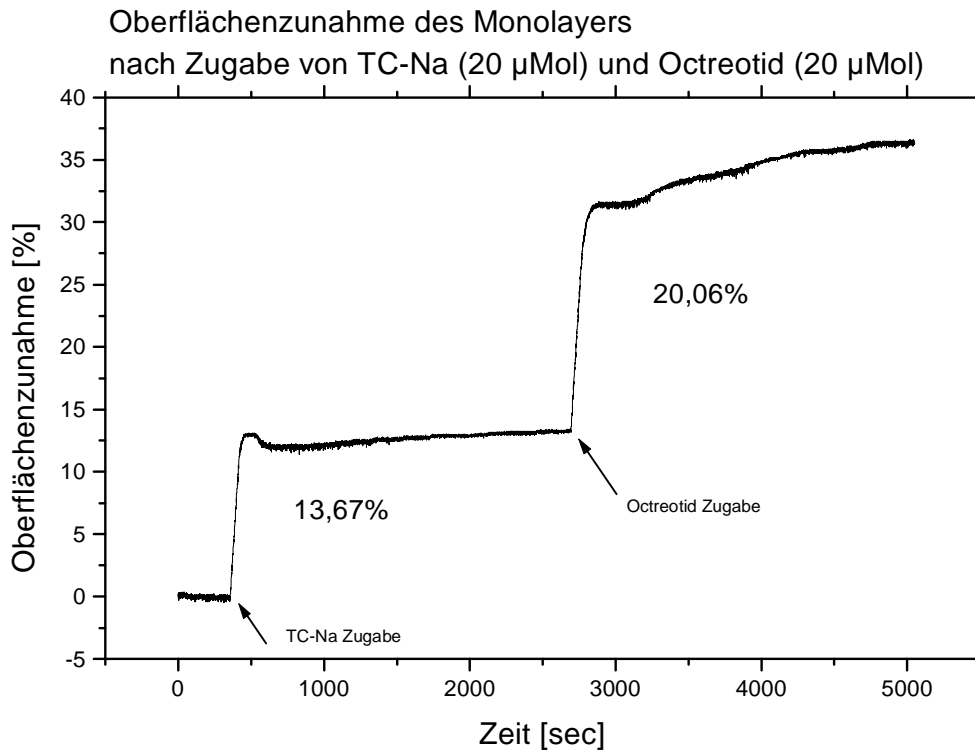


Oberflächenzunahme des Monolayers  
nach Zugabe von TC-Na (2  $\mu$ Mol) und Octreotid (20  $\mu$ Mol)



Oberflächenzunahme des Monolayers  
nach Zugabe von CS-Na (20  $\mu$ Mol) und Octreotid (20  $\mu$ Mol)





Die Ergebnisse zeigen, daß sich die untersuchten Gallensalze in Lipidmonolayer einlagern. In den oben dargestellten Abbildungen wird ersichtlich, daß sich das hydrophobere Gallensalz CDCA-Na stärker in den Monolayer einlagert als die hydrophileren TC-Na und CS-Na in vergleichbaren Konzentrationen. Der Einbau von UDCA-Na in den DOPC-Monolayer ist vernachlässigbar klein. Es ist lediglich eine Oberflächenzunahme kleiner 0,5% zu beobachten. Fricker et al. [76] fanden sogar eine geringfügige Oberflächenverkleinerung nach UDCA-Na Inkubation.

Der Fluoreszenzassay mit einem Fluoreszein-markierten Lipid (s. 3.6.) zeigte einen interessanten Synergismus zwischen Octreotid und Gallensalzen. Dieser stellt auch eine mögliche Erklärung für die stärkere resorptionsverbessernde Wirkung von Gallensalzen auf Octreotid im Gegensatz zu Desmopressin dar. Mit Hilfe der Monolayerexperimente soll das Ergebnisse aus 3.6 bestätigt werden.

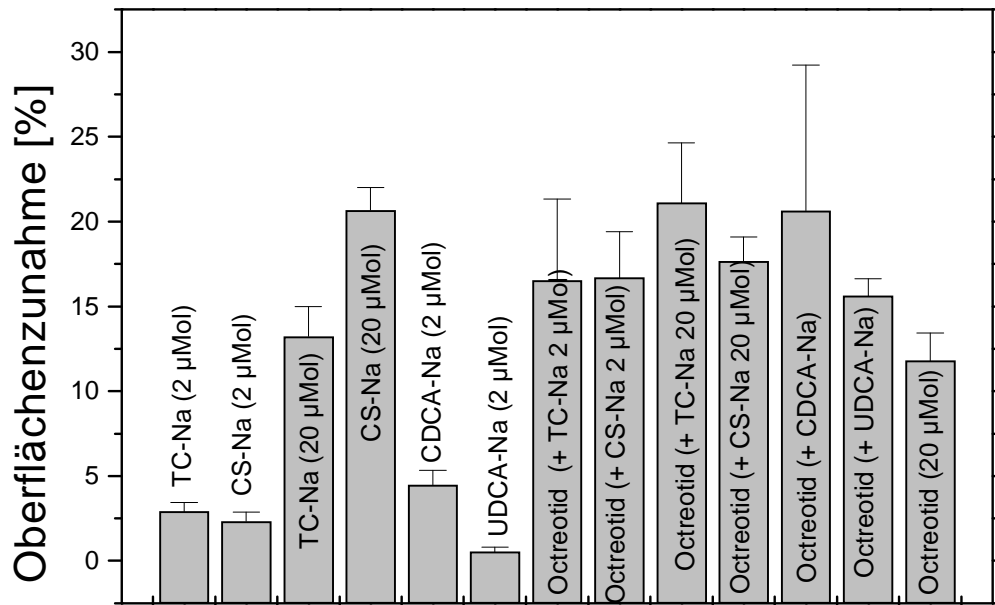
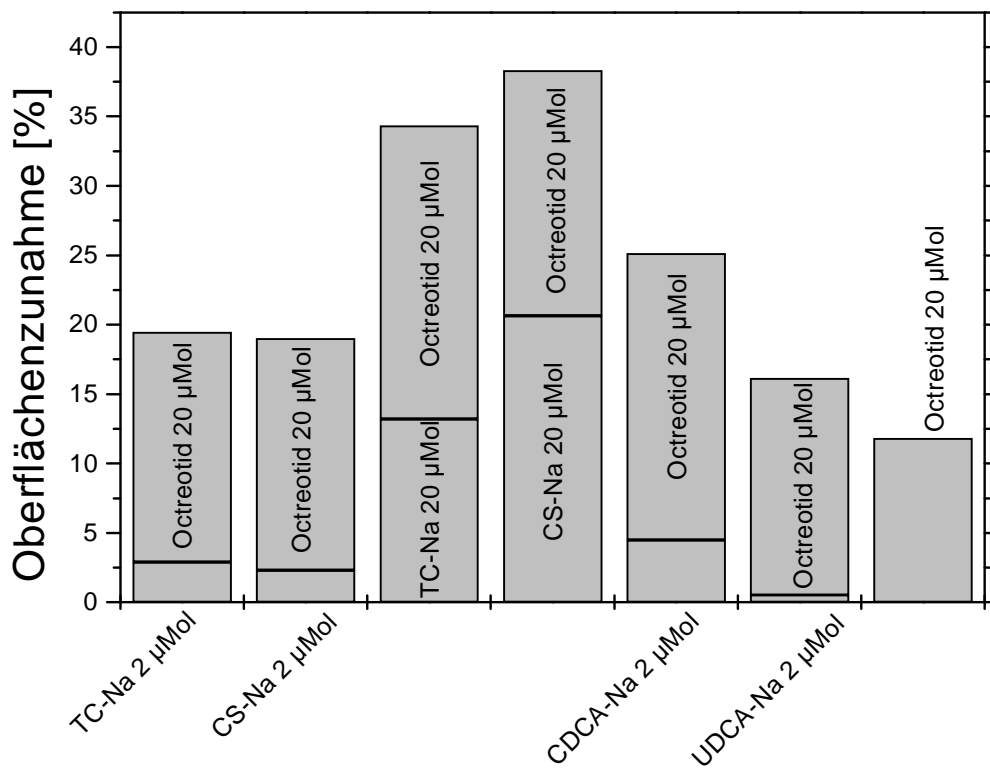


Abb. 3.9.1 und 3.9.2: Graphische Darstellung der Oberflächenzunahme des Monolayers nach Inkubation mit verschiedenen Gallensalzen und anschließender Inkubation mit Octreotid.



Beide Abbildungen verdeutlichen, daß in einen mit Gallensalzen vorinkubierten Monolayer mehr Octreotid eingelagert wird als in einen unbehandelten. Dieser Effekt ist, wie für TC-Na und CS-Na gezeigt, konzentrationsabhängig. Die Ergebnisse belegen den in 3.6 gefundenen Synergismus von Gallensalzen und Octreotid.

Vergleichende Untersuchungen mit Desmopressin konnten leider nicht durchgeführt werden. Für Langmuir-Trog-Experimente sind beträchtliche Mengen Peptid nötig. Die hohen Kosten führten zu einem Verzicht auf weitere Studien.

### 3.9 Beeinflussung der intertestinalen Mucusschicht durch Gallensalze

*In vivo* weist die auf den Epithelzellen haftende Mucusschicht eine Dicke von 100-150µm auf. Sie ist die längste Diffusionsstrecke, die eine Substanz auf ihrem Weg vom Darmlumen in die Blutgefäße zurücklegen muß. Ob die Mucusschicht eine resorptionslimitierende Barriere ist oder nicht, wird in der Literatur widersprüchlich beschrieben. Muranishi [151] hält die Mucusschicht als Resorptionsbarriere für annähernd vernachlässigbar. Dabei stützt er sich auf eine Studie, in der der Einsatz von mucolytischen Agentien zu keiner Resorptionsverbesserung geführt hat [152]. Mucus fördert die Bildung einer *unstirred water layer* auf den Epithelzellen. Nach Dietschy et al. [153] passieren Substanzen diese Schicht im Sinne eines passiven Diffusionsprozesses. Diese Diffusion ist lediglich von der Schichtdicke und von dem Diffusionskoeffizienten der diffundierenden Substanz abhängig. MacAdam [18] beschreibt die Mucusschicht als ein Glykoproteingel, das Interaktionen mit Wirkstoffen eingehen kann. Dadurch kann es zu einer Retardierung des Diffusionsprozesses kommen. Dies deckt sich mit den Ergebnissen von Matthes [112]: Die Wechselwirkungen zwischen Mucus und Substanzen sind unspezifisch und nicht elektrostatischer Natur. Hydrophile Moleküle diffundieren durch die wässrige Mucusschicht ohne Wechselwirkungen mit dem Mucingerüst. Die Diffusion wird nur durch die Molekülgröße beeinflusst. Lipophile Wirkstoffe verteilen sich in hydrophobe Bereiche der Mucusschicht. Zudem besitzt das Mucogel leicht kationenselektive Eigenschaften. Peptide werden nur in geringem Ausmaß über die Darmmucosa aufgenommen. Halbrook [154] fand heraus, daß Peptide nicht stärker an Mucus binden als andere Substanzen. Das bedeutet, daß die geringe Aufnahme von Peptiden über das Epithel nicht durch stärkere Mucusbindung begründet werden kann. Mit Hilfe des Mucusschichtmodells nach Nimmerfall et al. [63] und dessen Weiterentwicklung von Matthes [112] wurde der Einfluß von Gallensalzen auf die Wirkstoffdiffusion durch die Mucusschicht untersucht. Als Modellsubstanz wurde (5)-Carboxyfluoreszein gewählt. Dieses ist ebenso wie die im Vorangegangenen untersuchten Peptide ein hydrophiles Molekül.

## Bilanzierung:

Um Adsorption von Carboxyfluoreszein an Bestandteile der Apparatur oder der Membranen auszuschließen, wurde die Konzentration der Modells substanz in allen drei Kompartimenten nach 1 Stunde Dialyse bestimmt:

| Testlösung                      | Konzentration im Donor bezogen auf Ausgangskonz. [%] | Konzentration im Mittelkompartiment bezogen auf Ausgangskonz. [%] | Konzentration im Akzeptor bezogen auf Ausgangskonz. [%] |
|---------------------------------|--|---|---|
| Carboxyfluoreszein durch Mucus  | 44,04 ± 13,78  | Nicht bestimmbar  | 10,62 ± 3,96  |
| Carboxyfluoreszein durch Puffer | 45,38 ± 18,61  | 30,45 ± 8,72  | 20,31 ± 10,35   |

Aufgrund der starken Gelbfärbung des Schweinesmucus war eine Bestimmung des Carboxyfluoreszeingehalts in Mucus nicht möglich. Ohne Mucus ergibt sich eine Bilanz von 96,14 % Carboxyfluoreszein. Carboxyfluoreszein wird also nur im sehr geringen Ausmaß absorbiert.

Ergebnisse der Diffusionsstudien durch McIlvaine Zitratpuffer im mittleren Kompartiment (Nullwertexperimente) (n=12):

| Testlösung                         | Massenfluß/h [µMol/h] | Relativer Massenfluß /h [%/h] |
|------------------------------------|-----------------------|-------------------------------|
| Carboxyfluoreszein                 | 0,16 ± 0,056          | 16,5 ± 5,59                   |
| Carboxyfluoreszein + TC-Na 1%      | 0,19 ± 0,13           | 19,39 ± 13,21                 |
| Carboxyfluoreszein + CS-Na 1%      | 0,21 ± 0,065          | 21,16 ± 6,45                  |
| Carboxyfluoreszein + CDCA-Na 0,1%  | 0,21 ± 0,06           | 20,54 ± 6                     |
| Carboxyfluoreszein + UDCA-Na 0,25% | 0,12 ± 0,038          | 12,1 ± 3,83                   |

Der Massenfluß ohne Mucus ist im Vergleich zu den Ergebnissen von Matthes niedrig. Matthes fand einen relativen Massenfluß von durchschnittlich 36% in den Nullwertexperimenten. Auffällig ist der erniedrigte Massenfluß von Carboxyfluoreszein in Anwesenheit von UDCA-Na. Möglicherweise führt die vergleichsweise höhere Viskosität der UDCA-Na Lösung zu diesen erniedrigten Werten.

Ergebnisse der Diffusionsstudien durch Schweinedarmmucus:

| Testlösung                            | Massenfluß/h<br>[ $\mu\text{Mol/h}$ ] | Relativer Massenfluß<br>/h [%/h] |
|---------------------------------------|---------------------------------------|----------------------------------|
| Carboxyfluoreszein                    | $0,11 \pm 0,064$                      | $10,76 \pm 6,43$                 |
| Carboxyfluoreszein<br>+ TC-Na 1%      | $0,072 \pm 0,054$                     | $7,23 \pm 5,38$                  |
| Carboxyfluoreszein<br>+ TC-Na 0,5%    | $0,097 \pm 0,051$                     | $9,66 \pm 5,113$                 |
| Carboxyfluoreszein<br>+ CS-Na 1%      | $0,096 \pm 0,036$                     | $9,59 \pm 3,591$                 |
| Carboxyfluoreszein<br>+ CS-Na 0,5%    | $0,146 \pm 0,05$                      | $14,55 \pm 4,95$                 |
| Carboxyfluoreszein<br>+ CDCA-Na 0,1%  | $0,073 \pm 0,055$                     | $7,25 \pm 5,46$                  |
| Carboxyfluoreszein<br>+ CDCA-Na 0,05% | $0,17 \pm 0,076$                      | $16,9 \pm 7,56$                  |
| Carboxyfluoreszein<br>+ UDCA-Na 0,25% | $0,093 \pm 0,043$                     | $9,3 \pm 4,3$                    |
| Carboxyfluoreszein<br>+ UDCA-Na 0,1%  | $0,13 \pm 0,057$                      | $10,3 \pm 5,66$                  |

Carboxyfluoreszein wird offensichtlich nur geringfügig durch das Mucusgel retiniert. Zusatz von UDCA-Na führt zu keiner Veränderung des Massenflußs. Ebenso verhält sich CS-Na 0,5% und CDCA-Na 0,05%. Die Diffusion von CF wird gegenüber dem Nullwertexperiment weder erleichtert noch erschwert. TC-Na 1%, CS-Na 1% und CDCA-Na 0,1% hingegen führen zu einer Verringerung des relativen Massenflusses. Aus den Nullwertexperimenten und den Mucusexperimenten wurde der korrigierte relative Massenfluß berechnet:

## Korrigierter relativer Massenfluß

| Testlösung                            | Korrigierter relativer Massenfluß [%] |
|---------------------------------------|---------------------------------------|
| Carboxyfluorescein                    | 65,13                                 |
| Carboxyfluorescein<br>+ TC-Na 1%      | 37,29                                 |
| Carboxyfluorescein<br>+ TC-Na 0,5%    | 49,82                                 |
| Carboxyfluorescein<br>+ CS-Na 1%      | 45,32                                 |
| Carboxyfluorescein<br>+ CS-Na 0,5%    | 68,8                                  |
| Carboxyfluorescein<br>+ CDCA-Na 0,1%  | 35,33                                 |
| Carboxyfluorescein<br>+ CDCA-Na 0,05% | 82,28                                 |
| Carboxyfluorescein<br>+ UDCA-Na 0,25% | 76,86                                 |
| Carboxyfluorescein<br>+ UDCA-Na 0,1%  | 85,12                                 |

Diese Tabelle verdeutlicht noch einmal die aus dem relativen Massenfluß mit und ohne Mucus gewonnenen Erkenntnisse: Gallensalze in niedrigen Konzentrationen und UDCA-Na beeinflussen die Diffusion von CF nicht. Die höheren Konzentrationen führen zu einer erschwerten Diffusion. Zwischen den einzelnen Gallensalzen, TC-Na, CS-Na und CDCA-Na ist dabei kein Unterschied in den Auswirkungen feststellbar. Die geringfügige Bindung von CF an den Mucus ist durch die Hydrophilie des Moleküls erklärbar. Es wird nur wenig vom Mucugel zurückgehalten. Für lipophile Substanzen wie Progesteron oder Dihydroergotamin fand Matthes einen Rückgang des relativen Massenfluß auf 2-3 %: In der Literatur ist beschrieben, daß Gallensalze die Viskosität des Mucugels verringern [155, 156]. Dabei ist die Rede von einem Brechen der Struktur des Mucusgerüsts. Ob dieser Effekt der Gallensalze auch zu einer verbesserten Resorption von Peptiden und Proteinen führt, ist bisher noch nicht nachgewiesen worden [65]. Die in den Mucusdiffusionsexperimenten erzielten Ergebnisse sprechen nicht für eine positive Beeinflussung des Mucugels durch Gallensalze. Matthes untersuchte die Diffusion von Dihydroergotamin durch Mucus in Anwesenheit unterschiedlicher Konzentrationen an Tensiden (Solulan® und Tween® 80). Je größer die Konzentration des Tensids war, desto weniger Wirkstoff diffundierte in das Akzeptorkompartiment. Möglicherweise wird die Diffusion durch Einschluß in Mizellen erschwert oder es werden Verteilungsräume durch die Tenside besetzt, die dadurch nicht für den Wirkstoff zur Verfügung stehen. Aufgrund dieser Ergebnisse kam Matthes zu dem Schluß, daß die resorptionsverbessernden Eigenschaften dieser Tenside nicht auf einer Erleichterung der Mucusdiffusion beruhen. Die im Rahmen dieser Dissertation durchgeführten Untersuchungen führen zu dem selben Schluß. CS-Na und TC-Na verschlechterten in Konzentrationen oberhalb der CMC die Mucusdiffusion. Mizellen diffundieren offensichtlich schlecht durch das Mucusgerüst und blockieren dabei möglicherweise Verteilungsräume. Fricker et al. [139] fanden eine verringerte Resorption von Octreotid in Rattendünndarm in Gegenwart größerer Mengen an Gallenflüssigkeit. In Ratten mit kanülierten Gallengängen war die Resorption hingegen deutlich erhöht. Bermejo et al. [157] und Poelma et al. [158] zeigten, daß TC-Na und andere Gallensalze den

Diffusionswiderstand der Mucusschicht erhöhen und dadurch die Resorption von lipophilen Wirkstoffen erniedrigen. Daß Gallensalze die Mucusschicht positiv im Sinne einer Diffusionserleichterung beeinflussen, kann aufgrund der in den Mucusediffusionsexperimenten erzielten Ergebnisse, aber auch nach Studium der Literatur nicht angenommen werden.

Des weiteren ist zu bedenken, daß die Akkumulation eines Wirkstoffes in der Mucusschicht als Ergebnis von unspezifischer Bindung seine Bioverfügbarkeit auch positiv beeinflussen könnte. Durch Erreichen einer höheren Konzentration an den Epithelzellen und durch Verlängerung der Absorptionsphase können mehr Wirkstoffmoleküle in den Blutkreislauf aufgenommen werden. Für einige Wirkstoffe hat sich eine Steigerung der Bioverfügbarkeit nach Formulierung in mucoadhäsiven Trägern gezeigt [159]. Eine schnelle Diffusion durch die Mucusschicht ist im Hinblick auf die Bioverfügbarkeit nicht für alle Substanzen wünschenswert.

### **3.10 *In-situ*- Absorptionsversuche an Ratten**

In den Zellkulturexperimenten erwiesen sich TC-Na, CS-Na und CDCA-Na als Resorptionsförderer für die untersuchten Peptide. Dieses Ergebnis sollte nun in Tierversuchen bestätigt werden.

#### **3.10.1 Absorption von Desmopressin in Ratten in An- und Abwesenheit von Gallensalzen**

Desmopressin wurde in physiologischer Kochsalzlösung gelöst. Dieser Lösung wurden die jeweiligen Gallensalze zugegeben. Die Endkonzentration der Gallensalze in dieser Lösung betrug 1%. Zur Bestimmung der Absorptionseffizienz wurden die Testlösungen direkt in den Darm der Versuchstiere injiziert. Als Kontrolle wurde Desmopressin in physiologischer Kochsalzlösung i.v. verabreicht.

Desmopressindosis bei Applikation in das Jejunum: 76,4 pmol/ml

Desmopressindosis bei i.v. Applikation: 1,005 pmol/ml

Die Darmmucosa ist *in vivo* deutlich resistenter gegen schädigende Einflüsse als Zellkulturen [100]. Daher wurde CDCA-Na ebenfalls als 1% Lösung untersucht. In den CaCo-2 Experimenten führte diese Konzentration zur Zellyse.



Es ergaben sich folgende Blutspiegelkurven:

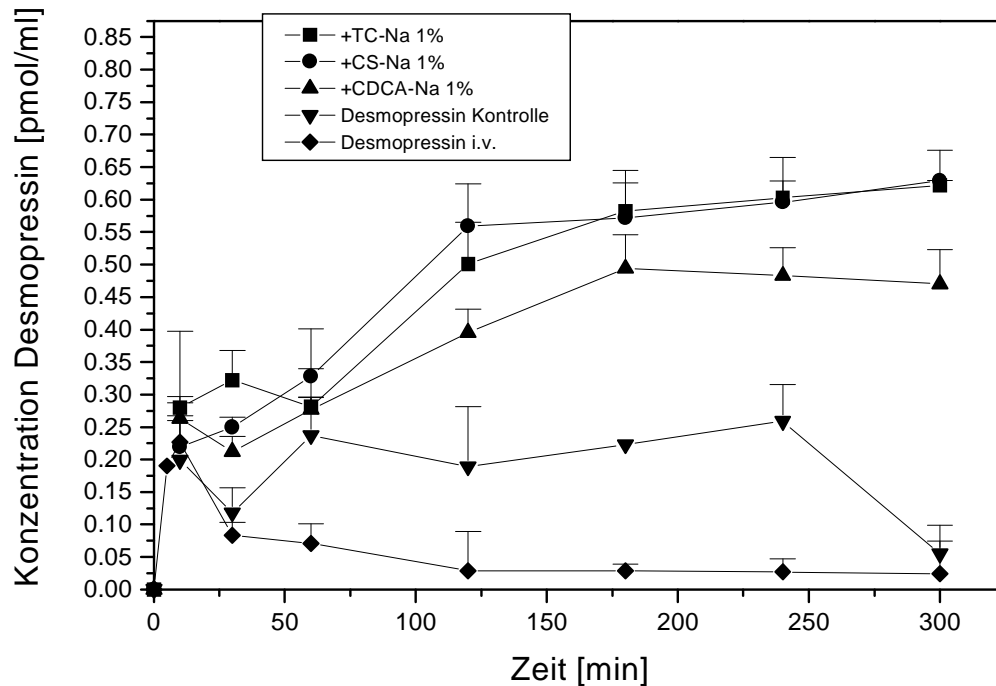


Abb. 3.9.1: Konzentration von Desmopressin im Blut

Berechnung der Aerea under the curve:

| Zeit [min] | TC-Na 1% AUC [pmol/ml*min] | CDCA-Na 1% [pmol/ml*min] | CS-Na 1% [pmol/ml*min] | Desmopressin [pmol/ml*min] | Desmopressin i.v. [pmol/ml*min] |
|------------|----------------------------|--------------------------|------------------------|----------------------------|---------------------------------|
| 5          | -                          | -                        | -                      | -                          | 1,135                           |
| 10         | 1,4                        | 1,315                    | 1,095                  | 0,995                      | 3,1                             |
| 30         | 6,02                       | 4,75                     | 4,69                   | 3,17                       | 3,1                             |
| 60         | 9,045                      | 7,335                    | 8,67                   | 5,325                      | 2,31                            |
| 120        | 23,46                      | 20,16                    | 26,61                  | 12,78                      | 3                               |
| 180        | 32,49                      | 26,67                    | 69,3                   | 26,88                      | 1,74                            |
| 240        | 72,24                      | 56,46                    | 36,75                  | 9,42                       | 1,68                            |
| 300        | -                          | -                        | -                      | -                          | 1,53                            |
| AUC        | 144,65                     | 116,69                   | 147,115                | 58,57                      | 14,495                          |

Berechnung der Absorption Effizienz:

|                           | Absorptions Effizienz [%] | Enhanceraktivität |
|---------------------------|---------------------------|-------------------|
| Desmopressin              | 0,48 ± 0,21               | 1                 |
| Desmopressin + TC-Na 1%   | 13,13 ± 2,52              | 28                |
| Desmopressin + CS-Na 1%   | 13,35 ± 2,82              | 28                |
| Desmopressin + CDCA-Na 1% | 10,59 ± 2,15              | 22                |

Die Ergebnisse zeigen, daß die untersuchten Gallensalze in einem vergleichbaren Ausmaß die Absorption von Desmopressin aus dem Jejunum verbessern. In den Zellkulturversuchen wurde ein deutlicher Unterschied in der Effektivität der einzelnen Gallensalze festgestellt. Der Tierversuch bestätigt diese Reihenfolge nicht. Die Versuche zeigen, daß mit *in-vitro* Zellkulturmodellen die komplexen Verhältnisse in lebenden Organismen nur unzureichend simuliert werden können. CS-Na erwies sich in den CaCo-2 Experimenten nur als mäßiger Resorptionsenhancer mit einer Enhanceraktivität von 1,14. In den Tierversuchen dagegen zeigte es deutliche, mit den anderen Gallensalzen vergleichbare Effekte.

### 3.10.2 Absorption von Octreotid in Ratten in An- und Abwesenheit von Gallensalzen

Zum Vergleich mit den Ergebnissen der Absorptionsstudien mit Desmopressin werden an dieser Stelle bisher unveröffentlichte Ergebnisse von Absorptionsstudien mit Octreotid und Gallensalzen vorgestellt. Diese Tierversuche wurden nicht von mir selbst sondern von Herrn Prof. Dr. Fricker durchgeführt. Die Daten werden mit freundlicher Erlaubnis an dieser Stelle präsentiert.

Octreotid wurde entsprechend den Versuchen mit Desmopressin direkt in das Jejunum der Ratten appliziert. Die Plasmakonzentration des Peptids wurde mittels eines spezifischen Radioimmunoassays bestimmt. Die eingesetzten Kaninchenantikörper reagieren spezifisch mit intaktem Peptid.

|                        | Absorptions Effizienz [%] | Enhanceraktivität |
|------------------------|---------------------------|-------------------|
| Octreotid              | 0,28 ± 0,07               | 1                 |
| Octreotid + TC-Na 1%   | 3,55 ± 1,56               | 13                |
| Octreotid + CS-Na 1%   | 3,79 ± 0,97               | 13                |
| Octreotid + CDCA-Na 1% | 19,9 ± 4,49               | 71                |

Die Effekte von TC-Na und CS-Na sind hier geringer als in den Versuchen mit Desmopressin. CDCA-Na erweist sich hier als deutlich besserer Resorptionsenhancer als TC- und CS-Na. Die mit einem bestimmten Resorptionsenhancer erzielbare Aufnahmeverbesserung hängt stark von dem eingesetzten Wirkstoff ab. Dies wird aus den Ergebnissen der Studien mit Octreotid und Desmopressin deutlich. Eine allgemeingültige Vorhersage kann nicht gemacht werden. Die Ergebnisse der Tierversuche zeigen, daß Cholylsarcosin-Na die Absorption von Peptiden verbessert. Der Effekt ist vergleichbar mit Taurocholol-Na.

## 4 ZUSAMMENFASSUNG UND AUSBLICK

Thema dieser Dissertation war die Untersuchung des Einflusses von Cholylsarcosin-Na auf die Aufnahme von Peptiden aus dem Darm. Vergleichend dazu sollten natürliche Gallensalze als Resorptionsenhancer getestet werden. Die resorptionsverbessernden Eigenschaften von CS-Na wurden im Verhältnis zu CDCA-Na, TC-Na und UDCA-Na beurteilt. Weiterhin wurde die Zytotoxizität von Cholylsarcosin im Vergleich zu den natürlichen Gallensalzen bestimmt und klassifiziert.

Der Einfluß von Cholylsarcosin und anderen natürlichen Gallensalzen auf die transzelluläre und parazelluläre Diffusion und auf die Mucusschicht wurde untersucht und verglichen werden.

Es konnte gezeigt werden, dass eine 1% ige Lösung von Cholylsarcosin-Na den Transport der Modellpeptide, Desmopressin und Octreotid, durch CaCo-2 Monolayer verbessert.

Insgesamt erwies sich CDCA-Na 0,1% als wirksamster Resorptionsenhancer. Taurocholat-Na 1% erhöhte den Permeabilitätskoeffizienten der Peptide stärker als Cholylsarcosin-Na 1%. UDCA-Na verbesserte den Transport durch die Zellen nicht.

In *in-situ* Absorptionsexperimenten an Ratten erwies sich Cholylsarcosin-Na 1% als guter Resorptionsverbesserer für Octreotid und Desmopressin. Die Absorption von Desmopressin wurde von TC-Na, CS-Na und CDCA-Na im gleichen Ausmaß verbessert. In den Experimenten mit Octreotid verbesserte CDCA-Na 1% die Absorption am stärksten. TC-Na und CS-Na zeigten denselben Effekt.

Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass CDCA-Na, TC-Na und CS-Na potente Resorptionsenhancer für Peptidwirkstoffe darstellen. Das Ausmaß der Transportverbesserung hängt dabei entscheidend von dem eingesetzten Wirkstoff ab. Eine allgemeingültige Vorhersage kann nicht gemacht werden. Die erzielbare Resorptionsverbesserung muß für jeden Wirkstoff neu bestimmt werden. Die CaCo-2 Zellkultur ist ein gutes Modell, um den Einsatz von Resorptionsenhancern zu untersuchen. Zu bedenken ist allerdings, daß eine Zellkultur die komplexen Bedingungen im Organismus nur unzureichend widerspiegeln kann. Die erhaltenen Daten müssen als erste Hinweise angesehen werden und durch geeignete *in vivo* Untersuchungen gestützt werden. Die in den CaCo-2 Experimenten gewonnenen Ergebnisse werden weitgehend in den Tierversuchen bestätigt.

Die Zytotoxizität der Gallensalze wurde mit Hilfe zweier Enzymassays, LDH und WST-1 sowie durch Trypanblaufärbung untersucht. Übereinstimmend wies Cholylsarcosin-Na eine deutlich geringere Toxizität als CDCA-Na und TC-Na auf. UDCA-Na verursachte kaum Schäden an den Zellen. Die Ergebnisse der Zytotoxizitätstest korrelieren mit den resorptionsverbessernden Potential der Gallensalze: Je toxischer das Gallensalz ist, desto stärker kann der Transport durch die Zellen verbessert werden.

Der Einfluß der Gallensalze auf den parazellulären Transportweg wurde näher untersucht:

CS-Na, CDCA-Na, und TC-Na verbesserten konzentrationsabhängig und reversibel den Transport eines parazellulären Markers über CaCo-2 Monolayer durch Öffnen der *tight junctions*. UDCA-Na hatte keine Auswirkung auf den Transport. Die Integrität des Aktin-Filaments wurde durch CDCA-Na und TC-Na deutlich zerstört, während CS-Na und UDCA-Na keine Schäden verursachten.

Die Untersuchung des Einflusses auf den parazellulären Transport von Gallensalzen, verdeutlichte die Unterschiede in den Eigenschaften zwischen Di- und Trihydroxygallensalzen:

TC-Na und CS-Na, beide Konjugate der Cholsäure, beeinflussten nur in Konzentrationen oberhalb ihrer CMC die parazelluläre Diffusion. Im Gegensatz zu den Trihydroxygallensalzen kann CDCA-Na die Zellmembran auch in niedrigen Konzentrationen unterhalb der CMC

überwinden und durch Interaktion mit Kalzium oder dem Aktin-Filament eine Öffnung der *tight junctions* bewirken.

Die Beeinflussung der Zellmembran durch Gallensalze wurde untersucht. Mit Hilfe eines fluoreszenzmarkierten Lipids (HDAF) konnte gezeigt werden, dass Gallensalze konzentrationsabhängig Lipide aus der Zellmembran herauslöslichen. Dazu muß das Gallensalz in Konzentrationen oberhalb der CMC vorliegen. Demzufolge hatten CS-Na und TC-Na in 1%iger die größten Effekte, CDCA-Na 0,1% konnte weniger Lipid aus der Membran entfernen, UDCA-Na zeigte keine Wirkung. Die Ergebnisse dieses Versuchs korrelierten nicht mit den Transportexperimenten. Eine Erleichterung der transzellulären Diffusion ist nur dann von Bedeutung, wenn die untersuchten Substanzen aufgrund ihrer Lipophilie durch Membranporen diffundieren können. Dies scheint bei den untersuchten Peptiden nicht der Fall zu sein.

Diese Ergebnisse zeigen, daß die untersuchten Gallensalze konzentrationsabhängig die parazelluläre Diffusion von Peptiden verbessern. Dabei wird folgendes Reihenfolge aufgestellt:

CDCA-Na >> TC-Na >> CS-Na >>>>> UDCA-Na

Dieselbe Reihenfolge wurde bereits nach den Transportexperimenten mit Octreotid und Desmopressin aufgestellt. Das Ausmaß der Transportverbesserung trat in den vorangegangenen Untersuchungen allerdings nicht so deutlich zu Tage. Insbesondere CS-Na zeigte dort nicht so große Effekte wie mit FITC-Dextran 4000.

An dieser Stelle kann festgestellt werden, daß *in-vitro* ein deutlicher Unterschied im Hinblick auf Transportverbesserung bei den Gallensalzen festzustellen ist. Des weiteren scheint die Beeinflussung des parazellulären Transportwegs der wesentliche Wirkmechanismus zu sein.

In Langmuir-Trog-Experimenten konnte gezeigt werden, daß sich Gallensalze in Lipidmonolayer einbauen. Interessant war, daß der Einbau von Octreotid in den Monolayer durch Vorinkubation mit Gallensalzen verstärkt wurde. Auch in den vorangegangenen Experimenten mit HDAF konnte dieser Synergismus beobachtet werden. Er könnte die stärkere Transportverbesserung durch TC-Na und CS-Na im Zellkulturmodell erklären.

Die Untersuchung des Einflusses der Gallensalze auf die Diffusion durch die Mucusschicht zeigte keine positiven Auswirkungen.

Cholylsarcosin ist aufgrund seiner geringeren systemischen Toxizität ein vielversprechender Resorptionsenhancer für Peptide. Cholylsarcosin wird nicht bakteriell abgebaut und dadurch nicht in die kochkanzerogene Desoxycholsäure umgewandelt.

Aufbauend auf die in dieser Arbeit präsentierten Ergebnisse sollte jetzt die Formulierung einer oralen Arzneiform mit Cholylsarcosin als Resorptionsenhancer und einem Peptid erfolgen. Interessant scheint hier die Herstellung einer direktverpressten Tablette aus lyophilisierten Peptid und Cholylsarcosin. In Einlagerungsversuchen sollte die Stabilität des Peptids in dieser Formulierung nachgewiesen werden. Weiterführend könnten mit dieser Formulierung Bioverfügbarkeitsstudien an Hunden durchgeführt werden.

## 5 ANHANG

*Bestimmung der LDH-Aktivität nach 30 min Inkubationszeit*

**Tabelle 0.1:**

| <b>Testlösungen</b> | <b>Toxizität [%]</b> | <b>s [%]</b> | <b>s<sub>rel</sub> [%]</b> | <b>n</b> |
|---------------------|----------------------|--------------|----------------------------|----------|
| HEPES B             | 1,67                 | 0,256        | 15,32                      | 24       |
| Triton X 100 0,1%   | 100                  | 0            | 0                          | 24       |
| CS-Na 1%            | 29,02                | 5,11         | 17,62                      | 12       |
| CS-Na 0,75%         | 16,45                | 2,46         | 14,94                      | 12       |
| CS-Na 0,5%          | 12,81                | 1,58         | 12,31                      | 12       |
| CS-Na 0,25%         | 6,25                 | 1,25         | 20,03                      | 12       |
| TC-Na 1%            | 56,07                | 11,13        | 19,85                      | 12       |
| TC-Na 0,75%         | 33,65                | 6,77         | 20,13                      | 12       |
| TC-Na 0,5%          | 11,44                | 0,58         | 5,04                       | 12       |
| TC-Na 0,25%         | 10,23                | 0,79         | 7,68                       | 12       |
| CDCA-Na 0,1%        | 42,17                | 6,65         | 15,76                      | 12       |
| CDCA-Na 0,05%       | 91,66                | 8,21         | 8,96                       | 12       |
| UDCA-Na 0,25%       | 1,63                 | 0,27         | 16,78                      | 9        |
| UDCA-Na 0,1%        | 4,97                 | 0,66         | 13,24                      | 9        |

*Bestimmung der LDH-Aktivität nach 60 min Inkubationszeit*

**Tabelle 0.2:**

| <b>Testlösungen</b> | <b>Toxizität [%]</b> | <b>s [%]</b> | <b>s<sub>rel</sub> [%]</b> | <b>n</b> |
|---------------------|----------------------|--------------|----------------------------|----------|
| HEPES B             | 1,39                 | 0,053        | 3,84                       | 24       |
| Triton X 100 0,1%   | 100                  | 0            | 0                          | 24       |
| CS-Na 1%            | 54,32                | 6,87         | 12,65                      | 12       |
| CS-Na 0,75%         | 29,64                | 6,36         | 21,47                      | 12       |
| CS-Na 0,5%          | 15,06                | 1,64         | 10,91                      | 12       |
| CS-Na 0,25%         | 7,21                 | 1,45         | 20,13                      | 12       |
| TC-Na 1%            | 33,47                | 5,13         | 15,32                      | 12       |
| TC-Na 0,75%         | 24,34                | 2,40         | 9,87                       | 12       |
| TC-Na 0,5%          | 7,31                 | 0,98         | 13,42                      | 12       |
| TC-Na 0,25%         | 9,35                 | 1,16         | 12,54                      | 12       |
| CDCA-Na 0,1%        | 19,92                | 2,85         | 14,32                      | 12       |
| CDCA-Na 0,05%       | 67,77                | 8,5          | 12,54                      | 12       |
| UDCA-Na 0,25%       | 7,42                 | 0,41         | 5,46                       | 9        |
| UDCA-Na 0,1%        | 25,87                | 1,66         | 6,43                       | 9        |

*Bestimmung der LDH-Aktivität nach 90 min Inkubationszeit***Tabelle 0.3:**

| Testlösungen      | Toxizität [%] | s [%] | s <sub>rel</sub> [%] | n  |
|-------------------|---------------|-------|----------------------|----|
| HEPES B           | 1,27          | 0,057 | 4,51                 | 24 |
| Triton X 100 0,1% | 100           | 0     | 0                    | 24 |
| CS-Na 1%          | 89,64         | 18,67 | 20,82                | 12 |
| CS-Na 0,75%       | 44,21         | 5,31  | 12,01                | 12 |
| CS-Na 0,5%        | 23,41         | 4,11  | 17,54                | 12 |
| CS-Na 0,25%       | 12,84         | 6,34  | 12,31                | 12 |
| TC-Na 1%          | 32,61         | 12,75 | 5,61                 | 12 |
| TC-Na 0,75%       | 28,73         | 10,87 | 7,89                 | 12 |
| TC-Na 0,5%        | 13,5          | 5,22  | 10,08                | 12 |
| TC-Na 0,25%       | 20,39         | 13,89 | 14,07                | 12 |
| CDCA-Na 0,1%      | 28,27         | 14,08 | 8,54                 | 12 |
| CDCA-Na 0,05%     | 83,43         | 32,28 | 17,62                | 12 |
| UDCA-Na 0,25%     | 11,31         | 11,05 | 20,01                | 9  |
| UDCA-Na 0,1%      | 71            | 26,72 | 14,32                | 9  |

*Bestimmung der LDH-Aktivität nach Inkubation mit CDCA-Na***Tabelle 0.4:**

| Testlösungen  | Aktivität [U/l] | s [U/l] | s <sub>rel</sub> [%] | n |
|---------------|-----------------|---------|----------------------|---|
| HEPES B       | 5278,71         | 263,94  | 5,35                 | 8 |
| CDCA-Na 1%    | 5193,98         | 330,86  | 6,37                 | 8 |
| CDCA-Na 0,75% | 5154,7          | 57,22   | 1,11                 | 4 |
| CDCA-Na 0,5%  | 5292,56         | 100,56  | 0,19                 | 4 |
| CDCA-Na 0,25% | 6714,08         | 171,21  | 2,55                 | 4 |
| CDCA-Na 0,1%  | 6249,87         | 143,12  | 2,29                 | 4 |
| CDCA-Na 0,05% | 6331,35         | 45,59   | 0,72                 | 4 |

*Bestimmung der Aktivität mitochondrialer Dehydrogenasen mittels WST-1 Assay***Tabelle 0.5:**

| Testlösungen      | Viabilität [%] | s [%] | s <sub>rel</sub> [%] | n  |
|-------------------|----------------|-------|----------------------|----|
| HEPES B           | 100            | 0     | 0                    | 18 |
| Triton X 100 0,1% | 14,7           | 2,9   | 19,72                | 18 |
| CS-Na 1%          | 70,12          | 13,71 | 19,55                | 18 |
| CS-Na 0,75%       | 92,86          | 20,3  | 21,86                | 18 |
| CS-Na 0,5%        | 101,13         | 7,40  | 7,32                 | 18 |
| CS-Na 0,25%       | 93,65          | 8,95  | 9,56                 | 18 |
| TC-Na 1%          | 41,12          | 8,47  | 20,6                 | 18 |
| TC-Na 0,75%       | 50,24          | 6,43  | 12,8                 | 18 |
| TC-Na 0,5%        | 94,11          | 10,2  | 10,84                | 18 |
| TC-Na 0,25%       | 80,3           | 13,89 | 17,3                 | 18 |
| CDCA-Na 1%        | 18,39          | 3,34  | 18,16                | 18 |
| CDCA-Na 0,75%     | 16,36          | 1,56  | 9,54                 | 18 |
| CDCA-Na 0,5%      | 17,88          | 2,86  | 16                   | 18 |
| CDCA-Na 0,25%     | 17,01          | 2,23  | 13,11                | 18 |
| CDCA-Na 0,1%      | 21,98          | 3,12  | 14,17                | 18 |
| CDCA-Na 0,05%     | 22,74          | 3,75  | 16,5                 | 18 |
| UDCA-Na 0,5%      | 59,6           | 12,11 | 20,32                | 18 |
| UDCA-Na 0,25%     | 87,47          | 3,8   | 4,35                 | 18 |
| UDCA-Na 0,1%      | 109,07         | 1,13  | 1,03                 | 3  |

*Durchgang von Octreotid***Tabelle 0.6:**

| t [min.] | Transport [%] | s [%] | s <sub>rel</sub> [%] | n  |
|----------|---------------|-------|----------------------|----|
| 15       | 0,53          | 0,19  | 35,5                 | 15 |
| 30       | 0,72          | 0,21  | 29,2                 | 15 |
| 45       | 0,95          | 0,13  | 13,7                 | 15 |
| 60       | 1,11          | 0,34  | 30,6                 | 15 |
| 75       | 1,35          | 0,45  | 33,3                 | 15 |
| 90       | 1,66          | 0,54  | 32,5                 | 15 |

*Durchgang von Octreotid in Anwesenheit von CS-Na 1%***Tabelle 0.7:**

| t [min.] | Transport [%] | s [%] | s <sub>rel</sub> [%] | n  |
|----------|---------------|-------|----------------------|----|
| 15       | 0,73          | 0,4   | 54,2                 | 15 |
| 30       | 1,34          | 0,92  | 68,3                 | 15 |
| 45       | 1,79          | 1,07  | 59,8                 | 15 |
| 60       | 2,55          | 1,59  | 62,5                 | 15 |
| 75       | 3,12          | 1,92  | 61,5                 | 15 |
| 90       | 3,74          | 2,15  | 57,5                 | 15 |

*Durchgang von Octreotid in Anwesenheit von CS-Na 0,5%*

**Tabelle 0.8**

| t [min.] | Transport [%] | s [%] | S <sub>rel</sub> [%] | n  |
|----------|---------------|-------|----------------------|----|
| 15       | 0,57          | 0,24  | 41,1                 | 15 |
| 30       | 0,66          | 0,28  | 42,2                 | 15 |
| 45       | 0,943         | 0,46  | 48,9                 | 15 |
| 60       | 1,33          | 0,66  | 49,6                 | 15 |
| 75       | 1,44          | 0,73  | 50,4                 | 15 |
| 90       | 1,53          | 0,83  | 54                   | 15 |

*Durchgang von Octreotid in Anwesenheit von TC-Na 0,5%*

**Tabelle 0.10**

| t [min.] | Transport [%] | s [%] | S <sub>rel</sub> [%] | n  |
|----------|---------------|-------|----------------------|----|
| 15       | 0,44          | 0,15  | 34,6                 | 15 |
| 30       | 0,61          | 0,25  | 40,4                 | 15 |
| 45       | 0,85          | 0,34  | 39,4                 | 15 |
| 60       | 1,01          | 0,55  | 54,3                 | 15 |
| 75       | 1,35          | 0,53  | 39,6                 | 15 |
| 90       | 1,53          | 0,59  | 38,9                 | 15 |

*Durchgang von Octreotid in Anwesenheit von CDCA-Na 0,05%*

**Tabelle 0.12**

| t [min.] | Transport [%] | s [%] | S <sub>rel</sub> [%] | n  |
|----------|---------------|-------|----------------------|----|
| 15       | 0,51          | 0,45  | 88,3                 | 15 |
| 30       | 0,56          | 0,14  | 24,6                 | 15 |
| 45       | 1,32          | 0,87  | 65,8                 | 15 |
| 60       | 1,87          | 1,12  | 59,7                 | 15 |
| 75       | 2,57          | 1,2   | 46,8                 | 15 |
| 90       | 3,46          | 1,74  | 50,4                 | 15 |

*Durchgang von Octreotid in Anwesenheit von TC-Na 1%*

**Tabelle 0.9**

| t [min.] | Transport [%] | s [%] | S <sub>rel</sub> [%] | n  |
|----------|---------------|-------|----------------------|----|
| 15       | 1,47          | 0,78  | 53,3                 | 15 |
| 30       | 2,51          | 0,89  | 35,3                 | 15 |
| 45       | 3,72          | 1,05  | 28,3                 | 15 |
| 60       | 4,64          | 1,21  | 25,9                 | 15 |
| 75       | 5,96          | 1,41  | 23,7                 | 15 |
| 90       | 7,56          | 1,36  | 18                   | 15 |

*Durchgang von Octreotid in Anwesenheit von CDCA-Na 0,1%*

**Tabelle 0.11**

| t [min.] | Transport [%] | s [%] | S <sub>rel</sub> [%] | n  |
|----------|---------------|-------|----------------------|----|
| 15       | 1,94          | 0,98  | 50,9                 | 15 |
| 30       | 3,63          | 1,85  | 50,9                 | 15 |
| 45       | 4,66          | 1,98  | 42,5                 | 15 |
| 60       | 6,13          | 2,82  | 37,2                 | 15 |
| 75       | 7,59          | 2,36  | 31,1                 | 15 |
| 90       | 9,07          | 2,89  | 31,9                 | 15 |

*Durchgang von Octreotid in Anwesenheit von UDCA-Na 0,25%*

**Tabelle 0.13**

| t [min.] | Transport [%] | s [%] | S <sub>rel</sub> [%] | n  |
|----------|---------------|-------|----------------------|----|
| 15       | 0,29          | 0,35  | 39,9                 | 15 |
| 30       | 1,23          | 0,45  | 36,6                 | 15 |
| 45       | 1,69          | 0,64  | 37,9                 | 15 |
| 60       | 1,94          | 0,91  | 46,9                 | 15 |
| 75       | 2,79          | 1,01  | 36,2                 | 15 |
| 90       | 3,57          | 1,23  | 34,5                 | 15 |



*Durchgang von Octreotid in Anwesenheit  
von UDCA-Na 0,1%*

**Tabelle 0.14**

| <b>t [min.]</b> | <b>Transport<br/>[%]</b> | <b>s<br/>[%]</b> | <b>s<sub>rel</sub><br/>[%]</b> | <b>n</b> |
|-----------------|--------------------------|------------------|--------------------------------|----------|
| 15              | 0,34                     | 0,12             | 35                             | 15       |
| 30              | 0,48                     | 0,28             | 57,6                           | 15       |
| 45              | 0,71                     | 0,38             | 53,7                           | 15       |
| 60              | 0,92                     | 0,49             | 53,5                           | 15       |
| 75              | 1,23                     | 0,64             | 51,6                           | 15       |
| 90              | 1,46                     | 0,84             | 57,5                           | 15       |

*Durchgang von Desmopressin*

**Tabelle 0.15:**

| <b>t [min.]</b> | <b>Transport<br/>[%]</b> | <b>s<br/>[%]</b> | <b>s<sub>rel</sub><br/>[%]</b> | <b>n</b> |
|-----------------|--------------------------|------------------|--------------------------------|----------|
| 15              | 1,51                     | 0,66             | 43,8                           | 15       |
| 30              | 2,34                     | 1,23             | 52,6                           | 15       |
| 45              | 3,15                     | 1,84             | 58,4                           | 15       |
| 60              | 3,69                     | 1,87             | 50,6                           | 15       |
| 75              | 4,19                     | 1,65             | 39,5                           | 15       |
| 90              | 4,96                     | 2,01             | 40,6                           | 15       |

*Durchgang von Desmopressin in  
Anwesenheit von CS-Na 1%*

**Tabelle 0.16:**

| <b>t [min.]</b> | <b>Transport<br/>[%]</b> | <b>s<br/>[%]</b> | <b>s<sub>rel</sub><br/>[%]</b> | <b>n</b> |
|-----------------|--------------------------|------------------|--------------------------------|----------|
| 15              | 1,47                     | 0,49             | 33,1                           | 15       |
| 30              | 2,35                     | 0,67             | 28,7                           | 15       |
| 45              | 3,39                     | 1,06             | 31,3                           | 15       |
| 60              | 4,16                     | 1,42             | 34,2                           | 15       |
| 75              | 4,98                     | 1,85             | 37,1                           | 15       |
| 90              | 5,67                     | 1,82             | 32,1                           | 15       |

*Durchgang von Desmopressin in Anwesenheit von CS-Na 0,5%*

**Tabelle 0.17**

| t [min.] | Transport [%] | s [%] | S <sub>rel</sub> [%] | n  |
|----------|---------------|-------|----------------------|----|
| 15       | 1,08          | 0,36  | 33,1                 | 15 |
| 30       | 1,64          | 0,61  | 37,5                 | 15 |
| 45       | 2,49          | 0,73  | 29,4                 | 15 |
| 60       | 2,86          | 0,94  | 32,9                 | 15 |
| 75       | 3,46          | 1,08  | 31,2                 | 15 |
| 90       | 4,02          | 1,11  | 27,7                 | 15 |

*Durchgang von Desmopressin in Anwesenheit von TC-Na 1%*

**Tabelle 0.18**

| t [min.] | Transport [%] | s [%] | S <sub>rel</sub> [%] | n  |
|----------|---------------|-------|----------------------|----|
| 15       | 2,59          | 1,13  | 43,5                 | 15 |
| 30       | 4,76          | 1,31  | 27,4                 | 15 |
| 45       | 6,64          | 2,12  | 31,9                 | 15 |
| 60       | 8,07          | 2,27  | 28,1                 | 15 |
| 75       | 9,95          | 3,37  | 33,9                 | 15 |
| 90       | 12,65         | 4,41  | 34,9                 | 15 |

*Durchgang von Desmopressin in Anwesenheit von TC-Na 0,5%*

**Tabelle 0.19**

| t [min.] | Transport [%] | s [%] | S <sub>rel</sub> [%] | n  |
|----------|---------------|-------|----------------------|----|
| 15       | 1,33          | 0,54  | 40,3                 | 15 |
| 30       | 1,99          | 0,65  | 32,7                 | 15 |
| 45       | 2,77          | 0,8   | 28,7                 | 15 |
| 60       | 3,45          | 1,22  | 35,4                 | 15 |
| 75       | 4,14          | 1,45  | 35                   | 15 |
| 90       | 4,82          | 2,04  | 42,4                 | 15 |

*Durchgang von Desmopressin in Anwesenheit von CDCA-Na 0,1%*

**Tabelle 0.20**

| t [min.] | Transport [%] | s [%] | S <sub>rel</sub> [%] | n  |
|----------|---------------|-------|----------------------|----|
| 15       | 6,26          | 4,13  | 66,1                 | 15 |
| 30       | 10,09         | 4,08  | 40,4                 | 15 |
| 45       | 14,52         | 6     | 41,4                 | 15 |
| 60       | 19            | 6,6   | 34,7                 | 15 |
| 75       | 24,15         | 7,88  | 32,6                 | 15 |
| 90       | 27,52         | 10,8  | 39,3                 | 15 |

*Durchgang von Desmopressin in Anwesenheit  
von CDCA-Na 0,05%*

**Tabelle 0.21**

| <b>t [min.]</b> | <b>Transport<br/>[%]</b> | <b>s<br/>[%]</b> | <b>S<sub>rel</sub><br/>[%]</b> | <b>n</b> |
|-----------------|--------------------------|------------------|--------------------------------|----------|
| 15              | 2,73                     | 0,97             | 35,4                           | 15       |
| 30              | 4,73                     | 2,89             | 60,9                           | 15       |
| 45              | 6,36                     | 3,6              | 56,5                           | 15       |
| 60              | 7,99                     | 3,99             | 49,9                           | 15       |
| 75              | 9,72                     | 4,18             | 43                             | 15       |
| 90              | 11,97                    | 5                | 45,2                           | 15       |

*Durchgang von Desmopressin in  
Anwesenheit von UDCA-Na 0,25%*

**Tabelle 0.22**

| <b>t [min.]</b> | <b>Transport<br/>[%]</b> | <b>s<br/>[%]</b> | <b>S<sub>rel</sub><br/>[%]</b> | <b>n</b> |
|-----------------|--------------------------|------------------|--------------------------------|----------|
| 15              | 2,83                     | 1,41             | 49,8                           | 15       |
| 30              | 3,83                     | 1,68             | 43,8                           | 15       |
| 45              | 4,85                     | 1,66             | 34,2                           | 15       |
| 60              | 6,56                     | 1,58             | 24,1                           | 15       |
| 75              | 7,7                      | 2,11             | 27,4                           | 15       |
| 90              | 8,82                     | 2,78             | 31,6                           | 15       |

*Durchgang von Desmopressin in Anwesenheit  
von UDCA-Na 0,1%*

**Tabelle 0.23**

| <b>t [min.]</b> | <b>Transport<br/>[%]</b> | <b>s<br/>[%]</b> | <b>S<sub>rel</sub><br/>[%]</b> | <b>n</b> |
|-----------------|--------------------------|------------------|--------------------------------|----------|
| 15              | 1,75                     | 0,52             | 29,6                           | 15       |
| 30              | 2,7                      | 0,49             | 18,2                           | 15       |
| 45              | 3,39                     | 0,56             | 16,6                           | 15       |
| 60              | 4,25                     | 0,68             | 16,0                           | 15       |
| 75              | 4,81                     | 0,81             | 16,8                           | 15       |
| 90              | 5,93                     | 1,15             | 19,4                           | 15       |

*TEER nach Inkubation mit HEPES B*

**Tabelle 0.24:**

| t [min.] | Widerstand s         |                      | S <sub>rel</sub> [%] | n |
|----------|----------------------|----------------------|----------------------|---|
|          | [Ω*cm <sup>2</sup> ] | [Ω*cm <sup>2</sup> ] |                      |   |
| 0        | 359,67               | 23,3                 | 6,5                  | 9 |
| 15       | 336,22               | 30,9                 | 9,2                  | 9 |
| 30       | 351,22               | 39,5                 | 11,2                 | 9 |
| 45       | 384,78               | 38,8                 | 10,1                 | 9 |
| 60       | 390,11               | 54,8                 | 14,1                 | 9 |
| 75       | 401,56               | 26,5                 | 6,6                  | 9 |

*TEER nach Inkubation CS-Na 1%*

**Tabelle 0.25:**

| t [min.] | Widerstand s         |                      | S <sub>rel</sub> [%] | n |
|----------|----------------------|----------------------|----------------------|---|
|          | [Ω*cm <sup>2</sup> ] | [Ω*cm <sup>2</sup> ] |                      |   |
| 0        | 322,67               | 19,1                 | 5,9                  | 3 |
| 15       | 230,33               | 8,4                  | 3,6                  | 3 |
| 30       | 204                  | 5,2                  | 2,6                  | 3 |
| 45       | 196,67               | 4,04                 | 2,1                  | 3 |
| 60       | 200                  | 9,9                  | 4,9                  | 3 |
| 75       | 190,33               | 7,57                 | 3,9                  | 3 |

*TEER nach Inkubation mit CS-Na 0,75%*

**Tabelle 0.26**

| t [min.] | Widerstand s         |                      | S <sub>rel</sub> [%] | n |
|----------|----------------------|----------------------|----------------------|---|
|          | [Ω*cm <sup>2</sup> ] | [Ω*cm <sup>2</sup> ] |                      |   |
| 0        | 362,67               | 41,2                 | 11,4                 | 3 |
| 15       | 275                  | 19,5                 | 7,1                  | 3 |
| 30       | 257                  | 20,1                 | 10,1                 | 3 |
| 45       | 260,33               | 25,6                 | 9,8                  | 3 |
| 60       | 257,33               | 16,3                 | 6,3                  | 3 |
| 75       | 258,33               | 32,1                 | 12,4                 | 3 |

*TEER nach Inkubation CS-Na 0,5%*

**Tabelle 0.27**

| t [min.] | Widerstand s         |                      | S <sub>rel</sub> [%] | n |
|----------|----------------------|----------------------|----------------------|---|
|          | [Ω*cm <sup>2</sup> ] | [Ω*cm <sup>2</sup> ] |                      |   |
| 0        | 346                  | 22,6                 | 6,5                  | 3 |
| 15       | 274                  | 9,54                 | 3,5                  | 3 |
| 30       | 256,67               | 11,5                 | 4,5                  | 3 |
| 45       | 268,67               | 9,02                 | 3,4                  | 3 |
| 60       | 282                  | 10,4                 | 3,7                  | 3 |
| 75       | 282,67               | 0,58                 | 0,2                  | 3 |

*TEER nach Inkubation mit CS-Na 0,25%*

**Tabelle 0.28**

| t [min.] | Widerstand s                  |                               | s <sub>rel</sub> [%] | n |
|----------|-------------------------------|-------------------------------|----------------------|---|
|          | [ $\Omega$ *cm <sup>2</sup> ] | [ $\Omega$ *cm <sup>2</sup> ] |                      |   |
| 0        | 386,33                        | 46,7                          | 12,1                 | 3 |
| 15       | 282,67                        | 21,1                          | 7,5                  | 3 |
| 30       | 280,33                        | 22,5                          | 8                    | 3 |
| 45       | 281,67                        | 33,9                          | 12,1                 | 3 |
| 60       | 278                           | 19,9                          | 7,2                  | 3 |
| 75       | 298,33                        | 14,6                          | 4,9                  | 3 |

*TEER nach Inkubation mit TC-Na 0,75%*

**Tabelle 0.30**

| t [min.] | Widerstand s                  |                               | s <sub>rel</sub> [%] | n |
|----------|-------------------------------|-------------------------------|----------------------|---|
|          | [ $\Omega$ *cm <sup>2</sup> ] | [ $\Omega$ *cm <sup>2</sup> ] |                      |   |
| 0        | 236,33                        | 4,04                          | 1,7                  | 3 |
| 15       | 202                           | 12,1                          | 6                    | 3 |
| 30       | 181                           | 7,55                          | 4,2                  | 3 |
| 45       | 182                           | 15,7                          | 8,6                  | 3 |
| 60       | 175                           | 5,29                          | 3,02                 | 3 |
| 75       | 186,67                        | 11,2                          | 6,02                 | 3 |

*TEER nach Inkubation TC-Na 1%*

**Tabelle 0.29**

| t [min.] | Widerstand s                  |                               | s <sub>rel</sub> [%] | n |
|----------|-------------------------------|-------------------------------|----------------------|---|
|          | [ $\Omega$ *cm <sup>2</sup> ] | [ $\Omega$ *cm <sup>2</sup> ] |                      |   |
| 0        | 269,33                        | 11,6                          | 4,3                  | 3 |
| 15       | 163,67                        | 5,69                          | 3,5                  | 3 |
| 30       | 157,67                        | 8,5                           | 5,4                  | 3 |
| 45       | 137                           | 5,57                          | 4,1                  | 3 |
| 60       | 144,67                        | 10,6                          | 7,3                  | 3 |
| 75       | 141,33                        | 4,93                          | 3,49                 | 3 |

*TEER nach Inkubation TC-Na 0,5%*

**Tabelle 0.31**

| t [min.] | Widerstand s                  |                               | s <sub>rel</sub> [%] | n |
|----------|-------------------------------|-------------------------------|----------------------|---|
|          | [ $\Omega$ *cm <sup>2</sup> ] | [ $\Omega$ *cm <sup>2</sup> ] |                      |   |
| 0        | 341                           | 39,3                          | 11,5                 | 3 |
| 15       | 297,33                        | 4,62                          | 1,56                 | 3 |
| 30       | 284,33                        | 28,7                          | 10,2                 | 3 |
| 45       | 305,33                        | 5,86                          | 1,9                  | 3 |
| 60       | 301                           | 36,6                          | 12,2                 | 3 |
| 75       | 309,67                        | 27                            | 8,73                 | 3 |

TEER nach Inkubation mit TC-Na 0,25%

**Tabelle 0.30**

| t [min.] | Widerstand s         |                      | s <sub>rel</sub> [%] | n |
|----------|----------------------|----------------------|----------------------|---|
|          | [Ω*cm <sup>2</sup> ] | [Ω*cm <sup>2</sup> ] |                      |   |
| 0        | 421                  | 58,4                 | 13,9                 | 3 |
| 15       | 328,33               | 42,8                 | 13                   | 3 |
| 30       | 335,33               | 39,5                 | 11,8                 | 3 |
| 45       | 352                  | 46,5                 | 13,2                 | 3 |
| 60       | 369,33               | 46,8                 | 12,7                 | 3 |
| 75       | 370,33               | 43,1                 | 11,6                 | 3 |

TEER nach Inkubation UDCA-Na 0,25%

**Tabelle 0.31**

| t [min.] | Widerstand s         |                      | s <sub>rel</sub> [%] | n |
|----------|----------------------|----------------------|----------------------|---|
|          | [Ω*cm <sup>2</sup> ] | [Ω*cm <sup>2</sup> ] |                      |   |
| 0        | 443                  | 14,7                 | 3,33                 | 3 |
| 15       | 411,33               | 5,69                 | 1,38                 | 3 |
| 30       | 382,67               | 6,11                 | 1,59                 | 3 |
| 45       | 373                  | 12,8                 | 3,4                  | 3 |
| 60       | 366                  | 4,36                 | 1,19                 | 3 |
| 75       | 334,33               | 6,66                 | 1,95                 | 3 |

TEER nach Inkubation mit UDCA-Na 0,1%

**Tabelle 0.32**

| t [min.] | Widerstand s         |                      | s <sub>rel</sub> [%] | n |
|----------|----------------------|----------------------|----------------------|---|
|          | [Ω*cm <sup>2</sup> ] | [Ω*cm <sup>2</sup> ] |                      |   |
| 0        | 455                  | 10,2                 | 2,23                 | 3 |
| 15       | 396,67               | 10,1                 | 2,55                 | 3 |
| 30       | 384                  | 12,2                 | 3,2                  | 3 |
| 45       | 382                  | 2,65                 | 0,69                 | 3 |
| 60       | 372                  | 7                    | 1,88                 | 3 |
| 75       | 339,67               | 12,4                 | 3,66                 | 3 |

TEER nach Inkubation CDCA-Na 0,1%

**Tabelle 0.33**

| t [min.] | Widerstand s         |                      | s <sub>rel</sub> [%] | n |
|----------|----------------------|----------------------|----------------------|---|
|          | [Ω*cm <sup>2</sup> ] | [Ω*cm <sup>2</sup> ] |                      |   |
| 0        | 289,67               | 13,3                 | 4,6                  | 3 |
| 15       | 173,67               | 10,9                 | 6,32                 | 3 |
| 30       | 150,33               | 9,61                 | 6,39                 | 3 |
| 45       | 146                  | 19,9                 | 6,39                 | 3 |
| 60       | 150,33               | 6,03                 | 4                    | 3 |
| 75       | 146,67               | 16,1                 | 10,9                 | 3 |

TEER nach Inkubation mit CDCA-Na 0,05%

**Tabelle 0.34**

| t [min.] | Widerstand s         |                      | s <sub>rel</sub> [%] | n |
|----------|----------------------|----------------------|----------------------|---|
|          | [Ω*cm <sup>2</sup> ] | [Ω*cm <sup>2</sup> ] |                      |   |
| 0        | 377,33               | 35,4                 | 9,39                 | 3 |
| 15       | 324,67               | 35,8                 | 11,0                 | 3 |
| 30       | 192,67               | 2,52                 | 1,31                 | 3 |
| 45       | 162,67               | 6,35                 | 3,9                  | 3 |
| 60       | 154,67               | 2,08                 | 1,35                 | 3 |
| 75       | 146,67               | 11                   | 7,5                  | 3 |

*Durchgang von FITC-Dextran 4000*

**Tabelle 0.35:**

| <b>t [min.]</b> | <b>Transport [%]</b> | <b>s [%]</b> | <b>S<sub>rel</sub> [%]</b> | <b>n</b> |
|-----------------|----------------------|--------------|----------------------------|----------|
| 15              | 0,01                 | 0,001        | 10,9                       | 15       |
| 30              | 0,02                 | 0,001        | 5,48                       | 15       |
| 45              | 0,022                | 0,001        | 4,45                       | 15       |
| 60              | 0,03                 | 0,011        | 36,5                       | 15       |
| 75              | 0,036                | 0,01         | 28,3                       | 15       |
| 90              | 0,04                 | 0,014        | 35,4                       | 15       |

*Durchgang von FITC-Dextran 4000 in Anwesenheit von TC-Na 1%*

**Tabelle 0.36:**

| <b>t [min.]</b> | <b>Transport [%]</b> | <b>s [%]</b> | <b>S<sub>rel</sub> [%]</b> | <b>n</b> |
|-----------------|----------------------|--------------|----------------------------|----------|
| 15              | 0,065                | 0,005        | 7,69                       | 9        |
| 30              | 0,125                | 0,005        | 4                          | 9        |
| 45              | 0,195                | 0,015        | 7,69                       | 9        |
| 60              | 0,255                | 0,015        | 5,88                       | 9        |
| 75              | 0,31                 | 0,02         | 6,45                       | 9        |
| 90              | 0,36                 | 0,02         | 5,56                       | 9        |

*Durchgang von FITC-Dextran 4000 in Anwesenheit von TC-Na 0,5%*

**Tabelle 0.35:**

| <b>t [min.]</b> | <b>Transport [%]</b> | <b>s [%]</b>              | <b>S<sub>rel</sub> [%]</b> | <b>n</b> |
|-----------------|----------------------|---------------------------|----------------------------|----------|
| 15              | 0,01                 | 1,6*<br>10 <sup>-10</sup> | 1,6*<br>10 <sup>-6</sup>   | 9        |
| 30              | 0,02                 | 3,2*<br>10 <sup>-10</sup> | 1,6*<br>10 <sup>-6</sup>   | 9        |
| 45              | 0,03                 | 4,6*<br>10 <sup>-10</sup> | 1,6*<br>10 <sup>-6</sup>   | 9        |
| 60              | 0,04                 | 6,6*<br>10 <sup>-10</sup> | 1,6*<br>10 <sup>-6</sup>   | 9        |
| 75              | 0,05                 | 0                         | 0                          | 9        |
| 90              | 0,06                 | 9,3*<br>10 <sup>-10</sup> | 1,6*<br>10 <sup>-6</sup>   | 9        |

*Durchgang von FITC-Dextran 4000  
In Anwesenheit von CS-Na 1%*

Tabelle 0.36:

| t [min.] | Transport [%] | s [%] | s <sub>rel</sub> [%] | n |
|----------|---------------|-------|----------------------|---|
| 15       | 0,035         | 0,005 | 14,3                 | 9 |
| 30       | 0,075         | 0,005 | 6,67                 | 9 |
| 45       | 0,115         | 0,005 | 4,35                 | 9 |
| 60       | 0,15          | 0,01  | 6,67                 | 9 |
| 75       | 0,18          | 0,01  | 5,56                 | 9 |
| 90       | 0,215         | 0,015 | 6,97                 | 9 |

*Durchgang von FITC-Dextran 4000  
In Anwesenheit von CDCA-Na 0,1%*

Tabelle 0.38:

| t [min.] | Transport [%] | s [%]                    | s <sub>rel</sub> [%]     | n |
|----------|---------------|--------------------------|--------------------------|---|
| 15       | 0,065         | 0,005                    | 7,69                     | 9 |
| 30       | 0,16          | 2,6*<br>10 <sup>-9</sup> | 1,6*<br>10 <sup>-6</sup> | 9 |
| 45       | 0,245         | 0,005                    | 2,04                     | 9 |
| 60       | 0,335         | 0,005                    | 1,49                     | 9 |
| 75       | 0,425         | 0,015                    | 3,53                     | 9 |
| 90       | 0,505         | 0,025                    | 4,95                     | 9 |

*Durchgang von FITC-Dextran 4000  
in Anwesenheit von CS-Na 0,5%*

Tabelle 0.37:

| t [min.] | Transport [%] | s [%]                     | s <sub>rel</sub> [%]     | n      |
|----------|---------------|---------------------------|--------------------------|--------|
| 15       | 0,005         | 0,001                     | 20                       | 9      |
| 30       | 0,015         | 0,005                     | 33,3                     | 9      |
| 45       | 0,02          | 3,2*<br>10 <sup>-10</sup> | 1,6*<br>10 <sup>-6</sup> | 9      |
| 60       | 0,03          | 4,6*<br>10 <sup>-10</sup> | 1,6*<br>10 <sup>-6</sup> | 9      |
| 75       | 0,035         | 0,005                     | 14,3                     | 9      |
| 90       | 0,04          | 6,6*<br>10 <sup>-10</sup> | 1,6*<br>10 <sup>-6</sup> | 1<br>5 |

*Durchgang von FITC-Dextran 4000  
in Anwesenheit von CDCA-Na 0,05%*

Tabelle 0.39:

| t [min] | Transport [%] | s [%] | s <sub>rel</sub> [%] | n |
|---------|---------------|-------|----------------------|---|
| 15      | 0,005         | 0,001 | 20                   | 9 |
| 30      | 0,02          | 0,01  | 50                   | 9 |
| 45      | 0,055         | 0,015 | 27,3                 | 9 |
| 60      | 0,105         | 0,015 | 14,3                 | 9 |
| 75      | 0,16          | 0,02  | 12,5                 | 9 |
| 90      | 0,22          | 0,02  | 9,09                 | 9 |



*Durchgang von FITC-Dextran 4000 in Anwesenheit von UDCA-Na 0,25%*

**Tabelle 0.40**

| <b>t [min.]</b> | <b>Transport [%]</b> | <b>s [%]</b>              | <b>s<sub>rel</sub> [%]</b> | <b>n</b> |
|-----------------|----------------------|---------------------------|----------------------------|----------|
| 15              | 0                    | 0                         | 0                          | 9        |
| 30              | 0                    | 0,01                      |                            | 9        |
| 45              | 0                    | 0,01                      | 0                          | 9        |
| 60              | 0,005                | 0,001                     | 20                         | 9        |
| 75              | 0,02                 | 0,01                      | 50                         | 9        |
| 90              | 0,04                 | 6,6*<br>10 <sup>-10</sup> | 1,6*<br>10 <sup>-6</sup>   | 9        |

*Bestimmung der HDAF-Fluoreszenz in den Zellen nach Lyse mit Hilfe von Triton X 100*

**Tabelle 0.41:**

| <b>Testlösungen</b>    | <b>Fluoreszenz [%]</b> | <b>s [%]</b> | <b>s<sub>rel</sub> [%]</b> | <b>n</b> |
|------------------------|------------------------|--------------|----------------------------|----------|
| HEPES B                | 100                    | 0            | 0                          | 45       |
| CS-Na 1%               | 20,12                  | 5,3          | 25,3                       | 45       |
| CS-Na 0,5%             | 40,86                  | 9,48         | 23,2                       | 45       |
| TC-Na 1%               | 21,92                  | 6,45         | 29,4                       | 45       |
| TC-Na 0,5%             | 43,98                  | 11,12        | 25,3                       | 45       |
| CDCA-Na 1%             | 9                      | 2,83         | 31,4                       | 45       |
| CDCA-Na 0,1%           | 35,27                  | 15,7         | 44,4                       | 45       |
| CDCA-Na 0,05%          | 71,03                  | 17,9         | 25,1                       | 45       |
| UDCA-Na 0,25%          | 90,83                  | 37,13        | 40,9                       | 45       |
| UDCA-Na 0,1%           | 97,64                  | 28,5         | 29,1                       | 45       |
| Octreotid              | 125,07                 | 6,47         | 5                          | 3        |
| Octreotid + CS-Na 1%   | 9,09                   | 0,34         | 3,74                       | 3        |
| Octreotid + CS-Na 0,5% | 52,57                  | 9,23         | 17,56                      | 3        |
| Octreotid + TC-Na 1%   | 6,87                   | 0,98         | 14,26                      | 3        |
| Octreotid + TC-Na 0,5% | 19,89                  | 3,45         | 17,34                      | 3        |
| Octreotid + FKS        | 63,66                  | 12,67        | 19,9                       | 3        |

*Prozentuale Oberflächenvergrößerung nach Inkubation mit Gallensalzen und Octreotid***Tabelle 0.42:**

| <b>Testlösungen</b>          | <b>Oberflächen-<br/>vergrößerung<br/>[%]</b> | <b>s [%]</b> | <b>S<sub>rel</sub><br/>[%]</b> | <b>n</b> |
|------------------------------|--|--------------|--------------------------------|----------|
| Octreotid 20 µMol            | 11,805                                       | 1,61         | 13,6                           | 4        |
| CS-Na 2 µMol                 | 2,33   | 0,54         | 23,2                           | 6        |
| Octreotid + CS-Na 2µMol      | 16,69  | 2,72         | 16,3                           | 6        |
| CS-Na 20 µMol                | 20,67  | 1,35         | 6,53                           | 5        |
| Octreotid + CS-Na<br>20 µMol | 17,66  | 1,43         | 8,1                            | 5        |
| TC-Na 2 µMol                 | 2,91   | 0,53         | 18,2                           | 6        |
| Octreotid + TC-Na 2µMol      | 16,54  | 4,79         | 28,96                          | 6        |
| TC-Na 20 µMol                | 13,22  | 1,76         | 13,31                          | 5        |
| Octreotid + TC-Na<br>20 µMol | 21,1   | 3,55         | 16,8                           | 5        |
| CDCA-Na 2 µMol               | 4,49   | 0,85         | 18,9                           | 8        |
| Octreotid + CDCA-Na 2µMol    | 20,65  | 8,59         | 41,6                           | 8        |
| UDCA-Na 2 µMol               | 0,54   | 0,27         | 50                             | 4        |
| Octreotid + CDCA-Na 2µMol    | 15,61  | 1,00         | 6,41                           | 4        |

## 6 LITERATURVERZEICHNIS

- [1] **Mutschler,E.** : Arzneimittelwirkungen, Lehrbuch der Pharmakologie und Toxikologie, Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH, Stuttgart, 6. Auflage, 1991
- [2] **Thews,G. ; Mutschler,E und Vaupel,P.:** Anatomie, Physiologie, Pathophysiologie des Menschen, Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH, Stuttgart, 4. Auflage, 1991
- [3] **Kearney,P. und Marriott,C.:** The effect of mucus glycoproteins on the bioavailability of tetracycline. III Everted Sac studies. In: *Int. J. Pharm.* 38 (1987), S. 211-220
- [4] **Smithson,K.W.;Millar, D.B.; Jacobs,L.R. und Gray,G.M.:** Intestinal diffusion barrier: unstirred water layer or membrane surface mucous coat? In: *Science* 214 (1981) S. 1241-1244
- [5] **Kramer,M. und Lauterbach,F.:** Intestinal Permeation. In: *Excerpta Medica*, 4 und 58 (1977), Amsterdam
- [6] **Ito,S.:** The entire surface coat on cat intestinal microvilli. In: *J. Cell Biol.* 27 (1965), S. 475-491
- [7] **Darnell,J.; Lodish,H. und Baltimore,D.:** Molecular Cell Biology, Scientific American Books, New York, 1986, S. 601
- [8] **Anderson,J.M.; Balda,M.S. und Fanning,A.S.:** The structure and regulation of tight junctions. In: *Curr. Op.in Cell Biol.* 5 (1993), S. 772-778
- [9] **Adson,A.; Raub,T.J.; Burton,P.S.; Barsuhn,C.L.; Hilgers,A.R.; Audus,K.L. und Ho,N.F.H.:** Quantitative approaches to delineate paracellular diffusion in cultured epithelial cell monolayers. In: *J. Pharm. Sci.* 83 (1994), S. 1529-1536
- [10] **Thiebaut,F.; Tsuru,T.; Hamada,H.; Gottesmann,M.M.; Pastan,I. und Willingham,M.C.:** Cellular localization of the multidrug-resistance gene product p-glycoprotein in normal human tissue. In: *Proc. Natl. Acad. Sci.* 84 (1987), S. 7735-7738
- [11] **Burton,P.S.; Goodwin,J.T.; Conradi,R.A.; Ho,N.F.H.und Hilgers,A.R.:** In vitro permeability of peptidomimetic drugs: the role of polarized efflux pathways as additional barriers to absorption. In: *Adv. Drug Delivery Rev.* 23 (1997), S. 143-156
- [12] **Gan,L.-S.L.und Thakker,D.R.:** Applications of the CaCo-2 model in the design and development of orally active drugs: elucidation of biochemical and physical barriers posed by the intestinal epithelium. In: *Adv. Drug Delivery Rev.* 23 (1997), S. 77-98
- [13] **Artursson,P.; Palm,K.und Luthmann,K.:** CaCo-2 monolayers in experimental and theoretical predicitions of drug transport. In: *Adv. Drug Delivery Rev.* 22 (1996), S. 67-84

- [14] **Pauletti,G.M.; Gangwar,S.; Knipp,G.T.; Nerurkar,M.M.; Okumu,F.W.; Tamura,K.; Siahaan,T.J. und Borchardt,R.T.:** Structural requirements for intestinal absorption of peptide drugs. In: *J. Controlled Release* 41 (1996), S. 3-17
- [15] **Burton,P.S.; Conradi,R.A. und Hilgers,A.R.:** (B) Mechanisms of peptide and protein absorption (2) Transcellular mechanism of peptide and protein absorption: passive aspects. In: *Adv. Drug Deliv. Rev.* 7 (1991), S. 365-386.
- [16] **Shen,W.-C.; Wan,J. und Ekrami,H.:** (C) Means to enhance penetration (3) enhancement of polypeptide and protein absorption by macromolecular carriers via endocytosis and transcytosis. In: *Adv. Drug Deliv. Rev.* 8 (1992), S. 93-113
- [17] **Nellans,H.N.:** (B) Mechanisms of peptide and protein absorption I Paracellular intestinal transport: modulation of absorption. In: *Adv. Drug Deliv. Rev.* 7 (1991), S. 339-364
- [18] **MacAdam, A.:** The effect of gastro-intestinal mucus on drug absorption. In: *Adv. Drug Deliv. Rev.* 11 (1993), S. 201-220
- [19] **Matthes,I.; Nimmerfall,F. und Sucker,H.:** Mucusmodelle zur Untersuchung von intestinalen Absorptionsmechanismen 2. Mitteilung: Mechanismen der Wechselwirkung von Wirkstoffen mit Intestinalmucus. In: *Pharmazie* 47 (1992), S. 609-613
- [20] **Camenisch,G.; Folkers,G. und Van de Waterbeemd,H.:** Comparison of passive drug transport through CaCo-2 cells and artificial membranes. In: *Int. J. Pharm.* 147 (1997), S. 61-70
- [21] **Dainty,J. und House,C.R.:** Unstirred layers in frog skin. In: *J. Physiol.* 182 (1966), S. 66-78
- [22] **Ho,N.F.H.; Park,J.Y.; Morozowich,W. und Higuchi,W.:** Physical model approach to the design of drugs with improved intestinal absorption. In: E.B. Roche (Ed.), Design of Biopharmaceutical Properties Through Prodrugs and Analogs, American Pharmaceutical Association, Academy of Pharmaceutical Sciences, Washington DC, S. 136-227
- [23] **Yalowsky,S.H. und Morozowich,W.:** A physical chemical basis of the design of orally active prodrugs. In: *Drug Design* 9 (1980), S. 122-185
- [24] **Barton,P.; Davis,A.M.; McCarthy,D.J. und Webborn,P.J.H.:** Drug-phospholipid interactions. 2. Predicting the sites of drug distribution using n-octanol/water and membrane/water distribution coefficients. In: *J. Pharm. Sci.* 86 (1997), S. 1034-1039
- [25] **Kanagalingam,K und Stause,E.:** Influence of lithocholic acid on 2-aminoanthracene-induced alterations in DNS synthesis in rat tissue in vivo. In: *Cancer Biochem. Biophys.* 4 (1980), S. 159-166

- [26] **Jones,M.N. und Chapman,D.:** Micelles, Monolayers, and Biomembranes, Wiley-Liss, New York, 1995
- [27] **Schindler,H.:** Formation of planar bilayers from artificial or native membrane vesicles. In: *FEBS Lett.* 122 (1980), S. 77-79
- [28] **Seelig,A.:** Local anaesthetics and pressure: a comparison of dibucaine binding to lipid monolayers and bilayers. In: *Biochim. Biophys. Acta* 899 (1987), S. 196-204
- [29] **Blume,A.:** A comparative study of the phase transitions of phospholipid bilayers and monolayers. In: *Biochim. Biophys. Acta* 557 (1979), S. 32-44
- [30] **Beschiaschvili, G. und Seelig, J.:** Peptide binding to lipid membranes. Spectroscopic studies on the insertion of a cyclic somatostatin analog into phospholipid bilayers. In: *Biochim. Biophys. Acta* 1061 (1991), S. 78-84
- [31] **Chantret,I.; Barbat,A.; Dussaulx,E.; Brattain,G. und Zweibaum,A.:** Epithelial polarity villin expression, and enterocytic differentiation of cultured human colon carcinoma cells: a survey of twenty cell lines. In: *Cancer Res.* 1 (1988), S. 1936-1942
- [32] **Brayden,D.J.:** Human intestinal cell monolayers as prescreens for oral drug absorption. *Pharm. News* 4 (1997), S. 11-15
- [33] **Quaroni,A. und Hochman,J.:** Development of intestinal cell culture models for drug transport and metabolism studies. In: *Adv. Drug Delivery Rev.* 22 (1996), S. 3-52
- [34] **Fogh,J.; Tiso,J. und Orfeo,T.:** Thirty-four lines of six human tumor categories established in nude mice. In: *J.Natl.Cancer Inst.* 64 (1980), S. 745-751
- [35] **Fogh,J.; Orfeo,T.; Sharkey,F.E.; Daniels,W.P. und Fogh,J.M.:** One hundred and twenty-seven cultured human tumor cell lines producing tumors in nude mice. In: *J.Natl.Cancer Inst.* 59 (1977), S. 221-226
- [36] **Arturrson,P.:** Cell cultures as models for drug absorption across the intestinal mucosa. In: *Crit. Rev. Ther. Drug Carrier Sys.* 8 (1991), S. 305-330
- [37] **Powell,D.W.:** Physiology of the Gastrointestinal Tract, second edition, 1987, Raven Press, New York, S. 1267-1305
- [38] **Hauri,H.P.; Sterchi,E.E.; Bienz,D.; Franzen,J.A.M. und Marxer,A.:** Expression and intracellular transport of microvillus membrane hydrolases in human intestinal cells. In: *J.Cell Biol.* 101 (1985), S. 838-851
- [39] **Rousset,M.; Laburthe,M.; Pinto,M.; Chevalier,G.; Ruoyer-Fessard,C.; Dussaulx,E.; Trugnan,G.; Boige,N.; Brun,J.L. und Zweibaum,A.:** Enterocytic differentiation and glucose utilization in the human colon tumor cell line CaCo-2: modulation by forskolin. In: *J.Cell Physiol.* 123 (1985), S. 377-385
- [40] **Howell,S.; Kenny,A.J. und Turner, A.J.:** A survey of membrane peptidases in two human colonic cell lines, CaCo-2 and HAT-29. In: *Biochem.J.* 284 (1992), S. 595-601

- [41] **Wilson,G.; Hassan,I.F.; Dix,C.J.; Williamson,I.; Shah,R.; Mackay,M. und Artursson,P.:** Transport and permeability properties of human CaCo-2 cells: An in-vitro model of the intestinal epithelial cell barrier. In: *J. Controlled Release* 11 (1990), S. 25-40
- [42] **Vachon,P.H. und Beaulieu,J.-F.:** Transient mosaic patterns of morphological and functional differentiation in the CaCo-2 cell line. In: *Gastroenterology* 103 (1992), S. 414-423
- [43] **Thwaites,D.T.; Hirst,B.H. und Simmons,N.L.:** Substrate specificity of the di/tripeptide transporter in human intestinal epithelia (CaCo-2): Identification of substrates that undergo H<sup>+</sup> coupled absorption. In: *Br.J.Pharmacol.* 113 (1994), S. 1050-1056
- [44] **Saito,H. und Inui,K.:** Dipeptide transporter in apical and basolateral membranes of the human intestinal cell line CaCo-2. In: *Am.J.Physiol.* 265 (1993), S. G289-G294
- [45] **Hidalgo,I.J. und Borchardt,R.T.:** Transport of a large neutral amino acid (phenylalanine) in a human intestinal epithelial cell line: CaCo-2. In: *Biochim. Biophys. Acta* 1028 (1990), S. 25-30
- [46] **Burton,P.S.; Conradi,R.A.; Hilgers,A.R. und Ho,N.F.H.:** Evidence for a polarized efflux system for peptides in the apical membrane of CaCo-2 cells. In: *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 190 (1993), S. 760-766
- [47] **Gutmann,H.; Fricker,G.; Török,M.; Michael,S.; Beglinger,C. und Drewe,J.:** Evidence for different ABS-transporters in CaCo-2 cells modulating drug uptake. In: *Pharm. Res.* 16 (1999), S. 402-407
- [48] **Hidalgo,I. und Li,J.:** Carrier-mediated transport and efflux mechanisms in CaCo-2 cells. In: *Adv. Drug Delivery Rev.* 22 (1996), S. 53-66
- [49] **Pinto,M.; Robine-Leon,S.; Appay,M.-D.; Kedinger,M.; Triadou,N.; Dussaulx,E.; Lacroix,B.; Simon-Assmann,P.; Haffen,K.; Fogh,J. und Zweibaum,A.:** Enterocyte-like differentiation and polarization of the human colon carcinoma cell line CaCo-2 in culture. In: *Biol. Cell* 47 (1983), S. 323-330
- [50] **Hidalgo,I.J.; Raub,T.J. und Borchardt,R.T.:** Characterization of the human colon carcinoma cell line (CaCo-2) as a model system for intestinal epithelial permeability. In: *Gastroenterology* 96 (1989), S.736-749
- [51] **Bailey,C.; Bryla,P. und Malick,A.W.:** The use of intestinal epithelial cell culture model, CaCo-2, in pharmaceutical development. In: *Adv. Drug Delivery Rev.* 22 (1996), S. 85-103
- [52] **Artursson,P. und Karlsson,J.:** Correlation between oral drug absorption in humans and apparent drug permeability coefficients in human intestinal epithelial (CaCo-2) cells. In: *Biochim. Biophys. Res. Commun.* 175 (1991) S. 880-885

- [53] **Artursson,P.:** Epithelial transport of drugs in cell culture. I: a model for studying the passive diffusion of drugs over intestinal absorptive (CaCo-2) cells. In: *J. Pharm. Sci.* 79 (1990), S. 476-482
- [54] **Stewart,B.H.; Chan,O.H.; Jezyk,N. und Fleisher,D.:** Discrimination between drug candidates using models for evaluation of intestinal absorption. In: *Adv. Drug Delivery Rev.* 23 (1997), S. 27-45
- [55] **Rubas,W.;Jezyk,N. und Grass,G.:** Comparison of the permeability characteristics of a human colonic epithelial (CaCo-2) cell line to colon of rabbit,monkey and dog intestine and human drug absorption. In: *Pharm. Res.* 10 (1993), S. 113-118
- [56] **Kim,D.-C.;Burton,P. und Borchardt,R.:** A correlation between the permeability characteristics of a series of peptides using an in-vitro cell culture model ( CaCo-2 ) and those using an in-situ perfused rat ileum model of the intestinal mucosa. In: *Pharm. Res.* 10 (1993), S. 1710-1714
- [57] **Artursson,P.; Ungell,A.-L. und Löfroth,J.-E.:** Selective paracellular permeability in two models of intestinal absorption: cultured monolayers of human intestinal epithelial cells and rat intestinal segments. In: *Pharm. Res.* 10 (1993), S. 1123-1129
- [58] **Yee,S.:** In-vitro permeability across CaCo-2 cells (colonic) can predict in vivo (small intestinal) absorption in man - fact or myth. In: *Pharm. Res.* 14 (1997), S. 763-766
- [59] **Lennernäs,H.:** Human intestinal permeability. In: *J. Pharm. Sci.* 87 (1998), S. 403-410
- [60] **Lennernäs,H.; Palm,K.; Fagerholm,U. und Artursson,P.:** Comparison between active and passive drug transport in human intestinal epithelial (CaCo-2) cells in-vitro and human jejunum in vivo. In: *Int. J. Pharm.* 127 (1996), S. 103-107
- [61] **Turner,N.C.; Martin,G.P. und Marriott,C.:** The influence of native porcine gastric mucus gel on hydrogenium ion diffusion: The effect of potentially ulcerogenic agents. In: *J. Pharm. Pharmacol.* 37 (1985), S. 776-780
- [62] **Cheema,M.S.; Marriott,C. und Beeson,M.F.:** In: Proc. 2<sup>nd</sup> Eur. Cong. Biopharm. Pharm. 1 (1984), S. 555-564
- [63] **Nimmerfall,F. und Rosenthaler,J.:** Significance of the goblet-cell mucin layer the outermost luminal barrier to passage through the gut wall. In: *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 94 (1980), S. 960-966
- [64] **Lennernäs,H.:** Human jejunal effective permeability and its correlation with preclinical drug absorption models. In: *J. Pharm. Pharmacol.* 49 (1997), S. 627-638
- [65] **Lee,V.H.L.; Yamamoto,A. und Bhaskar Kompella,U.:** Mucosal penetration enhancers for facilitation of peptide and protein drug absorption. In: *Crit. Rev. in Ther. Drug Carrier Sys.* 8 (1991), S. 91-192

- [66] **Helenius,A.; und Simons,K.:** Solubilization of membranes by detergents. In: *Biochim. Biophys. Acta* 415 (1975), S. 29-79
- [67] **Erlinger,S.:** Physiology of bile secretion and enterhepatic circulation. In: *Physiologie of the Gastrointestinal Tract*, 2<sup>nd</sup> edition, Johnson, L.R. (Ed.), Raven Press, New York, 1987
- [68] **Aigner,A. und Bauer,A.:** Gallensäuren, altbekannte Wirkstoffe mit Zukunft. In: *Med. Mo. Pharm.* 11 (1988), S. 369-375
- [69] **Buddecke,E.:** Grundriß der Biochemie,8.Auflage,de Gruyter, Berlin, 1989
- [70] **Shimada,K.; Bricknell,K.S. und Finegold,S.M.:** Deconjugation of bile acids by intestinal bacteria: review of literature and additional studies. In: *J. Infect. Dis.* 119 (1969), S. 273-281
- [71] **Carey,M.C. und Small,D.M.:** Micelle formation by bile salts. Physical, chemical and thermodynamic considerations. In: *Arch. Intern. Med.* 130 (1972), S. 506-527
- [72] **Aungst,B.J.:** Intestinal permeation enhancers. In: *J. Pharm. Sci.* 89 (2000), S. 429-442
- [73] **Roda,A.; Minutello,A.; Angelotti,M.A. und Fini,A.:** Bile acid structure-activity relationship: evaluation of bile acid lipophilicity using 1-octanol/water partition coefficient and reverse phase HPLC. In: *J. Lipid Res.* 31 (1990), S. 1433-1443
- [74] **Makino,S.; Reynolds,J. und Tanford,C.:** The binding of deoxycholate and triton x-100 to proteins. In: *J. Biol. Chem.* 248 (1973), S. 4926-4932
- [75] **Bermejo,M.V.; Perez-Varona,A.T.; Segura-Bono,M.J.; Martín-Villodre,A.; Plá-Delfina,J.M. und Garrigues,T.M.:** Compared effects of synthetic and natural bile acid surfactants on xenobiotic absorption I. Studies with polysorbate and taurocholate in rat colon .In: *Int. J. Pharm.* 69 (1991), S. 221-231
- [76] **Fricker,G.; Fahr,A.; Beglinger,C.; Kissel,T.; Reiter,G. und Drewe,J.:** Permeation enhancement of octreotide by specific bile salts in rats and human subjects: in-vitro, in vivo correlations. In: *Br. J. Pharmacol.* 117 (1996), S. 217-223
- [77] **Sakai,M.; Imai,T.; Ohtake,H.; Azuma,H. und Otagiri,M.:** Effects of absorption enhancers on the transport of model compounds in CaCo-2 monolayers: assessment by confocal laser scanning microscopy. In: *J. Pharm. Sci.* 86 (1997), S. 779-785
- [78] **Sakai,M.; Imai,T.; Ohtake,H.; Azuma,H. und Otagiri,M.:** Simultaneous use of sodium deoxycholate and dipotassium gycyrrhizinate enhances the cellular transport of poorly absorbed compounds across CaCo-2 monolayers. In: *J. Pharm. Pharmacol.* 51 (1999), S. 27-33
- [79] **Swenson,S.E.; Milisen,W.B. und Curatolo,W.:** Intestinal permeability enhancement: efficacy, acute local toxicity and reversibility. In: *Pharm. Res.* 11 (1994), S. 1132-1142



- [80] **Yamamoto,A.; Uchiyama,T.; Nishikawa,R.; Fujita,T. und Muranishi,S.:** Effectiveness and toxicity screening of various absorption enhancers in the rat small intestine:effects of absorption enhancers on the intestinal absorption of phenol red and the release of protein and phospholipids from the intestinal membrane. In: *J. Pharm. Pharmacol.* 48 (1996), S. 1285-1289
- [81] **Ziv,E.; Eldor,A.; Kleinman,Y.; Bar-On,H. und Kidron,M.:** Bile salts facilitate the absorption of heparin from the intestine. In: *Biochem. Pharmacol.* 32 (1983), S. 773-776
- [82] **Ziv,E.; Lior,O. und Kidron,M.:** Absorption of protein via the intestinal wall. A quantitative model. In: *Biochem. Pharmacol.* 36 (1987), S. 1035-1039
- [83] **Kimura,T.; Inui,K.-I. und Sezaki,H.:** Differences in effects on drug absorption between dihydroxy and trihydroxy bile salts. In: *J. Pharmacobio-Dyn.* 8 (1985), S. 578-585
- [84] **Mekhjian,H.S.; Phillips,S.F. und Hofmann,A.F.:** Colonic secretion of water and electrolytes induced by bile acids: Perfusion studies in man. In: *J. Clin. Invest.* 50 (1971), S. 1569-1577
- [85] **Freel,R.W.; Hatch,M.; Earnest,D.L. und Goldner,A.M.:** Role of tight-junctional pathways in bile salt-induced increases in colonic permeability. In: *Am. J. Physiol.* 245 (1983), S. G 816-G 823
- [86] **Chadwick,V.S.; Gaginella,T.S.; Carlson,G.L.; Debongnie,J.-C.; Phillips,S.F. und Hofmann,A.F.:** Effect of molecular structure on bile morphology in the perfused rabbit colon. In: *J. Lab. Clin. Med.* 94 (1979), S. 661-674
- [87] **Camilleri,M.; Murphy,R. und Chadwick,V.S.:** Dose-related effects of chenodeoxycholic acid in the rabbit colon. In: *Dig. Dis. Sci.* 25 (1980), S. 433-438
- [88] **Teem,M.V. und Phillips,S.F.:** Perfusion of the hamster jejunum with conjugated and unconjugated bile acids: inhibition of water absorption and effects on morphology. In: *Gastroenterology* 62 (1972), S. 261-267
- [89] **Saunders,D.R.; Hedges,J.R.; Sillery,J.; Esther,L.; Matsumura,K. und Rubin,C.E.:** Morphological and functional effects of bile salts on rat colon. In: *Gastroenterology* 68 (1975), S. 1236-1245
- [90] **Sladen,G.E. und Harries,J.T.:** Studies on the effects of unconjugated dihydroxy bile salts on rat small intestinal function in vivo. In: *Biochim. Biophys. Acta* 288 (1972), S. 443-456
- [91] **Kanagalingam,K. und Andrews,A.W.:** Inhibition of the mutagenicity of methylazoxymethanol acetate (MAMOAc) by lithocholic acid (LA). In: *Proc. Am. Soc. Clin. Oncol.* (1979)
- [92] **Latta,R.K.; Fiander,H.; Ross,N.W.; Simpson,C. und Schneider,H.:** Toxicity of bile acids to colon cancer cell lines. In: *Cancer Lett.* 70 (1993), S. 167-173

- [93] **Kandell,R.L. und Bernstein,C.:** Bile salt / acid induction of DNA damage in bacterial and mammalian cells: implications for colon cancer. In: *Nutr. Cancer* 16 (1991), S. 227-238
- [94] **Batta,A.K.; Salen,G.; Arora,R.; Shefer,S.; Batta,M. und Person,A.:** Side chain conjugation prevents bacterial 7-dehydroxylation of bile acids. In: *J. Biol. Chem.* 265 (1990), S. 10925-10928
- [95] **Lillienau,J.; Schteingart,C. und Hofmann,A.F.:** Physicochemical and physiological properties of cholylsarcosine a potential replacement detergent for bile acid deficiency states in the small intestine. In: *J. of Clin. Invest.* 89 (1992), S. 420-431
- [96] **Heumann,D.; Vlahcevic,Z.; Pandak,W.; Hylemon,P.; Kim,Y.; Lillienau,J. und Hofmann,A.F.:** Effect of cholylsarcosine on hepatic cholesterol and bile acid synthesis. In: *Gastroenterology* 103 (1992), S. 1641-1648
- [97] **Longmire-Cook,S.; Lillienau,J.; Kim,Y.; Schteingart,C.; Danzinger,R.; Esch,O. und Hofmann,A.F.:** Effect of replacement therapy with cholylsarcosine on fat malabsorption associated with severe bile acid malabsorption. In: *Dig. Dis. Sci.* 37 (1992), S. 1217-1227
- [98] **Schmassmann,A.; Fehr,H.F.; Locher,J.; Lillienau,J.; Schteingart,C.D.; Rossi,S.S. und Hofman,A.F.:** Cholylsarcosine, a new bile acid analogue: Metabolism and effect on biliary secretion in humans. In: *Gastroenterology* 104 (1993), S. 1171-1181
- [99] **Schmassmann,A.; Angellotti,M.; Ton-Nu,H.; Schteingart,C.; Marcus,S.; Rossi,S. und Hofmann,A.F.:** Transport, metabolism, and effect of chronic feeding of cholylsarcosine, a conjugated bile acid resistant to deconjugation and dehydroxylation. In: *Gastroenterology* 98 (1990), S. 163-174
- [100] **Bauer,W.; Briner,U.; Doepfner,W.; Haller,R.; Huguenin,R.; Marbach,P.; Petcher T. und Pless,J.:** SMS 201-995: A very potent and selective octapeptide analogue of somatostatin with prolonged action. In: *Life Sci.* 31 (1982), S. 1133-1140
- [101] **Fuessl,H.S.; Domin,J. und Bloom,S.R.:** Oral absorption of the somatostatin analogues SMS 201-995: theoretical and practical implications. In: *Clin. Sci.* 72 (1987), S. 255-257
- [102] **Köhler,E.; Duberow-Drewe,M.; Drewe,J.; Ribes,G.; Loubatières-Mariani,M.M.; Mazer,N.; Gyr,K. und Beglinger,C.:** Absorption of an aqueous solution of a new synthetic somatostatin analogue administered to man by gavage. In: *Eur. J. Clin. Pharmacol.* 33 (1987), S. 167-171
- [103] **Beschiaschvili,G. und Seelig,J.:** Peptide binding to lipid membranes. Spectroscopic studies on the insertion of a cyclic somatostatin analog into Phospholipid bilayers. In: *Biochim. Biophys. Acta* 1061 (1991), S. 78-84
- [104] **Zaoral,M.:** Vasopressin analogs with high and specific antidiuretic activity. In: *Int. J. Peptide Protein Res.* 25 (1985), S. 561-574

- [105] **Fjellestad-Paulsen,A.; Söderberg-Ahlm,C. und Lundin,S.:** Metabolism of vasopressin, oxytocin, and their analogues in the human gastrointestinal tract. In: *Peptides* 16 (1995), S. 1141-1147
- [106] **Andersson,K.-E. und Arner,B.:** Effects of DDAVP, a synthetic analogue of vasopressin, in patients with cranial diabetes insipidus. In: *Acta Med. Scand.* 192 (1972), S. 21-27
- [107] **Vilhardt,H.; Hammer,M. und Bie,P.:** Peroral administration of antidiuretic peptides to conscious dogs, normal humans and patients with diabetes insipidus. In: *Front. Horm. Res.* 13 (1985), S. 314-320
- [108] **Hillgren,K.M.; Kato, A. und Borchardt,R.T.:** In-vitro systems for studying intestinal drug absorption. In: *Med. Res. Rev.* 15 (1995), S. 83-109
- [109] **Ishiyama,M.; Shiga,M.; Sasamoto,K.; Mizoguchi,M. und He,P.:** A new sulfonated tetrazolium salt that produces a highly water-soluble formazan dye. In: *Chem. Pharm. Bull.* 41 (1993), S. 1118-1122SS.
- [110] **Ishiyama,M.; Tominaga,H.; Shiga,M.; Sasamoto,K.; Ohkura,Y.; Ueno,K. und Watanabe,M.:** In: *In-vitro Toxicol.* 8, (1995), S. 187-190
- [111] **Hurni,M.A.; Noach,A.B.J.; Blom-Roosemalen,M.C.M.; De Boer,A.G.; Nagelkerke,J.F. und Breimer,D.D.:** Permeability enhancement in CaCo-2 cell monolayers by sodium salicylate and sodium taurodihydrofusidate: assessment of effect-reversibility and imaging of transepithelial transport routes by confocal laser scanning microscopy. In: *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 26 (1993), S. 942-950
- [112] **Matthes,I.:** Ein Mucusdiffusionsmodell zur Erläuterung von intestinalen Absorptionsmechnismen, Dissertation, Basel, 198
- [113] **Blanchard,J.:** Principles and Perspectives in Drug Bioavailability, 1. Auflage,Karger Verlag, Basel, 1979
- [114] **Fini,A.; Roda,A.; Fugazza,R. und Grigolo,B.:** Chemical properties of bile acids: III. Bile acid structure and solubility in water. In: *J. Solution Chem.* 14 (1985), S. 595-603
- [115] **Jones,C.A.; Hofmann,A.F.; Mysels,K.J. und Roda,A.:** The effect of calcium and sodium ion concentration on the properties of dilute aqueous solutions of glycine conjugated bile salts: phase behaviour and solubility products of the calcium salts of the common glycine conjugated bile acids. In: *J. Colloid. Interface Sci.* 114 (1986), S. 452-470
- [116] **Hofman,A.F. und Mysels,K.J.:** Bile salts as biological surfactants. In: *Colloids and Surfaces* 30 (1988), S. 145-173
- [117] **Gaull,G.E. und Wright,C.E.:** Taurine conjugation of bile acids protects human cells in culture. In: *Adv. Exp. Med. Biol.* 217 (1987), S. 61-67

- [118] **Rahman,K. und Billington,D.:** Effect of chenodeoxychoate feeding upon the biliary output of plasma membrane enzymes in the rat. In: *Biochem. Pharmacol.* 33 (1984), S. 2231-22
- [119] **Werner,U.:** Dissertation: Modelle der nasalen und intestinalen Mukosa für Transport- und Metabolismusuntersuchungen, Marburg, 1995
- [120] **Ruetz,S. und Gros,P.:** Enhancement of Mdr2-mediated phosphatidylcholine translocation by the bile salt taurocholate. In: *J. Biol. Chem.* 270 (1995), S. 25388-25395
- [121] **Schölmerich,J.; Becher,M.-S.; Schmidt,K.; Schubert,R.; Kremer,B.; Feldhaus,S. und Gerok,W.:** Influence of hydroxylation and conjugation of bile salts on their membrane-damaging properties-studies on isolated hepytocytes and lipid membrane vesicles. In: *Hepatology* 4 (1984), S. 661-666
- [122] **Schiff,E.R.; Small,N.C. und Dietschy,J.M.:** Characterization of the kinetics of the passive and active transport mechanism for bile acid absorption in the small intestine and colon of the rat. In: *J. Clin. Invest.* 51 (1972), S. 1351-1362
- [123] **Munster,I.P.van; Tangerman,A.; De Haan,A.F.J. und Nagengast,F.M.:** A new method for the determination of the cytotoxicity of bile acids and aqueous phase of stool: the effect of calcium. In: *Eur. J. Clin. Invest.* 23 (1993), S. 773-777
- [124] **Anwer,M.S.; Engelking,L.R.; Nolan,K.; Sullivan,D.; Zimniak,P. und Lester,R.:** Hepatotoxic bile acids increase cytosolic Ca<sup>++</sup> activity of isolated rat hepatocytes. In: *Hepatology* 8 (1988), S. 887-891
- [125] **Vyvoda,O.S.; Coleman,R. und Holdsworth,G.:** Effects of different bile salts upon the composition and morphology of a liver plasma membrane preparation. Deoxycholate is more membrane damaging than cholate and ist conjugates. In: *Biochim. Biophys. Acta* 465 (1977), S. 68-76
- [126] **Sasaki,E.; Ohota,Y.; Ishiguro,I. und Shinohara,R.:** Cytotoxic effect of bile acids on isolated rat liver cells. In: *Jpn. J. Clin. Chem.* 16 (1987), S. 96-105
- [127] **Shefer,S.; Zaki,F.G. und Salen,G.:** Early morphologic and enzymatic changes in livers of rats treated with chenodeoxycholic and ursodeoxycholic acids. In: *Hepatology* 3 (1983), S. 201-208
- [128] **Nishimura,D.; Imoto,M. und Satake,T.:** Mechanism of liver mitochondrial dysfunction associated with bile duct obstruction. In: *Arzneimittel Forschung* 35 (1985), S. 1427-1430
- [129] **Sokol,R.J.; Devereaux,M.; Khandwala,R. und O'Brien,K.:** Evidence for involvement of oxygen free radicals in bile acid toxicity to isolated rat hepatocytes. In: *Hepatology* 17 (1993), S. 869-881
- [130] **Gaull,G.E. und Wright,C.E.:** Taurine conjugation of bile acids protects human cells in culture. In: *Adv. Exp. Med. Biol.* 217 (1987), S. 61-67

- [131] **Anderberg,E.K.; Nyström,C. und Artursson,P.:** Epithelial transport of drugs in cell culture. VII: Effects of pharmaceutical surfactant excipients and bile acids on transepithelial permeability in monolayers of human intestinal epithelial (CaCo-2). In: *J. Pharm. Sci.* 81 (1992), S. 879-887
- [132] **Haugland,R.P.:** Handbook of fluorescent probes and research chemicals, 6. Auflage Molecular Probes, 1996
- [133] **Madara,J.L.:** Intestinal absorptive cell tight junctions are linked to cytoskeleton. In: *Am. J. Physiol.* 253 (1987), S. C171-C175
- [134] **Madara,J.L.:** Tight junction dynamics: is paracellular transport regulated? In: *Cell* 53 (1988), S. 497-498
- [135] **Anderson,J.M.; Balda,M.S. und Fanning,A.S.:** The structure and regulation of tight junctions. In: *Curr. Opin. In. Cell Biol.* 5 (1993), S. 772-778
- [136] **Anderberg,E.K.; Nyström,C. und Artursson,P.:** Epithelial transport of drugs in cell culture. VII: Effects of pharmaceutical surfactant excipients and bile acids on transepithelial permeability in monolayers of human intestinal epithelial (CaCo-2). In: *J. Pharm. Sci.* 81 (1992), S. 879-887
- [137] **Lundin, S. und Artursson, P.:** Absorption of a vasopressin (dDAVP), in a human intestinal epithelial cell line, CaCo-2. In: *Int. J. Pharm.* 64 (1990), S. 181-186
- [138] **Vilhardt,H. und Lundin,S.:** In-vitro intestinal transport of vasopressin and its analogues. In: *Acta Physiol. Scand.* 126 (1986), S. 601-607
- [139] **Fricker,G.; Drewe,J.; Vonderscher,J.; Kissel,T. und Beglinger,C.:** Enteral absorption of octreotide. In: *Br. J. Pharmacol.* 105 (1992), S. 783-786
- [140] **Freel,R.W.; Hatch,M.; Earnest,D.L. und Goldner,A.M.:** Dihydroxy bile salt-induced alterations in NaCl transport across the rabbit colon. In: *Am. J. Physiol.* 245 (1983), S. G808-G815
- [141] **Dragsten,P.R.; Blumenthal,R. und Handler,S.:** Membran asymmetry in epithelia: is the tight junction a barrier to diffusion in the plasma membrane? In: *Nature* 294 (1981), S. 718-722.
- [142] **Beschiaschvili,G. und Seelig,J.:** Peptid binding to lipid bilayers. Nonclassical hydrophobic effect and membrane-induced pK shifts. In: *Biochemistry* 31 (1992), S. 10044-10053.
- [143] **Seelig,J.; Nebel,S.; Ganz,P. und Bruns,C.:** Electrostatic and nonpolar peptide-membrane interactions. Lipid binding and functional properties of somatostatin analogues of charge  $z=+1$  to  $z=+3$ . In: *Biochemistry* 32 (1993), S. 9714-9721.
- [144] **Amador,E.; Dorfman,L.E. und Wacker,W.E.C.:** Serum lactic dehydrogenase activity: an analytical assessment of current assays. In: *Clin. Chem.* 9 (1963), S. 391-399

- [145] **Bangham,J.A. und Lea,E.J.A.:** The interaction of detergents with bilayer lipid membranes. In: *Biochim. Biophys. Acta* 511 (1978), S. 388-396
- [146] **Schubert,R. und Schmidt,K.H.:** Structural changes in vesicle membranes and mixed micelles of various lipid compositions after binding of different bile salts. In: *Biochemistry* 27 (1988), S. 8787-8794
- [147] **Ahlers,M et al.:** Spezifische Wechselwirkungen von Proteinen mit funktionellen Lipidmonoschichten - Wege zur Simulation von Biomembranprozessen. In: *Angew. Chemie* 102 (1990), S. 1310-1327
- [148] **Pink, D.A.:** Theoretical studies of phospholipid bilayers and monolayers. Perturbing probes, monolayer phase transitions, and computer simulations of lipid-protein bilayers. In: *Can. J. Biochem. Cell Biol.* 62 (1984), S. 760-770
- [149] **Fricker,G.; Bruns,C.; Munzer,J.; Briner,U.; Albert,R.; Kissel,T. und Vonderscher,J.:** Intestinal absorption of the octapeptide SMS 201-995 visualized by fluorescence derivatization. In: *Gastroenterology* 100 (1991), S. 1544-1552
- [150] **Fahey,D.A.; Carey,M.C. und Donovan,J.M.:** Bile acid/phosphatidylcholine interactions in mixed monomolecular layers: differences in condensation effects but not interfacial orientation between hydrophobic and hydrophilic bile acid species. In: *Biochemistry* 34 (1995), S. 10886-10897
- [151] **Muranishi, S.:** Absorption enhancers. In: *Crit. Rev. in Ther. Drug Carrier Sys.* 7 (1990), S. 1-33
- [152] **Murakami,M; Masuda,Y.; Fukui,H.; Yoshikawa,H.; Takada,K. und Muranishi,S.:** Role of the dispersion systems containing fusogenic lipids on enhanced absorption of poorly absorbable drugs from the gastrointestinal tract. In: *J. Pharmacobio-Dyn.* 8 (1985), S. 49
- [153] **Dietschy,J.M.:** Mechanism of bile salt and fatty acid absorption across the unstirred water layer and brush border of the intestine. In: *Helv. Med. Acta* 37 (1973), S. 89-102
- [154] **Halbrook,P.A.:** Biological barriers to the nasal delivery of peptide drugs. PhD Thesis, University of Aston, Birmingham
- [155] **Martin,G.P.; Marriott,C. und Kellaway,I.W.:** Direct effect of bile salt and phospholipids on the physical properties of mucus. In: *Gut* 19 (1978), S. 103
- [156] **Martin,G.P.; Marriott,C. und Kellaway,I.W.:** The effect of natural surfactants on the rheological properties of mucus. In: *J. Pharm. Pharmacol.* 28 (1976), S. 76P

- [157] **Bermejo,M.V.; Pérez-Varona,A.T.; Segura-Bono,M.J.; Martín-Villodre,A.; Plá-Delfina,J.M. und Garrigues,T.M.:** Compared effects of synthetic and natural bile Acid surfactants on xenobiotic absorption. I. Studies with polysorbate and taurocholate in rat colon. In: *Int. J. Pharm.* 69 (1991), S. 221-231
- [158] **Poelma,F.G.J.; Tukker,J.J. und Crommelin,D.J.A.:** Intestinal absorptions of drugs.I. The influence of taurocholate on the absorption of dantrolene in the small intestine of the rat. In: *J. Pharm. Sci.* 78 (1989), S. 285-289
- [159] **Ilan,E.; Amselem,S.; Weisspapier,M.; Schwarz,J.; Yogev,A.; Zawoznik,E. und Friedman,D.:** Improved oral delivery of desmopressin via a novel vehicle: muvoadhesive submicron emulsion. In: *Pharm. Res.* 13 (1996), S. 1083-1087