MECHANISMEN UND STEREOSELEKTIVITÄT DER OFLOXACINPERMEATION DURCH CACO-2/TC7 MONOLAYER

DISSERTATION

der Fakultät für Chemie und Pharmazie
der Eberhard Karls Universität Tübingen

zur Erlangung des Grades eines Doktors
der Naturwissenschaften

2009

vorgelegt von

Cornelia Witt

Tag der mündlichen Prüfung	24. April 2009
Dekan	Prof. Dr. L. Wesemann
1. Berichterstatter	Prof. Dr. M. A. Wahl
2. Berichterstatter	Prof. Dr. R. Daniels

Die vorliegende Arbeit entstand unter der Anleitung von

Herrn Prof. Dr. Martin A. Wahl

am Lehrstuhl für Pharmazeutische Technologie und Biopharmazie der Eberhard Karls Universität Tübingen.

Für das Gelingen dieser Doktorarbeit standen mir viele Menschen hilfreich zur Seite, die ich an dieser Stelle erwähnen möchte. Besonders möchte ich mich bei meinem Doktorvater Prof. Dr. Martin A. Wahl bedanken für die Überlassung des interessanten und herausfordernden Themas, für zahlreiche hilfreiche Diskussionen und wertvolle Ratschläge und das freundschaftliche Verhältnis, das mich gerade in schwierigen Phasen durchhalten ließ. Auch für die Möglichkeit der Teilnahme an internationalen Kongressen und Workshops möchte ich mich herzlich bedanken.

Herrn Prof. Dr. Rolf Daniels danke ich für das angenehme Arbeitsklima am Lehrstuhl, die Möglichkeit der Teilnahme an der Weiterbildung zum Fachapotheker für Pharmazeutische Technologie sowie die Erstellung des Zweitgutachtens.

Die Caco-2/TC7 Zellen wurden freundlicherweise von Herrn Prof. Dr. K.-W. Bock, Toxikologisches Institut, Eberhard Karls Universität zur Verfügung gestellt. Dafür bedanke ich mich herzlich.

Jutta Walk sowie Martina Brenn möchte ich für die gute Zusammenarbeit und gegenseitige Unterstützung im Rahmen der Zellkultur bedanken.

Bei Klaus Weyhing, Roland Walker, Renate Beer und Dagmar Thumm bedanke ich mich für ihre Hilfestellung bei der Bewältigung zahlreicher technischer sowie administrativer Probleme.

Meine Kolleginnen und Kollegen im Arbeitskreis sind meine Freunde geworden und ich danke allen für die unvergessliche Zeit am Institut aber auch außerhalb. Neben zahlreichen fachlichen Diskussionen stand immer der Spaß an der Arbeit im Vordergrund. Die gemeinsam verbrachte Zeit im Kaffeeraum half über so manchen Tiefpunkt hinweg und führte dazu, dass ich mich auch in Zukunft sehr gerne an diesen Lebensabschnitt zurückerinnern werde.

Meinem Freund Nico Kohler danke ich für die Unterstützung und Geduld während der letzten Jahre. Er hat mich stets bestärkt und mir Mut gemacht, so dass manche Probleme plötzlich nicht mehr so gross waren, wie sie ursprünglich zu sein schienen.

Ganz besonders danken möchte ich meinen Eltern und meiner Familie, die mich in meiner gesamten schulischen und akademischen Ausbildung immer liebevoll unterstützten und in allen Lagen mitfieberten.

Meiner Familie

Teile dieser Arbeit wurden bereits veröffentlicht beziehungsweise vorgestellt:

Witt, C. und Wahl, M. A.
Mechanism and stereoselectivity of ofloxacin permeation through Caco-2/TC7 monolayers
Poster, 6th World Meeting on Pharmaceutics, Biopharmaceutics and Pharmaceutical Technology, 7.-10. April 2008, Barcelona

Witt, C. und Wahl, M. A.
Stereoselectivity of ofloxacin transport and characterization of the mechanism in Caco-2 cells
Poster, DPhG Jahrestagung, 8.-11. Oktober 2008, Bonn

Witt, C. und Wahl, M. A.
Mechanism and stereoselectivity of ofloxacin transport through Caco-2/TC7 monolayers
Poster, AAPS Annual Meeting and Exposition, 16.-20. November 2008, Atlanta

INHALTSVERZEICHNIS

1 Einleitung und Zielsetzung 1

1.1 Einleitung 1

1.2 Modelle zur Ermittlung der intestinalen Permeabilität 2

1.2.1 In vivo Modelle 2

1.2.2 In situ Modelle 3

1.2.3 In vitro Modelle 3

1.2.4 Charakterisierung der Caco-2 Zelllinie 4

1.2.4.1 Parentale Caco-2 Zellen 4

1.2.4.2 Der Subklon TC7 6

1.2.5 Weitere epitheliale Zellkulturmodelle 7

1.3 Epitheliale Transportmechanismen 7

1.3.1 Parazellulärer Transport 8

1.3.2 Transzellulärer Transport 9

1.3.2.1 Passive Diffusion 9

1.3.2.2 Erleichterte Diffusion 10

1.3.2.3 Aktiver Transport 11

1.3.2.4 Endocytose 12

1.3.3 Transporterfamilien 12

1.3.3.1 ABC-Transporter 12

1.3.3.2 SLC-Transporter 15

1.4 Ofloxacin 17

1.4.1 Allgemeines 17

1.4.2 Physikalisch-chemische Eigenschaften 18

1.4.3 Pharmakokinetische Eigenschaften 18

1.5 Zielsetzung 21

2 Material 23

2.1 Zellkultur 23

2.2 Material und Geräte für die Zellkultur 23

2.3 Chemikalien und Lösungsmittel 24

2.4 Kapillarelektrophorese – apparativer Aufbau 25

2.5 Datenverarbeitung 26

2.5.1 Hardware 26

2.5.2 Software 26

3 Methoden 27
3.1 Methoden der Zellkultur 27
3.1.1 Allgemeine Kultivierung der Caco-2/TC7 Zellen 27
3.1.2 Durchführung der Permeationsstudien 28
3.1.2.1 Transwell-Filterkammersyteme 28
3.1.2.2 Bestimmung des transepithelialen elektrischen Widerstandes 29
3.1.2.3 Transportpuffer 30
3.1.2.4 Permeationsstudien 31
3.1.2.5 Überprüfung der Integrität mit Fluorescein-Natrium 32
3.1.2.6 Berechnung des apparenten Permeationskoeffizienten (P_{app}) 33
3.1.3 Untersuchung der Arzneistoffaufnahme in die Zellen 33
3.1.3.1 Durchführung der Uptake-Experimente 33
3.1.3.2 Proteinbestimmung mit der Methode nach Lowry 34
3.1.3.3 Auswertung der Uptake-Experimente 35
3.2 Untersuchungen am Cytoskelett 35
3.2.1 Aufbau des Cytoskeletts 36
3.2.2 Möglichkeiten der Hemmung 37
3.2.3 Visualisierung der Mikrotubuli mit Immunfluoreszenz 38
3.2.4 Ergebnisse der Hemmung der Mikrotubuli 40
3.3 Analytische Methoden 42
3.3.1 Validierung der analytischen Methoden 42
3.3.2 Bestimmung der Ofloxacin-Enantiomere mittels Kapillarelektrophorese 44
3.3.2.1 Probenaufbereitung 44
3.3.2.2 Trennpuffer 45
3.3.2.3 Einbau und Konditionierung der Kapillare 45
3.3.2.4 Trennparameter 46
3.3.2.5 Kalibrierung 47
3.3.3 Analytische Methode zur Bestimmung von Rhodamin 123 49
3.4 Statistische Methoden 50

4 Ergebnisse 51
4.1 Einleitung 51
4.2 Permeationsstudien mit Ofloxacin und Rhodamin 123 52

4.2.1 Konzentrationsabhängigkeit des Ofloxacintransports 52
4.2.2 Einfluss verschiedener P-Glycoprotein-Inhibitoren..... 54
4.2.2.1 Einfluss auf die Permeation von Ofloxacin 54
4.2.2.2 Einfluss auf die Permeation von Rhodamin 123 56
4.2.2.3 Bewertung der Ergebnisse..... 57
4.2.3 Untersuchung der Energieabhängigkeit 58
4.2.3.1 Energieabhängigkeit des Ofloxacintransports..... 59
4.2.3.2 Energieabhängigkeit des Rhodamin 123-Transports 60
4.2.3.3 Bewertung der Ergebnisse..... 61
4.2.4 Einfluss von Ofloxacin auf die Permeation von Rhodamin 123..... 62
4.2.5 Einfluss von Probenecid auf den Ofloxacintransport..... 63
4.2.6 Einfluss von Naringin auf den Ofloxacintransport..... 65
4.3 Ergebnisse der Uptake-Experimente 66
4.3.1 Untersuchung der Rhodamin-Aufnahme..... 66
4.3.2 Untersuchung der Ofloxacin-Aufnahme 67
4.3.3 Bewertung der Uptake-Experimente 69

5 Diskussion 70

6 Zusammenfassung 77

7 Literaturverzeichnis 82

8 Anhang 94
8.1 Analytik Ofloxacin..... 94
8.2 Analytik Rhodamin 123 97
8.3 Geräte und Verbrauchsmaterialien 99
8.4 Immunchemisches Färbeprotokoll 102
8.5 Firmenverzeichnis..... 103

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

ABC	ATP-binding Cassette
ANOVA	Analysis of variance
AP	apikal
ATP	Adenosintriphosphat
AUC	Area under the curve
BCRP	Breast cancer resistance protein
BCS	Biopharmaceutics Classification System
BL	basolateral
BSA	Bovine Serum Albumin
CYP	Cytochrom P450
DABCO	1,4-Diazabizyclo-[2.2.2]-octan
DAPI	4',6-Diamidino-2-phenylindol-dihydrochlorid
d. h.	das heißt
DMSO	Dimethylsulfoxid
D-PBS	Dulbecco's Phosphate Buffered Saline
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
et al.	et alii
FDA	Food and Drug Administration
FKS	Fötales Kälberserum
ICH	International Conference on Harmonization
IgG	Immunglobulin G
INSERM	Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale
MCT	Monocarboxylat-Transporter
MDR	Multi drug resistance
MRP	Multidrug resistance associated protein
$NADH_2$	Nicotinsäureamid-Adenin-Dinucleotid
ns	nicht signifikant
NSAID	Not steroidal antiinflammatory drug
OAT	Organic anion transporter
OATP	Organic anion-transporting polypeptide
OCT	Organic cation transporter
P_{app}	apparenter Permeationskoeffizient
p. a.	pro analysi

PFA	Paraformaldehyd
P-gp	P-Glycoprotein
r^2	Bestimmtheitsmaß
RFC	Reduced folat carrier
rpm	rounds per minute
SD	Standard deviation (Standardabweichung)
SLC	Solute carrier
TEER	Transepithelialer elektrischer Widerstand
UV	ultravioletter Bereich des Spektrums
VB	Vertrauensbereich
z. B.	zum Beispiel
ZNS	Zentrales Nervensystem

Besondere Hinweise

Die Fehlerbalken in den Abbildungen geben die Standardabweichungen des Mittelwerts an. Unterschiedliche Buchstaben in den Diagrammen kennzeichnen unterschiedliche Signifikanzniveaus.

Gesetzlich geschützte Warenzeichen werden ohne besondere Kennzeichnung verwendet.

1 EINLEITUNG UND ZIELSETZUNG

1.1 EINLEITUNG

Neue wissenschaftliche Methoden im Bereich der molekularen Biologie verbessern das Verständnis über den Verlauf von Krankheiten und decken eine Vielzahl neuer Zielstrukturen zur Behandlung von Krankheiten auf. Mit Hilfe des Computer-Aided Drug Designs, der kombinatorischen Chemie und High-Throughput-Screenings gelingt es der Wirkstoffentwicklung, eine Vielzahl neuer Leitstrukturen und folglich zahlreiche neue Wirkstoffkandidaten zu kreieren. Wirkstoffe, die so entwickelt werden, sind zunächst nur Liganden mit hoher Rezeptoraffinität. Mit entscheidend für den therapeutischen Erfolg eines solchen Wirkstoffkandidaten ist allerdings seine Bioverfügbarkeit, d. h. der Anteil des Arzneistoffes, der nach Applikation am Wirkort zur Verfügung steht.

Der einfachste und beliebteste Weg, ein Arzneimittel anzuwenden, ist nach wie vor die perorale Applikation. Voraussetzung einer peroralen Verabreichung ist neben einer ausreichenden Löslichkeit in wässrigen Medien, eine gute intestinale Permeabilität. Der Einsatz von in vitro Testsystemen ermöglicht die Untersuchung der intestinalen Permeabilität an humanen Zellen in einer sehr frühen Phase der Arzneistoffentwicklung. Im Gegensatz zu den in vivo Testungen mit Hilfe von Tierversuchen oder klinischen Studien muss die Pharmakologie und Toxikologie des Wirkstoffes noch nicht aufgeklärt sein. Außerdem reichen minimale Mengen des Stoffes aus, um eine Aussage über die Permeabilität zu treffen.

Eines der bekanntesten in vitro Modelle zur Untersuchung intestinaler Absorptionsmechanismen ist die aus einem humanen Colon Adenokarzinom abgeleitete Caco-2 Zelllinie. Durch ihren verbreiteten Einsatz ist sie mittlerweile sehr gut charakterisiert (Hidalgo et al., 1989). Die aus Caco-2 Studien erhaltenen Absorptionskinetiken zeigen eine gute Korrelation zu den aus klinischen Studien am Menschen erhaltenen Profilen (Polli und Ginski, 1998). Etabliert wurde die Caco-2 Zelllinie durch die Einführung des biopharmazeutischen Klassifizierungssystems (Biopharmaceutics Classification System; BCS) der amerikanische Food and Drug Administration (FDA) (FDA Guidance for Industry, 2000). Die Industrierichtlinie teilt pharmazeutische Wirkstoffe aus schnell freisetzenden, festen, peroral verabreichten Formulierungen anhand ihrer Löslichkeit sowie ihrer Permeabilität über die Darmschleimhaut, die

anhand geeigneter in vitro Modelle, beispielsweise mit Permeabilitätsuntersuchungen an Caco-2 Zellen, ermittelt werden kann, in vier Klassen ein (Amidon et al., 1995). Unter der Voraussetzung einer guten Löslichkeit und einer ausreichenden Permeabilität darf ein sogenannter Biowaiver beantragt werden, d. h. auf eine aufwändige klinische Bioverfügbarkeitsstudie kann mit Hilfe der Einteilung des Wirkstoffes ins BCS verzichtet werden.

Neben qualitativen Aussagen über die Permeabilität, bieten Caco-2 Zellen darüber hinaus die Möglichkeit der Aufklärung intestinaler Mechanismen des Arzneistofftransports. So können einzelne am Transport beteiligte Carrier identifiziert werden. Sowohl an der Absorption als auch an der Sekretion können Transporter beteiligt sein. Werden mehrere Arzneistoffe über die gleichen Transporter transportiert, kann es zu Interaktionen kommen. So genannte Transporter-basierte Wechselwirkungen gewinnen zunehmend an Bedeutung. Die bekanntesten Transporter-basierten Wechselwirkungen sind auf das ABC-Transportprotein P-Glycoprotein zurückzuführen. Durch die genaue Kenntnis der beteiligten Transportmechanismen können mögliche Wechselwirkungen vermieden werden. Aus diesem Grund ist ersichtlich, warum auch die Zulassungsbehörden Interesse an der vollständigen Aufklärung der am Transport der Arzneistoffe beteiligten Carrier haben und dies für zukünftige Neuzulassungen fordern (FDA Draft Guidance, 2006).

1.2 MODELLE ZUR ERMITTLUNG DER INTESTINALEN PERMEABILITÄT

Der Arzneistofftransport durch Membranen ist einer der wichtigsten die Bioverfügbarkeit eines Arzneistoffes beeinflussenden Prozesse. Die Methoden zur Ermittlung der intestinalen Absorption lassen sich in drei Gruppen einteilen: in vivo, in situ und in vitro Methoden.

1.2.1 In vivo Modelle

Bei in vivo Modellen wird die Absorption eines Arzneistoffes an einem lebenden Versuchstier getestet. Der größte Vorteil liegt in der Ausnutzung normaler physiologischer Verhältnisse. So ermöglichen die mesenterische Blutzirkulation und der Mucuslayer eine gute Dissolution und anschließende Resorption des Arzneistoffes. Das am häufigsten verwendete Tiermodell ist die Ratte, da dieses die Situation im Menschen aufgrund ähnlicher Proteinausstattung am besten wider-

spiegelt. Dennoch kann es zu falschen Ergebnissen kommen. Nachteil bei in vivo Experimenten ist deren Komplexität, die es unmöglich macht, einzelne Variablen im Absorptionsprozess isoliert zu betrachten (Le Ferrec et al., 2001).

1.2.2 In situ Modelle

In situ Modelle nehmen eine Zwischenstellung zwischen in vitro Labormodellen und klinischen Studien ein. Sie werden an anästhesierten Versuchstieren, aber auch am Menschen durchgeführt. Der Arzneistoff wird dabei über einen Ballonkatheder verabreicht und die intestinale Permeabilität kann in einzelnen Darmabschnitten isoliert betrachtet werden. Die in vivo Korrelation ist vergleichbar mit in vivo Experimenten. In situ Modelle bieten darüber hinaus den Vorteil, dass die untersuchten Stoffe die Magenpassage umgehen und damit Einflüsse durch die Magensäure ausgeschlossen werden. Das luminale Wasservolumen kann kontrolliert werden und es kommt nicht zu den unter normalen physiologischen Bedingungen beobachteten Schwankungen. Von Nachteil ist, dass diese Methode, zumindest am Menschen, nicht in der Routine eingesetzt werden kann. Sie birgt ähnliche, wenn nicht sogar höhere ethische Probleme als klinische Studien. Zusätzlich muss bei der Auswahl des einzusetzenden Anästhetikums dessen Einfluss auf die intestinale Peristaltik und damit auf die Resorption mit berücksichtigt werden (Lennernäs, 1998).

1.2.3 In vitro Modelle

In vitro Absorptionsmodelle bieten die Möglichkeit, Informationen und mechanistische Aspekte intestinaler Arzneistoffabsorption, welche aufgrund der Komplexität des Organismus in vivo nicht zugängig sind, zu gewinnen. Sie erlauben darüber hinaus durch Modifikation der Bedingungen (z. B. Temperatur, Energieblockade), die molekularen Vorgänge bei der Absorption genauer zu betrachten. Neben den Zellkulturmodellen, auf die in Kapitel 1.2.4 und 1.2.5 genauer eingegangen wird, gibt es zahlreiche andere in vitro Modelle.

Die Ussingkammer beispielsweise verwendet aus Versuchstieren isoliertes intestinales Epithel, welches zwei mit Puffer gefüllte Kompartimente voneinander trennt. Neben dem Stofftransport kann mit Hilfe von Messelektroden die Potentialdifferenz über der Epithelschicht gemessen werden. Für die „everted gut sac“ Methode kommen nach außen gestülpte Rattendünndarmabschnitte zum Einsatz, um die Absorption von Arzneistoffen zu untersuchen (Wilson und Wiseman, 1954).

Ein Nachteil beider genannten Methoden sind relativ große interindividuelle Schwankungen zwischen den isolierten Organen verschiedener Versuchstiere. Die aus den Versuchstieren isolierten Gewebe bestehen nicht nur aus der epithelialen Schicht, sondern zusätzlich aus Muskelgewebe sowie einer Schleimschicht. Diese können Arzneistoffe binden und führen so zur Diffusionsbeeinträchtigung. Der große Nachteil bei der Verwendung von präparierten Gewebeabschnitten ist deren kurze Lebensdauer. Da die Gewebeabschnitte nach Entnahme aus den Versuchstieren nicht mehr versorgt werden, kommt es mit der Zeit zu einer verringerten Überlebensfähigkeit. Die Integrität des Zellverbandes ist nicht mehr gegeben und die Experimente sind folglich nicht mehr aussagekräftig.

Alle in vitro Modelle haben den gemeinsamen Nachteil, dass die Extrapolation der gewonnenen Daten auf in vivo Verhältnisse schwierig und nur dann möglich ist, wenn nachgewiesen wird, dass das jeweilige Modell der Fragestellung genügt. Dabei kann das Fehlen der typischen physiologischen Faktoren wie beispielsweise der Schleimschicht als Diffusionsbarriere aber auch der Gallensalze, die die Arzneistoffe solubilisieren, nachteilig sein. Bei den Zellkulturmodellen besteht ein weiterer Nachteil im tumoralen Ursprung der Zellen, was ihnen im Vergleich zu nicht tumoralen Zellen eine etwas andere Transporter- oder Enzymausstattung gibt (Le Ferrec et al., 2001).

1.2.4 Charakterisierung der Caco-2 Zelllinie

Zellkulturmodelle weisen gegenüber den anderen in vitro Modellen einige Vorteile auf. Sie sind sehr simple Modelle, an denen der Transport über einen isolierten Monolayer untersucht werden kann. Die Permeabilität kann folglich unter eng kontrollierten Bedingungen untersucht werden, losgelöst von störenden Einflüssen von angrenzenden Gewebeschichten oder durch den Mucuslayer. Die Durchführung dieser Versuche ist kostengünstig, liefert schnell Ergebnisse und kann auch im Rahmen von High-Throughput-Screenings Anwendung finden.

1.2.4.1 Parentale Caco-2 Zellen

Die Caco-2 Zelllinie ist die meist verbreitete Zelllinie zur Untersuchung des Arzneistofftransports. Sie wurden 1974 von dem dänischen Arzt J. Fogh aus einem Colon Adenokarzinoms gewonnen und charakterisiert (Fogh et al., 1977). Die Caco-2 Zellen sind adhärente Zellen, die auf Oberflächen konfluente Monolayer bilden,

welche untereinander über Tight Junctions verbunden sind. Unter Kulturbedingungen differenzieren sie spontan aus und besitzen morphologische Ähnlichkeit mit dem Dünndarmepithel des Menschen (Pinto et al., 1983). Sie polarisieren und bilden einen Bürstensaum, der mit den typischen Enzymen und Transportern des Dünndarmepithels ausgestattet ist (Tavelin et al., 2002). Im Gegensatz zum normalen Dünndarmepithel fehlen hier die Mucus produzierenden Becherzellen. Dies wird gerne ausgenutzt, um beteiligte Mechanismen unabhängig von der Schleimschicht zu untersuchen. Auch das Ausmaß der exprimierten Transportproteine kann von in vivo Verhältnissen abweichen. Bei der Anzucht auf festen Oberflächen bilden die Caco-2 Zellen so genannte Dome, d. h. unterhalb der Zellen entsteht ein Flüssigkeitsreservoir, das die basolaterale Membran aufwölbt. Werden die Zellen auf Filter ausgesät, bilden sie einen Monolayer aus säulenartigen Zellen, das Palisaden- bzw. Zylinder-Epithel (Abbildung 1-1). Die Bürstensaummembran mit den Microvilli befindet sich an der apikalen Seite, die Zellkerne sitzen im basalen Teil (Artursson, 1991).

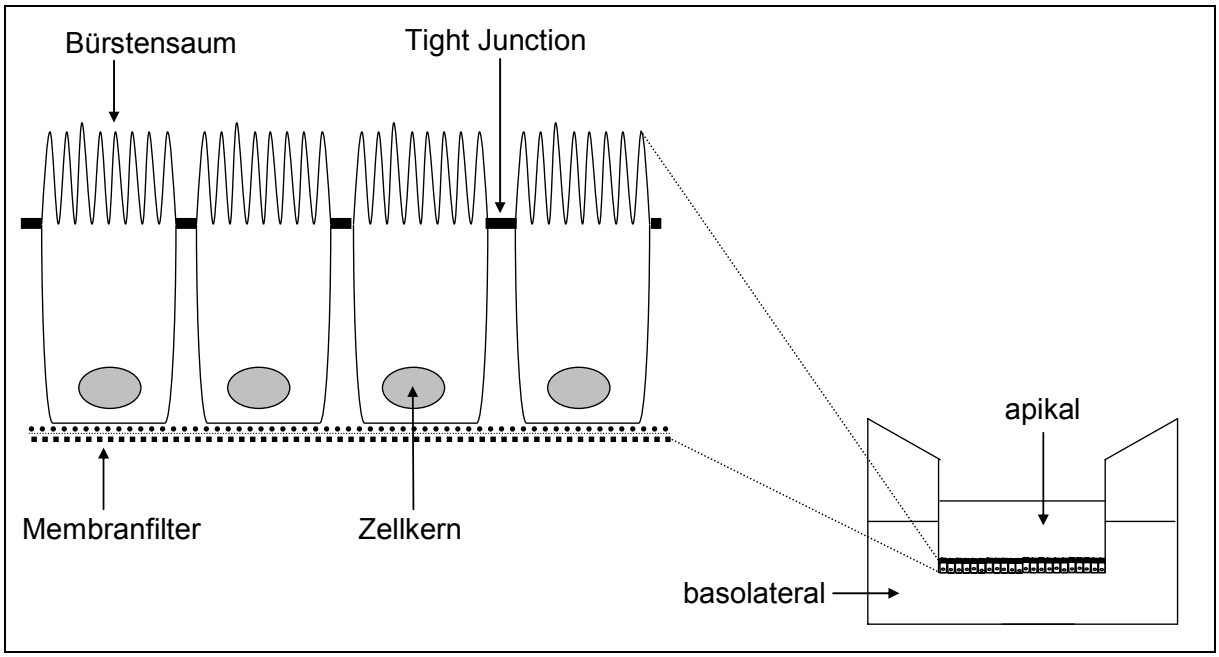


Abbildung 1-1 Schematische Darstellung eines Caco-2 Monolayers gewachsen auf einem Transwell-Filterkammersystem

Obwohl die Caco-2 Zellen dank ihrer Enzym- und Transporterausstattung dem menschlichen Dünndarmepithel entsprechen, weisen sie eine Barrierefunktion auf, die eher dem Colon, also ihrer ursprünglichen Herkunft entspricht (Artursson et al.,

1993). Dies führt dazu, dass hydrophile, hauptsächlich parazellulär transportierte Moleküle eine geringere Permeabilität zeigen, als dies in vivo der Fall wäre.

1.2.4.2 Der Subklon TC7

Bei der parentalen Caco-2 Zelllinie handelt es sich um polyklonale und damit heterogene Zellen, deren Phänotyp sich laufend, wenn auch nur gering, verändert. Aus dieser polyklonalen Zelllinie wurden einige Subklone isoliert. Bei den so entstandenen Zelllinien handelt es sich um monoklonale Zellpopulationen. Die Variabilität zwischen einzelnen Passagen ist somit im Vergleich zur parentalen Zelllinie reduziert. Die einzelnen Klone unterscheiden sich dennoch untereinander und variieren auch von den ursprünglichen Zellen aufgrund veränderter Expression einzelner Proteine, wie beispielsweise Enzyme oder Transporter (Woodcock et al., 1991).

Der Subklon TC7 wurde aus einer späten Passage (#198; T für tardif, spät) der ursprünglichen Caco-2 Zelllinie von A. Zweibaum, INSERM (Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale, Villejuif, Frankreich) isoliert (Caro et al., 1995). Es konnte gezeigt werden, dass sich dieser Zellklon ebenfalls zur Untersuchung des intestinalen Arzneistofftransports eignet (Grès et al., 1998). Er bietet gegenüber der parentalen Zelllinie, abgesehen davon, dass es sich um eine monoklonale Population handelt, weitere Vorteile. So ist die Enzymausstattung dieses Zellklons anders ausgeprägt, als dies bei den ursprünglichen Zellen der Fall ist. Der TC7-Klon zeigt zwar insgesamt eine höhere Enzymaktivität von CYP3A, allerdings handelt es sich hierbei nicht um die Isoform CYP3A4, sondern um CYP3A5 (Carrière et al., 1994; Raeissi et al., 1997). Damit ermöglicht dieser Subklon die Untersuchung der Transportmechanismen unabhängig von CYP3A4, dem wichtigsten Enzym für die Metabolisierung von Arzneistoffe. Ein weiterer Vorteil liegt in der Expression von P-Glycoprotein. Bei Caco-2 Zellen ist aufgrund ihres kanzerogenen Ursprungs im Vergleich zu normalen menschlichen Epithelzellen P-gp stark überexprimiert (Le Ferrec et al., 2001). Der Subklon TC7 zeigt im Vergleich zu den ursprünglichen Zellen einen verminderten P-gp-vermittelten Efflux und entspricht damit eher den normalen Bedingungen (Grès et al., 1998). Darüber hinaus gibt es noch einige weitere Unterschiede zu den parentalen Zellen. So hat der Subklon einen geringeren Glucosebedarf, die Generationszeit ist leicht verkürzt und die Zelldichte in der stationären Phase ist leicht erhöht.

1.2.5 Weitere epitheliale Zellkulturmodelle

Neben der Caco-2 Zelllinie gibt es eine Reihe weiterer ebenfalls gut charakterisierter Zellkulturmodelle. Im Folgenden soll kurz auf die wichtigsten eingegangen werden. Unter den intestinalen Zellen sind hierbei die HT-29 sowie die T84 Zelllinie zu erwähnen. HT-29 Zellen sind humane Colonkarzinom-Zellen. Im Gegensatz zu den Caco-2 Zellen differenzieren sie aber zu den schleimproduzierenden Becherzellen (Zweibaum et al., 1985) aus. Sie bilden selbst keinen dichten Monolayer, können aber in Cokultur mit Caco-2 Zellen zu integeren Monolayern heranwachsen (Walter et al., 1996). T84 Zellen wurden aus einer Lungenmetastase eines humanen Colon-Karzinoms gewonnen. Sie bilden in Kultur Monolayer und ähneln adulten Kryptenzellen. Sie bilden nur wenig morphologische Differenzierungsmerkmale wie Enzyme oder Transporter (Barthe et al., 1999).

Das renale Epithel kann mit MDCK-Zellen (Madin-Darby canine kidney) oder aber LLC-PK1-Zellen in vitro simuliert werden. Beide Zelllinien bilden konfluente Monolayer. MDCK-Zellen stammen aus dem distalen Tubulus eines Hundes, LLC-PK1-Zellen hingegen sind von Nierenzellen eines männlichen Hampshire-Schweines abgeleitet und bilden ein Epithel ähnlich dem des proximalen Tubulus.

Als Modell für das Bronchialepithel eignet sich die Calu-3 Zelllinie. Sie stammen von den bronchotrachealen Drüsenzellen der Submucosa ab und wurden aus einem humanen Lungen Adenokarzinom entnommen (Fogh et al., 1977).

1.3 EPITHELIALE TRANSPORTMECHANISMEN

Epithelien sind hoch spezialisierte Grenzschichten, welche dem Stoff- und Flüssigkeitsaustausch dienen, aber auch eine Barrierefunktion darstellen. Sie bestehen aus polarisierten Zellen, welche funktionell in eine apikale, dem Lumen zugewandte Seite und eine basolaterale, dem Blutkreislauf zugewandte Seite unterteilt werden. Die spezifischen Transportmechanismen und Barrierefunktionen werden durch eine Vielzahl membranständiger Proteine gewährleistet.

Man unterscheidet bei epithelialen Transportmechanismen grundsätzlich zwischen der parazellulären und der transzellulären Route, die beide im Folgenden vorgestellt werden. Einen Überblick über die epithelialen Transportmechanismen liefert Abbildung 1-2.

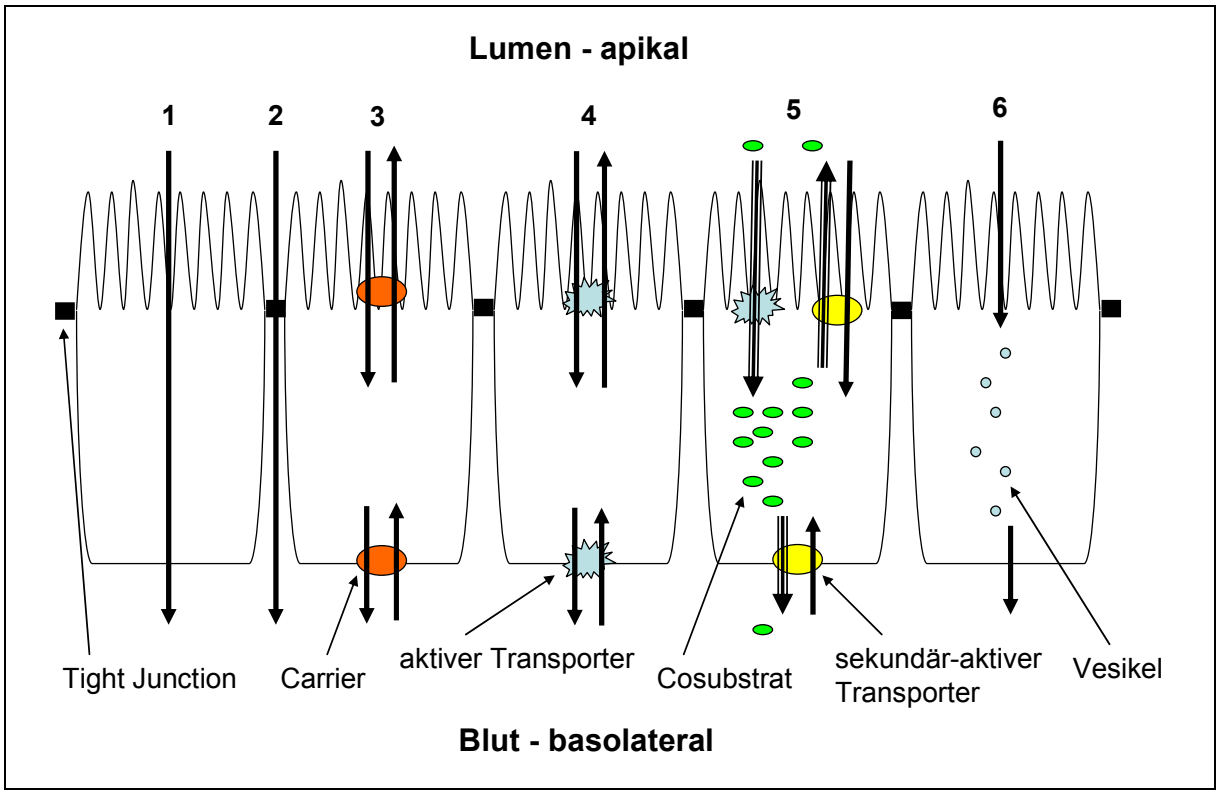


Abbildung 1-2 Schematische Übersicht über epitheliale Transportmechanismen: (1) passiv transzellulär; (2) passiv parazellulär; (3) Carrier-vermittelte erleichterte Diffusion; (4) primär-aktiver Transport; (5) sekundär-aktiver Transport; (6) Endocytose

1.3.1 Parazellulärer Transport

Beim parazellulären Transport werden Stoffe durch die Zellzwischenräume transportiert. Es handelt sich um einen rein passiven Transport, der durch den transepithelialen Konzentrationsgradienten angetrieben wird. Die Schlussleisten, so genannte Tight Junctions, bilden eine Diffusionsbarriere und kontrollieren damit das Ausmaß des parazellulären Transports. Tight Junctions bestehen aus unterschiedlichen Membranproteinen, die wichtigsten gehören zur Familie der Claudine. Diese Transmembranproteine bringen benachbarte Zellen in Kontakt und bilden eine mit Wasser gefüllte Pore in den Zellzwischenräumen, welche je nach Proteinzusammensetzung eine unterschiedliche Permeabilität für bestimmte Ionen oder kleine hydrophile Moleküle besitzt (Schneeberger, 2003). So weisen unterschiedliche epitheliale Monolayer durch Unterschiede in der Zusammensetzung der Tight Junctions sehr unterschiedliche parazelluläre Permeabilitäten auf.

1.3.2 Transzellulärer Transport

Im Gegensatz zum parazellulären Transport werden beim transzellulären Transport die Stoffe durch die Zellen hindurch transportiert. Der zu transportierende Stoff wird auf der einen Seite über die Membran aufgenommen, wandert dann durch das Cytosol oder entlang der Membran auf die andere Zellseite und passiert dort wiederum die Membran. Der Transport durch die Membranen kann dabei über verschiedene Mechanismen, die im Folgenden aufgeführt sind, erfolgen.

1.3.2.1 Passive Diffusion

Passive Diffusion erfordert keine Energie. Der permeierende Stoff wandert getrieben von einem Konzentrationsgradienten zunächst durch die apikale Membran, dann durch die Zelle um die basolaterale Membran ebenfalls durch Diffusion zu überwinden. Lipophilere Stoffe werden wahrscheinlich zusätzlich entlang der Plasmamembran transportiert.

Die Diffusionsgeschwindigkeit verschiedener Moleküle hängt von der Höhe des Konzentrationsgefälles, von der Fläche und der Dicke der Membran sowie von einem stoffspezifischen Diffusionskoeffizienten ab. Der Diffusionskoeffizient wiederum wird bestimmt durch die Viskosität des Diffusionsmediums, die Temperatur und die Größe des diffundierenden Stoffes. Dieser physikalische Zusammenhang wird im 1. Fick'schen Diffusionsgesetz beschrieben (Gleichung 1).

$$\frac{dm}{dt} = D \cdot P \cdot \frac{A}{d} \cdot (c_a - c_i)$$ *Gleichung 1*

dm/dt	Diffusionsgeschwindigkeit [mg/s]
D	Diffusionskoeffizient [cm^2/s]
P	Verteilungskoeffizient zwischen Membran und Außenmedium
A	Membranfläche, die für die Diffusion zur Verfügung steht [cm^2]
(c_a-c_i)	Konzentrationsgradient an der Membran [mg/ml]
d	Diffusionstrecke, Dicke der Membran [cm]

Entscheidend für die passive Diffusion eines Arzneistoffes ist folglich sein Verteilungskoeffizient zwischen Außenmedium und der Membran, da dieser bestimmt, welcher Anteil des Stoffes aus dem Medium in die Membran wandert. Der

Transport in der Membran erfolgt über Diffusion, der Austritt aus der Membran wird vom Verteilungskoeffizienten zwischen Membran und dem Cytosol bestimmt. Nach Durchwandern des Cytosols muss der Arzneistoff auf der gegenüberliegenden Seite nach dem gleichen Prinzip die basolaterale Membran durchdringen. Das heißt, ein gut passiv permeierender Stoff muss sowohl hydrophile als auch lipophile Anteile haben, damit sichergestellt ist, dass er in die Membran wandern kann, diese aber auch wieder in ausreichendem Ausmaß verlässt. Ist der Arzneistoff zu lipophil, reichert er sich in der Membran an. Charakterisiert wird dies durch den Verteilungskoeffizienten, der experimentell durch die Verteilung des Stoffes zwischen einer wässrigen und einer organischen Phase bestimmt wird (Gleichung 2).

$$V_k = \frac{c_{org}}{c_{wäßrig}}$$ Gleichung 2

V_k Verteilungskoeffizient
c_{org} Konzentration in der organischen Phase
$c_{wäßrig}$ Konzentration in der wässrigen Phase

In der Literatur findet man meist die log P-Werte der Substanzen, der Logarithmus des Octanol-Wasser-Verteilungskoeffizienten im nicht ionisierten Zustand. Substanzen mit log P-Werten kleiner als fünf zeigen eine ausreichende passive Permeabilität (Lipinski, 2000). Da die meisten Arzneistoffe ionisierbar sind, ist der log D-Wert, der die Verteilung bei einem bestimmten pH-Wert angibt allerdings aussagekräftiger (Artursson et al., 2001).

1.3.2.2 Erleichterte Diffusion

Unter erleichterter Diffusion versteht man einen passiven über Diffusion gesteuerten Prozess, der durch ein Trägermolekül, einen so genannten Carrier, in der Membran ermöglicht wird. Für viele Stoffe würde die normale Diffusion aus den oben erläuterten Gründen nicht oder nur sehr langsam ablaufen, da die Lipophilie oder Hydrophilie einen ausreichenden Transport durch die Membran nicht zulässt. Aus diesem Grund binden Membranproteine den zu transportierenden Stoff auf der einen Seite der Membran, der Arzneistoff-Protein-Komplex diffundiert durch die Membran und der Stoff wird auf der anderen Seite wieder freigegeben. Im Falle eines transmembranären Proteins ist es auch möglich, dass das Protein nach Bindung des

Arzneistoffs seine Konformation ändert und durch diese Umlagerung der Stoff durch die Membran geschleust und an der anderen Seite freigesetzt wird. Bei solchen Membranproteinen kann es sich auch um Poren bildende Transmembranproteine handeln. Die so entstehenden Kanäle leiten selektiv kleine, hydrophile Moleküle, meist Ionen, durch die Membranen.

Allen diesen Mechanismen gemeinsam ist, dass sie ohne Energieverbrauch ablaufen und deshalb auf einen Konzentrationsgradienten angewiesen sind. Darüber hinaus sind sie durch die Bildung der Substrat-Protein-Komplexe substanzspezifisch oder zumindest auf bestimmte Leitstrukturen am zu transportierenden Molekül angewiesen.

1.3.2.3 Aktiver Transport

Im Gegensatz zum passiven Transport benötigt der aktive Transport immer Energie, deshalb kann er auch gegen ein Konzentrationsgefälle ablaufen. Der Transport erfolgt mit Hilfe von Membranproteinen, so genannten Transportern oder Carriern. Man unterscheidet die primär-aktiven von den sekundär-aktiven bzw. tertiär-aktiven Transportmechanismen.

Aktive Transporter sind membranständige Enzyme mit ATPase-Aktivität, d. h. sie sind dazu in der Lage, unter ATP-Verbrauch Energie zu gewinnen und mit deren Hilfe Moleküle gegen einen Konzentrationsgradienten zu transportieren. Diese Transporter sind alle substanzspezifisch und sättigbar, da sie nur eine begrenzte Kapazität aufweisen.

Beim sekundär-aktiven Transport stammt die Energie aus einem elektrochemischen Konzentrationsgradienten, der von einem primär-aktiven Transportvorgang aufgebaut wurde. Ein sekundär-aktiver Carrier nutzt diesen Gradienten, indem er den zu transportierenden Stoff im Cotransport mit dem entsprechenden Ion durch die Membran schleppt. Beim Cotransport besitzt der Carrier Bindungsstellen für verschiedene Substrate, der Transport erfolgt erst, wenn alle Bindungsstellen besetzt sind. Man unterscheidet hier den Symport, bei dem alle Substrate in die gleiche Richtung transportiert werden und den Antiport, welcher in entgegengesetzte Richtung abläuft.

Auf die einzelnen Transporter wird in Kapitel 1.3.3 genauer eingegangen.

1.3.2.4 Endocytose

Als Endocytose bezeichnet man den vesikulären Einschluss von Stoffen wie beispielsweise große Moleküle, aber auch Feststoffpartikel (Phagocytose) oder Flüssigkeitströpfchen (Pinocytose). Dabei stülpt sich die Membran um den Stoff und es wird ein Vesikel ins Zellinnere abgeschnürt, welches dann mit Hilfe des Endomembransystems weiter transportiert wird.

1.3.3 Transporterfamilien

Es gibt mehrere Möglichkeiten Transporter einzuteilen. Zunächst kann man, wenn man Transportvorgänge auf Zellebene betrachtet, zwischen Influx-Transportern, welche Arzneistoffe in die Zelle transportieren und Efflux-Transportern, die den auswärts gerichteten Transport übernehmen, unterscheiden. Aus pharmako-kinetischer Sicht spricht man von absorptiven Transportern und sekretorischen Transportern, je nachdem ob sie dazu dienen Arzneistoffe ins Blut aufzunehmen oder aus dem Blut zu entfernen. Da viele nicht aktive Transporter ihre Substrate je nach Konzentration in die eine oder andere Richtung transportieren, ist solch eine Einteilung eher schwierig.

Mechanistisch kann man zwei große Gruppen an Transportern unterscheiden. Auf der einen Seite die ABC-Transporter (ATP-binding cassette transporters), die primär-aktive Efflux Pumpen sind, auf der anderen Seite gibt es die SLC-Transporter (Solute carrier transporters), die keine ATPase-Aktivität aufweisen und deshalb über erleichterte Diffusion oder sekundär-aktiv Substrate transportieren. Die SLC-Transporter sind im Gegensatz zu den ABC-Transportern, welche ausschließlich an der Sekretion der Arzneistoffe beteiligt sind, sowohl an der Sekretion als auch an der Absorption beteiligt. Die wichtigsten Vertreter beider Gruppen werden im Folgenden genauer beschrieben.

1.3.3.1 ABC-Transporter

Derzeit sind 49 ABC-Transporter charakterisiert, die sich in sieben unterschiedliche Subfamilien einordnen lassen.

P-Glycoprotein

P-Glycoprotein (P-gp) ist der meist untersuchte Transporter. Er gehört zur ABCB Subfamilie und ist das Genprodukt von ABCB1 bzw. MDR1 (Multi drug resistance).

P-gp ist zwar ubiquitär in allen Körperzellen vorhanden, in Epithelzellen ist es aber stärker exprimiert. Es sitzt in der apikalen Membran der Zellen. Seine ursprüngliche Rolle ist der Schutz der Zellen vor Toxinen. P-gp zeichnet sich durch eine geringe Substratspezifität und sehr hohe Kapazität aus. Es ist aufgebaut aus zwei äquivalenten Hälften mit je sechs Transmembran-Regionen sowie zwei ATP-Bindungsstellen. Die Transmembran-Regionen beider Hälften bilden zusammen die Substratbindungstasche, die aus der Lipid-Doppelschicht der Membran erreicht werden kann (Loo et al., 2004).

Als Efflux-Mechanismus gilt die sogenannte „Staubsauger-Funktion“, die in Abbildung 1-3 graphisch dargestellt ist, als am wahrscheinlichsten (Higgins und Gottesmann, 1992). Das Substrat diffundiert entsprechend seinem Verteilungs-koeffizienten aus dem Extrazellularraum oder dem Cytosol in die Membran. Aus der Lipid-Doppelschicht wird die Bindungstasche des Transporters zugängig. Nach Binden des Substrats an die Bindungsstelle kommt es zur ATP-Hydrolyse, die wiederum eine Konformationsänderung des Enzyms nach sich zieht. Die Affinität des Substrats zur Bindungstasche sinkt, was schließlich die Freisetzung des Substrats ins extrazelluläre Medium zur Folge hat.

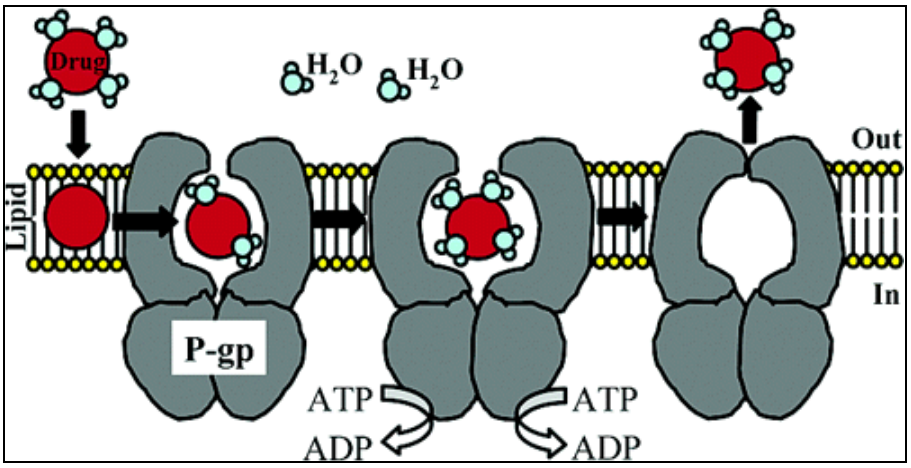


Abbildung 1-3 Prinzip der Staubsauger-Funktion für den Efflux-Mechanismus von P-gp (Loo et al., 2004)

Die geringe Substratspezifität lässt sich am besten dadurch erklären, dass die Bindungstasche entweder mehrere Bindungsstellen für Substrate aufweist, oder dass es sich um eine recht große und flexible Bindungsstelle handelt (Shapiro und Ling, 1997). Zu den bekanntesten Substraten zählen Cyclosporin A, Taxol, Verapamil und

Tacrolimus. Die einzige Vorraussetzung für das Substrat ist eine ausreichende Lipophilie, damit es in die Membran verteilt wird und von dort die Efflux-Pumpe erreicht.

MRP – Multidrug resistance associated protein

Die MRPs gehören zur ABCC-Subfamilie, die insgesamt 12 Mitglieder hat. Wie alle ABC-Transporter besitzen auch die MRPs Transmembrandomänen sowie zwei hoch konservierte ATP-Bindungsstellen. Ihre Substrate sind konjugierte und unkonjugierte organische Anionen. Ähnlich dem P-gp besitzen die MRPs auch eine geringe Substratspezifität, die Substrate sind aber unterschiedlich. Die einzelnen Transporter der Familie unterscheiden sich untereinander durch ihre Substratspezifität, die Gewebeverteilung sowie die Lage in den Epithelzellen. Durch ihre vorwiegende Lokalisation in Leber, Intestinum, Niere und Blut-Gewebe-Grenzen spielen sie eine wichtige Rolle für die orale Bioverfügbarkeit, die Gewebeverteilung sowie die Elimination von Arzneistoffen (Leslie et al., 2005).

BCRP – Breast Cancer Resistance Protein

Dieser Efflux-Transporter gehört zur ABCG-Subfamilie und stellt das Genprodukt von ABCG2 dar. Entdeckt wurde er erstmals in Zusammenhang mit der Mitoxantron-Resistenz von Brustkrebszellen (Nakagawa et al., 1992). Mittlerweile ist bekannt, dass BCRP in eine Vielzahl von Zytostatika-Resistenzen involviert ist. Der Transporter hat ähnlich wie P-gp auch ein sehr breites Substratspektrum, das sich in großen Bereichen mit dem von P-gp überlappt. Analog zu den Substraten gibt es auch sehr viele Wirkstoffe, die einen inhibitorischen Effekt auf BCRP haben, darunter Glucocorticoide und Flavonoide. Es ist davon auszugehen, dass in Zukunft noch sehr viele Substrate und Inhibitoren identifiziert werden. Die stärkste Expression zeigt BCRP im ZNS, in der Leber, Placenta sowie den Sexualorganen. Eher schwach exprimiert ist er dagegen im Gastrointestinaltrakt, wo er in der apikalen Membran der Epithelzellen zu finden ist. Durch Imalinib, einen Tyrosinkinase-Inhibitor, lässt sich der Transporter in Caco-2 Zellen induzieren (Burger et al., 2005). In transduzierten MDCK (Madine-Darby canine kidney) Zellen konnte gezeigt werden, dass BCRP auch an der Sekretion der Gyrasehemmer Ciprofloxacin, Ofloxacin und Norfloxacin beteiligt ist (Merino et al., 2006).

1.3.3.2 SLC-Transporter

Organische Kationen-Transporter

Die organischen Kationen-Transporter (Organic cation transporter-OCT) gehören zur großen SLC22A-Genfamilie. Ihre Substrate sind niedermolekulare, eher hydrophile organische Kationen. Sie sind hauptsächlich in der Leber und in der Niere zu finden, deshalb spielen sie für die intestinale Absorption eine untergeordnete Rolle. Neben den OCT, gibt es noch die OCTNs (Organic cation/carnitine transporter), deren Gewebeverteilung ubiquitär ist. Sie befinden sich auch im Darm und wurden in Caco-2 Zellen bereits nachgewiesen (Elimrani et al., 2003).

Organische Anionen-Transporter

Die Familie der organischen Anionen-Transporter (OAT) ist die größte Familie an sekundär- bzw. tertiär-aktiven Transportern (Saier et al., 1999). Auch sie gehören zusammen mit den Kationen-Transportern zur SLC22A-Familie. Sie sind hauptsächlich in der Niere zu finden, wo sie für die Elimination vieler Arzneistoffe verantwortlich sind, kommen allerdings auch in anderen Geweben vor. Zu den Substraten gehören sowohl hydrophile als auch amphiphile Stoffe (z. B. viele anorganische Ionen, ACE-Hemmer, Diuretika, ß-Lactam Antibiotika, NSAIDs, Methotrexat). P-Aminohippurat und Estron-3-sulfat gehören zu den bekanntesten Substraten. Es sind sechs verschiedene OATs bekannt, die allerdings untereinander eine überlappende Substratspezifität und Gewebeverteilung aufweisen.

OATP – Organic anion-transporting polypeptide

OATPs spielen eine wichtige Rolle bei der intestinalen Absorption sowie bei der hepatischen und renalen Clearance (Hagenbuch und Meier, 2003). Es gibt sowohl gewebespezifische Vertreter, als auch ubiquitär verteilte. Sie sind in der Lage, bidirektional zu transportieren. Die Richtung wird bestimmt durch den Konzentrationsgradienten des Substrats über der Membran. Die OATPs sind auf den SLCO-Genen kodiert, die auf unterschiedlichen Chromosomen zu finden sind. Sie gliedern sich in sechs Familien, die wiederum in mehrere Subfamilien eingeteilt werden.

Die einzelnen OATPs teilen viele gleiche Substrate und sind am Transport einer Vielzahl von Arzneistoffen beteiligt, darunter sind HMG-CoA-Reduktaseinhibitoren, AT2-Rezeptorantagonisten, ACE-Hemmer und Herzglykoside. Aus diesem Grund ist

es schwierig, spezifische Inhibitoren für einzelne Transporter ausfindig zu machen. Es konnte gezeigt werden, dass einige Nahrungsmittelbestandteile inhibitorische Effekte auf diese Transporter besitzen (z. B. Grapefruitsaft, Apfelsaft, Orangensaft, grüner Tee, Traubenkerne). Im Falle des Grapefruitsafts macht man den Inhaltsstoff Naringin für diesen Effekt verantwortlich (Bailey et al., 2007). Aus der großen Substratbreite der Transporterfamilien ist ersichtlich, dass hier ein großes Potential an möglichen Arzneimittel-Interaktionen vorhanden ist. Tabelle 1-1 zeigt eine Zusammenfassung der bisher gefundenen Wechselwirkungen, bei denen eine Beteiligung von OATPs nachgewiesen werden konnte.

OATP1A2 ist ein Transporter, der in der apikalen Membran von Epithelzellen des Gastrointestinaltraktes zu finden ist (Lee et al., 2005). OATP1B1 hingegen ist vorwiegend in der basolateralen Membran des Nierenepithels lokalisiert. Aus dieser unterschiedlichen Lokalisation ergeben sich die gegensätzlichen Effekte auf die Bioverfügbarkeit (Tabelle 1-1).

Tabelle 1-1 Interaktionen in Zusammenhang mit OATP (aus „Drug Transporters“, You und Morris, 2007)

involvierter Transporter	Arzneistoff	Interaktion	Pharmakokinetischer Einfluss
OATP1A2	Fexofenadin	Grapefruitsaft	AUC ↓ 63 %
	Fexofenadin	Orangensaft	AUC ↓ 70 %
	Talinolol	Grapefruitsaft	AUC ↓ 44 %
OATP1B1	Pravastatin	Orangensaft	AUC ↑ 152 %
	Pravastatin	Cyclosporin A	AUC ↑
	Pravastatin	Gemfibrozil	AUC ↑ 202 %
	Rosuvastatin	Cyclosporin A	AUC ↑ 710 %
	Rosuvastatin	Gemfibrozil	AUC ↑ 188 %
	Cyclosporin A	Cyclosporin A	AUC ↑ (3-5fach)
	Gemfibrozil	Gemfibrozil	AUC ↑ (559 %)

Die OATP-Transporterfamile spielt darüber hinaus auch pathophysiologisch eine Rolle. So werden endogene Substrate wie Schilddrüsen- und Steroidhormone, Gallensäuren, Prostaglandine und Bilirubin über diese Transporterfamilien transportiert. Die Hyperbilirubinämie (Gilbert’s Syndrom) ist auf einen Gendefekt

eines OATPs zurückzuführen. Hepatozyten nehmen über OATP-vermittelte erleichterte Diffusion Bilirubin aus dem Blut auf, um dieses abzubauen. Durch den Gendefekt, ist das OATP nicht mehr in der Lage, Bilirubin über die Hepatozyten-Membran zu transportieren, demzufolge reichert sich Bilirubin im Blut an.

Monocarboxylat-Transporter

Die Monocarboxylat-Transporter (MCT) gehören zur SLC16-Genfamilie. Es sind 14 verschiedene Transporter der Familie bekannt, wobei erst wenige funktionell charakterisiert werden konnten. Sie sind sekundär-aktive Transporter, die ihre Substrate im Cotransport mit Protonen transportieren. Ihre physiologische Rolle liegt im Transport endogener Monocarboxylate wie Lactat, Pyruvat und Ketonkörpern. Auch unter den Arzneistoffen finden sich MCT-Substrate, darunter einige ß-Lactam-Antibiotika und NSAIDs.

Peptidtransporter

Der bekannteste Vertreter der Peptidtransporter Pept1 befindet sich in der apikalen Membran intestinaler Epithelzellen. Der Transportmechanismus ist, wie auch bei den Monocarboxylat-Transportern ein Protonen-gekoppelter Cotransport. Ihre Aufgabe ist es, kurzkettige Di- und Tripeptide durch die Membranen zu transportieren und so dem Organismus zur Verfügung zu stellen. Weitere Substrate sind peptidähnliche Antibiotika, was durch die gute Bioverfügbarkeit einiger Aminocephalosporine und Aminopenicilline dokumentiert wird.

1.4 OFLOXACIN

1.4.1 Allgemeines

Ofloxacin gehört zur Gruppe der Chinolone, genauer Fluorochinolone, die derzeit bekanntesten, totalsynthetischen, antibakteriellen Arzneistoffe (Abbildung 1-4). Es handelt sich um ein chirales Molekül. Sowohl racemisches Ofloxacin als auch das reine S-Enantiomer (Levofloxacin) befinden sich im Handel, wobei die Chiralität einen großen Einfluss auf die Wirksamkeit des Moleküls hat. So ist Levofloxacin je nach untersuchter Bakterienart 8- bis 128-fach stärker wirksam als R-Ofloxacin (Fujimoto und Mitsuhashi, 1990).

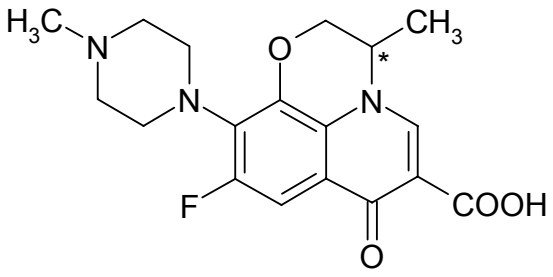


Abbildung 1-4 Strukturformel von Ofloxacin

Ofloxacin besitzt ein breites Wirkspektrum, das neben gramnegativen wie Pseudomonas aeroginosa auch grampositive Bakterien umfasst. Der Wirkmechanismus liegt in einer Hemmung der prokariotischen DNA-Gyrase, welche eine Entwindung des DNA-Doppelstranges über induzierte Strangbrüche hervorrufen kann. Ohne die Entwindung kommen Polymerisationsreaktionen entlang der DNA für die Replikation und Transkription zum Erliegen, was die Zellteilung verhindert und schließlich zum Tod der Zellen führt. Es konnte gezeigt werden, dass der inhibitorische Effekt auf die DNA-Gyrase von Levofloxacin im Vergleich zum R-Enantiomer etwa doppelt so hoch ist (Morrisey et al., 1996).

1.4.2 Physikalisch-chemische Eigenschaften

Die Carbonsäurefunktion von Ofloxacin hat einen pK_s-Wert von 6,05, die methylierte tertiäre Amingruppe des Piperazinrings weist einen pK_s-Wert von 8,22 auf. Der isoelektrische Punkt ist bei 7,14. Damit liegt das Molekül bei einem physiologischen pH-Wert von 7,4 als Zwitterion vor. Der Einfluss der Carboxylgruppe auf die Löslichkeit ist geringer als der der N-Basizität, was zu einer guten Löslichkeit des Moleküls im stark sauren Bereich führt (Sörgel et al., 2001). Ofloxacin hat einen Verteilungskoeffizienten von 0,33 bei einem pH-Wert von 7,2 (Hirai et al., 1986). Damit ist das amphiphile Zwitterion trotz seiner Ladungen im neutralen Bereich in der Lage, in gewissem Ausmaß in die lipophile Phase überzutreten.

1.4.3 Pharmakokinetische Eigenschaften

Nach peroraler Gabe wird Ofloxacin rasch und nahezu vollständig resorbiert. Die Bioverfügbarkeit ist mit 90 % sehr hoch (Sörgel et al., 1989). Maximale Serumwerte werden innerhalb 1-3 Stunden erreicht. Die Plasmaeiweißbindung liegt bei 25 % und ist nicht stereoselektiv (Okazaki et al., 1991). Das scheinbare Verteilungsvolumen ist 120 Liter. Dieser recht hohe Wert ist auf eine sehr gute Gewebeverteilung

zurückzuführen. Die Halbwertszeit beträgt fünf bis sieben Stunden, wobei nur 4-5 % des Stoffes metabolisiert werden. Die Ausscheidung erfolgt in erster Linie unverändert über die Niere. Eine stereoselektive Metabolisierung von Ofloxacin zu Gunsten des Levofloxacin gilt als sicher, da allerdings nur ein kleiner Teil metabolisiert wird, stellt sich die Frage, ob der Metabolismus überhaupt Einfluss auf die Wirkung hat (Okazaki et al., 1989). Hauptmetabolite von Ofloxacin sind das N-Desmethyl-Ofloxacin, das noch antibakterielle Aktivität aufweist, sowie das Ofloxacin-N-Oxid, das inaktiv ist (Okeri und Arhewoh, 2008).

Die intestinale Permeabilität von Ofloxacin wurde schon in vielen Studien mit zahlreichen unterschiedlichen Modellen untersucht. So konnte im perfundierten Rattendarm ein sättigbarer Mechanismus für die Absorption nachgewiesen werden (Prieto et al., 1988). Darüber hinaus war eine mögliche Stereoselektivität in Zusammenhang mit dem Arzneistofftransport Gegenstand zahlreicher Untersuchungen. In einer in vivo Studie am Menschen wurden verschiedene pharmakokinetische Parameter der beiden Isomere getrennt voneinander ermittelt. Es konnte gezeigt werden, dass Levofloxacin eine längere Halbwertszeit und eine höhere AUC hat. Die maximale Plasmakonzentration zeigt allerdings keine signifikanten Unterschiede zwischen beiden Enantiomeren, diese treten erst zu späteren Zeiten der Blutspiegelkurven auf. Dies führt die Autoren zur Schlussfolgerung, dass die Stereoselektivität nicht auf die intestinale Absorption, sondern auf eine unterschiedliche renale Clearance zurückzuführen ist (Okazaki et al., 1991). Untersuchungen am isolierten Rattendarm hingegen wiesen nach, dass die intestinale Elimination des R-Enantiomers schneller ist. Sie kann durch Verapamil und Chinidin reduziert werden, der stereoselektive Unterschied bleibt dabei erhalten (Rabaa et al., 1996). Demzufolge scheint die P-gp-vermittelte Sekretion nicht stereoselektiv zu sein. Beide Enantiomere werden am besten im neutralen pH-Bereich also nahe ihrem isoelektrischen Punkt resorbiert. Da hier die Lipophilie der Moleküle ein Maximum aufweist, kann abgeleitet werden, dass Ofloxacin zu einem großen Teil über passive Diffusion transportiert wird (Rabaa et al., 1997). Zusammen mit Ciprofloxacin oder Pefloxacin, beides strukturähnliche Chinolone, kommt es zu einem Anstieg der Absorption, wobei keine stereoselektiven Unterschiede mehr zu beobachten sind (Rabaa et al., 1997).

Auch mit Hilfe von Caco-2 Zellen wurde die intestinale Permeabilität von Ofloxacin untersucht. Es konnte gezeigt werden, dass der Arzneistoff einem aktiven sekretorischen Mechanismus unterliegen muss, da die Ergebnisse aus den Permeationsstudien für die Absorption deutlich höhere Werte liefern, als die der Gegenrichtung. Neben P-gp müssen weitere Transporter an der Sekretion beteiligt sein. OCT, OAT und MRP können hierzu allerdings ausgeschlossen werden. Die gesuchten Transporter sind in der apikalen Membran lokalisiert, wobei eine Anreicherung über die basolaterale Membran vorgeschaltet ist (Yamaguchi et al., 2000). Auch in absorptiver Richtung liegt ein Transporter-vermittelter Mechanismus durch Studien an Caco-2 Zellen nahe. Hierbei wird ein bisher unbekannter Carrier diskutiert, bei dem es sich weder um einen Dipeptid- oder Aminosäuretransporter noch um einen Monocarboxylat-Transporter handelt (Yamaguchi et al., 2001). Im Jahr 2006 gelang es schließlich anhand verschiedener Zellklone durch die Auswertung der unterschiedlichen mRNA-Expression und deren Effekt auf die Arzneistoffaufnahme, einen möglichen Transporter zu identifizieren. Hierbei handelt es sich um den Anionentransporter OATP1A2 (Maeda et al., 2006).

Die renale Permeabilität ist ebenfalls Gegenstand vieler Untersuchungen. Wie oben bereits erwähnt, spielt sie eine wesentliche Rolle bei der Elimination des Wirkstoffs und könnte möglicherweise einen stereoselektiven Mechanismus beinhalten. Da viele Transporter ubiquitär verteilt sind, können in Tubuluszellen identifizierte Carrier durchaus auch im intestinalen Epithel zu finden sein und auch hier eine Rolle für den Ofloxacintransport spielen. An der Bürstensaummembran der Ratte wurden Untersuchungen durchgeführt, die zeigen, dass Aminocephalosporine die Aufnahme von Ofloxacin in die Epithelzellen aus dem Blut inhibieren. Diese Interaktion wird auf einen organischen Kationentransporter zurückgeführt (Okano et al., 1990). In HEK 293 Zellen (Human embryonic kidney) wird OCT2 dafür verantwortlich gemacht (Okano et al., 2006). Auch Probenecid, ein unselektiver Inhibitor verschiedener Anionentransporter in der Niere, ist in der Lage die renale Ausscheidung zu hemmen (Foote und Halstenson, 1998). Die Beteiligung von BCRP an der renalen Sekretion gilt als wahrscheinlich (Merino et al., 2006).

Abbildung 1-5 bietet einen Überblick über die in der vorliegenden Arbeit untersuchten Transporter sowie die eingesetzten Inhibitoren. Der Vollständigkeit halber sind, unabhängig von einer möglichen Beteiligung beim Ofloxacintransport, auch die

Transporter dargestellt, auf die die verwendeten Hemmstoffe einen inhibitorischen Effekt ausüben.

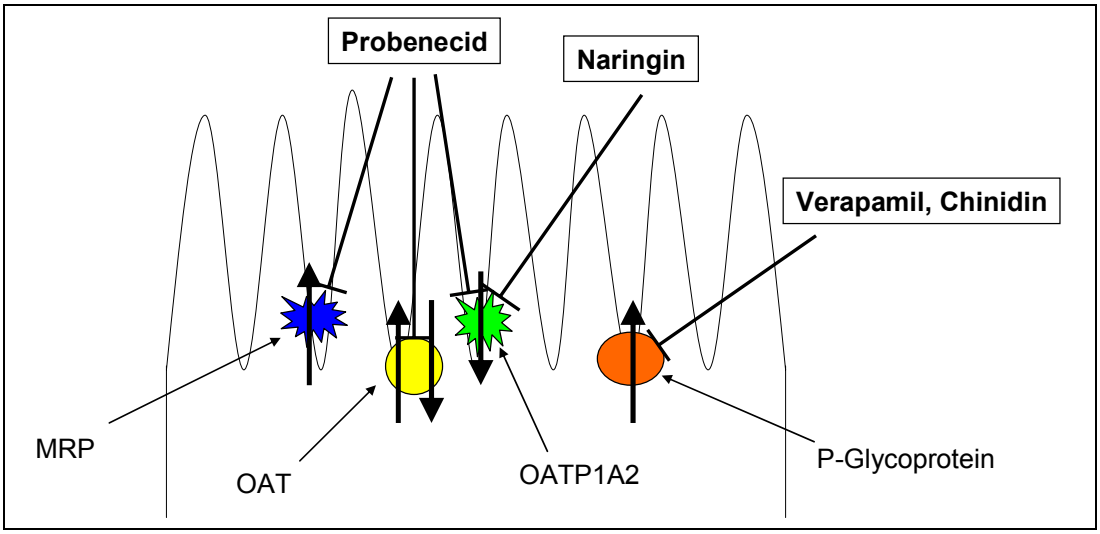


Abbildung 1-5 Schematische Darstellung der apikalen Membran der Caco-2 Zellen mit den untersuchten Transportern, deren Transportrichtung sowie die Möglichkeiten der Inhibition

1.5 ZIELSETZUNG

Ziel dieser Arbeit ist die Untersuchung der Stereoselektivität des Ofloxacintransports über Caco-2/TC7 Monolayer. Dabei soll untersucht werden, ob der intestinale Transport einen Beitrag zu den stereoselektiven Wirkunterschieden von Ofloxacin leistet. In der Literatur finden sich widersprüchliche Aussagen hinsichtlich einer möglichen stereoselektiven Diskriminierung eines der beiden Isomere beim transepithelialen Transport. Durch Permeationsstudien mit Transwell-Filterkammer-systemen und Caco-2 Zellen soll der transzelluläre Transport von Ofloxacin näher beleuchtet werden. Mit Hilfe einer kapillarelektrophoretischen Methode ist es möglich, beide Enantiomere nebeneinander zu bestimmen und so die Permeationskoeffizienten beider Isomere getrennt voneinander zu ermitteln.

Darüber hinaus soll das Ausmaß der Beteiligung von P-Glycoprotein an der intestinalen Sekretion bestimmt werden. Es wird von verschiedenen Autoren diskutiert, dass neben P-gp weitere Efflux-Transporter den Auswärtstransport vermitteln. Bislang konnte noch keiner identifiziert werden. Die Quantifizierung des Beitrags von P-gp soll durch den Einsatz verschiedener Inhibitoren sowie durch

Experimente unter Energieblockade untersucht werden. Zur besseren Einordnung der erhaltenen Resultate werden diese Experimente zusätzlich mit dem P-gp-Modellarzneistoff Rhodamin 123 durchgeführt.

Ofloxacin zeigt, obwohl es einem aktiven auswärtsgerichteten Transport-mechanismus unterliegt, eine hohe Bioverfügbarkeit, sowie eine sehr gute Gewebegängigkeit. Die bisher in Caco-2 Zellmodellen ermittelten Permeations-koeffizienten in absorptiver Richtung sind aufgrund der starken Sekretion eher gering. Die Kombination aus geringen in vitro ermittelten Permeationskoeffizienten trotz einer guten Bioverfügbarkeit in vivo, ist häufig auf die Beteiligung eines Carriers zurückzuführen (Artursson et al., 1996). Aus diesem Grund liegt ein weiterer Aspekt dieser Arbeit in der Untersuchung und möglichen Identifizierung eines aktiven oder aber ATP-unabhängigen Carriers, der die Absorption von Ofloxacin unterstützt.

Die Durchführung der transzellulären Permeationsstudien hat den Nachteil, dass nur der Gesamteffekt der Permeation durch beide Membranen der Epithelzellen experimentell zugängig ist, da der Probenzug jeweils an einer der beiden Epithelseiten erfolgt. Die Transportgeschwindigkeit durch die gegenüberliegenden Membranen kann dabei unterschiedlich sein, wobei der langsamere Prozess immer den schnelleren maskiert. Aus diesem Grund soll der Transport über die einzelnen Membranen isoliert voneinander untersucht werden, um so bessere Aussagen treffen zu können. Dazu dienen sogenannte Uptake-Experimente, bei denen die Monolayer von jeweils einer Seite mit Arzneistofflösung inkubiert werden, um anschließend die intrazellulär akkumulierte Arzneistoffmenge zu bestimmen. Die Schwierigkeit liegt in der Quantifizierung sehr kleiner intrazellulärer Arzneistoffkonzentrationen. In der vorliegenden Arbeit soll zunächst mit dem Modellarzneistoff Rhodamin 123 eine Methode entwickelt werden, die es ermöglicht die Zellen zu lysieren und aus dem Lysat die intrazelluläre Arzneistoffkonzentration zu bestimmen. Rhodamin hat den Vorteil, dass es fluorimetrisch mit einer sehr guten Empfindlichkeit detektierbar ist und darüber hinaus auch in ausreichendem Ausmaß intrazellulär angereichert wird. Um schwankende Zellzahlen bei den verwendeten Monolayern zu erfassen, wird eine Methode entwickelt, um den Gesamtproteingehalt des Lysats zu bestimmen. Mit dessen Hilfe ist es möglich, die erhaltenen Ergebnisse zu normieren und untereinander zu vergleichen. Die für Rhodamin entwickelte Methode soll dann schließlich auf Ofloxacin übertragen werden.

2 MATERIAL

2.1 ZELLKULTUR

In der vorliegenden Arbeit werden Caco-2 Zellen des Subklons TC7 verwendet. Die ursprüngliche Caco-2 Zelllinie wurde 1974 aus einem humanen Colon Adenokarzinom eines 72-jährigen Mannes gewonnen (Fogh et al., 1977). Alain Zweibaum isolierte aus einer späten Passage (#198) dieser Zelllinie 1986 den Subklon TC7 (Caro et al., 1995). Die Caco-2/TC7 Zellen wurden uns freundlicherweise von Prof. Dr. K.-W. Bock, Toxikologisches Institut, Eberhard-Karls-Universität Tübingen zur Verfügung gestellt.

2.2 MATERIAL UND GERÄTE FÜR DIE ZELLKULTUR

Tabelle 2-1 Medien und Reagenzien

Bezeichnung	Hersteller/Lieferant
Dulbecco's Modified Eagle Medium mit Glutamax-I (D-MEM)	Invitrogen GmbH
Dulbecco's Phosphate Buffered Saline (D-PBS)	Invitrogen GmbH
Fötales Kälberserum (FKS) bis August 2007 Herkunft: Südamerika, Batch No. 40F6245	Invitrogen GmbH
Fötales Kälberserum (FKS) ab August 2007 Herkunft: Frankreich, Batch No. 046K3395	Sigma Aldrich Chemie GmbH
Nicht-essentielle Aminosäuren (MEM NEAA)	Invitrogen GmbH
Gentamicin (50 mg/ml)	Invitrogen GmbH
Trypsin-EDTA (0,25 %)	Invitrogen GmbH
Recovery Cell Culture Freezing Medium	Invitrogen GmbH
Rinder-Serum Albumin (BSA)	Paesel + Lorei Pharma GmbH

Tabelle 2-2 Material und Geräte

Bezeichnung	Hersteller/Lieferant
Zellkulturflasche Nunclon (83 cm^2) mit Filterkappe	Nunc GmbH & Co. KG
Zellkulturflasche Cellbind (25 cm^2) mit Filterkappe	Corning B. V.
Transwell Inserts Nr. 3401, Polycarbonatmembran, Porengröße 0,4 µM	Corning B. V.
Multiwell-Platten, 12 well, PS	Corning B. V.
Kryoröhrchen, 1,8 ml	Nunc GmbH & Co. KG
PP-Reaktionsgefäße, 1,5 ml	VWR international
PP-Röhrchen, 15 ml, steril	Greiner Bio-One GmbH
PP-Röhrchen, 50 ml, steril	Greiner Bio-One GmbH
Mikroplatten 96 well	Greiner Bio-One GmbH
Pipetten, 10 ml, steril	Greiner Bio-One GmbH
Pipetten, 25 ml, steril	Greiner Bio-One GmbH
Zählkammer (Neubauer-improved: Kammertiefe 0,1 mm, gemäß DIN 12874)	Paul Marienfeld-GmbH & Co. KG
Deckgläser (24 x 32 mm)	Menzel Gläser GmbH & Co. KG
Skalpell mit Klinge	C. Bruno Bayha GmbH

2.3 CHEMIKALIEN UND LÖSUNGSMITTEL

Tabelle 2-3 Wirkstoffe

Bezeichnung	Hersteller/Lieferant
Ofloxacin (Racemat)	Sigma Aldrich Chemie GmbH
Rhodamin 123 Hydrat	Sigma Aldrich Chemie GmbH
Verapamil Hydrochlorid ≥ 99 %	Sigma Aldrich Chemie GmbH
Chinidin ≥ 97 %	Sigma Aldrich Chemie GmbH
Natriumazid purum p. a.	Fluka
Fluorescein-Natrium	Fluka
Probenecid ≥ 98 %	Sigma Aldrich Chemie GmbH
Enrofloxacin ≥ 98 %	Fluka
Naringin ≥ 95 %	Fluka

Tabelle 2-4 Antikörper und Hilfsstoffe für die Immunfluoreszenz

Bezeichnung	Hersteller/Lieferant
Alexa Fluor 488 Goat Anti-Mouse IgG_1	Molecular Probes
Alexa Fluor 555 Goat Anti-Mouse IgG_1	Molecular Probes
DABCO (1,4-Diazabicyclo[2.2.2]octan)	Sigma Aldrich Chemie GmbH
DAPI (4',6-Diamidino-2-phenylindol-dihydrochlorid)	Sigma Aldrich Chemie GmbH
Glycergel Mounting Medium	Dako Deutschland GmbH
Glycerol p. a.	Carl Roth GmbH & Co. KG
Mouse Anti-α-Tubulin	Zymed Laboratories
Eselnormalserum	Dianova GmbH
Paraformaldehyd	Carl Roth GmbH & Co. KG
Triton X-100	Sigma Aldrich Chemie GmbH

Eine ausführliche Auflistung der weiteren verwendeten Geräte und Chemikalien befindet sich im Anhang unter Kapitel 8.3.

2.4 KAPILLARELEKTROPHORESE – APPARATIVER AUFBAU

Der Aufbau der Kapillarelektrophorese ist sehr einfach. Sie besteht aus einer an beiden Seiten offenen Quarzkapillare, die in Puffergefäße eintaucht. Über Platinelektroden kann mit Hilfe einer Hochspannungsquelle eine Gleichspannung angelegt werden. Nach Injektion der zu trennenden Analytmoleküle wandern diese dann entsprechend ihrer elektrophoretischen Mobilität in der Kapillare. Die Detektion erfolgt über einen UV-Detektor durch ein Sichtfenster in der Kapillare.

Tabelle 2-5 Kapillarelektrophorese – apparativer Aufbau

Bezeichnung	Hersteller/Lieferant
Beckman P/ACE System 5500	Beckman Coulter GmbH
UV-Detektor für Beckman P/ACE 5500	Beckman Coulter GmbH
eCAP Capillary Cartridge with 100 x 800 µM Aperture	Beckman Coulter GmbH
eCAP Capillary Cartridge Rebuild Kit	Beckman Coulter GmbH
CE-Kapillare 3x1 m x 0,05 mm	Macherey-Nagel GmbH & Co. KG
Software: Beckman P/ACE Station Version 0.4	Beckman Coulter GmbH

2.5 DATENVERARBEITUNG

2.5.1 Hardware

Prozessor: Intel Core Duo Processor T2300, 1.66 GHz

Arbeitsspeicher: 1GB DDR2 SDRAM (533 MHZ)

Festplatte: 100 GB

2.5.2 Software

Tabelle 2-6 Software

Software	Hersteller/Lieferant
Microsoft Windows XP	Microsoft GmbH
Microsoft Office Word 2003	Microsoft GmbH
Microsoft Office Excel 2003	Microsoft GmbH
Microsoft Office Powerpoint 2003	Microsoft GmbH
GraphPad Prism 4	GraphPad Software, Inc.
Isis Draw 4.5	MDL Information Systems GmbH
Adobe 7.0 Professional	Adobe Sytems GmbH
Adobe Photoshop 5.0	Adobe Sytems GmbH

3 METHODEN

3.1 METHODEN DER ZELLKULTUR

3.1.1 Allgemeine Kultivierung der Caco-2/TC7 Zellen

Alle Arbeiten in Zusammenhang mit der Kultivierung der Caco-2/TC7 Zellen finden unter aseptischen Bedingungen in einer Sicherheitswerkbank statt. Die Kultivierung der Zellen erfolgt bei 37 °C mit 5 % Kohlendioxid Sättigung und 95 % relativer Luftfeuchtigkeit. Als Wachstumsmedium dient D-MEM, welches mit 10 % fötalem Kälberserum, 1 % nicht-essentiellen Aminosäuren und 0,1 % Gentamicin angereichert wird. Das Medium wird dreimal in der Woche gewechselt, außerdem 24 Stunden nach dem Auftauen oder Subkultivieren der Zellen, sowie am Tag vor dem Versuch.

Ein Vorrat verschiedener Passagen der Caco-2 Zellen wird in flüssigem Stickstoff gelagert und kann so nach Bedarf kultiviert werden. Zur Präkultivierung wird eine Passage aufgetaut und mit frischem Wachstumsmedium in eine 25 cm^2 Cellbind Zellkulturflasche überführt. Alle weiteren Subkultivierungen finden in 83 cm^2 Zellkulturflaschen statt.

Die Zellen werden nach Erreichen von etwa 80 % Konfluenz subkultiviert, da bei höherer Konfluenz die Zellen stärker an den Flaschenboden adhärieren. Dies würde zur Selektion weniger adhärenter Zellen führen, da sich diese beim Umsetzen schneller und in größerem Ausmaß ablösen lassen. Mit fortlaufender Passage ändert sich infolgedessen der Phänotyp der Zellen (Artursson et al., 1996). Da eine gewisse Selektion nicht verhindert werden kann, werden für diese Arbeit nur Zellen der Passagen 35-52 verwendet.

Zur Subkultivierung wird zunächst das Wachstumsmedium entfernt und die Zellkulturflasche zweimal mit D-PBS gewaschen, so dass anschließend die Zellen mit 0,0625 % Trypsin/0,0095 % EDTA vom Flaschenboden und voneinander abgelöst werden können. Nach etwa 5 Minuten im Brutschrank sind die Zellen vereinzelt und können in frischem Medium suspendiert werden, hierdurch erfolgt gleichzeitig die Inaktivierung des Trypsins. Die Zellen werden in einer Zentrifuge bei 1300 rpm für 5 Minuten zentrifugiert und das so erhaltene Zellpellet kann nun in 10 ml frischem Medium resuspendiert werden. Von dieser Zellsuspension wird mit

Hilfe einer Zählkammer die Zellzahl ermittelt. Die Zellen können nach Verdünnung in einer Konzentration von 10000 Zellen/ml in einer neuen Zellkulturflasche weiter kultiviert werden oder in einer Aussaatdichte von 60000 Zellen/cm^2 in Transwell-Einsätze ausgesät werden. Für die immunchemischen Experimente werden Deckgläser in die Vertiefung von 6-Well-Platten eingebracht und die Zellen (60000) auf diesen ausgesät. Jedes Well wird anschließend mit 3 ml Wachstumsmedium befüllt.

An dieser Stelle können die Zellen auch zur Bevorratung eingefroren und so in flüssigem Stickstoff über lange Zeiträume gelagert werden. Zum Einfrieren wird das Zellpellet, das durch die Zentrifugation erhalten wird, nicht in normalem Medium, sondern in 10 ml eiskaltem Einfriermedium resuspendiert. Dieses Einfriermedium enthält 10 % DMSO, welches die Bildung von Eiskristallen und damit die Zerstörung der Zellmembranen während des Einfrierprozesses verhindert. Da DMSO bei Raumtemperatur zytotoxisch ist, muss mit vorgekühltem Einfriermedium und sehr zügig gearbeitet werden. Die erhaltene Zellsuspension wird zu gleichen Teilen in sechs Kryoröhrchen überführt, die sofort in eine mit Eis gefüllte Styroporbox gelegt werden. Diese Box wird für 24 Stunden in einer -70 °C Gefriertruhe gelagert, um am nächsten Tag in den Lagerbehälter mit flüssigem Stickstoff überführt zu werden.

3.1.2 Durchführung der Permeationsstudien

3.1.2.1 Transwell-Filterkammersyteme

Zur Durchführung der Permeationsstudien werden die Zellen in Transwell-Filter-kammersysteme, wie in Kapitel 3.1.1 beschrieben, ausgesät. Die Polycarbonatmembranen der Filtereinsätze haben Porendurchmesser von 0,4 µm und eine Filterfläche von 1,13 cm^2. Die einzelnen Transwells befinden sich in den Vertiefungen einer 12-Well-Platte. Durch den Filter mit den darauf gewachsenen Zellen wird das Well in zwei sogenannte Kompartimente geteilt (Abbildung 3-1). Oben befindet sich das apikale Kompartiment, welches der dem Darmlumen zugewandten Seite des Epithels entspricht, unten ist das basolaterale Kompartiment, das die den Blutgefäßen zugewandte Seite darstellt. Das Volumen der apikalen Seite beträgt 0,5 ml, das basolaterale Kompartiment fasst ein Volumen von 1,5 ml.

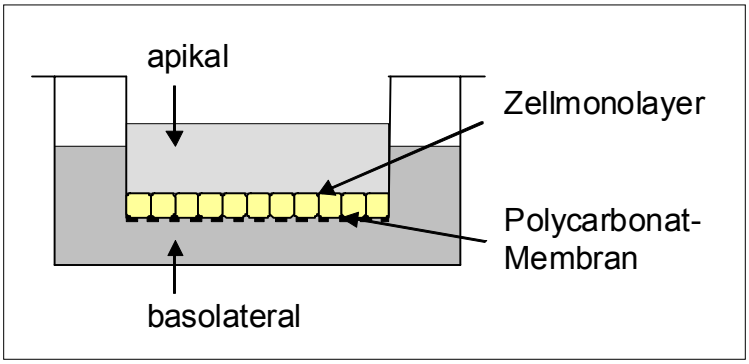


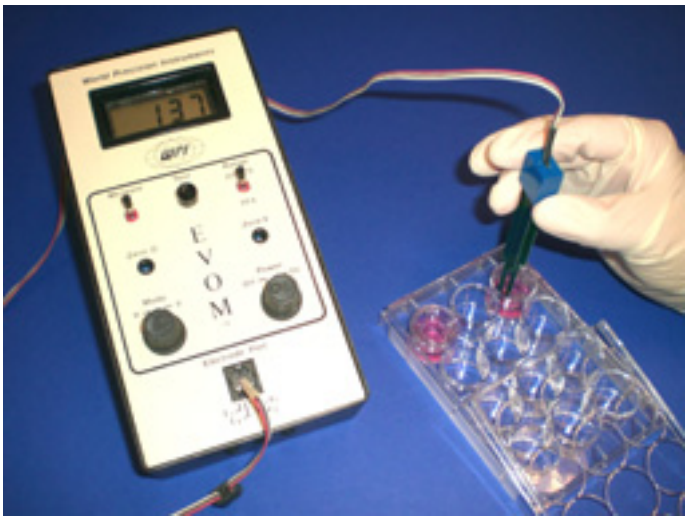
Abbildung 3-1 Schematische Darstellung eines Transwell-Filterkammersystems

Nach der Aussaat der Caco-2/TC7 Zellen auf die Filter bilden sich innerhalb von 21 Tagen dichte, polarisierte Zellmonolayer (Pinto et al., 1983). Die ausdifferenzierten Zellen besitzen alle für das Dünndarmepithel charakteristischen Enzyme und Transporter (Artursson et al., 1993).

3.1.2.2 Bestimmung des transepithelialen elektrischen Widerstandes

Die Permeationsstudien werden an Tag 21-28 nach dem Aussäen durchgeführt. Am Tag vor dem Versuch wird das Medium erneut gewechselt, um direkt im Anschluss den transepithelialen elektrischen Widerstand (TEER), den Widerstand gegenüber dem Ionenfluss über den Zellmonolayer, zu bestimmen. Der Ionenfluss durch die Zellmonolayer verläuft großteils über die Tight Junctions, deshalb ist der TEER ein Maß für die Dichtigkeit der Tight Junctions und damit für die Integrität der Zellmonolayer (Artursson et al., 1996).

Zur Bestimmung des TEER dient ein Voltohmmeter mit sogenannten Chopstick-Elektroden (Abbildung 3-2).



A

B

Abbildung 3-2 TEER-Messung mit dem EVOM Voltohmmeter (A) und Chopstick-Elektrode (B)

Der TEER-Wert ergibt sich aus dem effektiven Widerstand des Zellmonolayers multipliziert mit der Fläche des Filters bzw. des Zellmonolayers (1,13 cm^2). Der effektive Widerstand berechnet sich aus der Differenz des Widerstands eines unbewachsenen Polycarbonatfilters (~ 130 Ω) und des tatsächlich ermittelten Messwertes (*Gleichung 3*) (Tavelin et al., 2002).

$$TEER = (Messwert - 130) \cdot 1{,}13 \quad [\Omega \cdot cm^2] \qquad \textit{Gleichung 3}$$

Beobachtet man den TEER-Wert über die Zeit von der Aussaat bis zum Versuchstag, so ist dieser zu Beginn sehr niedrig und erreicht typischerweise nach 10-14 Tagen mit Erreichen der Konfluenz sein Maximum (Awadallah 2003). In unserem Labor liegen diese TEER-Werte zwischen 190-240 $\Omega \cdot cm^2$. Der TEER wird als Qualitätsstandard für die Monolayer verwendet und von jedem Transwell am Tag vor dem Versuch bestimmt. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit werden nur Monolayer mit TEER-Werten ≥ 226 $\Omega \cdot cm^2$ verwendet (Awadallah 2003).

3.1.2.3 Transportpuffer

Alle Permeationsversuche finden in Hank's Puffer, einer physiologischen Pufferlösung, deren Zusammensetzung in Tabelle 3-1 aufgelistet ist, statt. Die Substanzen werden in der erforderlichen Menge destilliertem Wasser gelöst, der pH-Wert wird mit NaOH auf pH 7,4 eingestellt und die Osmolarität mit Hilfe des Halbmikroosmometers überprüft (300 ± 25 mosmol/kg).

Tabelle 3-1 Zusammensetzung Hank's Puffer

Substanz	Menge (g/l)
Calciumchlorid	0,14
Kaliumchlorid	0,40
Kaliumdihydrogenphosphat	0,06
Magnesiumchlorid-Hexahydrat	0,1
Magnesiumsulfat-Heptahydrat	0,1
Natriumchlorid	8,00
Di-Natriumhydrogenphosphat-Heptahydrat	0,09
D-Glucose	1,00
HEPES	5,07

3.1.2.4 Permeationsstudien

Die Versuche werden alle sowohl in absorptiver Richtung (apikal nach basolateral, AP-BL) als auch in umgekehrter, sekretorischer Richtung (basolateral nach apikal, BL-AP), durchgeführt.

Zu Beginn des Experiments wird das Wachstumsmedium aus beiden Kammern der Transwells abgesaugt und jedes Transwell zweimal mit auf 37 °C temperiertem Hank's Puffer gewaschen. Anschließend werden die Zellmonolayer im Schüttelwasserbad bei der gleichen Temperatur für 30 Minuten im Hank's Puffer äquilibriert. Bei den energieabhängigen Experimenten, bei denen Natriumazid und 2-Deoxyglucose zum Einsatz kommen, werden diese Inhibitoren schon bei der Äquilibrierung zugesetzt.

Nach der Äquilibrierung wird der Transportpuffer auf beiden Seiten entfernt und je nach Transportrichtung werden die Kammern neu befüllt. Für Experimente in absorptiver Richtung wird das apikale Kompartiment mit Arzneistofflösung befüllt, das basolaterale Kompartiment mit reinem Transportpuffer, bei Versuchen in sekretorischer Richtung entsprechend umgekehrt.

Für die Untersuchung der Konzentrationsabhängigkeit von Ofloxacin werden über zwei Stunden alle 20 Minuten 200 µl Proben aus dem Akzeptorkompartiment in 1,5 ml Eppendorf-Reaktionsgefäße gezogen und durch temperierten Transportpuffer ergänzt. Unter Einsatz von Inhibitoren wird die Versuchszeit auf eine Stunde

verkürzt, das Probenzugsintervall beträgt hier 15 Minuten. Bei den Experimenten mit Rhodamin 123 beträgt die Versuchszeit 80 Minuten, der Probenzug findet alle 20 Minuten statt, wobei die Proben, falls erforderlich nach Verdünnung, direkt in eine 96-Well-Platte gezogen werden. Darüber hinaus wird die Konzentration der eingesetzten Arzneistofflösung, also die Startkonzentration, ermittelt. Nach Versuchende wird jedem Well eine Endprobe aus dem Donorkompartiment entnommen, anhand derer die Wiederfindung des eingesetzten Arzneistoffs überprüft wird. Die Proben werden direkt im Anschluss analysiert oder bei -20 °C bis zur Analyse gelagert.

3.1.2.5 Überprüfung der Integrität mit Fluorescein-Natrium

Im Anschluss an die Experimente wird mit jeden Transwell ein weiteres Transport-experiment mit Fluorescein-Natrium (Abbildung 3-2) durchgeführt. Fluorescein-Natrium liegt bei pH 7,4 geladen und damit hydrophil vor und wird überwiegend passiv parazellulär transportiert. Somit eignet es sich zur Überprüfung der Dichtigkeit der Zellmonolayer (Artursson et al., 1996).

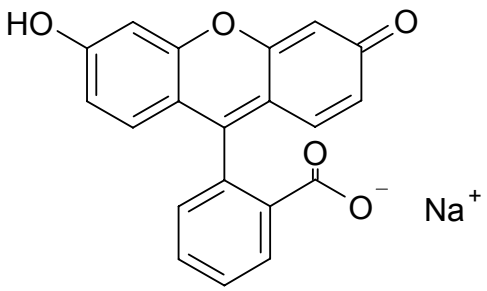


Abbildung 3-3 Fluorescein-Natrium

Die Transwells werden analog der regulären Transportexperimente befüllt, wobei die Untersuchung nur in absorptiver Richtung (AP-BL) durchgeführt wird. Die Einsatzkonzentration von Fluorescein-Natrium ist 100 µg/ml in Hank's Puffer pH 7,4. Nach 60 Minuten wird eine Probe aus dem Akzeptorkompartiment entnommen und in einer 96-Well-Platte am Plattenreader fluorimetrisch analysiert.

Der apparente Permeationskoeffizient (3.1.2.6) darf $1 \cdot 10^{-6}$ cm/s nicht überschreiten, um die Integrität des Zellmonolayers zu gewährleisten (Artursson et al., 1996). Daraus lässt sich ein Grenzwert für die Konzentration im Akzeptorkompartiment nach 60 Minuten von 0,26 µg/ml Fluorescein-Natrium berechnen.

3.1.2.6 Berechnung des apparenten Permeationskoeffizienten (P_{app})

Ein gebräuchlicher Parameter zur Beschreibung der Durchlässigkeit (Permeabilität) eines Zellmonolayers für eine bestimmte Substanz ist der sogenannte scheinbare (apparente) Permeationskoeffizient (P_{app}). Er gibt Auskunft über die Absorption eines Arzneistoffes über das entsprechende Epithel.

Der P_{app} wird durch Auswertung der aus den Permeationsstudien erhaltenen Daten mit Hilfe der Gleichung 4 berechnet.

$$P_{app} = \frac{dc}{dt} \cdot \frac{V}{A \cdot c_0} \left[cm/s\right] \qquad \textit{Gleichung 4}$$

Hierbei entspricht dc/dt [$\mu g \cdot ml^{-1} \cdot s^{-1}$] der transportierten Arzneistoffmenge. Diese berechnet sich durch lineare Regression der kumulierten Arzneistoffkonzentration über der Zeit. V ist das Volumen des Akzeptorkompartiments (1,5 ml für Versuche von AP-BL, 0,5 ml für Versuche in die Gegenrichtung), A ist die Fläche des Monolayers (1,13 cm^2) und c_0 die eingesetzte Startkonzentration. Substanzen mit Permeationskoeffizienten unter $1 \cdot 10^{-6}$ cm/s gelten als schlecht permeabel, zwischen 1 und $10 \cdot 10^{-6}$ cm/s als moderat permeabel und Stoffe mit Koeffizienten über $10 \cdot 10^{-6}$ cm/s sind sehr gut permeabel (Yee, 1997).

3.1.3 Untersuchung der Arzneistoffaufnahme in die Zellen

Um die transzelluläre Arzneistoffpermeation besser verstehen zu können, wird eine Methode entwickelt, mit der die im Zellinnern akkumulierte Arzneistoffmenge bestimmt werden kann. Dies ermöglicht es, den Transport über die apikale bzw. die basolaterale Membran weitestgehend unabhängig voneinander untersuchen zu können.

3.1.3.1 Durchführung der Uptake-Experimente

Um die Arzneistoffanreicherung in der Zelle zu untersuchen, werden wie bei den Permeationsversuchen, auf Transwells ausgesäte Caco-2/TC7 Zellen zwischen Tag 21 bis 28 nach der Aussaat verwendet. Um die Integrität der Monolayer zu überprüfen wird auch hier einen Tag vor dem Versuch nochmals das Wachstumsmedium gewechselt und sofort im Anschluss erfolgt die Bestimmung der TEER-Werte (3.1.2.2).

Die Zellmonolayer werden zu Beginn des Versuchs 30 Minuten lang im Hank's Transportpuffer äquilibriert. Anschließend wird der Puffer auf beiden Seiten entfernt und je nach Untersuchungsrichtung durch Arzneistofflösung im Donorkompartiment bzw. Hank's Puffer im Akzeptorkompartiment ersetzt. Der Ansatz wird für 60 Minuten in das auf 37 °C temperierte Schüttelwasserbad gegeben.

Von den eingesetzten Arzneistofflösungen werden Proben genommen, um die Startkonzentrationen überprüfen zu können.

Nach Ende der Versuchszeit wird die Multiwellplatte mit den Transwell-Einsätzen auf ein eiskaltes Kühlkissen gestellt und jeder Monolayer zügig zweimal mit eiskaltem Hank's Puffer gespült. Anschließend werden die Filter mit den darauf befindlichen Zellen mit Hilfe eines Skalpells aus den Transwell-Einsätzen herausgeschnitten und in ein 1,5 ml Eppendorff-Reaktionsgefäß überführt. Jeder Filter wird mit 200 µl 1 N NaOH versetzt und 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Im Anschluss folgt eine Ultraschallbehandlung mit einer Sonotrode (Amplitude 120 µm, Schallleistung 600 W/cm^2) für 40 Sekunden. Jeder Ansatz wird nun mit 200 µl 1 N HCl neutralisiert und nochmals homogenisiert.

Jedem so gewonnenen Zellextrakt werden zwei Proben zu je 50 µl für die Proteinbestimmung (3.1.3.2) entnommen. Zell- und Filterbestandteile werden abzentrifugiert (13000 rpm, 5 min) und aus dem Überstand eine 200 µl Probe zur Bestimmung der Arzneistoffkonzentration entnommen. Die Proben werden direkt im Anschluss analysiert oder bei -20 °C bis zur Analyse gelagert.

3.1.3.2 Proteinbestimmung mit der Methode nach Lowry

Die Proteinbestimmung nach Lowry ist eine einfache und zuverlässige Methode zur Konzentrationsbestimmung löslicher sowie unlöslicher Proteine (Lowry et al., 1951). Die Methode beruht auf der sogenannten Biuret-Reaktion, bei der Cu^{2+}-Ionen in alkalischer Lösung mit den Peptidbindungen der Proteine eine dem Biuret-Komplex ähnliche Verbindung eingehen. In einem zweiten Schritt wird Folin-Ciocalteu's Phenolreagenz zugesetzt. Das darin enthaltene Molybdat und Wolframat reduziert die komplexierten Cu^{2+}-Ionen. Durch die so entstandenen Cu^{+}-Ionen kommt es zum Farbumschlag von gelb nach blau. Der blaue Cu^{+}-Protein-Komplex wird photometrisch mit Hilfe des Plattenreaders (Bio-Tek SynergyHT) bei einer

Wellenlänge von 725 nm bestimmt. Mit einer mit Rinder-Serum Albumin (BSA) erstellten Kalibriergeraden wird die Proteinmenge der Probe berechnet.

Zur Bestimmung werden die 50 µl Zellsuspensionsproben mit 1 ml Lowry-Reagenz (2 % Na_2CO_3 in 1 N NaOH-Lösung; 0,2 % K-Na-Tartrat-Lösung; 1 % $CuSO_4$*$5H_2O$-Lösung 100:1:1) versetzt und 10 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Nun wird 100 µl Folin-Ciocalteu's Phenolreagenz (1:3 verdünnt mit Aqua bidest) dazugegeben und kräftig geschüttelt. Nach weiteren 30 Minuten werden die Proben auf eine 96-Well-Platte überführt und am Plattenreader vermessen. Als Blindwert dient eine 50 µl Probe aus Aqua bidest. Die BSA Proben zur Erstellung der Kalibriergeraden in einem Konzentrationsbereich von 0,25 – 1 mg/ml werden analog behandelt. Es erfolgt eine Doppelbestimmung jeder Probe.

3.1.3.3 Auswertung der Uptake-Experimente

Die aus den analysierten Proben erhaltenen Konzentrationen werden unter Berücksichtigung der Verdünnungsschritte umgerechnet in die absolut aufgenommene Arzneistoffmenge. Diese wird auf die in der Probe vorhandene Proteinmenge, welche als Maß für die Anzahl an Zellen dient, normiert und als µg Uptake/mg Protein angegeben.

3.2 UNTERSUCHUNGEN AM CYTOSKELETT

Das Cytoskelett ist an einer Vielzahl von Transportvorgängen durchs Cytosol beteiligt. Es trägt beispielsweise zum Zellorganelltransport oder zum Vesikeltransport für die Endo- bzw. Exocytose bei. Hieraus leitet sich die Frage ab, wie Arzneistoffmoleküle das Cytosol durchqueren. Bisher geht man davon aus, dass dies über einfache Diffusion abläuft. Denkbar wäre allerdings auch eine Beteiligung des Cytoskeletts. Die Moleküle könnten entlang der Cytoskelettfilamente durch das Cytosol geleitet werden.

Um den Einfluss des Cytoskeletts zu untersuchen, soll eine Möglichkeit gefunden werden, dieses möglichst effektiv zu zerstören, um anschließend die Arzneistoffpermeation an Zellen ohne intaktes Cytoskelett zu untersuchen.

3.2.1 Aufbau des Cytoskeletts

Das Cytoskelett ist ein aus Proteinen bestehendes Netzwerk auf- und abbaubarer fadenförmiger Strukturen, sogenannter Filamente, im Cytosol der Zellen. Es übernimmt viele wichtige Funktionen in der Zelle. In erster Linie gibt es mechanische Stabilität, darüber hinaus dient es der Fortbewegung der Zellen sowie dem intrazellulären Transport.

Man unterscheidet drei Klassen von Cytoskelettfilamenten, die jeweils aus unterschiedlichen Proteinen aufgebaut sind und deshalb verschiedene Aufgaben übernehmen. Dies sind die Intermediärfilamente, die Mikrotubuli und die Actinfilamente (Abbildung 3-4) (Alberts, 2005).

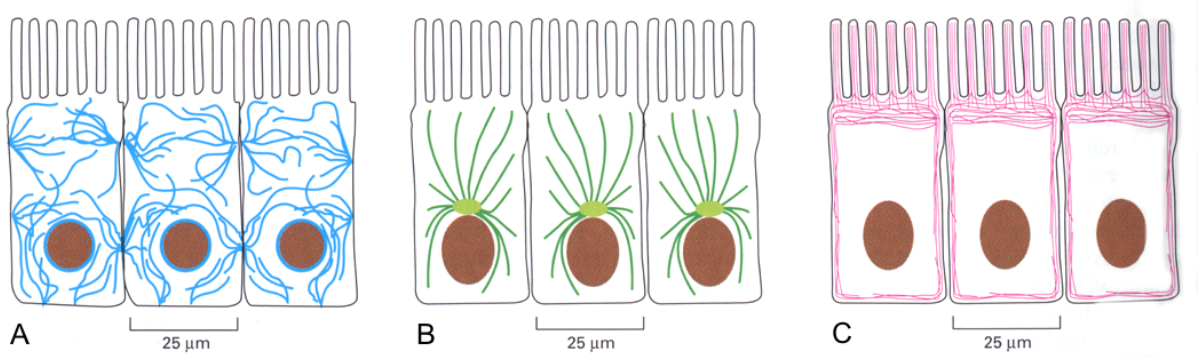


Abbildung 3-4 Cytoskelettfilamente am Beispiel von Darmepithelzellen: (A) Intermediärfilamente; (B) Mikrotubuli; (C) Actinfilament (aus Alberts 2005)

Intermediärfilamente sind aufgebaut aus unterschiedlichen Proteinmonomeren (z. B. Keratin) und dienen der mechanischen Stabilisierung der Zellen. Sie bilden ein dichtes Netzwerk innerhalb der Membranen der Kernhülle und durchziehen das Cytosol bis zu ihren Verankerungsstellen in der Zellmembran.

Mikrotubuli sind Hohlröhren mit einem Durchmesser von 25 nm, die aus polymerisierten α- und ß-Tubulineinheiten bestehen. Sie sind mit einem Ende im Centrosom verankert, das andere Ende kann sich durch Verlängerung oder Verkürzung zur Zellperipherie hin bewegen bzw. von dort zurückziehen, so dass ein dynamisches Netzwerk an Filamenten entsteht. Das Mikrotubuli-Skelett strahlt damit vom Zellzentrum zur Zelloberfläche aus und erlaubt die Positionierung diverser Strukturen im Cytosol. Mit Hilfe bestimmter Motorproteine wie Dynein und Kinesin, die an die einzelnen Tubulineinheiten der Filamente binden und sich an diesen

entlang bewegen können, sind die Mikrotubuli in der Lage, Zellorganellen oder Vesikel durch das Cytosol zu transportieren. Eine weitere Aufgabe liegt in der Ausbildung des Spindelapparats für die Zellteilung (Abbildung 3-5).

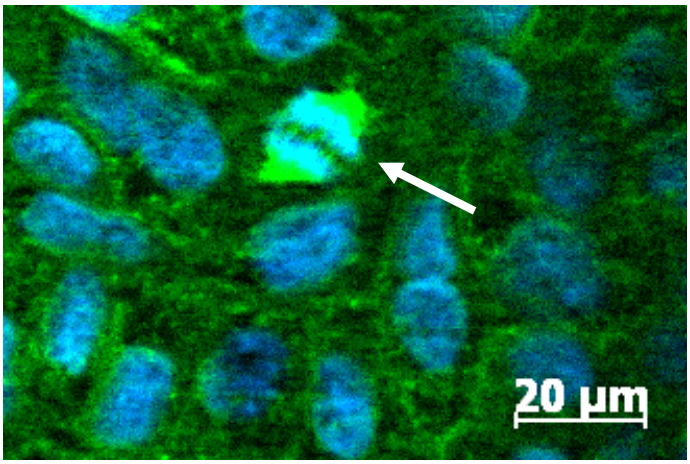


Abbildung 3-5 Darstellung einer Zellteilung; Mikrotubuli-Färbung mit Mouse Anti-α-Tubulin IgG_1 (grün durch Alexa 488 konjugierten Sekundärantikörper) und Kernfärbung mit DAPI (blau)

Actinfilamente sind Polymere, die aus einzelnen Actinmonomeren aufgebaut sind. Sie befinden sich hauptsächlich direkt unter der Zellmembran, mit der sie zusammen den sogenannten Zellcortex bilden. Auf diese Weise stabilisieren sie die äußere Form der Zelle und ermöglichen endo- und exocytotische Prozesse. Im Zellcortex sind Membranproteine, also auch Transporter, verankert und werden an ihrem Platz gehalten. Darüber hinaus ist der Zellcortex an der Ausbildung der Tight Junctions beteiligt, da über die Actinfilamente im Zellcortex die Proteine der Tight Junctions fixiert werden.

3.2.2 Möglichkeiten der Hemmung

Aufgrund der unterschiedlichen Funktionen der einzelnen Cytoskelettfilamente ergeben sich verschiedene Angriffspunkte, um das Cytoskelett in seiner Funktion zu beeinträchtigen und anschließend mittels Permeationsversuchen dessen Einfluss auf die transzelluläre Permeabilität zu untersuchen. Dabei ist es nicht zweckmäßig, die Intermediärfilamente zu modulieren, da diese rein mechanische Bedeutung aufweisen. Actinfilamente hingegen tragen zwar zum intrazellulären Transport bei, sind aber gleichzeitig an der Ausbildung der Tight Junctions beteiligt. Eine Beeinträchtigung des Actincytoskeletts führt infolgedessen auf alle Fälle zu einer

Zunahme der Permeabilität durch die Monolayer. Daraus ergibt sich die Blockade des Mikrotubuliaufbaus als einzige mögliche Herangehensweise.

Man hat grundsätzlich zwei Möglichkeiten den Aufbau der Mikrotubuli zu stören. Auf der einen Seite gibt es Depolymerisationshemmstoffe wie beispielsweise Paclitaxel (Taxol), die dazu führen, dass die polymerisierten Filamente stabilisiert werden und so die Depolymerisation verhindert wird. Auf der anderen Seite stehen die Polymerisationshemmstoffe, die verhindern, dass sich die Tubulinmonomere zu Filamenten zusammenlagern. Zu ihnen gehört z. B. Colchicin. Für die zu untersuchende Fragestellung wird Colchicin als Inhibitor gewählt und kommt in einer Konzentration von 100 µM zum Einsatz. Die Monolayer werden für vier Stunden mit dem Inhibitor inkubiert (Gilbert und Rodriguez-Boulan, 1991).

Vorversuche mit unterschiedlichen Arzneistoffen (Ofloxacin, Ibuprofen, Propranolol und Theophyllin), bei denen die eingesetzten Monolayer mit Colchicin vorinkubiert wurden, haben gezeigt, dass es zu keiner Änderung der Permeabilität kommt. Durch immunchemische Anfärbung der Mikrotubuli soll deshalb die Effektivität des Inhibitors untersucht werden. Der eingesetzte Polymerisationshemmstoff Colchicin stabilisiert die Tubulinmonomere und verhindert deren Polymerisation zu Filamenten. Dies lässt sich mittels Fluoreszenzmikroskopie überprüfen.

3.2.3 Visualisierung der Mikrotubuli mit Immunfluoreszenz

Immunfluoreszenz macht Proteine mit Hilfe von fluoreszenzmarkierten Antikörpern sichtbar. Angefärbte Präparate können unter dem Fluoreszenzmikroskop mit entsprechenden Filtersets betrachtet werden. Mit Hilfe einer ApoTome-Einheit am Mikroskop ist das Erstellen von dreidimensionalen Aufnahmen möglich, indem optische Schnitte des Präparats aufgenommen werden.

Bei der in dieser Arbeit angewandten Färbetechnik handelt es sich um die sogenannte 2-Schritt indirekte Methode. Hierbei wird das Zielprotein, also die α-Tubulinuntereinheit mit einem unkonjugierten Primärantikörper (Mouse Anti-α-Tubulin IgG_1) markiert. Im zweiten Schritt bindet ein fluoreszenzmarkierter Sekundärantikörper, der gegen das Immunglobulin derjenigen Spezies gerichtet ist, aus der der Primärantikörper stammt (Goat Anti-Mouse-IgG_1 markiert mit Alexa 555). Um zu verhindern, dass der Sekundärantikörper auch an andere Strukturen des

Präparats bindet, müssen diese durch Behandlung des Präparats mit Normalserum der Spezies, aus der der Sekundärantikörper stammt, blockiert werden.

Um aussagekräftige Färbeergebnisse zu bekommen, müssen optimal verdünnte Antikörper verwendet werden. Zur Verdünnung dient eine Antikörper-verdünnungslösung, die Triton X-100 sowie Rinderserumalbumin (Bovine Serum Albumin-BSA) enthält. Triton X-100 macht die Zellmembranen durchlässig, damit die eingesetzten Antikörper das Zellinnere erreichen können. BSA sättigt freie Protein-Bindungsstellen ab, damit eine unspezifische Bindung der Antikörper verhindert wird.

Zunächst werden die Konzentrationen, in denen Primär- und Sekundärantikörper zum Einsatz kommen, ermittelt. Es hat sich gezeigt, dass eine Kombination des Primärantikörpers in einer 1:50 Verdünnung mit dem Sekundärantikörper in einer 1:1000 Verdünnung zum besten Resultat mit geringer unspezifischer Hintergrundfärbung aber dennoch starker spezifischer Anfärbung führt.

Neben den Mikrotubuli werden zur besseren Orientierung in der Zelle zusätzlich die Zellkerne, die sich im basalen Teil der Zellen befinden, mit DAPI (4’,6-Diamidino-2-phenylindol-dihydrochlorid) angefärbt.

Die Kultivierung von Zellen auf Deckgläsern ist für die anschließende Färbung am besten geeignet, da dieser Träger im Gegensatz zu den Transwell-Filtern die geringere Eigenfluoreszenz aufweist (Braun, 2007). Die Zellen werden vor Beginn der Färbeprozedur mit Paraformaldehyd (PFA) fixiert. PFA reagiert mit basischen Aminosäuren und führt so zu deren Quervernetzung.

Am Ende muss das fertig behandelte Präparat auf dem Objektträger fixiert („eingedeckt“) werden (Abbildung 3-6). Als Eindeckmedium dient Glycergel, dem das „Antifade“-Reagenz DABCO (1,4-Diazabizyclo-[2.2.2]-octan) zur Verhinderung des Ausbleichens zugesetzt wird. Das eingedeckte Präparat härtet über Nacht im Kühlschrank aus.

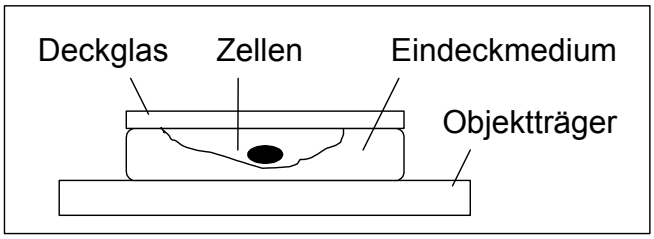


Abbildung 3-6 Schemazeichnung eines eingedeckten Präparates im Querschnitt

Eine Auflistung der eingesetzten Lösungen für die Durchführung der immunchemischen Färbungen sowie ein ausführliches Färbeprotokoll findet sich in Kapitel 8.3 und 8.4.

Die eingedeckten Präparate werden in einem abgedunkelten Raum mit Hilfe des Mikroskops AxioImager Z.1 unter Verwendung der in Tabelle 3-2 aufgeführten Filtersets und der ApoTome-Einheit fluoreszenzmikroskopisch betrachtet. Optische Schnitte, sogenannte Z-Stapel, werden mit einer Schichtdicke von 1 µm bestehend aus 10-20 Einzelschnitten, je nach Planarität des fixierten Präparates, aufgenommen. Bei Schnitten mit Schichtdicken kleiner als 1 µm besteht die Gefahr, dass das Präparat zu stark ausbleicht.

Tabelle 3-2 Eingesetzte Filtersets für die verwendeten Farbstoffe

Farbstoff	Farbe (Exzitation-/Emission-Maxima) [nm]	Filterset Nr.	Exzitation [nm]	Strahlen-teiler [nm]	Emission [nm]
DAPI	blau (358/463)	49	335-338	395	420-470
Alexa 555	rot (553/568)	43 HE	538-562	570	570-640

3.2.4 Ergebnisse der Hemmung der Mikrotubuli

Zur Untersuchung des Colchicin-Einflusses auf die Caco-2 Monolayer werden die auf den Deckgläsern kultivierten Zellen vor der Färbeprozedur für vier Stunden bei 37 °C im Brutschrank mit Colchicin in einer Konzentration von 100 µM in Hank's Transportpuffer inkubiert. Zur Kontrolle wird ein zweiter Monolayer für vier Stunden mit reinem Hank's Puffer behandelt. Die anschließende Färbung liefert die in Abbildung 3-7 dargestellten Ergebnisse.

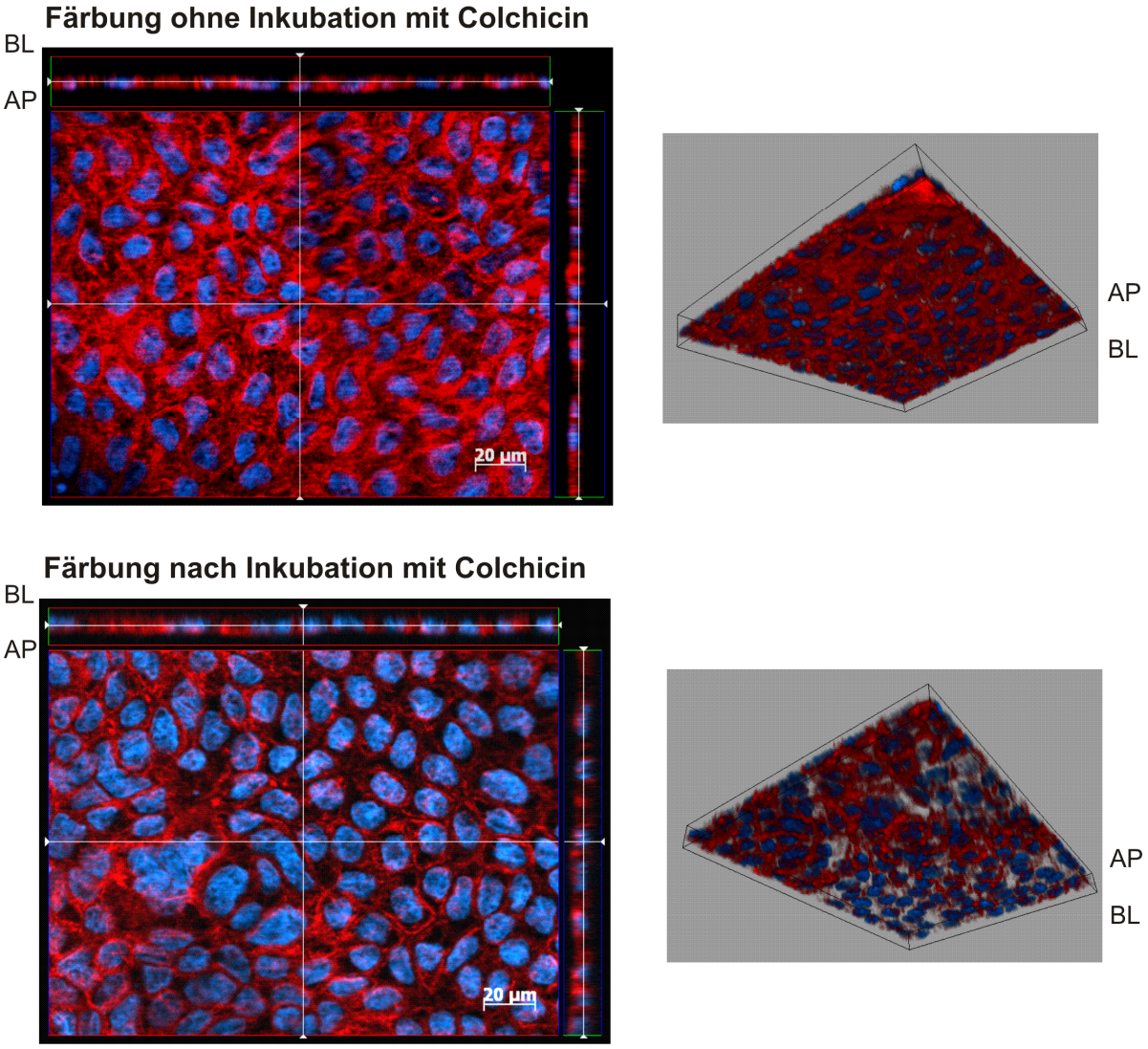


Abbildung 3-7 Einfluss von Colchicin auf die Ausbildung von Mikrotubuli. Schnittansichten (1 µm Schichtdicke) und 3D-Bilder der Monolayer. Darstellung der Mikrotubuli mit dem Antikörper Mouse Anti-α-Tubulin IgG_1 (rot durch Alexa 555 markierten Goat Anti-Mouse IgG_1) und der Zellkerne (blau durch DAPI-Färbung). AP – apikale Seite des Monolayers; BL – basolaterale Seite des Monolayers.

An der Anfärbung des unbehandelten Monolayers ist zu erkennen, dass die Mikrotubuli das ganze Cytosol durchziehen und die Zellkerne darin eingebettet sind. Die Inkubation mit Colchicin führt zu einer deutlichen Reduktion der vorhandenen Mikrotubuli, wobei vor allem an der 3D-Ansicht zu erkennen ist, dass einige Zellen noch eine deutliche Rotfärbung aufweisen. Durch die Colchicininkubation kommt es zu einer Stabilisierung der Tubulinmonomere, die sich infolgedessen nicht mehr zu Mikrotubuli zusammenlagern. Die Monomere werden wahrscheinlich während der

Färbeprozedur aus dem Zellinnern herausgewaschen. Colchicin führt folglich zu einer Reduktion der Mikrotubuli. In der eingesetzten Konzentration und Inkubationsdauer kommt es allerdings nicht zu einer vollständigen Depolymerisation der Strukturen. Es ist schwer, durch diese rein optische Begutachtung eine quantitative Aussage über die Effektivität der Inhibition zu treffen.

Die Untersuchung der Beteiligung des Cytoskeletts am transzellulären Transport ist durch die Zerstörung der Mikrotubuli und die anschließenden Durchführung von Permeationsstudien nicht zu realisieren. Die Funktionen des Cytoskeletts sind vielfältig und tragen eine wesentliche Rolle für die Überlebensfähigkeit der Zellen. Mit den hier gewählten Versuchsbedingungen ist es nicht möglich, eine vollständige Depolymerisation hervorzurufen. Längere Inkubation oder aber höhere Colchicinkonzentrationen führen dazu, dass die Integrität der Monolayer beeinträchtigt wird. Die Grundvoraussetzung für die Durchführung von transzellulären Permeationsversuchen ist somit nicht mehr gewährleistet. Aus diesem Grund wird die Untersuchung einer möglichen Beteiligung des Cytoskeletts am Arzneistofftransport durch das Cytosol nicht weiter untersucht.

3.3 ANALYTISCHE METHODEN

3.3.1 Validierung der analytischen Methoden

Die Validierung der analytischen Methoden erfolgt nach den Vorgaben der ICH Guideline Q2(R1). Hierin werden die folgenden Qualitätsmerkmale einer Validierung beschrieben.

Spezifität:

Hierunter versteht man, dass die zu bestimmende Substanz mit der jeweiligen analytischen Methode spezifisch neben anderen Probenbestandteilen bestimmt werden kann. Bei der Bestimmung mittels Kapillarelektrophorese bedeutet dies, dass die durch die beiden Enantiomere hervorgerufen Peaks, sowohl von denen des eingesetzten internen Standards als auch der eingesetzten Inhibitoren, getrennt sind. Für die fluorimetrische Bestimmung am Plattenreader muss ausgeschlossen werden, dass Probenbestandteile neben der zu bestimmenden Substanz bei der verwendeten Anregungs- und Emissionswellenlänge ein Signal hervorrufen.

Linearität:

Die Linearität beschreibt die Eignung einer analytischen Methode, Testwerte zu erhalten, welche proportional der Analytkonzentrationen sind. Zur Bestimmung der Linearität werden sowohl für die kapillarelektrophoretische Methode als auch für die Bestimmungen am Plattenreader sieben äquidistante Konzentrationen des Analyten jeweils sechsmal vermessen und daraus eine Kalibriergerade erstellt. Zur Überprüfung der Güte der Linearität werden das Bestimmtheitsmaß r^2 aus den Werten der linearen Regression sowie die Residuen der Kalibrierfunktion in y-Richtung und die sich daraus ergebende Verfahrensstandardabweichung herangezogen.

Richtigkeit:

Die Richtigkeit beschreibt den Grad der Übereinstimmung eines gemessenen Wertes mit dem wahren Wert. Sie wird überprüft, indem drei verschiedene Konzentrationen aus dem niedrigen, mittleren und hohen Konzentrationsbereich der Kalibriergeraden separat hergestellt und jeweils dreimal bestimmt werden. Aus den erhaltenen Messwerten wird mit Hilfe der zuvor ermittelten Kalibrierfunktion die Konzentration errechnet und diese als Prozent der jeweils erwarteten Konzentration angegeben. Die mittlere Wiederfindung sollte zwischen 98 - 102 % liegen.

Systempräzision:

Unter Systempräzision versteht man das Ausmaß der Streuung von Analysenergebnissen. Bestimmt wird die Systempräzision, indem man eine zu analysierende Probe mehrmals bestimmt und daraus die Standardabweichung sowie die relative Standardabweichung berechnet. Die Streuung der Werte soll nicht über 1 % liegen. Da für die Systempräzision im Falle der Ofloxacin-Bestimmung mit der Kapillarelektrophorese vor allem die Probenaufbereitung eine wesentliche Rolle spielt, werden für die Systempräzision fünf Proben aufbereitet, diese je dreimal gemessen und daraus die erforderlichen statistischen Daten ermittelt.

Nachweis- und Bestimmungsgrenze:

Nach ICH versteht man unter der Nachweisgrenze die Konzentration eines Analyten, die zwar noch detektiert, allerdings nicht mehr quantitativ bestimmt werden kann. Die Bestimmungsgrenze hingegen ist die Konzentration, ab der ein Analyt innerhalb der zuvor festgelegten Ergebnisunsicherheit quantitativ bestimmt werden kann. Beide

Grenzen ergeben sich aus der Steigung der Kalibrierfunktion und der Reststandardabweichung.

3.3.2 Bestimmung der Ofloxacin-Enantiomere mittels Kapillarelektrophorese

Die Konzentrationen der einzelnen Ofloxacin-Enantiomere werden mit einer enantioselektiven kapillarelektrophoretischen Methode bestimmt (Awadallah et al., 2003). Um die Empfindlichkeit dieser Methode zu erhöhen, wird die Probe elektrokinetisch injiziert. Da die aus den Zellversuchen erhaltenen Proben in Hank's Puffer gelöst vorliegen, müssen diese vor der Injektion aufbereitet werden, um die Puffersalze zu separieren (Abbildung 3-8).

3.3.2.1 Probenaufbereitung

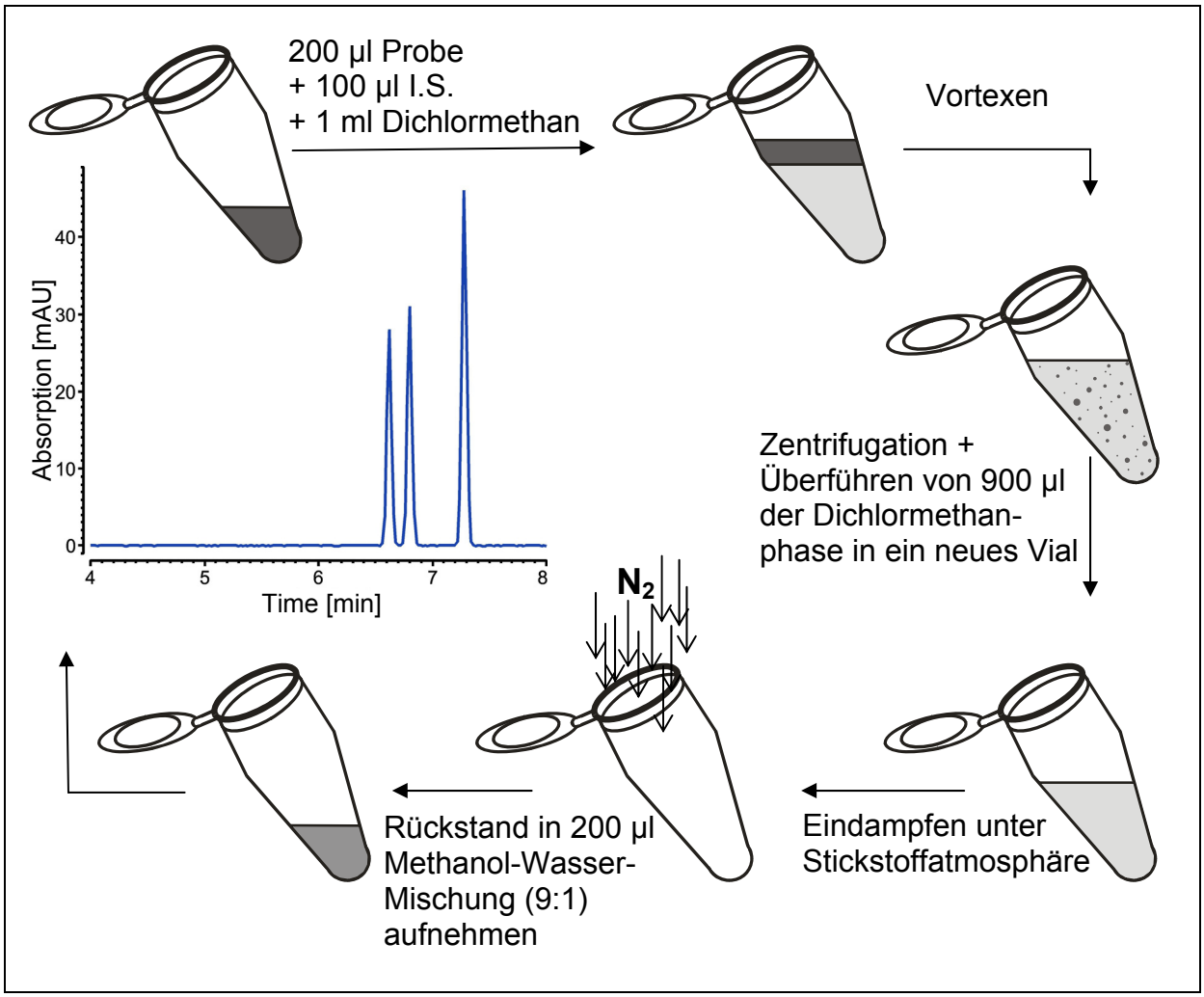


Abbildung 3-8 Probenaufbereitung für die Kapillarelektrophorese

Als interner Standard dient Enrofloxacin. Es zeigt ähnliche chemische Eigenschaften wie Ofloxacin und besitzt deshalb eine Retentionszeit nahe derer der beiden Enantiomere. Enrofloxacin ist lichtempfindlich, deshalb werden alle Arbeiten nach Zusatz des internen Standards unter Lichtschutz ausgeführt.

Zunächst wird die zu vermessende Probe mit 100 µl Enrofloxacin-Lösung (770 ng pro ml destilliertes Wasser) und 1 ml Dichlormethan versetzt. Die Reaktionsgefäße werden verschlossen, sofort in Alu-Folie verpackt und für vier Minuten bei 800 min^{-1} gevortext. Anschließend werden die Phasen durch Zentrifugation (13000 rpm, 5 min) separiert. Nun werden von der Dichlormethan-Phase 900 µl mit einer Eppendorf-Pipette abgenommen und in ein neues 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt. Das Lösungsmittel wird in einem verdunkelten, mit Stickstoff gefluteten Exsikkator abgedampft. Die vollständig getrocknete Probe wird mit einer Methanol-Wasser-Mischung (1:9) aufgenommen und kann anschließend zur Analyse in die Kapillarelektrophorese injiziert werden.

3.3.2.2 Trennpuffer

Eine Trennung von Enantiomeren ist nur möglich, wenn man eine chirale Umgebung erzeugt. Das wird erreicht, indem man dem Trennpuffer eine optisch aktive Substanz, in unserem Fall Methyl-ß-Cyclodextrin, als chiralen Selektor zusetzt. Eines der Enantiomere tritt nun bevorzugt in Wechselwirkung mit dem Selektor und bildet ein stabiles Diastereomerenpaar. Dadurch wird die elektrophoretische Mobilität der beiden Enantiomere unterschiedlich beeinflusst und es erfolgt eine Aufspaltung (Engelhardt et al., 1994).

Für die Trennung der Ofloxacin-Enantiomere wird ein 20 mM Dihydrogen-phosphatpuffer mit einem pH-Wert von 2,8 gewählt, dem 4 % (m/V) Methyl-ß-Cyclodextrin zugesetzt wird. Der Trennpuffer wird direkt nach der Herstellung filtriert (0,45 µm Membranfilter) und kann so bis zu sieben Tagen im Kühlschrank gelagert werden.

3.3.2.3 Einbau und Konditionierung der Kapillare

Für die Trennung werden Polyimid-beschichtete Fused-Silica-Kapillarsäulen mit einem Innendurchmesser von 50 µm verwendet. Mit einem Keramikmesser kann die als Meterware vorliegende Kapillare auf die gewünschte Länge von 37 cm

geschnitten werden, wobei darauf zu achten ist, dass die Enden plan abgeschnitten und nicht zersplittert sind. Die Schnittstellen werden unter der Stereolupe überprüft. Vor Einlegen der Kapillare in die dafür vorgesehene Kassette wird 7 cm vor dem Säulenende ein etwa 3 mm langes Stück der Polyimid-Beschichtung mit einem rotglühenden Widerstandsdraht entfernt. Diese Zone dient als optisches Fenster für die On-Column UV-Detektion. Außerdem werden auch die letzten 2 mm der Beschichtung an beiden Enden entfernt.

Zur Konditionierung einer neuen oder längere Zeit nicht gebrauchten Kapillare wird diese über mehrere Stunden gespült (Tabelle 3-3). Durch das Spülen mit 1 M NaOH kommt es zur vollständigen Deprotonierung der Silanolgruppen an der Innenoberfläche der Quarzkapillare, der Grundvoraussetzung für den elektroosmotischen Fluss (Engelhardt et al., 1994).

Tabelle 3-3 Methode zur Konditionierung der Kapillaren

Spülflüssigkeit	Art	Dauer
1 M NaOH	Druck, 20 psi	60 min
Aqua Bidest	Druck, 20 psi	60 min
0,1 M NaOH	Druck, 20 psi	60 min
Aqua Bidest	Druck, 20 psi	60 min
Trennpuffer	Druck, 20 psi	60 min
Trennpuffer	Spannung, 20 kV	60 min

Vor Ausbau der Kapillare zur Lagerung wird die Kapillare zunächst für 30 Minuten mit 0,1 N NaOH gespült und anschließend 40 Minuten lang mit destilliertem Wasser geflutet. Zur Lagerung tauchen die offenen Enden der Kapillare ebenfalls in destilliertes Wasser. Damit soll ein Eintrocknen der Kapillaroberfläche verhindert werden.

3.3.2.4 Trennparameter

Die Injektion erfolgt elektrokinetisch durch Anlegen einer Spannung von 10 kV für 20 Sekunden. Im Anschluss an die Injektion erfolgt die Trennung mit 20 kV bei 25 °C. Die Detektion wird mit einem UV-Detektor bei 280 nm durchgeführt.

Zwischen den einzelnen Trennungen muss die Kapillare gespült werden. Hier wird folgendes Schema gewählt (Tabelle 3-4):

Tabelle 3-4 Methode zum Spülen der Kapillare

Spülflüssigkeit	Art	Dauer
0,1 M NaOH	Druck, 20 psi	3 min
Aqua Bidest	Druck, 20 psi	2 min
Trennpuffer	Druck, 20 psi	2 min

3.3.2.5 Kalibrierung

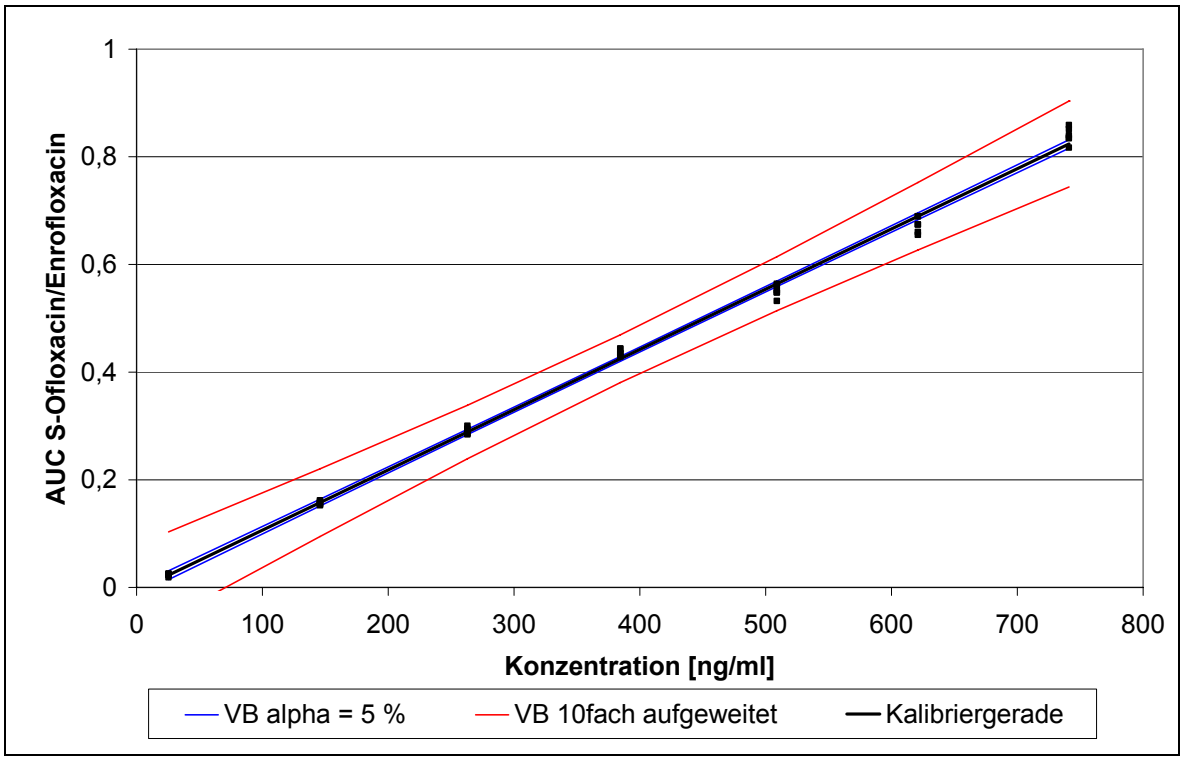


Abbildung 3-9 Kalibriergerade S-Ofloxacin

Für die Erstellung der Kalibriergerade werden sieben Lösungen von racemischem Ofloxacin in Hank's Puffer im Konzentrationsbereich von 50,8 ng/ml – 1482 ng/ml hergestellt. Von den hergestellten Lösungen werden je zweimal 200 µl in Eppendorf-Reaktionsgefäße überführt und nach der in 3.3.2.1 beschriebenen Methode aufbereitet. Jede dieser Proben wird anschließend dreimal mit der Kapillarelektrophorese vermessen. Aus den so erhaltenen Daten werden die Kalibriergeraden für S-Ofloxacin und für R-Ofloxacin erstellt (Abbildung 3-9 und Abbildung 3-10).

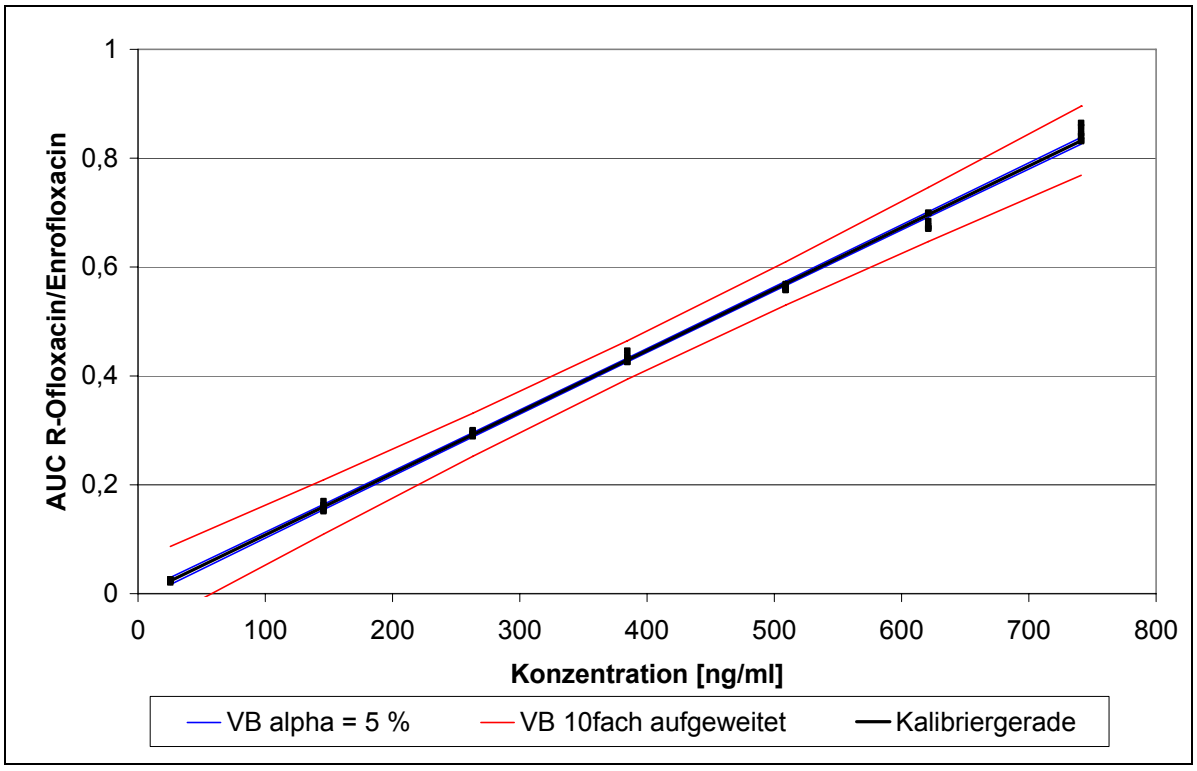


Abbildung 3-10 Kalibriergerade R-Ofloxacin

Die Rohdaten zur Ermittlung der Richtigkeit und der Systempräzision können dem Anhang (8.1) entnommen werden. Hier befindet sich auch eine Abbildung des Residuenplots.

Tabelle 3-5 Kalibrierdaten von Ofloxacin

	S-Ofloxacin	R-Ofloxacin
Anzahl der Proben	42	42
Anzahl der Freiheitsgrade	40	40
Kalibrierfunktion	y = 0,0011 x - 0,0055	y = 0,0011 x – 0,0053
Bestimmtheitsmaß	r^2 = 0,9973	r^2 = 0,9983
Reststandardabweichung	s_y = 0,014 ng/ml	s_y = 0,011ng/ml
Nachweisgrenze	42,7 ng/ml	33,9 ng/ml
Bestimmungsgrenze	129,4 ng/ml	102,7 ng/ml
Richtigkeit: mittlere Wiederfindung mittlere SD	100,99 % 1,91 %	102,1 % 1,64 %
Systempräzision	4,35 %	3,38 %

3.3.3 Analytische Methode zur Bestimmung von Rhodamin 123

Die quantitative Bestimmung von Rhodamin 123 erfolgt fluoreszenzspektroskopisch. am Plattenreader (BioTek SynergyHT). Der eingesetzte Filter führt zu einer Anregungswellenlänge von 485 nm, die Emission erfolgt bei 525 nm. Bei jedem Versuch wird eine Kalibrierung auf der beim jeweiligen Versuch verwendeten 96-Well-Platte durchgeführt. Dabei werden sieben Konzentrationen des Arzneistoffs in Hank's Puffer in einem Konzentrationsbereich von 30 – 600 µg/l je dreimal aufpipettiert und daraus die Kalibriergerade erstellt. Um die Methode abzusichern, wurde einmalig eine komplette Methodenvalidierung durchgeführt.

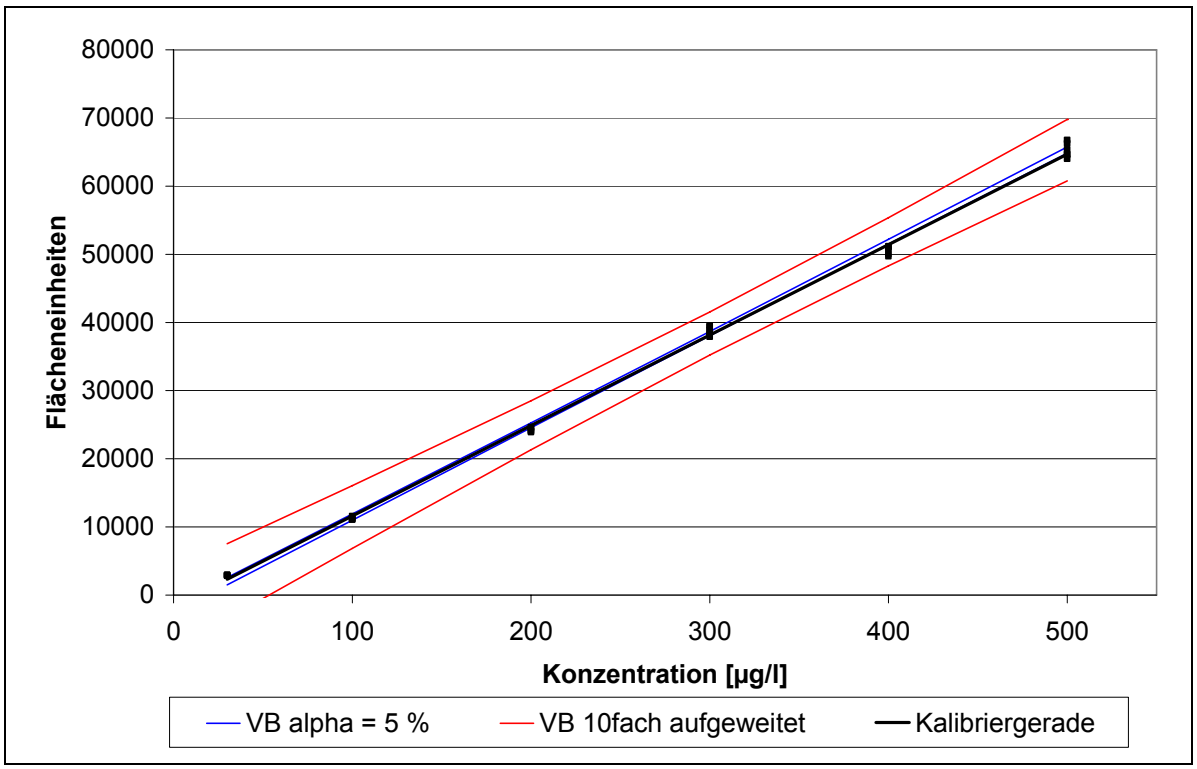


Abbildung 3-11 Kalibriergerade Rhodamin 123

Die Rohdaten zur Ermittlung der Richtigkeit und Systempräzision, sowie das Diagramm des Residuenplots können dem Anhang (8.2) entnommen werden.

Tabelle 3-6 Kalibrierdaten Rhodamin 123

Messbereich		30 – 600 µg/l
Anzahl der Kalibrierproben		42
Anzahl der Freiheitsgrade		40
Kalibrierfunktion		y = 132,77 x – 1671,6
Bestimmtheitsmaß		r^2 = 0,9986
Reststandardabweichung		s_y = 1015,51 µg/l
Nachweisgrenze		25,24 µg/l
Bestimmungsgrenze		76,49 µg/l
Richtigkeit:	mittlere Wiederfindung	96,95 %
	mittlere SD	2,07 %
Systempräzision		1,14 %

3.4 STATISTISCHE METHODEN

Alle durchgeführten Experimente werden parallel an drei Wells jeweils mindestens an drei unterschiedlichen Passagen durchgeführt. In den Abbildungen sind die Mittelwerte aus diesen Versuchen mit der Standardabweichung dargestellt.

Die erhaltenen Daten werden mittels ANOVA, gefolgt von einem Posttest nach Newman-Keuls, auf statistische Signifikanz untersucht. P-Werte kleiner 0,05 werden als signifikant betrachtet. In den Diagrammen sind unterschiedliche Signifikanzniveaus mit unterschiedlichen Buchstaben gekennzeichnet. Aus Gründen der Übersichtlichkeit sind die Werte der einzelnen Enantiomere von Ofloxacin, wenn sie sich nicht signifikant unterscheiden, mit nur einem Buchstaben beschriftet.

4 ERGEBNISSE

4.1 EINLEITUNG

Permeationsstudien mit dem Transwell-Filterkammersystem bieten einen mechanistischen Ansatz für die Aufklärung von Transportmechanismen für Arzneistoffe. Durch Variation des Versuchsaufbaus, beispielsweise durch den Einsatz unterschiedlicher Startkonzentrationen, die Zugabe von Inhibitoren oder Eingriffe in den Energiestoffwechsel, können charakteristische Merkmale des Transports erfasst werden. Je mehr solche Merkmale bekannt sind, desto genauer ist das Gesamtbild, das sich für den Transportmechanismus ergibt.

Für die Experimente dieser Arbeit werden ausschließlich Zellpassagen zwischen 35 und 52 verwendet, da sich durch Subkultivierung die Eigenschaften der Zellen im Laufe der Zeit verändern können (Walter und Wissel, 1995; Artursson et al., 1996). Zur Kontrolle wird am Versuchstag von jeder Passage ein festgelegtes Experiment parallel durchgeführt. Hierzu dient die Ofloxacin-Permeation einer Startkonzentration von 80 µM Racemat in beide Transportrichtungen. So können auch bei neuen Versuchsanordnungen die Eigenschaften der Caco-2 Monolayer überprüft werden.

Die Ermittlung der Permeationskoeffizienten für beide Enantiomere erfolgt aus jeweils einem Experiment, da mit Hilfe der kapillarelektrophoretischen Methode die Ofloxacin-Enantiomere nebeneinander quantifiziert werden können. Die Versuchslösungen werden hierbei mit racemischem Ofloxacin hergestellt, in den gesammelten Proben werden dann beide Enantiomere bestimmt.

Zur besseren Interpretation der Ergebnisse hinsichtlich der Beteiligung bzw. des Ausmaßes der Beteiligung von P-Glycoprotein am Transport von Ofloxacin werden die Schlüsselexperimente unter Einsatz entsprechender Inhibitoren zum Vergleich zusätzlich mit dem Modellarzneistoff Rhodamin 123, einem Substrat des P-Glycoproteins, durchgeführt (Yumoto et al., 1999).

4.2 PERMEATIONSSTUDIEN MIT OFLOXACIN UND RHODAMIN 123

4.2.1 Konzentrationsabhängigkeit des Ofloxacintransports

Anhand des Permeationskoeffizienten (3.1.2.6 Gleichung 4) können Rückschlüsse auf eine mögliche Konzentrationsabhängigkeit und dadurch auf eine Beteiligung von sättigbaren Transportmechanismen gezogen werden.

Wird ein Arzneistoff ausschließlich durch passive Diffusion über den Zellmonolayer transportiert, folgt die Diffusionsgeschwindigkeit dem 1. Fick'schen Diffusionsgesetz (1.3.2.1 Gleichung 1). Dies bedeutet, dass sich die transportierte Arzneistoffmenge pro Zeit proportional zur eingesetzten Startkonzentration verhält. Je höher die eingesetzte Startkonzentration ist, desto höher wird die transportierte Menge pro Zeit. Der Permeationskoeffizient bleibt bei steigender Startkonzentration konstant, da die transportierte Menge über der Zeit in den Zähler, die Startkonzentration in den Nenner der Gleichung eingeht (3.1.2.6 Gleichung 4). Im Gegensatz dazu steigt bei einem sättigbaren Mechanismus ab einer bestimmten Schwellenkonzentration die transportierte Menge pro Zeit nicht mehr weiter an, da diesen Transport-mechanismen Transporter mit begrenzter Kapazität zugrunde liegen. Trotz steigender Einsatzkonzentration bleibt bei Transporter-Sättigung die transportierte Menge konstant. Der resultierende Permeationskoeffizient sinkt in diesem Fall mit steigender Startkonzentration.

Zur Untersuchung der Konzentrationsabhängigkeit von Ofloxacin wird eine Permeationscharakteristik mit Konzentrationen zwischen 20 und 160 µM racemischem Ofloxacins erstellt. Die Permeationskoeffizienten werden für beide Enantiomere getrennt ermittelt, um zusätzlich eine Aussage über mögliche stereoselektive Unterschiede beim Arzneistofftransport zu treffen (Abbildung 4-1).

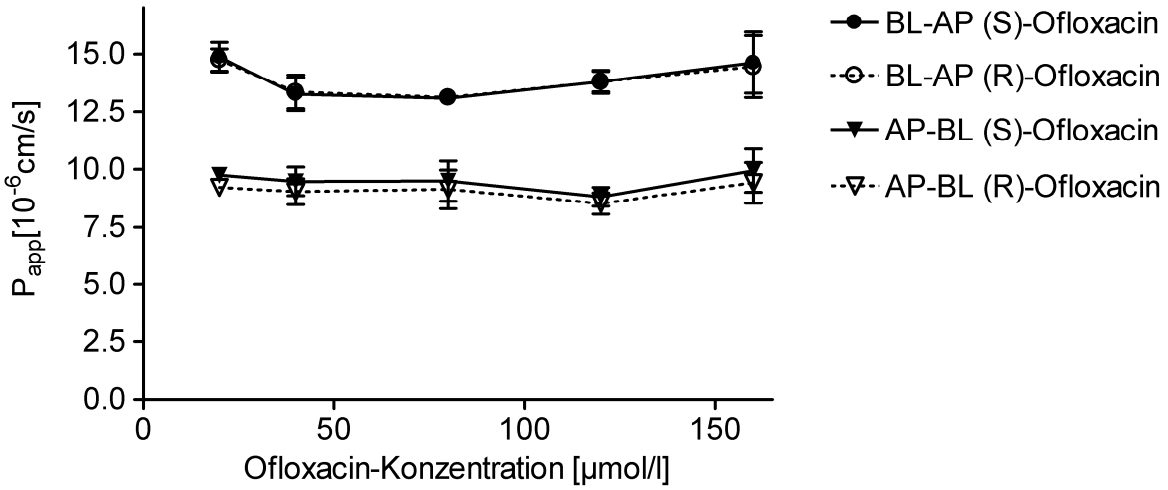


Abbildung 4-1 Konzentrationsabhängigkeit des Ofloxacintransports im Konzentrationsbereich von 20 – 160 µM. Darstellung der Permeationskoeffizienten der beiden Enantiomere über der Startkonzentration an racemischem Ofloxacin in beiden Transportrichtungen

Sowohl die P_{app}-Werte der Absorption (AP-BL) als auch die der Sekretion liegen jeweils auf einem ähnlichen Niveau. Es lässt sich keine signifikante Konzentrationsabhängigkeit erkennen. Dem Auswärtstransport muss deshalb ein Mechanismus mit hoher Kapazität unterliegen.

Die Permeationskoeffizienten in Richtung Sekretion (BL-AP) liegen im gesamten Konzentrationsbereich signifikant über denen der Gegenrichtung. Daraus lässt sich auf die Beteiligung von einem oder mehreren auswärtsgerichteten aktiven Transportmechanismen schließen.

Hinsichtlich der Stereoselektivität lassen sich keine signifikanten Unterschiede beim Transport der beiden Enantiomere erkennen. Allerdings sieht man in absorptiver Richtung einen leichten Trend. Die P_{app}-Werte des S-Enantiomers (Levofloxacin) liegen konstant oberhalb derer des R-Enantiomers. Wird für die statistische Auswertung der Ergebnisse allerdings der parameterfreie Vorzeichentest nach Dixon und Mood herangezogen (Dixon und Mood, 1946), ergibt sich ein signifikanter Unterschied der P_{app}-Werte in absorptiver Richtung.

4.2.2 Einfluss verschiedener P-Glycoprotein-Inhibitoren

Die Ergebnisse der Untersuchung der Konzentrationsabhängigkeit zeigen, dass Ofloxacin einem aktiven auswärtsgerichteten Transportmechanismus unterliegen muss. Es ist bereits bekannt, dass P-gp zum Teil an der Sekretion von Ofloxacin beteiligt ist (Yamaguchi et al., 2000; Sikri et al., 2004). Durch den Einsatz der Inhibitoren Verapamil und Chinidin, die beide bekannte P-gp-Substrate bzw. Inhibitoren sind (Emi et al., 1998), soll das Ausmaß der P-gp-Beteiligung an der Sekretion von Ofloxacin untersucht werden. Als Hemmstoff kommen beide Substanzen in einer üblichen Konzentration von 100 µM zum Einsatz (Hunter et al., 1993; Faassen et al., 2003). Die beiden Inhibitoren werden sowohl separat als auch in Kombination verwendet. Für die Experimente wird eine mittlere Ofloxacin-Konzentration von 80 µM gewählt. Die Vergleichsexperimente mit Rhodamin 123 werden zur besseren Interpretation in äquimolaren Konzentrationsverhältnissen durchgeführt. Die Versuche finden in beiden Transportrichtungen statt.

4.2.2.1 Einfluss auf die Permeation von Ofloxacin

In absorptiver Richtung lassen sich durch Zugabe der P-gp-Inhibitoren keine signifikanten Unterschiede zum Kontrollexperiment mit reinem Ofloxacin erkennen (Abbildung 4-2). Die Permeation bleibt mit Verapamil auf dem gleichen Niveau, mit Chinidin ist sie im Vergleich dazu leicht, allerdings nicht signifikant, erhöht. Der Zusatz beider Inhibitoren gleichzeitig führt zu Werten, die etwa zwischen den erhaltenen Ergebnissen der Versuche mit je einem Inhibitor liegen. Stereoselektive Unterschiede für den Transport sind in dieser Transportrichtung nicht zu erkennen.

Die leichte Erhöhung der Werte bei der Ofloxacin-Absorption unter Chinidin-Zusatz lässt sich dadurch erklären, dass der Auswärtstransport aus der Zelle zurück ins Lumen durch die P-gp-Blockade gehemmt ist. Es kommt vermutlich zu einer Anreicherung des Arzneistoffes in der Zelle und deshalb zu einer erhöhten Permeation ins basolaterale Kompartiment. Bei den Experimenten mit Verapamil lassen sich keine Unterschiede in absorptiver Richtung im Vergleich zum Kontrollexperiment erkennen.

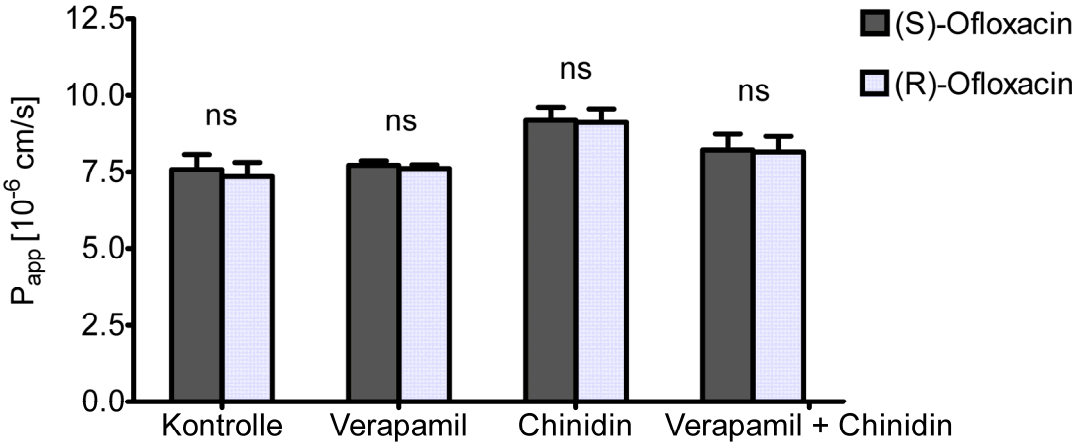


Abbildung 4-2 Einfluss von Verapamil (100 µM) und Chinidin (100 µM) auf die Permeationskoeffizienten der Ofloxacin-Enantiomere (80 µM) in absorptiver Richtung

Die Sekretion wird durch Inhibitorzusatz reduziert (Abbildung 4-3). Am stärksten ist dies bei Verapamil zu erkennen. Chinidin zeigt einen etwas schwächeren Effekt. Beide Inhibitoren gleichzeitig führen, wie auch schon bei Versuchen in die Gegenrichtung zu erkennen war, zu Permeationskoeffizienten, die zwischen den Werten mit je einem Inhibitor liegen.

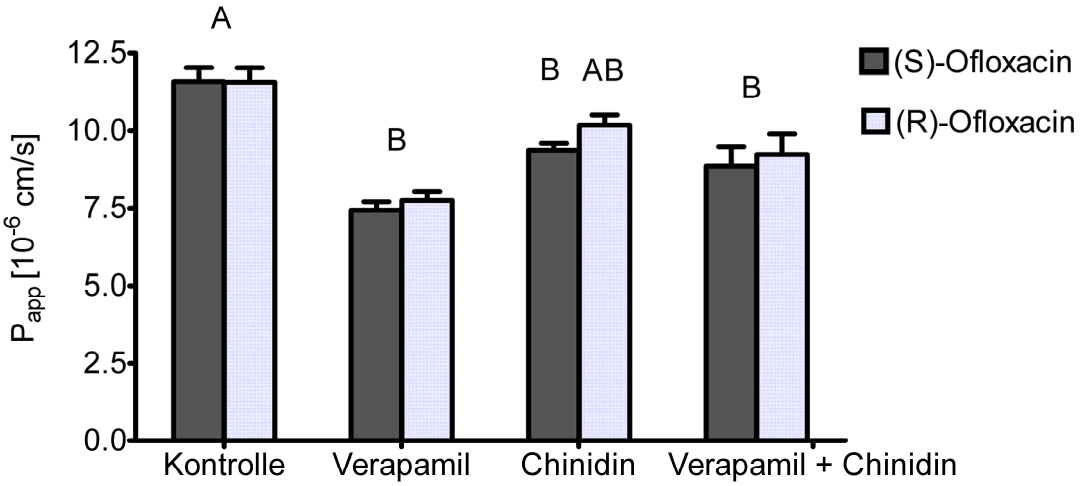


Abbildung 4-3 Einfluss von Verapamil (100 µM) und Chinidin (100 µM) auf die Permeationskoeffizienten der Ofloxacin-Enantiomere (80 µM) in sekretorischer Richtung

Interessanterweise tritt unter Einsatz der Inhibitoren ein leichter stereoselektiver Trend zu Gunsten des R-Enantiomers auf, der beim Kontrollexperiment ohne Inhibitor nicht zu beobachten ist. Am besten ist dies bei den Experimenten mit Chinidin zu sehen. Dieser Trend ist in umgekehrter Richtung, wie der bei der Absorption in Kapitel 4.2.1 beschriebene stereoselektive Unterschied. Das deutet darauf hin, dass ein stereoselektiver Transportmechanismus existiert, der unter Normalbedingungen durch die starke Sekretion maskiert ist und erst durch die Inhibition der Sekretion erkennbar wird.

4.2.2.2 Einfluss auf die Permeation von Rhodamin 123

Rhodamin 123 unterliegt einer stark ausgeprägten Sekretion, die durch den Einsatz der beiden Inhibitoren Verapamil und Chinidin signifikant reduziert werden kann (Abbildung 4-4). Wie bereits bei den Experimenten mit Ofloxacin beobachtet werden konnte, ist auch hier der Effekt von Chinidin schwächer ausgeprägt als der von Verapamil. Werden beide Inhibitoren gleichzeitig eingesetzt, setzt sich in diesem Fall der stärker inhibitorische Effekt von Verapamil durch.

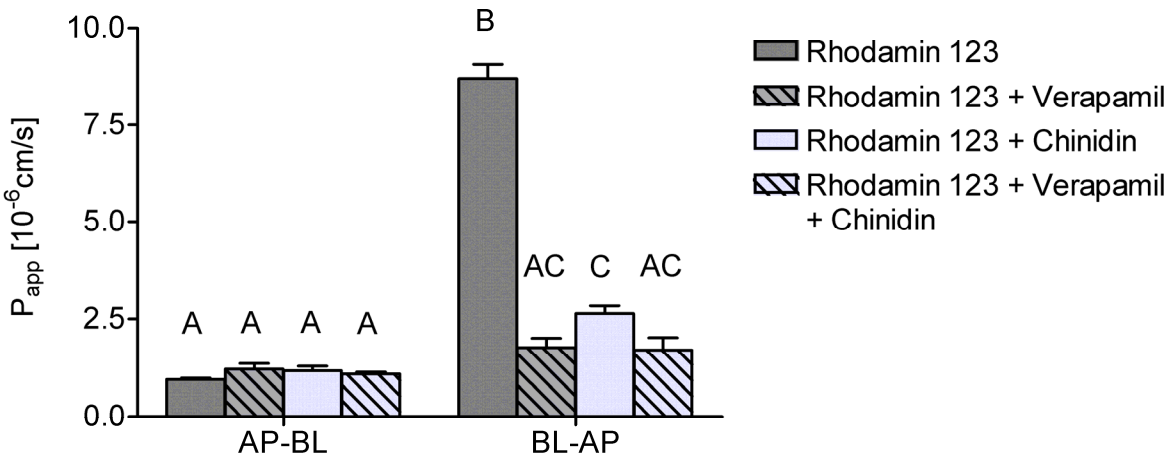


Abbildung 4-4 Einfluss von Verapamil (100 µM) und Chinidin (100 µM) auf die Permeationskoeffizienten von Rhodamin 123 (80 µM) in beiden Transportrichtungen

Die Absorption zeigt unter P-gp-Inhibition keine signifikanten Änderungen der Permeationskoeffizienten. Rhodamin 123 wird in absorptiver Richtung ausschließlich parazellulär transportiert (Troutman und Thakker, 2003). Deshalb erreicht der Arzneistoff in dieser Richtung den Transporter nicht, der in der apikalen Membran

sitzt und Arzneistoffe aus der Membran oder dem Zellinnern zurück ins Lumen pumpt. Nur in sekretorischer Richtung permeiert Rhodamin 123 transzellulär, da es in dieser Richtung die basolaterale Membran mit Hilfe eines Carriers passieren kann und auf der gegenüberliegenden Seite mittels P-gp sezerniert wird (Troutman und Thakker, 2003).

4.2.2.3 Bewertung der Ergebnisse

Die Experimente unter P-gp-Blockade zeigen, dass ein großer Teil der Arzneistoff-Sekretion auf P-gp zurückzuführen ist. Verapamil zeigt im Vergleich zu Chinidin sowohl bei den Ofloxacin- als auch bei den Rhodamin-Experimenten den stärkeren inhibitorischen Effekt. Der Hemmmechanismus von Verapamil auf P-gp ist weitestgehend aufgeklärt. Verapamil ist zum einen ein P-gp-Inhibitor mit einer spezifischen Bindungsstelle und zum anderen Substrat von P-gp (Yusa und Tsuruo, 1989). Der Verapamil-Transport durch Caco-2 Zellmonolayer weist einen hohen passiven Anteil auf, das führt dazu, dass Verapamil selbst, trotz hoher Affinität zu P-gp, keiner Permeabilitätsänderung durch P-gp-Inhibition unterliegt (Doppenschmidt et al., 1998). Verapamil wird also weitestgehend unabhängig von P-gp transportiert und ist daher ein gut zu verwendender Inhibitor (Barecki-Roach et al., 2003). Verapamil als relativ lipophiles Molekül erreicht, nachdem es durch P-gp ins Lumen zurückgepumpt wird, sehr schnell wieder das Cytosol des Epithels und damit die Bindungsstelle des Efflux-Transporters. Damit ist der Inhibitor durch den schnellen Wiedereintritt in die Zelle immer wieder in der Lage, P-gp zu blockieren und seine Aktivität zu reduzieren.

Auch Chinidin ist sowohl Substrat als auch Inhibitor von P-gp (Emi et al., 1998). Es bindet allerdings an eine andere Bindungsstelle als Verapamil (Wang et al., 2000). Der schwächer ausgeprägte Effekt des Chinidins kann auch dadurch zustande kommen, dass der Hemmstoff gemeinsam mit den zu untersuchenden Substanzen ins Donorkompartiment, im Falle der Sekretion also ins basolaterale Kompartiment, gegeben wird, P-gp aber in der apikalen Membran zu finden ist. Beide Inhibitoren müssen folglich zunächst die basolaterale Membran überwinden. Verapamil zeigt, wie oben bereits erwähnt, eine sehr gute passive Permeabilität. Möglicherweise wird Chinidin zum Teil an der basolateralen Membran zurückgehalten und erreicht seinen Wirkort nicht in vollem Ausmaß.

Ein geringer Unterschied ergibt sich für den Effekt in absorptiver Richtung bei Untersuchung des Ofloxacintransports. Verapamil verändert die Ofloxacin-Permeation in absorptiver Richtung nicht, wohingegen die Werte unter Zusatz von Chinidin leicht erhöht sind. Die Erhöhung der Werte lässt sich durch die Blockade der Sekretion und damit einer Hemmung der Absorptionsbarriere erklären. Es stellt sich die Frage, warum es bei der noch stärker ausgeprägten Inhibition durch Verapamil nicht ebenfalls zu einem Anstieg der entgegengerichteten Permeation in absorptiver Richtung kommt. Um dies zu beantworten, muss der gewählte Versuchsaufbau für die Permeationsexperimente genauer betrachtet werden. Bei transzellulären Transportexperimenten permeiert der Arzneistoff zunächst durch die Zellmembran der einen Zellseite, anschließend durch das Cytosol bzw. entlang der Membran, um letztendlich an der gegenüberliegenden Zellseite die Zelle durch die Membran zu verlassen. Arzneistoffe können auf beiden Seiten der Zelle mittels Transporter durch die Membran permeieren oder durch passive Diffusion die Membran überwinden. Transportproteine sind meist nicht gleichmäßig über die Zellmembran verteilt, sondern befinden sich bevorzugt an einer der beiden Zellseiten, also entweder apikal oder basolateral. Beim hier gewählten Versuchssetup ist immer nur der Transport über beide Membranen in Summe zugänglich. So kann es dazu kommen, dass Ofloxacin in Kombination mit Verapamil vermehrt an der basolateralen Membran ankommt, diese aber nicht merklich schneller überwindet. Der Substanzfluss bleibt deshalb trotzdem konstant. Außerdem kann auch nicht ausgeschlossen werden, dass die beiden Inhibitoren mit anderen Transportsystemen interagieren und es so zu den unterschiedlichen Effekten kommt.

4.2.3 Untersuchung der Energieabhängigkeit

Die Sekretion von Ofloxacin kann mit Hilfe der P-gp-Inhibitoren Verapamil und Chinidin reduziert werden. Offen bleibt allerdings, ob auch in absorptiver Richtung ein aktiver Transportmechanismus beteiligt ist und ob möglicherweise weitere aktive Mechanismen zusätzlich an der Sekretion beteiligt sind. Eine Möglichkeit, aktive Transportmechanismen zu erkennen, ist die Blockade der ATP-Synthese und damit die Ausschaltung des Energiestoffwechsels der Zellen. Hierzu wird eine Kombination aus Natriumazid und 2-Deoxyglucose gewählt. Natriumazid hemmt die Atmungskette und damit die Bildung von neuem ATP in den Mitochondrien der Zellen.

2-Deoxyglucose hemmt die Glycolyse und damit auf dieser Stufe die Bildung von ATP-Molekülen sowie die Bereitstellung von $NADH_2$ für die Atmungskette.

Natriumazid wird in einer Konzentration von 5 mM, 2-Deoxyglucose von 20 mM eingesetzt (Artursson et al., 1996; Yamaguchi et al., 2001). Auch dieses Experiment wird zur besseren Interpretation zusätzlich mit dem Modellarzneistoff Rhodamin 123 durchgeführt.

4.2.3.1 Energieabhängigkeit des Ofloxacintransports

Die Sekretion wird unter ATP-Blockade signifikant reduziert (Abbildung 4-5). Das Ausmaß der Inhibition ist ähnlich stark ausprägt, wie unter P-gp-Inhibition (vgl. 4.2.2.1). Die resultierenden Permeationskoeffizienten in beiden Transportrichtungen liegen unter ATP-Depletion auf einem Niveau, in der Gesamtbilanz ist also keine Sekretion mehr zu erkennen.

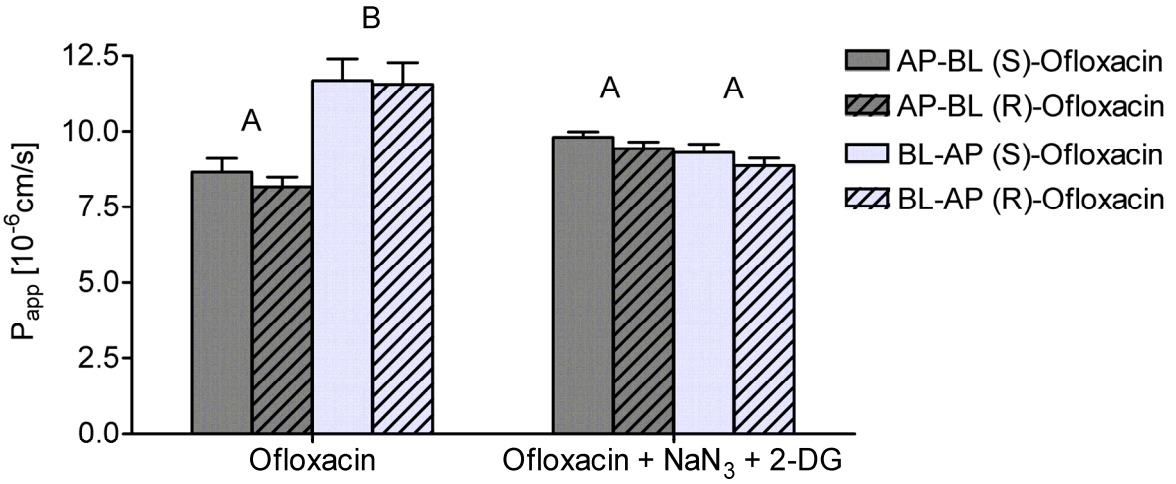


Abbildung 4-5 Einfluss von Natriumazid (5 mM) und 2-Deoxyglucose (20 mM) auf Permeationskoeffizienten von Ofloxacin (80 µM) in beiden Transportrichtungen

Die Absorption kann durch Energie-Blockade nicht reduziert werden. Stattdessen lässt sich ein leichter Anstieg der Werte, der allerdings nicht signifikant ist, beobachten. Diese leichte Steigerung der Permeation ist vermutlich auf die Blockade der Sekretion zurückzuführen. Der Rücktransport von bereits aufgenommenem Arzneistoff wird verhindert, deshalb wird mehr Arzneistoff auf die basolaterale Seite transportiert. Ein aktiver Transportmechanismus für die Absorption ist

unwahrscheinlich. Es liegt nahe, dass die Absorption über passive Diffusion oder einen energieunabhängigen Carrier stattfindet. Allerdings kann keine endgültige Aussage getroffen werden, da bei diesem Versuchsaufbau nur der resultierende transzelluläre Gesamttransport zugänglich ist, der auch in absorptiver Richtung durch eine starke auswärtsgerichtete Sekretion maskiert wird. Man erhält deshalb keinen wahren Kontrollwert für die Permeation in absorptiver Richtung.

4.2.3.2 Energieabhängigkeit des Rhodamin 123-Transports

Abbildung 4-6 stellt die Permeationskoeffizienten der ATP-Depletion beim Transport von Rhodamin 123 dar. In sekretorischer Richtung kommt es zu einer Reduktion der Werte im Vergleich zum Kontrollexperiment ohne Zusatz von Inhibitoren. In Richtung der Absorption ist keine Änderung erkennbar. Der minimale Anstieg könnte auf die im Zusammenhang mit ATP-Blockade oft diskutierte Beeinträchtigung der Tight Junctions und damit einer Zunahme der parazellulären Permeabilität zurückzuführen sein (Artursson et al., 1996), die im Falle der Rhodamin-Permeation den vorrangigen Transportweg in absorptiver Richtung (AP-BL) darstellt (vgl. 4.2.2.2).

Auffällig ist, dass sich ein großer Teil der Sekretion nicht durch ATP-Depletion blockieren lässt. Im Gegensatz dazu ist das Ausmaß der Inhibition durch Verapamil und Chinidin sehr viel größer. Eine Erklärung dafür wäre, dass die beiden P-gp-Inhibitoren zu einer effektiveren Hemmung des Transporters führen. Rhodamin stellt möglicherweise ein wesentlich besseres Substrat für P-gp dar als Ofloxacin und wird deshalb auch bei reduzierter P-gp-Aktivität durch die Energieblockade noch zu einem großen Ausmaß transportiert, wohingegen der Ofloxacintransport unter diesen Bedingungen nicht mehr abläuft.

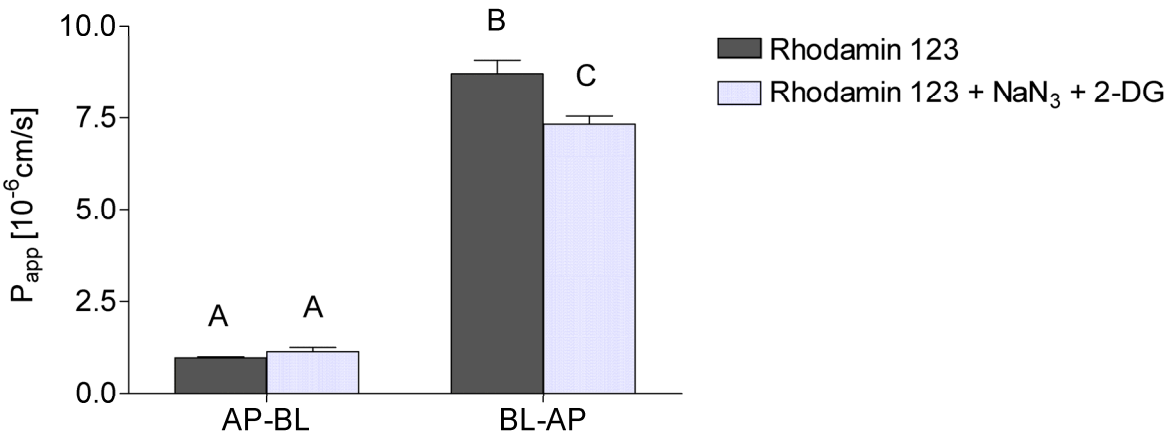


Abbildung 4-6 Einfluss von Natriumazid (5 mM) und 2-Deoxyglucose (20 mM) auf die Permeation von Rhodamin 123 in beiden Transportrichtungen

4.2.3.3 Bewertung der Ergebnisse

Durch ATP-Depletion können im Fall der Ofloxacin-Permeation die Permeationskoeffizienten der beiden entgegengesetzten Transportrichtungen auf ein gleiches Niveau gebracht werden. Dies ist ein Beleg dafür, dass die aktiven Mechanismen der Sekretion tatsächlich vollständig inhibiert werden können. Es liegt die Vermutung nahe, dass P-gp der einzige an der Sekretion beteiligte aktive Mechanismus ist, da der Effekt der beiden P-gp-Inhibitoren genauso stark ist, wie die durch ATP-Inhibition erreichte Wirkung.

Die Werte der Ofloxacin-Absorption werden durch ATP-Blockade nicht reduziert, sie steigen aufgrund der Hemmung des Transports in entgegengesetzter Richtung sogar leicht an. Aus diesem Versuch kann somit die Beteiligung aktiver Transportmechanismen am Transport in absorptiver Richtung ausgeschlossen werden.

Die zur Kontrolle durchgeführten Versuche mit Rhodamin 123 sind widersprüchlich. Die stark ausgeprägte Sekretion von Rhodamin kann durch den Einsatz von Natriumazid und 2-Deoxyglucose nur unzulänglich inhibiert werden. Ein Problem bei der Untersuchung der Energieabhängigkeit ist die Tatsache, dass die Zellen, um vital bleiben zu können und weiterhin einen intakten Monolayer zu bilden, eine ausreichende Restenergiemenge benötigen. Es kann also durchaus sein, dass einige aktiven Transportproteine nach wie vor Aktivität haben. Am Beispiel der Rhodamin-Sekretion kann dies gezeigt werden.

Vor diesem Hintergrund müssen die Ergebnisse der Experimente mit Ofloxacin kritisch hinterfragt werden. Es ist denkbar, dass trotz aller bisherigen Erkenntnisse weitere aktive Mechanismen am Transport beteiligt sind, diese Transportproteine lassen sich aber durch die gewählten Bedingungen nicht ausreichend in ihrer Aktivität beeinflussen.

4.2.4 Einfluss von Ofloxacin auf die Permeation von Rhodamin 123

Ein Vergleich der erzielten Resultate durch die unterschiedlichen Inhibitoren aus den Experimenten mit Ofloxacin und Rhodamin 123 macht deutlich, dass die Sensitivität der beiden Arzneistoffe gegenüber den eingesetzten Substanzen unterschiedlich ist. Aus diesem Grund wird ein Experiment durchgeführt, bei dem der Transport von Rhodamin 123 unter Anwesenheit der äquimolaren Menge Ofloxacin untersucht wird. So lässt sich eine Aussage über eine mögliche Präferenz des Efflux-Transporters für eines der beiden Substrate erkennen.

In Abbildung 4-7 ist das Ergebnis dieser Untersuchung dargestellt. Die Permeationskoeffizienten von Rhodamin 123 mit und ohne Ofloxacin unterscheiden sich in beiden Transportrichtungen nicht signifikant. Es ist lediglich eine schwach ausgeprägte Reduktion der Sekretion zu erkennen, die sich aus der Konkurrenz um den Efflux über P-gp erklären lässt.

Aus diesem Versuch ist deutlich ersichtlich, dass Rhodamin 123 das bevorzugte Substrat für P-gp ist. Die Bindungsaffinität von Rhodamin 123 an P-Glycoprotein scheint größer zu sein als die von Ofloxacin, so dass Ofloxacin keinen signifikanten Einfluss auf den Transport von Rhodamin hat. Ofloxacin zeigt folglich in der eingesetzten Konzentration keinen signifikanten inhibitorischen Effekt.

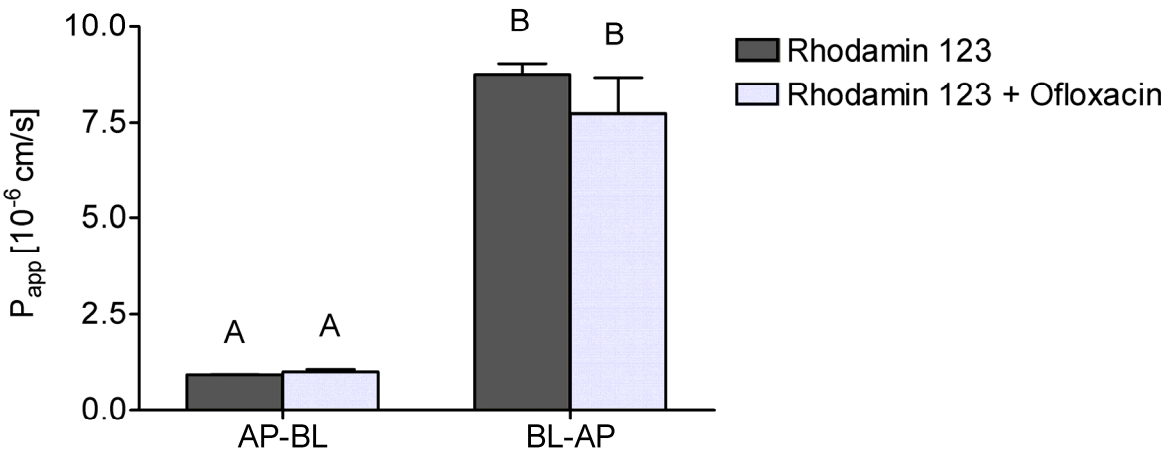


Abbildung 4-7 Einfluss von Ofloxacin (80 µM) auf die Permeation von Rhodamin (80 µM) in beiden Transportrichtungen

Diese Erkenntnis steht im Einklang mit den erhaltenen Ergebnissen aus den vorangegangenen Versuchen. Das Ausmaß der Sekretion von Rhodamin ist um ein Vielfaches höher als das von Ofloxacin. Dies deutet darauf hin, dass Rhodamin einem sehr viel stärkeren P-gp-vermittelten Efflux unterliegt. Die Tatsache, dass Rhodamin bevorzugt transportiert wird, bestätigt auch das Resultat, dass es trotz reduzierter Aktivität unter Energieblockade noch zu einem beträchtlichen Ausmaß aktiv sezerniert wird.

4.2.5 Einfluss von Probenecid auf den Ofloxacintransport

Es ist bekannt, dass andere Gyrasehemmer, wie beispielsweise Grepafloxacin, neben der Sekretion durch P-gp auch MRP-2 (Multidrug Resistance-associated Polypeptide-2) Substrate sind (Lowes und Simmons, 2002). Daher wird mit Hilfe des MRP-2-Inhibitors Probenecid (Versantvoort et al., 1995; Holló et al., 1996) eine mögliche Beteiligung dieses ABC-Transporters am Auswärtstransport von Ofloxacin untersucht. In der Niere konnte bereits gezeigt werden, dass Probenecid die renale Clearance von Ofloxacin reduziert, ein bestimmter Transporter wurde in diesem Zusammenhang aber nicht vorgeschlagen (Foote und Halstenson, 1998). Im Falle eines MRP-vermittelten Effluxes ist mit einer Reduktion der P_{app}-Werte in apikaler Richtung (BL-AP) zu rechnen.

Der Inhibitor kommt in einer Konzentration von 100 µM zum Einsatz und wird zusammen mit Ofloxacin ins Donorkompartiment gegeben. Die Ofloxacin

Startkonzentration beträgt, wie auch schon bei den vorangegangenen Experimenten, 80 µM.

Durch den Einsatz von Probenecid kommt es zu keiner Änderung der Permeabilität in sekretorischer Richtung (Abbildung 4-8). Es ist allerdings eine Erniedrigung der Permeationskoeffizienten in absorptiver Richtung zu beobachten.

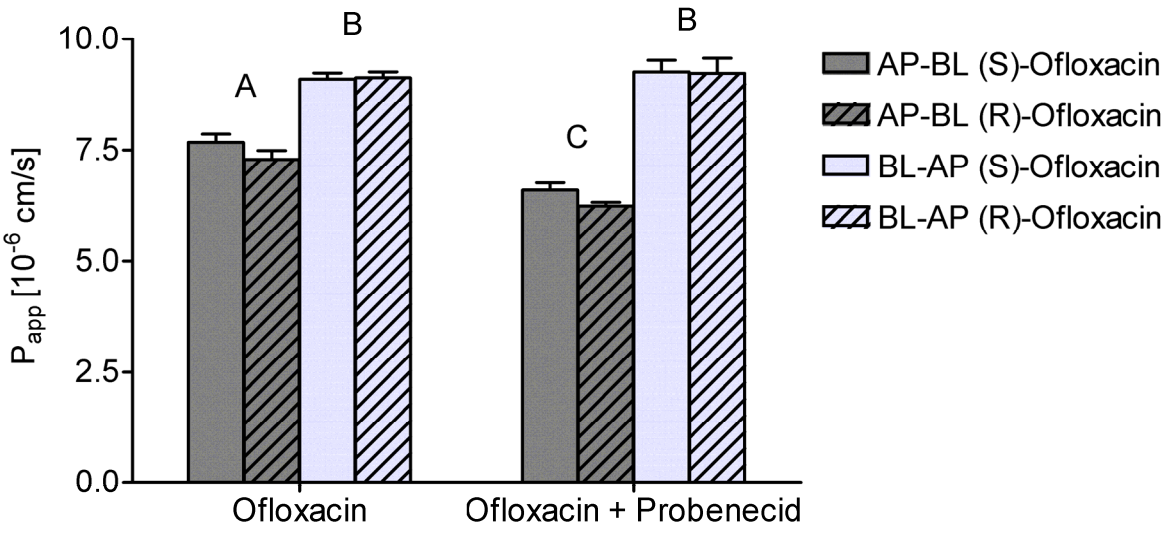


Abbildung 4-8 Einfluss von Probenecid (100 µM) auf die Permeation von Ofloxacin (80 µM) in beiden Transportrichtungen

Damit wird ein Probenecid-sensitiver Transporter in absorptiver Richtung für Ofloxacin identifiziert. Eine Beteiligung von MRP hingegen lässt sich bei diesem Versuchsaufbau nicht erkennen.

Probenecid wird therapeutisch als Urikosurikum eingesetzt. Es hemmt die organischen Anionentransporter OAT 1 und OAT 3 (Tahara et al., 2005), organischen Anionen-Transport-Polypeptide (organic anion transporting polypeptide; OATP) (Janneh et al., 2007) sowie das bereits erwähnte MRP-2 in den proximalen Tubuluszellen und verhindert dadurch die Rückresorption von Harnsäure und anderen organischen Anionen. Es ist bekannt, dass Probenecid-sensitive Transporter nicht nur in der Niere, sondern im ganzen Körper zu finden sind (Silverman et al., 2008). Auch der sogenannte Reduced Folate Carrier (RFC), welcher am stereoselektiven Transport von Methotrexat beteiligt ist, lässt sich in Caco-2 Zellen durch Probenecid hemmen (Narawa et al., 2007). Somit gibt es eine

Vielzahl an Transportern, die sowohl an der Arzneistoffabsorption als auch an der Sekretion beteiligt sind und sich durch Probenecid modulieren lassen. Der beobachtete Effekt kann demzufolge auch das Resultat von mehreren Einzeleffekten sein. Dieses Experiment ist allerdings der erste Beweis dafür, dass beim Ofloxacintransport auch von apikal nach basolateral ein oder mehrere Carrier beteiligt sein müssen.

4.2.6 Einfluss von Naringin auf den Ofloxacintransport

Bei Naringin handelt es sich um einen Inhibitor des Anionentransporters OATP1A2 (Bailey et al., 2007). Im Jahr 2007 wurde auf molekularer Ebene erstmals ein Influx-Transporter für Ofloxacin gefunden. Durch Uptake-Experimente an verschiedenen Caco-2 Subklonen und die Korrelation der erhaltenen Ergebnisse mit der mRNA-Expression verschiedener Transporter der jeweiligen Zellen, wurde die Beteiligung des Anionentransporters OATP1A2 an der Ofloxacin-Aufnahme in die Zellen postuliert (Maeda et al., 2007).

Dies soll nun mit Hilfe der transzellulären Permeation bestätigt werden. Analog der vorangegangenen Experimente mit Inhibitorzusatz wird auch bei diesen Versuchen der Einfluss einer Inhibitor-Konzentration von 100 µM auf die Permeation von Ofloxacin (80 µM) in beiden Transportrichtungen untersucht.

Die Ergebnisse sind in Abbildung 4-9 dargestellt. Der Transport in absorptiver Richtung wird durch Naringin reduziert. Die Beteiligung von OATP1A2 kann demzufolge auch auf Ebene der transzellulären Permeation nachgewiesen werden. Auf die Ofloxacin-Sekretion hat Naringin keinen signifikanten Effekt. Auffällig ist dabei, dass es unter Inhibitorzusatz zu einer enormen Streuung der Werte kommt. Eine mögliche Erklärung wäre, dass OATP1A2 in der apikalen Membran der Zellen zu finden ist. Der Inhibitor wird ins basolaterale Donorkompartiment gegeben. Er muss also zunächst die basolaterale Membran überwinden, um am Transporter anzukommen. Es ist denkbar, dass die Naringin-Permeabilität zwischen den unterschiedlichen Passagen schwankt und sich dies auf den Effekt am Transporter und damit auf den Ofloxacintransport auswirkt.

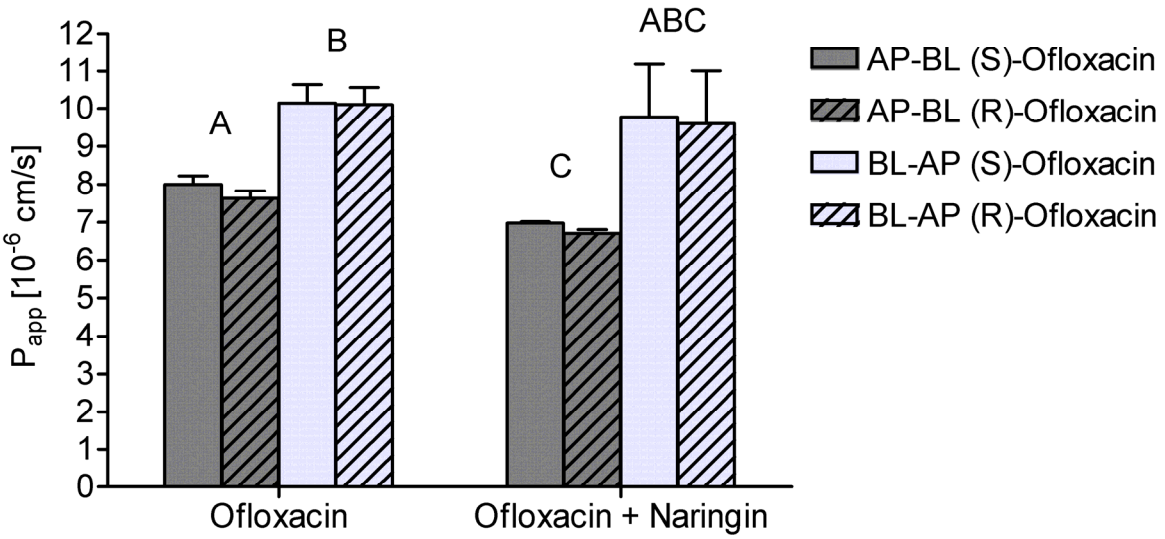


Abbildung 4-9 Einfluss von Naringin (100 µM) auf die Permeation von Ofloxacin in beiden Transportrichtungen

4.3 ERGEBNISSE DER UPTAKE-EXPERIMENTE

4.3.1 Untersuchung der Rhodamin-Aufnahme

Rhodamin 123 dient als Modellsubstanz zur Entwicklung einer Methode, um die intrazelluläre Arzneistoffkonzentration zu quantifizieren. Es zeigt die Besonderheit, in absorptiver Richtung parazellulär und nur in sekretorischer Richtung transzellulär transportiert zu werden (Troutman und Thakker, 2003). Rhodamin permeiert folglich in absorptiver Richtung nicht durch die Zellen, sondern wandert über die Tight Junctions durch die Zellzwischenräume. In sekretorischer Richtung hingegen wird es mit Hilfe eines Carriers in der basolateralen Membran ins Zellinnere aufgenommen. Nach Durchqueren des Cytosols verlässt der Arzneistoff die Zelle mit Hilfe von P-gp, das in der apikalen Membran lokalisiert ist. Aus diesem Grund wird die Arzneistoffaufnahme nur in sekretorischer Richtung untersucht, da in der Gegenrichtung nicht mit signifikanten Konzentrationen im Zellinnern zu rechnen ist.

Die Startkonzentration von Rhodamin beträgt 80 µM und ist damit analog zu den Permeationsstudien. Es wird ein Vergleichsexperiment ohne Inhibitor und ein Experiment mit Verapamil in einer Konzentration von 100 µM durchgeführt.

In Abbildung 4-10 ist das Ergebnis dieser Versuche dargestellt. Man sieht eine deutliche Zunahme der intrazellulären Rhodamin Konzentration unter P-gp-Hemmung. Die aufgenommene Menge steigt auf mehr als das Doppelte. Dies lässt sich dadurch erklären, dass Rhodamin über die basolaterale Membran aufgenommen wird, aber nicht auf der gegenüberliegenden Seite über P-gp aktiv aus der Zelle herausgepumpt werden kann.

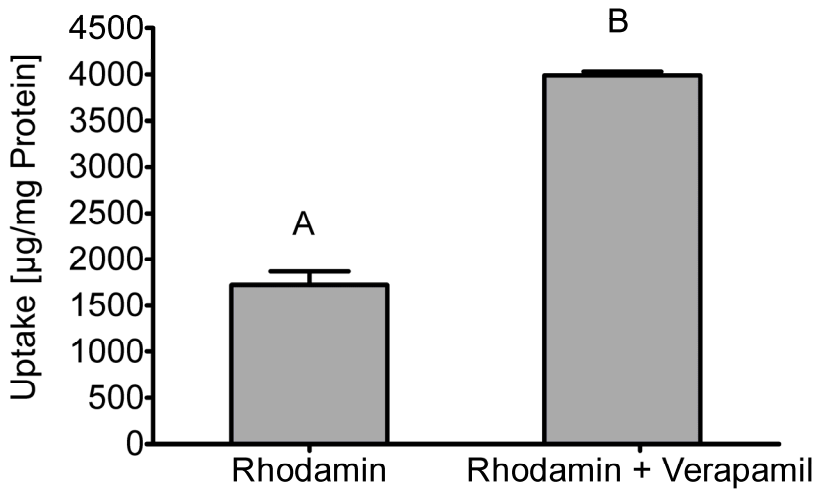


Abbildung 4-10 Einfluss von Verapamil (100 µM) auf die Aufnahme von Rhodamin 123 (80 µM) ins Zellinnere über die basolaterale Membran

4.3.2 Untersuchung der Ofloxacin-Aufnahme

Für die Untersuchung des Uptakes von Ofloxacin wird eine Startkonzentration von 200 µM gewählt. Diese Konzentration liegt über der höchsten Konzentration der Permeationsuntersuchungen, da es sich gezeigt hat, dass bei niedrigeren Konzentrationen die zu bestimmenden Konzentrationen an der Grenze der Bestimmungsgrenze der kapillarelektrophoretischen Methode zur Quantifizierung der Ofloxacin-Konzentrationen liegen. Analog zum Rhodamin-Experiment kommt auch hier Verapamil in einer Konzentration von 100 µM als P-gp-Inhibitor zum Einsatz. Die Arzneistoffaufnahme wird bei Ofloxacin über beide Membranen, also sowohl in absorptiver Richtung über die apikale als auch in sekretorischer Richtung über die basolaterale Membran untersucht.

Abbildung 4-11 zeigt die Ergebnisse der Versuche in absorptiver Richtung. Da die aufgenommene Arzneistoffmenge erheblich streut, wird ein Kontrollexperiment mit

leeren Transwell-Filterinserts ohne Zellen durchgeführt. So kann die Adsorption des Arzneistoffs an den Filter bestimmt werden, welche eine mögliche Ursache für die Ungenauigkeit darstellen könnte. Aus diesem Experiment ist ersichtlich, dass der relativ lipophile Arzneistoff zu einem beträchtlichen Anteil, d. h. mehr als einem Viertel der gesamten aufgenommenen Menge, am Filtermaterial adsorbiert. Verapamil scheint die aufgenommene Menge an Ofloxacin zu reduzieren. Unter P-gp-Blockade sollte eher mit einem Anstieg der Werte gerechnet werden. Durch die große Streuung der Werte ist die Aussagekraft dieser Experimente allerdings fraglich.

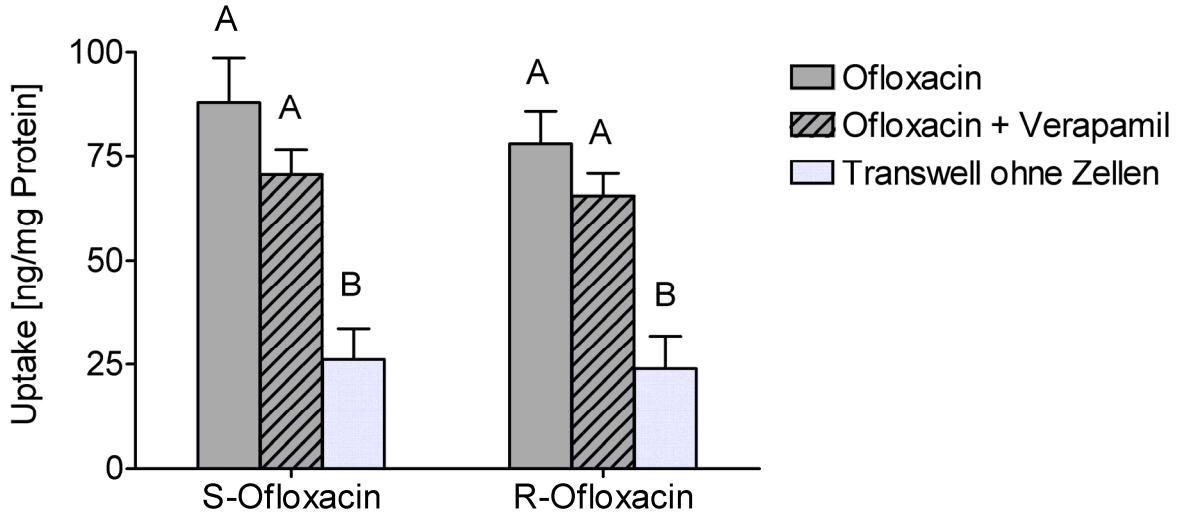


Abbildung 4-11 Darstellung der Aufnahme der Ofloxacin-Enantiomere (200 µM) ins Zellinnere über die apikale Membran mit und ohne Zusatz von Verapamil (100 µM) sowie die der Werte aus einem Kontroll-experiment ohne Zellen

Die Aufnahme über die basolaterale Membran, also in sekretorischer Richtung, ist in Abbildung 4-12 dargestellt. Auch in dieser Versuchsrichtung ist die Streuung der Ergebnisse sehr hoch. Es lässt sich auch bei diesem Versuchsaufbau wieder ein leichter Trend in Richtung einer Reduktion der ermittelten intrazellulären Konzentrationen bei Anwesenheit von Verapamil erkennen, durch die breite Streuung der Werte liegt auch hier kein signifikanter Effekt vor.

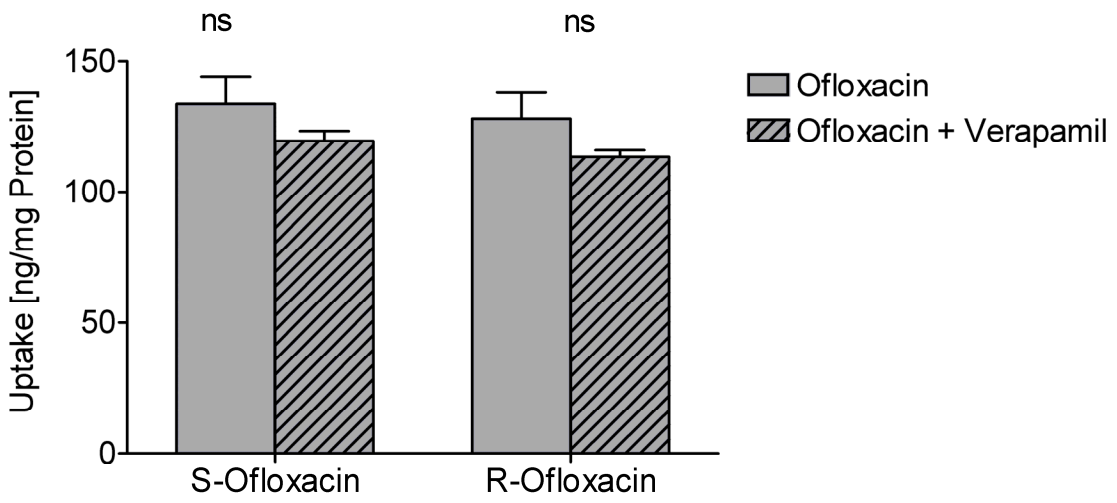


Abbildung 4-12 Darstellung der Aufnahme der Ofloxacin-Enantiomere (200 µM) ins Zellinnere über die basolaterale Membran mit und ohne Zusatz von Verapamil (100 µM)

4.3.3 Bewertung der Uptake-Experimente

Die entwickelte Methode eignet sich zur Bestimmung der intrazellulären Akkumulation von Rhodamin 123. Es stellt sich die Frage, warum die für Ofloxacin erhaltenen Ergebnisse eine so große Ungenauigkeit aufweisen. In der eingesetzten Startkonzentration von 200 µM ist Ofloxacin noch gut löslich und liegt deutlich unterhalb der Sättigungslöslichkeit. Trotzdem zeigt die Untersuchung der Adsorption von Ofloxacin am Filtermaterial, dass der Arzneistoff in großem Ausmaß an das Filtermaterial adsorbiert und damit der wässrigen Lösung entzogen wird. Infolgedessen ist davon auszugehen, dass ein erheblicher Teil des Ofloxacins aufgrund seiner erhöhten Lipophilie und damit verbunden seiner schlechten Löslichkeit in wässrigen Medien in der Membran der Zellen vorliegt. Somit ist es schwierig, Ofloxacin quantitativ von den Zellen zu trennen und in die wässrige Probenlösung zu überführen. Es liegt nahe, dass der Großteil, der durch die Zellen zurückgehaltenen Ofloxacinmenge, bei Trennung der Zellreste von der Untersuchungslösung mittels Zentrifugation, im Zellpellet zu finden ist. Dieses Problem tritt bei den Versuchen mit Rhodamin 123 nicht auf, da Rhodamin eine bessere Wasserlöslichkeit und einen kleineren Verteilungskoeffizienten aufweist und deshalb vorzugsweise in der wässrigen Prüflösung ist.

5 DISKUSSION

Um die am epithelialen Ofloxacintransport beteiligten Mechanismen aufzuklären, werden transzelluläre Permeationsstudien im Transwell-Filterkammersystem mit unterschiedlichen Versuchsbedingungen durchgeführt. Durch Variationen im Versuchsaufbau gelingt es, einzelne Aspekte des Transports aufzuklären. Als Gesamtbild ergibt sich schließlich ein möglicher Transportmechanismus, an dem mehrere Einzelmechanismen beteiligt sein können.

Der Einsatz unterschiedlicher Startkonzentrationen ergibt in keiner der beiden untersuchten Transportrichtungen einen signifikanten Einfluss auf die Ofloxacinpermeation. Die ermittelten Permeationskoeffizienten liegen für beide Richtungen bei allen untersuchten Konzentrationen jeweils auf dem gleichen Niveau, wobei die Werte der Sekretion deutlich über denen der Absorption liegen. Dies spricht für einen aktiven Sekretionsmechanismus, der Ofloxacin auch gegen ein Konzentrationsgefälle transportieren kann. Da sich die Permeationskoeffizienten bei unterschiedlich großen Startkonzentrationen nicht ändern, ist die Kapazität dieses Transportmechanismus im untersuchten Konzentrationsbereich nicht ausgeschöpft, es tritt keine Transportersättigung ein. Dagegen konnte Prieto et al. (1988) anhand von Untersuchungen der Konzentrationsabhängigkeit des Ofloxacintransports am isolierten Rattendarm einen sättigbaren Mechanismus für die Absorption nachweisen. Ein Unterschied liegt im untersuchten Konzentrationsbereich. Bei den Untersuchungen am Rattendarm liegen die Konzentrationen zwischen 350 µM und 13,8 mM. In der vorliegenden Arbeit wird ein Bereich zwischen 20 und 160 µM Ofloxacin untersucht. Eine Erhöhung der Startkonzentration ist nicht möglich, da dies die Vitalität der Zellen und damit die Integrität der Monolayer beeinträchtigt. Es wäre denkbar, dass die Transportersättigung erst bei der höheren Konzentration vorliegt. Darüber hinaus muss mit berücksichtigt werden, dass die Untersuchungen an unterschiedlichen Modellen stattfinden. Die Transporterausstattung ist für die beiden Modelle unterschiedlich. Bei Krebszellen, wie z. B. Caco-2 Zellen, ist P-gp im Vergleich zu nicht tumoralen Zellen überexprimiert. Demzufolge hat die P-gp-vermittelte Sekretion, der Ofloxacin unterliegt, in Caco-2 Zellen eine höhere Kapazität als im isolierten Rattenintestinum. Des Weiteren findet die Permeation durch den isolierten Rattendarm im Gegensatz zum Caco-2 Modell zusätzlich durch

angrenzende Gewebeschichten und den Mucuslayer statt. Diese üben auch einen Einfluss auf den Transport aus.

Die intestinale Sekretion, der Ofloxacin unterliegt, wird zu einem großen Teil auf P-gp zurückgeführt. Dies kann mit Hilfe der Inhibitoren Verapamil und Chinidin bestätigt werden. Bei Zusatz der Inhibitoren werden die Werte für die Ofloxacin-Sekretion so weit reduziert, dass sie auf dem Niveau der Werte für die Absorption liegen. Sind die Absorption und die Sekretion gleich groß, ist davon auszugehen, dass kein aktiver Sekretionsmechanismus mehr funktionsfähig ist. Der Transport ist lediglich durch den vorliegenden Konzentrationsgradienten getrieben, der für beide Richtungen gleich groß ist. Bei P-gp kann es sich folglich um den einzigen an der Sekretion beteiligten Transporter handeln. Allerdings wird von einigen Autoren ein zusätzlicher Transporter postuliert. So konnten Yamaguchi et al. (2000) die durch den P-gp-Inhibitor Cyclosporin A erhaltene Hemmung durch Zusatz anderer Chinolone verstärken. Das unterschiedliche Ergebnis lässt sich möglicherweise durch die unterschiedlichen Inhibitoren, aber auch durch die verschiedenen Caco-2 Zelllinien, die verwendet werden, erklären. Die Versuche mit Cyclosporin A werden an parentalen Caco-2 Zellen durchgeführt, die bekannterweise eine etwas andere Transporterausstattung aufweisen. Ein Hauptunterschied liegt in der unterschiedlich starken Expression von P-gp, welches bei den ursprünglichen Zellen stärker exprimiert wird als beim Subklon TC7. In Folge der stärkeren Expression von P-gp in parentalen Zellen hat der Transporter eine höhere Kapazität und lässt sich mit der eingesetzten Konzentration nicht vollständig hemmen. Es wäre also denkbar, dass Cyclosporin A beim Subklon TC7 ebenfalls zu einer vollständigen Hemmung der Sekretion führt.

Durch Energieblockade kann die Sekretion von Ofloxacin ebenfalls auf das Niveau der Absorption reduziert werden. Dieses Ergebnis ist vorhersehbar, da unter Ausschaltung des Energiestoffwechsels keine aktiven Transportmechanismen mehr stattfinden. Es laufen lediglich über Konzentrationsgradienten getriebene, passive Diffusionsvorgänge ab, die Carrier-vermittelt oder als einfache Diffusion erfolgen können. In absorptiver Richtung ergibt sich im Vergleich zum Standardversuch ohne Inhibitor sogar eine leichte Steigerung der Permeation. Diese Steigerung kann mit der Blockade des Transports von Ofloxacin aus der Zelle zurück ins Lumen erklärt werden. Damit kommt es zu einer Anreicherung des Arzneistoffs im Zellinnern, was

die durch das vorliegende Konzentrationsgefälle getriebene passive Diffusion, aber auch erleichterte Diffusionsmechanismen, steigert. Es kann folglich die Beteiligung eines aktiven Transporters für die Absorption ausgeschlossen werden, da sich dies in einer Reduktion der Permeabilität unter Energieentzug in absorptiver Richtung auswirken müsste. Aus dem Kontrollexperiment mit Rhodamin 123 unter Energieblockade wird allerdings ersichtlich, dass aktive Transportmechanismen sehr unterschiedlich auf ATP-Depletion reagieren. Der Effekt des Energieentzugs auf die Rhodamin-Sekretion ist im Vergleich zum Effekt, der bei der Sekretion von Ofloxacin beobachtet wird, schwächer. Die Restenergiemenge, die die Zellen zum Überleben benötigen, wird demzufolge auch noch in Transportmechanismen geleitet, so dass diese durchaus noch Aktivität aufweisen. Ein aktiver Absorptionsmechanismus für Ofloxacin ist zwar nach diesem Versuchsergebnis unwahrscheinlich, kann aber je nach Sensitivität des Transporters auf Energieentzug nicht völlig ausgeschlossen werden.

Es bleibt festzuhalten, dass ein sehr großer Teil der Sekretion auf P-gp zurückzuführen ist. In absorptiver Richtung spielt wahrscheinlich eine gute passive Permeabilität eine entscheidende Rolle. Dies wird bestätigt durch frühere Untersuchungen am isolierten Rattendarm (Rabaa et al., 1997). In dieser Studie wurde die pH-Abhängigkeit des Transports untersucht, welche nahe dem isoelektrischen Punkt, also am Maximum der Lipophilie des Moleküls, die beste Permeabilität aufweist. Die sehr gute Bioverfügbarkeit trotz intestinaler Sekretion kann allerdings nicht mit einer rein passiven Permeation in absorptiver Richtung erklärt werden. Es ist davon auszugehen, dass Carrier beteiligt sind. Generell kann man sagen, dass bei Vorliegen von niedrigen bis moderaten Permeations-koeffizienten (P_{app}<$10 \cdot 10^{-6}$ cm/s) an Caco-2 Zellen trotz guter in vivo Bioverfügbarkeit, häufig ein Carrier an der Arzneistoffabsorption beteiligt ist (Artursson et al., 1996). Aus den energieabhängigen Versuchen scheint es wahrscheinlich, dass es sich dabei nicht um primär-aktive Transporter handelt. Ein Mechanismus, der der erleichterten Diffusion entspricht, liegt nahe.

Die Versuche mit Probenecid als Inhibitor deuten auf einen Probenecid-sensitiven Mechanismus in absorptiver Richtung hin. Probenecid reduziert die Permeationskoeffizienten von Ofloxacin in absorptiver Richtung signifikant. Da es sich bei Probenecid um einen unspezifischen Inhibitor verschiedener Anionen-

Transporter handelt, kann der Effekt von unterschiedlichen Carriern hervorgerufen werden.

Eine Untersuchung aus dem Jahr 2007 (Maeda et al.) postulierte auf molekularer Ebene durch den Vergleich des Ausmaßes der Expression verschiedener Transporter, erstmals einen möglichen Influx-Transporter für Ofloxacin. Es handelt sich dabei um OATP1A2, einen organischen Anionentransporter. OATPs transportieren ihre Substrate im Sinne einer erleichterten Diffusion über die Membran. Auch Probenecid wird unter anderem über diesen Carrier transportiert. Mit Hilfe einer transzellulären Permeationsstudie unter Einsatz des spezifischen OATP1A2-Inhibitors Naringin kann die postulierte Beteiligung von OATP1A2 an der Ofloxacin-Absorption auf diesem Weg bestätigt werden. Naringin führt wie Probenecid zu einer Reduktion der Permeationskoeffizienten in absorptiver Richtung Der inhibitorische Effekt von Naringin ist allerdings etwas schwächer ausgeprägt als der durch Probenecid hervorgerufene. Es ist folglich nicht auszuschließen, dass auch weitere Carrier über erleichterte Diffusion die Absorption von Ofloxacin begünstigen.

Abbildung 5-1 gibt einen Überblick über den nach den vorliegenden Ergebnissen postulierten Transportmechanismus von Ofloxacin durch Caco-2/TC7 Monolayer. Die basolaterale Membran wird durch einfache passive Diffusion überwunden. Es ist nicht auszuschließen, dass dieser Transport durch Carrier unterstützt wird, bisher kann allerdings noch kein Transporter identifiziert werden, bei dem bekannt ist, dass er in der basolateralen Membran lokalisiert ist. Auch beim Transport durch die apikale Membran ist ein großer Anteil der Permeabilität auf einfache passive Diffusion zurückzuführen. Die Absorption wird durch Influx-Carrier, die im Sinne einer erleichterten Diffusion Ofloxacin durch die Membran schleusen, verbessert. Einer dieser Carrier ist OATP1A2, darüber hinaus liegt die Beteiligung weiterer Carrier nahe. Der Transport in sekretorischer Richtung erfolgt hauptsächlich durch aktive Sekretion über P-gp.

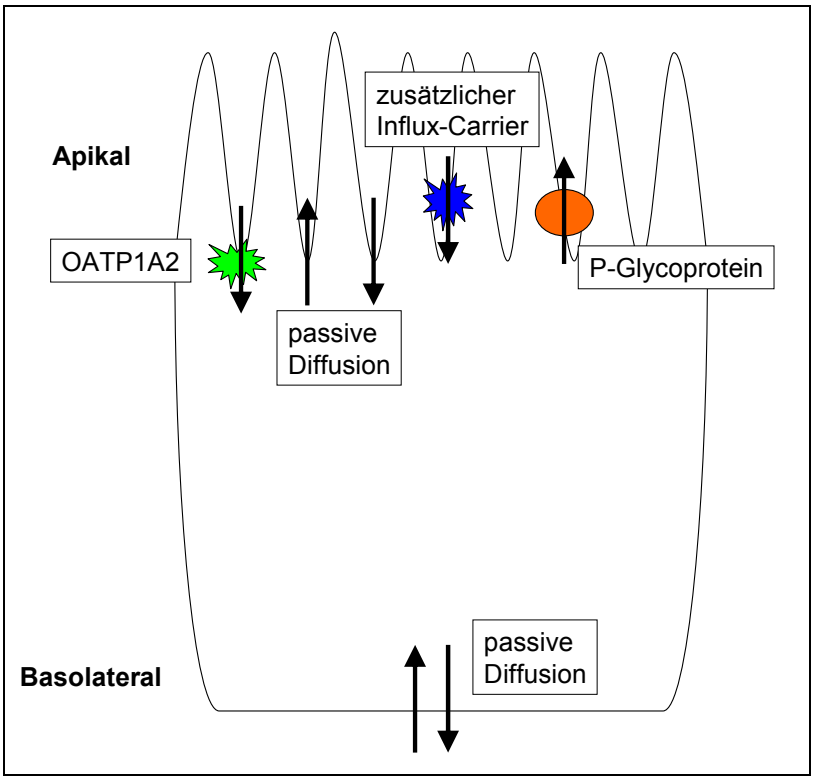


Abbildung 5-1 Schematische Darstellung des transepithelialen Transport-mechanismus von Ofloxacin

Hinsichtlich der Stereospezifität ergeben sich leichte, wenn auch nicht signifikante, Unterschiede. So liegen die Permeationskoeffizienten in Richtung Absorption für Levofloxacin konstant über den Werten, die sich für das R-Enantiomer ergeben. Unter Standardbedingungen sind die Werte beider Enantiomere in Richtung Sekretion gleich. Interessanterweise wird durch den Einsatz der P-gp-Inhibitoren Verapamil und Chinidin auch in dieser Transportrichtung ein stereoselektiver Unterschied hervorgerufen, allerdings ist er in dieser Richtung zu Gunsten des R-Enantiomers. Demnach kann ein stereoselektiver Mechanismus am Ofloxacin-transport beteiligt sein, der allerdings in sekretorischer Richtung durch die starke P-gp-vermittelte Sekretion maskiert wird und erst durch die Blockade des Efflux-Transporters bemerkbar wird.

Eine mögliche Erklärung für dieses Phänomen wäre die Existenz eines Carriers, der beide Enantiomere durch die apikale Membran transportiert. Dabei kann dieser stereoselektive Unterschied entweder durch den besseren Transport von Levofloxacin in die Zelle, oder aber eine erhöhte Sekretion des R-Enantiomers aus der Zelle hervorgerufen werden (Abbildung 5-2).

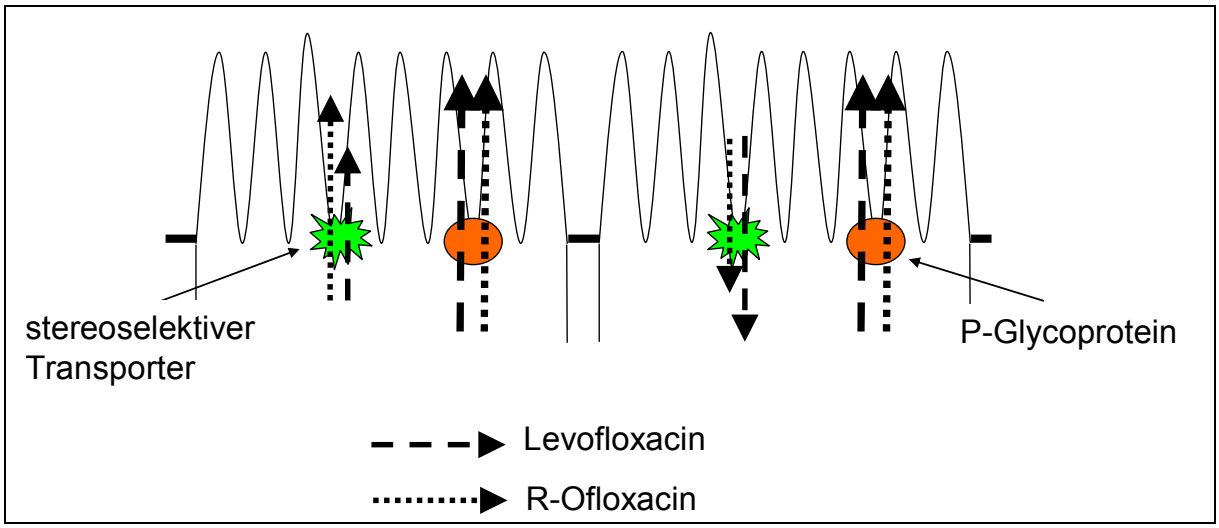


Abbildung 5-2 Schematische Darstellung der beiden Möglichkeiten für einen stereoselektiven Transportmechanismus: linke Hälfte Efflux-mechanismus; rechte Hälfte Influxmechanismus

Unter Normalbedingungen sieht man den stereoselektiven Trend nur in absorptiver Richtung, da er in der Gegenrichtung durch die starke, stereounspezifische P-gp-vermittelte Sekretion überlagert ist. Erst durch Hemmung von P-gp kommt der deutlich langsamere Transport, der vermutlich über erleichterte Diffusion vermittelt wird, zum Tragen.

Sowohl durch Inhibition mit Probenecid als auch mit Naringin bleiben die beobachteten stereoselektiven Trends erhalten. Es ist folglich unwahrscheinlich, dass ein Probenecid-sensitiver Carrier oder OATP1A2 die Unterschiede hervorruft.

Offen bleibt die Frage, warum der stereoselektive Trend unter P-gp-Blockade in Richtung Sekretion sogar stärker ausgeprägt ist als der ursprünglich beobachtete Trend in absorptiver Richtung. Hierzu folgende Überlegung: Angenommen der Transporter sitzt in der apikalen Membran der Zellen. In absorptiver Richtung passiert der Arzneistoff zunächst die apikale Membran im Sinne einer erleichterten Diffusion. Nach Durchqueren des Cytosols wird die basolaterale Membran durch passive Diffusion oder über einen weiteren Carrier überwunden. Da es sich nicht um einen aktiven Transport handelt, wird die Transportgeschwindigkeit durch den Konzentrationsgradienten über den Membranen bestimmt. Dieser ist an der apikalen Membran deutlich größer. Der an der apikalen Seite hervorgerufene stereoselektive Unterschied wird folglich durch die langsame Permeation durch die basolaterale Membran wieder maskiert.

Beim Transport in die Gegenrichtung verhalten sich die Transportgeschwindigkeiten durch die Membranen nun umgekehrt. Der Konzentrationsgradient ist hier über der basolateralen Membran größer, weshalb der Arzneistoff diese schneller überwinden kann. Da in der apikalen Membran unter P-gp-Blockade dieser Transporter keine Rolle spielt, kommt nun der Transport über den stereoselektiven Carrier zum Tragen. Gerade bei kleinen Konzentrationsgradienten macht es einen deutlichen Unterschied, ob ein Stoff über einfache Diffusion oder unterstützt durch einen Transporter über erleichterte Diffusion die Membran passiert. Der in der apikalen Membran lokalisierte Carrier ist nun in der Lage, entweder das R-Enantiomer bevorzugt durch die Membran zu schleusen oder Levofloxacin, das im apikalen Kompartiment ankommt, wieder zurück ins Cytosol zu transportieren (Abbildung 5-2). Beide Alternativen führen zu einer erhöhten Konzentration des R-Ofloxacins im apikalen Kompartiment und damit zu einer erhöhten Sekretion dieses Enantiomers. Der stärker ausgeprägte stereoselektive Trend unter P-gp-Blockade lässt sich folglich nur dann erklären, wenn der entsprechende Carrier an der apikalen und damit der gleichen Seite wie P-gp lokalisiert ist, wobei nicht ausgeschlossen werden kann, dass er zusätzlich in der basolateralen Membran exprimiert wird.

Abschließend muss nochmals betont werden, dass es sich bei der beobachteten Stereoselektivität nur um Trends handelt. Wie oben bereits erwähnt, wird Ofloxacin vermutlich über eine Vielzahl von möglichen Carriern transportiert. Es liegt nahe, dass die beiden Enantiomere des Ofloxacins für diese Proteine unterschiedlich gute Substrate darstellen können. Es kann sich allerdings kein wirklicher Effekt durchsetzen, da immer nur die Gesamtheit aller Mechanismen sichtbar ist.

Zusammenfassend lässt sich aus den durchgeführten Experimenten folgendes Gesamtbild für den Transportmechanismus ableiten: Ofloxacin unterliegt einer gerichteten Sekretion, die zu einem großen Teil auf den Transport über P-Glycoprotein zurückzuführen ist. Weitere Transporter sind in dieser Richtung allerdings nicht auszuschließen. In Richtung Absorption spielt sicherlich die einfache passive Diffusion eine entscheidende Rolle für die Permeabilität, zusätzlich sind aber noch weitere Carrier am Transport beteiligt, die vermutlich alle im Sinne einer erleichterten Diffusion den Ofloxacintransport durch die Biomembran unterstützen. Bei einem dieser Carrier handelt es sich um das organische Anionen-transportierende Polypeptid OATP1A2.

6 ZUSAMMENFASSUNG

Ziel der vorliegenden Arbeit ist die Aufklärung der endothelialen Transportmechanismen von Ofloxacin. Als in vitro Modell für das gastrointestinale Epithel steht der Subklon TC7 der Caco-2 Zelllinie zur Verfügung. Anhand von Permeationsstudien, die an Monolayern im Transwell-Filterkammersystem durchgeführt werden, sollen die Mechanismen der Arzneistoffabsorption mittels Variationen im Versuchsaufbau durchleuchtet werden. Ein weiterer Teil der Arbeit beschäftigt sich mit der Entwicklung einer Methode, die es ermöglicht, die intrazelluläre Arzneistoffkonzentration zu quantifizieren und so die Arzneistoffaufnahme in die Zelle zu bestimmen.

Beim Gyrasehemmer Ofloxacin handelt es sich um ein chirales Molekül, wobei die beiden Enantiomere Unterschiede in ihrer antibiotischen Wirkung aufweisen. Dies ist zunächst auf den unterschiedlich starken inhibitorischen Effekt der Moleküle auf das Zielenzym zurückzuführen, daneben wird eine unterschiedliche Pharmakokinetik der Enantiomere diskutiert. Es konnte bereits in früheren Studien nachgewiesen werden, dass der Metabolismus des Arzneistoffs stereoselektiv ist. Da allerdings nur ein kleiner Teil des Ofloxacins metabolisiert wird, wohingegen der Hauptteil unverändert über die Niere eliminiert wird, stellt sich die Frage, ob hierin der ausschließliche Grund für die unterschiedlich gute Wirkung liegen kann. Denkbar wäre auch eine Stereoselektivität beim epithelialen Arzneistofftransport.

Aufgrund widersprüchlicher Angaben in der Literatur bezüglich einer stereoselektiven Diskriminierung eines der beiden Enantiomere bei der intestinalen Permeation, wird die Stereoselektivität anhand der isolierten Betrachtung des epithelialen Transports beider Enantiomere untersucht. Darüber hinaus wird die starke Sekretion, der Ofloxacin unterliegt, genauer betrachtet. Dabei stellt sich die Frage, welcher Anteil der Sekretion auf P-Glycoprotein zurückzuführen ist und ob möglicherweise weitere Efflux-Transporter mitwirken. Ein weiterer Aspekt dieser Arbeit beschäftigt sich mit dem Transport von Ofloxacin in absorptiver Richtung. Ofloxacin zeigt trotz der starken Sekretion, der es unterliegt, in vivo eine sehr gute Bioverfügbarkeit. Dies ist ein Hinweis auf mögliche Transporter, die in absorptiver Richtung den Transport unterstützen. Eine rein passive Permeabilität bei der vorliegenden starken Sekretion würde eine geringere Bioverfügbarkeit erwarten lassen.

Mit Hilfe einer kapillarelektrophoretischen Methode ist es möglich, die beiden Ofloxacin-Enantiomere nebeneinander in einer Probe zu quantifizieren. Auf diese Weise werden für jedes durchgeführte Experiment die Permeationskoeffizienten der beiden Isomere getrennt voneinander ermittelt. Zur besseren Interpretation der Ergebnisse hinsichtlich des Ausmaßes der Beteiligung von P-gp dient Rhodamin 123, ein bekanntes P-gp-Substrat, als Vergleichssubstanz. Die Schlüsselexperimente, bei denen P-gp-Inhibitoren zum Einsatz kommen sowie die Untersuchungen der Energieabhängigkeit, werden aus diesem Grund auch mit Rhodamin durchgeführt.

Permeationsstudien mit Caco-2 Monolayern im Transwell-Filterkammersystem bieten einen mechanistischen Ansatz zur Aufklärung der beim Arzneistofftransport beteiligten Mechanismen. Zunächst wird die Konzentrationsabhängigkeit des Ofloxacintransports untersucht. Es wird weder in Richtung der Absorption, noch in Richtung der Sekretion ein signifikanter Effekt der eingesetzten Startkonzentrationen auf die daraus resultierenden Permeationskoeffizienten beobachtet. Die ermittelten Werte sind im gesamten Konzentrationsbereich jeweils auf einem Niveau, wobei die Werte der Sekretion alle signifikant über den Werten der Absorption liegen. Dies ist der Beweis dafür, dass Ofloxacin einem aktiven Sekretionsmechanismus unterliegt, der allerdings im untersuchten Konzentrationsbereich keine Sättigung zeigt.

Durch den Einsatz der beiden P-gp-Inhibitoren Verapamil und Chinidin wird das Ausmaß der Beteiligung dieses Efflux-Transporters an der Sekretion von Ofloxacin ermittelt. Sowohl Verapamil als auch Chinidin reduziert die Permeationskoeffizienten in sekretorischer Richtung im Vergleich zum Kontrollexperiment ohne Inhibitor. Ein Vergleich der erhaltenen Ergebnisse mit den Resultaten aus den Versuchen mit dem Modellarzneistoff Rhodamin 123 lässt eine Aussage über die Effektivität beider Inhibitoren zu. Verapamil zeigt sowohl bei Ofloxacin als auch bei Rhodamin im Vergleich zu Chinidin den stärkeren inhibitorischen Effekt auf P-gp. Die Ofloxacin-Sekretion kann mit beiden Inhibitoren auf das Niveau der Werte für die Absorption reduziert werden, in der Gesamtbilanz ist also keine aktive Sekretion mehr zu erkennen. Da die Permeation in beiden Transportrichtungen gleich groß ist, hat sie vermutlich passiven Charakter und ist nur noch über den Konzentrationsgradienten an der Membran bestimmt, der in beiden Richtungen gleich groß ist.

Ferner stellt sich die Frage, ob neben P-gp möglicherweise andere aktive Mechanismen an der Sekretion beteiligt sind. Dazu wird die Energieabhängigkeit der Permeation untersucht. Durch Ausschaltung des Energiestoffwechsels der Zellen sollten keine aktiven Transportmechanismen mehr ablaufen. Zur Blockade der ATP-Synthese kommt eine Kombination von Natriumazid und 2-Deoxyglucose zum Einsatz. Durch ATP-Depletion können die Permeationskoeffizienten der beiden entgegengesetzten Transportrichtungen, wie dies auch nach P-gp-Inhibition zu beobachten ist, auf dasselbe Niveau gebracht werden. Dies ist ein Beleg dafür, dass die aktiven Mechanismen der Sekretion vollständig inhibiert werden. Da der Effekt genauso stark ist wie bei P-gp-Hemmung, liegt die Vermutung nahe, dass dies der einzige beteiligte aktive Efflux-Mechanismus ist. Des Weiteren kann auf Grund dieses Experiments die Beteiligung eines aktiven Transporters in absorptiver Richtung ausgeschlossen werden. Wäre ein aktiver Mechanismus in dieser Richtung beteiligt, müssten die Permeationskoeffizienten reduziert werden. Im Gegensatz dazu steigen die Werte im Vergleich zum Standardexperiment ohne Inhibitor sogar leicht an, was mit der Blockade der Sekretion und damit der Verhinderung des Rücktransports bereits permeierten Arzneistoffs erklärt werden kann.

Für den Transport in absorptiver Richtung lässt sich folglich festhalten, dass ein aktiver Mechanismus unwahrscheinlich ist. Die Beteiligung eines Carriers an der Absorption gilt allerdings aufgrund der guten in vivo Bioverfügbarkeit von Ofloxacin als sehr wahrscheinlich. Es könnte sich dabei um einen Transporter handeln, der im Sinne einer erleichterten Diffusion die Permeation unterstützt. Sowohl Probenecid, ein unspezifischer Inhibitor verschiedener Anionentransporter als auch Naringin, ein spezifischer Inhibitor des organischen Anionen-transportierenden Polypeptids OATP1A2, führen zu einer Reduktion der Permeationskoeffizienten in Richtung der Absorption. Der Effekt von Probenecid ist etwas stärker ausgeprägt, als der von Naringin. Dementsprechend kann OATP1A2 als ein Influx-Transporter für Ofloxacin identifiziert werden, eine Beteiligung weiterer Probenecid-sensitiver Transporter ist allerdings wahrscheinlich. Da OATP1A2 kein aktiver Transporter ist, sondern über erleichterte Diffusion Substrate transportiert, steht dieses Ergebnis im Einklang mit den aus den energieabhängigen Versuchen erhaltenen Resultaten.

Im Hinblick auf eine mögliche Stereoselektivität des Ofloxacintransports ergibt der Vergleich der jeweiligen Permeationskoeffizienten beider Enantiomere zunächst

keine signifikanten Unterschiede. Bei genauerer Betrachtung ist allerdings auffällig, dass in Richtung der Absorption die Werte von Levofloxacin konstant über den Werten des R-Enantiomers liegen. Im Gegensatz zum ANOVA-Test ergibt die Anwendung des parameterfreien Vorzeichentests nach Dixon und Mood einen signifikanten Unterschied der Permeationskoeffizienten beider Enantiomere. In Richtung der Sekretion sind unter Standardbedingungen die Werte für beide Isomere gleich. Erst durch P-gp-Blockade tritt auch hier ein stereoselektiver Trend, der wiederum nicht signifikant ist, auf. In Richtung Sekretion ist der stereoselektive Trend zu Gunsten des R-Enantiomers. Aus diesem Resultat kann die Existenz eines stereoselektiven Carriers postuliert werden. Hierbei könnte es sich entweder um einen Influx-Transporter handeln, für den Levofloxacin das etwas bessere Substrat darstellt oder aber einen Efflux-Transporter, der R-Ofloxacin schneller transportiert. Unter normalen Bedingungen ist der Carrier nur in absorptiver Richtung bemerkbar, da die stereounspezifische P-gp-vermittelte Sekretion den Effekt in der Gegenrichtung maskiert.

Im letzten Teil dieser Arbeit wird eine Methode zur Bestimmung der Arzneistoffaufnahme in die Zelle ausgearbeitet. Mit Hilfe des Modellarzneistoffes Rhodamin 123 ist es gelungen, eine Methode zu entwickeln, mit der die intrazelluläre Arzneistoffkonzentration, also der Teil des Arzneistoffes der in der Zelle angereichert wird, quantifiziert werden kann. Dazu werden nach Inkubation der Monolayer mit Arzneistofflösung diese gewaschen und anschließend lysiert. Die Lyse der Zellen erfolgt durch Behandlung mit Natronlauge in Kombination mit einer Ultraschallbehandlung. Aus dem Lysat wird neben der vorhandenen Arzneistoffkonzentration die Proteinmenge nach der Methode von Lowry bestimmt. Die aufgenommene Arzneistoffmenge kann dann auf den Proteingehalt, als Maß für die in der Probe vorhandenen Zellen, normiert werden. Diese Methode ermöglicht es, den Arzneistofftransport im Gegensatz zum Vorgehen bei den transzellulären Permeationsversuchen, isoliert über je eine der beiden gegenüberliegenden Membranen der Epithelzellen zu betrachten. Aufgrund seiner schlechteren Wasserlöslichkeit und einer dadurch bedingten Adsorption des Arzneistoffes an Membranbestandteile und Filtermaterial erweist sich die Übertragung der Methode auf Ofloxacin als problematisch und wird Gegenstand weiterer Untersuchungen sein.

Zusammenfassend lässt sich für den ermittelten Transportmechanismus von Ofloxacin durch das Epithel folgendes festhalten: Ofloxacin unterliegt einer starken Sekretion, die sich zum Großteil, wenn nicht sogar komplett, durch P-Glycoprotein erklären lässt. Ofloxacin zeigt außerdem eine gute passive Permeabilität, die für den transmembranären Transport sicherlich eine wichtige Rolle spielt. Die Ofloxacin-Absorption wird darüber hinaus durch verschiedene Carrier unterstützt, die im Sinne einer erleichterten Diffusion die Permeabilität von Ofloxacin durch die Membran erhöhen. Ein Permeationsexperiment mit Naringin als spezifischen Inhibitor kann OATP1A2 als einen der beteiligten Transporter identifizieren. Die Untersuchung des Ofloxacintransports durch Caco-2/TC7 Monolayer deutet das Vorhandensein eines stereoselektiven Transporters an, es kann letztlich aber kein signifikanter Unterschied im Ausmaß des Transports der beiden Enantiomere nachgewiesen werden. Dies ist sicherlich auf die Komplexität des Transportmechanismus zurückzuführen, der aus dem Zusammenspiel vieler einzelner Mechanismen resultiert. Der Effekt eines stereospezifischen Carriers wird vermutlich durch andere unspezifische aber auch durch den Anteil, der über einfache passive Diffusion transportiert wird, überdeckt.

7 LITERATURVERZEICHNIS

Amidon G. L.; Lennernäs, H.; Sha, V. P.; Crison, J. R.
A theoretical basis for a biopharmaceutics drug classification: the correlation of in vitro drug product dissolution and in vivo bioavailability
Pharm. Res. **12** (3), 413-420 **(1995)**

Artursson, P.
Cell cultures as models for drug absorption across the intestinal mucosa
Crit. Rev. Ther. Drug Carrier Syst. **8**, 305-330 **(1991)**

Artursson, P.; Unguell, A.-L.; Löfroth, J.-E.
Selective paracellular permeability in two models for intestinal absorption: cultured monolayers of human intestinal epithelial cells and rat intestinal segments
Pharm. Res. **10** (8), 1123-1129 **(1993)**

Artursson, P.; Karlsson, J.; Ocklind, G.; Schipper, N.
Studying transport processes in absorptive epithelia
Epithelial Cell Culture, Oxford, UK, 111-133 **(1996)**

Awadallah, B.
Stereospezifität des aktiven Arzneistofftransports: Modelluntersuchungen an Caco-2/TC-7-Zellen und quantitative Enantiomerenbestimmung mittels Kapillar-elektrophorese
Dissertation, Eberhard-Karls-Universität, Tübingen **(2003)**

Awadallah, B.; Schmidt, P. C.; Wahl, M. A.
Quantitation of the enantiomers of ofloxacin by capillary electrophoresis in the parts per billion concentration range for in vitro drug absorption studies
J. Chromatogr. A. **988** (1), 135-143 **(2003)**

Bailey, D. G.; Dresser, G. K.; Leake, B. F.; Kim, R. B.
Naringin is a major and selective clinical inhibitor of organic anion-transporting polypeptide 1A2 (OATP1A2) in grapefruit juice
Clin. Pharmacol. Ther. **81** (4), 495-502 **(2007)**

Barecki-Roach, M.; Wang, E.-J.; Johnson, W.
Many P-glycoprotein substrates do not inhibit the transportprocess across cell membranes
Xenobiotica **33** (2), 131-140 **(2003)**

Barthe, L.; Woodley, J.; Houin, G.
Gastrointestinal absorption of drugs: methods and studies
Fundam. Clin. Pharm. **13** (2), 154-168 **(1999)**

Braun, J. S.
Arzneistoffabsorption in Caco-2/TC7 Zellen: Ibuprofen und der Monocarboxylat-Transporter 1 (MCT1)
Dissertation, Eberhard-Karls-Universität, Tübingen **(2007)**

Burger, H.; van Tol, H.; Brok, M.; Wiemer, E. A.; de Bruijn, E. A.; Guetens, G.; de Boeck, G.; Sparreboom, A.; Verweij, J.; Nooter, K.
Chronic imatinib mesylate exposure leads to reduced intracellular drug accumulation by induction of the ABCG2 (BCRP) and ABCB1 (MDR1) drug transport pumps
Cancer Biol. Ther. **4** (7), 747-752 **(2005)**

Caro, I.; Boulenc, X.; Rousset, M.; Meunier, V.; Bourrié, M.; Julian, B.; Joyeux, H.; Roques, C.; Berger, Y.; Zweibaum, A.; Fabre, G.
Characterisation of a newly isolated Caco-2 clone (TC-7), as a model of transport processes and biotransformation of drugs
Int. J. Pharm. **116**, 147-158 **(1995)**

Carrière, V.; Lesuffleur, T.; Barbat, A.; Rousset, M.; Dussaulx, E.; Costet, P.; de Waziers, I.; Beaune, P.; Zweibaum, A.
Expression of cytochrome P-450 3 A in HT29-MTX cells and Caco-2 clone TC7
FEBS Letters **355**, 247-250 **(1994)**

Dixon, W. J.; Mood, A. M.
The statistical sign test
J. Amer. Statist. Assoc. **41**, 557-566 **(1946)**

Doppenschmidt, S.; Spahn-Langguth, H.; Regårdh, C.; Langguth, P.
Role of P-glycoprotein-mediated secretion in absorptive drug permeability: An approach using passive membrane permeability and affinity to P-gycoprotein
J. Pharm. Sci. **88** (10), 1067-1072 **(1999)**

Elimrani, I.; Lahjouji, K.; Seidman, E.; Roy, M. J.; Mitchell, G. A.; Qureshi, I.
Expression and localization of organic cation/carnitine transporter OCTN2 in Caco-2 cells
Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol. **284**, 863-871 **(2003)**

Emi, Y.; Tsunashima, D.; Ogawara, K.-I.; Higaki, K.; Kimura, T.
Role of P-glycoprotein as a secretory mechanism in quinidine absorption from rat small intestine
J. Pharm. Sci. **87** (3), 295-299 **(1998)**

Engelhardt, H.; Beck, W.; Schmitt, T.
Kapillarelektrophorese – Methoden und Möglichkeiten
1. Auflage, Vieweg Verlag **(1994)**

Faasen, F.; Vogel, G.; Spanings, H.; Vromans, H.
Caco-2 permeability, P-glycoprotein transport ratios and brain penetration of heterocyclic drugs
Int. J. Pharm. **263**, 113-122 **(2003)**

FDA Guidance for Industry
Waiver of in vivo bioavailability and bioequivalence studies for immediate-release solid oral dosage forms based on a biopharmaceutics classification system
Center for Drug Evaluation and Research/FDA **(2000)**

FDA Draft Guidance for Industry
Drug interaction studies – Study design, data analysis, and implications for dosing and labeling
Center for Drug Evaluation and Research/FDA **(2006)**

Fogh, J.; Fogh, M.; Orfeo, T.
One hundred and twenty-seven cultured human tumor cell lines producing tumors in nude mice
J. Natl. Cancer Inst. **59**, 221-226 **(1997)**

Foote, E. F.; Halstenson, C. E.
Effects of probenecid and cimetidine on renal disposition of ofloxacin in rats
Antimicrob. Agents Chemother. **42** (2), 456-458 **(1998)**

Fujimoto, T.; Mitsuhashi, S.
In vitro antibacterial activity of DR-3355, the S-(-)-isomer of ofloxacin
Chemotherapy **36** (4), 268-276 **(1990)**

Gilbert, T.; Rodriguez-Boulan, E.
Induction of vacuolar apical compartments in the Caco-2 intestinal epithelial cell line
J. Cell Sci. **100**, 451-458 **(1991)**

Grès, M.-C.; Julian, B.; Bourrié, M.; Meunier, V.; Roques, C.; Berger, M.; Boulenc, X.; Berger, Y.; Fabre, G.
Correlation between oral drug absorption in humans, and apparent drug permeability in TC-7 cells, a human epithelial intestinal cell line: comparison with the parental Caco-2 cell line
Pharm. Res. **15** (5), 726-733 **(1998)**

Hagenbuch, B.; Meier, P. J.
The superfamily of organic anion transporting polypeptides
Biochim. Biophys. Acta **1609** (1), 1-18 **(2003)**

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

Higgins, C. F.; Gottesman, M. M.
Ist the multidrug transporter a flippase?
Trends Biochem. Sci. **17** (1), 18-21 **(1992)**

Hirai, K.; Aoyama, H.; Irikura, T.; Iyobe, S.; Mitsuhashi, S.
Differences in susceptibility to quinolones of outer membrane mutants of Salmonella typhimurium and Escherichia coli
Antimicrob. Agents Chemother. **29** (3), 535-538 **(1986)**

Holló, Z.; Homolya, L.; Hegedüs, T.; Sarkadi, B.
Transport properties of the multidrug resistance-associated protein (MRP) in human tumour cells
FEBS Letters **383**, 99-104 **(1996)**

Hunter, J.; Hirst, B.; Simmons, N.
Drug absorption limited by P-glycoprotein-mediated secretory drug transport in human intestinal epithelial Caco-2 cell layers
Pharm. Res. **10** (5), 743-749 **(1993)**

ICH Guideline for Industry ICH-Q2(R1), Validation of analytical procedures: Text and Methodology (November **2005**)

Janneh, O.; Jones, E.; Chandler, B.; Owen, A.; Khoo, S. H.
Inhibition of P-glycoprotein and multidrug resistance-associated proteins modulates the intracellular concentration of lopinavir in cultured CD4 T cells and primary human lymphocytes
J. Antimicrob. Chemother. **60** (5), 987-993 **(2007)**

Lee, W.; Glaeser, H.; Smith, L. H.; Roberts, R. L.; Moeckel, G. W.; Gervasini, G.; Leake B. F.; Kim R. B.
Polymorphisms in human organic anion-transporting polypeptide 1A2 (OATP1A2): implications for altered drug disposition and central nervous system drug entry
J. Biol. Chem. **280** (10), 9610-9617 **(2005)**

Le Ferrec, E.; Chesne, C.; Artursson P.; Brayden, D.; Fabre, G.; Gires, P.; Guillou, F.; Rousset, M.; Rubas, W.; Scarino, M. L.
In vitro models of the intestinal barrier
ATLA **29**, 649-668 **(2001)**

Lennernäs, H.
Human intestinal permeability
J. Pharm. Sci. **87** (4), 403-410 **(1998)**

Lesslie, E. M.; Deeley, R.G.; Cole, S. P.
Multidrug resistance proteins: role of P-glycoprotein, MRP1, MRP2, and BCRP (ABCG2) in tissue defense
Toxicol. Appl. Pharmacol. **204** (3), 216-237 **(2005)**

Lipinski, C.A.
Drug-like properties and the cause of poor solubility and poor permeability
J. Pharmacol. Toxicol. Methods **44** (1), 235-249 **(2000)**

Loo, T. W.; Bartlett, C.; Clarke, D. M.
The drug-binding pocket of the human multidrug resistance P-glycoprotein is accessible to the aqueous medium
Biochemistry **42**, 12081-12089 **(2004)**

Lowes, S.; Simmons, N. L.
Multiple pathways for fluoroquinolone secretion by human intestinal epithelial (Caco-2) cells
Br. J. Pharmacol. **135**, 1263-1275 **(2002)**

Lowry, O. H.; Rosebrough, N. J.; Farr, A. L.; Randall R. J.
Protein measurement with folin phenol reagent
J. Biol. Chem. **193**, 265-275 **(1951)**

Maeda, T.; Takahashi, K.; Ohtsu, N.; Oguma, T.; Ohnishi, T.; Atsumi, R.; Tamai, I.
Identification of influx transporter for the quinolone antibacterial agent levofloxacin
Mol. Pharm. **4** (1), 85-94 **(2007)**

Merino, G.; Alvarez, A. I.; Pulido, M. M.; Molida, A. J.; Schinkel, A. H.; Prieto, J. G.
Breast cancer resistance protein (BCRP/ABCG2) transports fluoroquinolone antibiotics and effects their oral availability, pharmacokinetics and milk secretion
Drug. Metab. Dispos. **34** (4), 690-695 **(2006)**

Morrissey, I.; Hoshino, K.; Sato, K.; Yoshida, A.; Hayakawa, I.; Bures, M. G.; Shen, L. L.
Mechanism of differential activities of ofloxacin enantiomers
Antimicrob. Agents Chemother. **40** (8), 1775-1784 **(1996)**

Nakagawa, M.; Schneider, E.; Dixon, K. H.; Horton, J.; Kelley, K.; Morrow, C.; Cowan, K. H.
Reduced intracellular drug accumulation in the absence of P-glycoprotein (mdr1) overexpression in mitoxantrone-resistant human MCF-7 human breast cancer cells
Cancer Res. **52** (22), 6175-6181 **(1992)**

Narawa, T.; Tsuda, Y.; Itoh, T.
Chiral recognition of amethopterin enantiomers by the reduced folate carrier in Caco-2 cells
Drug Metab. Pharmacokinet. **22** (1), 33-40 **(2007)**

Okano, T.; Maegawa, H.; Inui, K.-I.; Hori, R.
Interaction of ofloxacin with organic cation transport system in rat renal brush-border membranes
J. Pharmacol. Exp. Ther. **255** (3), 1033-1037 **(1990)**

Okazaki, O.; Kurata, T.; Tachizawa, H.
Stereselective metabolic disposition of enantiomers of ofloxacin in rats
Xenobiotica **19** (4), 419-429 **(1989)**

Okazaki, O.; Kojima, C.; Hakusui, H.; Nakashima, M.
Enantioselective Disposition of Ofloxacin in Humans
Antimicrob. Agents Chemother. **35** (10), 2106-2109 **(1991)**

Okeri, H. A.; Arhewoh, I. M.
Analytic profile of the fluoroquinolone antibacterials: Ofloxacin
Afr. J. Biotechnol. **7** (6), 670-680 **(2008)**

Okuda, M.; Kimura, N.; Inui, K.
Interaction of fluoroquinolone antibacterials, DX-619 and levofloxacin, with creatinine transport by renal organic cation transporter hOCT2
Drug Metab. Pharmakokinet. **21** (5), 432-436 **(2006)**

Pinto, M.; Robine-Leon, S.; Appay, M.-D.; Kedinger, M.; Triadou, N.; Dussaulx, E.; Lacroix, B.; Simon-Assmann, P.; Haffen, K.; Fogh, J.; Zweibaum, A.
Enterocyte-like differentiation and polarization of the human colon carcinoma cell line Caco-2 in culture
Biol. Cell **35**, 323-330 **(1983)**

Polli, J. E.; Ginski, M.
Human drug absorption kinetics and comparison to Caco-2 monolayer permeabilities
Pharm. Res. **15** (1), 47-52 **(1998)**

Prieto, J. G.; Barrio, J. P.; Alvarez, A. I.; Gómez, G.
Kinetic mechanism for the intestinal absorption of ofloxacin
J. Pharm. Pharmacol. **40** (3), 211-212 **(1988)**

Rabbaa, L.; Dautrey, S.; Colas-Linhart, N.; Carbon, C.; Farinotti, R.
Intestinal elimination of ofloxacin enantiomers in the rat: evidence of a carrier-mediated process
Antimicrob. Agents Chemother. **40** (9), 2126-2130 **(1996)**

Rabbaa, L.; Dautrey, S.; Colas-Linhart, N.; Carbon, C.; Farinotti, R.
Absorption of ofloxacin isomers in the rat small intestine
Antimicrob. Agents Chemother. **41** (10), 2274-2277 **(1997)**

Raeissi, S. D.; Guo, Z.; Dobson, G. L.; Artursson, P.; Hidalgo, I. J.
Comparison of CYP3A activities in a subclone of Caco-2 cells (TC7) and human intestine
Pharm. Res. **14** (8), 1019-1025 **(1997)**

Saier, M. H. Jr.; Beatty, J. T.; Goffeau, A.; Harley, K. T.; Heijne, W. H.; Huang, S. C.; Jack, D. L.; Jahn, P. S.; Lew, K.; Liu, J.
The major facilitator superfamily
J. Mol. Microbiol. Biotechnol. **1** (2), 257-279 **(1999)**

Schneeberger, E. E.
Claudins form ion-selective channels in the paracellular pathway. Focus on “Claudin extracellular domains determine paracellular charge selectively and resistance but not tight junction fibril architecture“
Am. J. Physiol. Cell. Physiol. **284**, 1331-1333 **(2003)**

Shapiro, A. B.; Ling, V.
Positively cooperative sites for drug transport by P-glycoprotein with distinct drug specificities
Eur. J. Biochem. **250** (1), 130-137 **(1997)**

Silverman, W.; Locovei, S.; Dahl, G.
Probenecid, a gout remedy, inhibits pannexin 1 channels
Am. J. Physiol. Cell Physiol. **295**, 761-767 **(2008)**

Sikri, V.; Pal, D.; Jain, R.; Kalyani, D.; Mitra, A.
Cotransport of macrolide and fluoroquinolones, a beneficial interaction reversing P-glycoprotein efflux
Am. J. Ther. **11**, 433-442 **(2004)**

Sörgel, F.; Jaehde, U.; Naber, K. G.; Stephan, U.
Pharmakokinetics disposition of quinolones in human body fluids and tissues
Clin. Pharmacokinet. **16** (1), 5-24 **(1989)**

Sörgel, F.; Bulitta, J.; Kinzig-Schippers, M.
Wie gut wirken Gyrasehemmer? Pharmakokinetik der Chinolone
Pharmazie in unserer Zeit **5**, 418-427 **(2001)**

Tahara, H.; Kusuhara, H.; Endou, H.; Koepsell, H; Imaoka, T.; Fuse, E.; Sugiyama, Y.
A species difference in the transport activities of H_2 Receptor antagonists by rat and human reanl organic anion and cation transporters
J. Pharmacol. Exp. Ther. **315**, 337-345 **(2005)**

Tavelin, S.; Grasjö, J.; Taipalensuu, J.; Ocklind, G.; Artursson, P.
Applications of epithelial cell culture in studies of drug transport
Methods in molecular biology **188**: Epithelial cell culture protocolls **(2002)**

Troutman, M. D.; Thakker, D. R.
Rhodamine 123 requires carrier-mediated influx for its activity as a P-glycoprotein substrate in Caco-2 cells
Pharm. Res. **20** (8), 1192-1199 **(2003)**

Versantvoort, C. H. M.; Bagrij, T.; Wright, K. A.; Twentyman, P. R.
On the relationship between the probenecid-sensitive transport of daunorubicin or calcein and the glutathione status of the cells overexpressing the multidrug resistance-associated protein (MRP)
Int. J. Cancer **63**, 855-862 **(1995)**

Walter E.; Janich S.; Roessler B. J.; Hilfinger J. M.; Amidon G. L.
HT29-MTX/Caco-2 cocultures as an in vitro model for the intestinal epithelium: in vitro-in vivo correlation with permeability data from rats and humans
J Pharm Sci. **85** (10),1070-1076 **(1996)**

Walter, E.; Kissel, T.
Heterogeneity in the human intestinal cell line Caco-2 leads to differences in transepithelial transport
Eur. J. Pharm. Sci. **3**, 215-230 **(1995)**

Wang, E.; Casciano, R.; Clement, R.; Johnson, W.
Two transport binding sites of P-glycoprotein are unequal yet contingent: initial rate kinetic analysis by ATP hydrolysis demonstrates intersite dependence
Biochim. Biophys. Acta **1481**, 63-74, **(2000)**

Wilson, T. H.; Wiseman G.
The use of sacs of everted small intestine for the study of the transference of substances from the mucosal to the serosal surface
J. Physiol. **123** (1) 116–125 **(1954)**

Woodcock, S.; Williamson, I.; Hassan, I.; Machay, M.
Isolation and characterisation of clones from the Caco-2 cell line displaying increased taurocholic acid transport
J. Cell. Sci. **98**, 323-332 **(1991)**

Yamaguchi, H.; Yano, I.; Hashimoto, Y.; Inui, K.-I.
Secretory mechanisms of grepafloxacin and levofloxacin in the human intestinal cell line Caco-2
J. Pharmacol. Exp. Ther. **295** (1), 360-366 **(2000)**

Yamaguchi, H.; Yano, I.; Saito, H.; Inui, K.-I.
Transport characteristics of grepafloxacin and levofloxacin in the human intestinal cell line Caco-2
Eur. J. Pharmacol. **431**, 297-303 **(2001)**

Yee, S.
In Vitro Permeability Across Caco-2 Cells (Colonic) Can Predict In Vivo (Small Intestinal) Absorption in Man - Fact or Myth
Pharm. Res. **14** (6), 763-766 **(1997)**

You, G.; Morris, M. E.
Drug transporters : Molecular Characterization an Role in Drug Disposition
Wiley Series in Drug Discovery an Development **(2007)**

Yumoto, R.; Murakami, T.; Nakamoto, Y.; Hasegawa, R.; Nagai, J.; Takano, M.
Transport of rhodamine 123, a P-glycoprotein substrate, across rat intestine and Caco-2 cell monolayers in the presence of cytochrome P-450 3A-related compounds
J. Pharm. Exp. Ther. **289**, 149-155 **(1999)**

Yusa, K.; Tsuruo, T
Reversal mechanism of multidrug resistance by verapamil: direct binding of verapamil to P-glycoprotein on specific sites and transport of verapamil outward across the plasma membrane of K562/ADM cells
Cancer Res. **49**, 5002-5006 **(1989)**

Zweibaum A.; Pinto M.; Chevalier G.; Dussaulx E.; Triadou N.; Lacroix B.; Haffen K.; Brun J.; Rousset M.
Enterocytic differentiation of a subpopulation of the human colon tumor cell line HT-29 selected for growth in sugar-free medium and its inhibition by glucose
J. Cell. Physiol. **122** (1), 21–29 **(1985)**

8 ANHANG

8.1 ANALYTIK OFLOXACIN

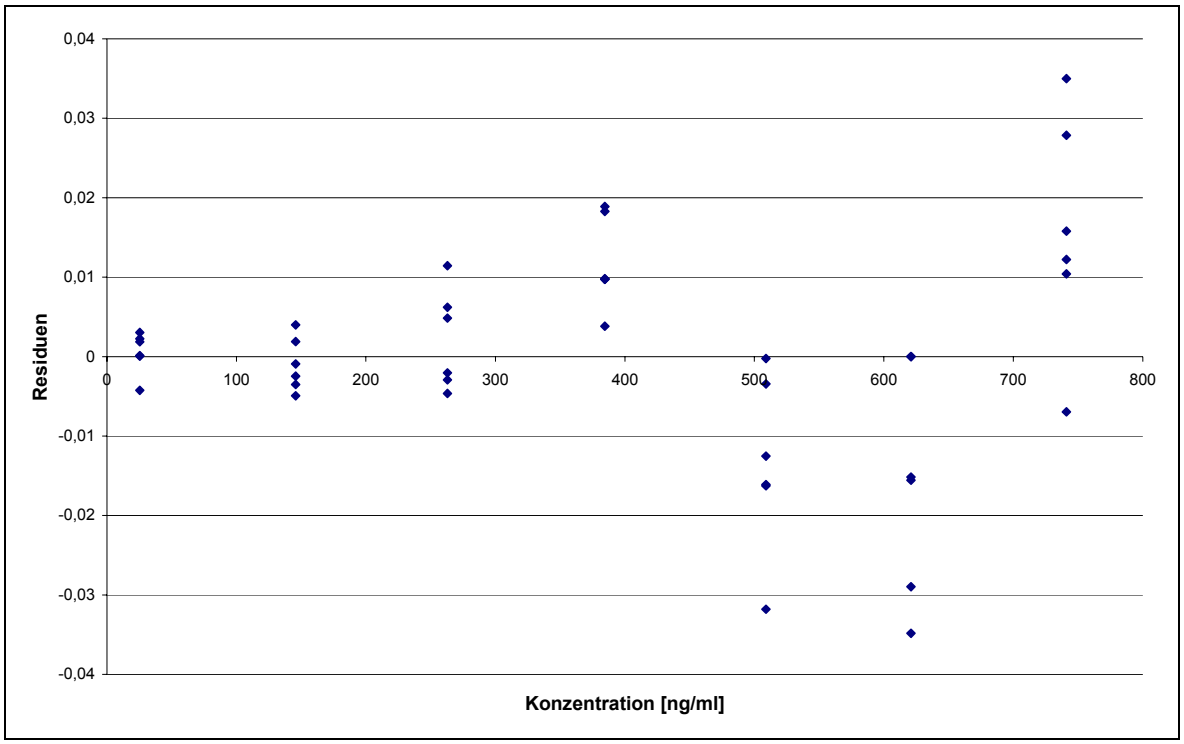


Abbildung 8-1 Residuenplot für S-Ofloxacin

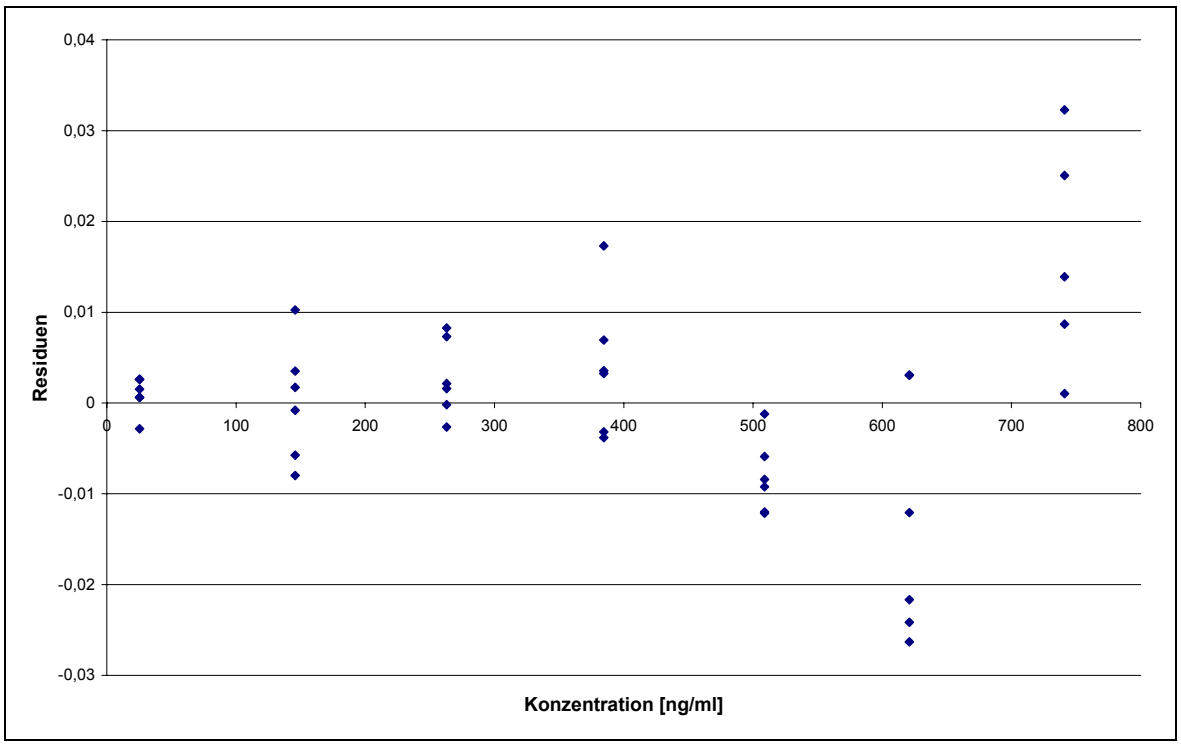


Abbildung 8-2 Residuenplot für R-Ofloxacin

Tabelle 8-1 Richtigkeit für S-Ofloxacin

Soll [ng/ml]	145,7	384,5	509
Ist [ng/ml]	148,3	377,3	504,7
	152,6	385,8	503,2
	150,1	392,7	513,1
Mittelwert [ng/ml]	150,3	385,2	507,0
SD [ng/ml]	2,1	7,7	5,3
relative SD [ng/ml]	1,42	2,00	1,05
Wiederfindung [%]	103,17	100,19	99,60
mittlere Wiederfindung [%]		100,99	
mittlere relative SD		1,91	

Tabelle 8-2 Richtigkeit für R-Ofloxacin

Soll [ng/ml]	145,7	384,5	509
Ist [ng/ml]	146,6	394,2	513,3
	149,5	401,9	519,6
	147,6	403,0	506,7
Mittelwert [ng/ml]	147,9	399,7	513,2
SD [ng/ml]	1,5	4,8	6,4
relative SD [ng/ml]	1,00	1,21	1,25
Wiederfindung [%]	101,52	103,94	100,82
mittlere Wiederfindung [%]		102,10	
mittlere relative SD		1,64	

Tabelle 8-3 Systempräzision Ofloxacin-Bestimmung

Soll: 274 ng/ml	Ist (S-Ofloxacin) [ng/ml]	Ist (R-Ofloxacin) [ng/ml]
1	256,4 258,1 265,0	251,7 254,9 264,1
2	255,7 258,8 256,9	254,9 255,6 260,3
3	262,2 262,6 259,6	262,3 261,7 261,2
4	254,8 253,0 257,2	254,6 259,7 254,2
5	271,1 281,7 281,5	275,4 281,0 280,1
Mittelwert [ng/ml]	262,3	262,1
Relative SD [%]	3,45	3,57

8.2 ANALYTIK RHODAMIN 123

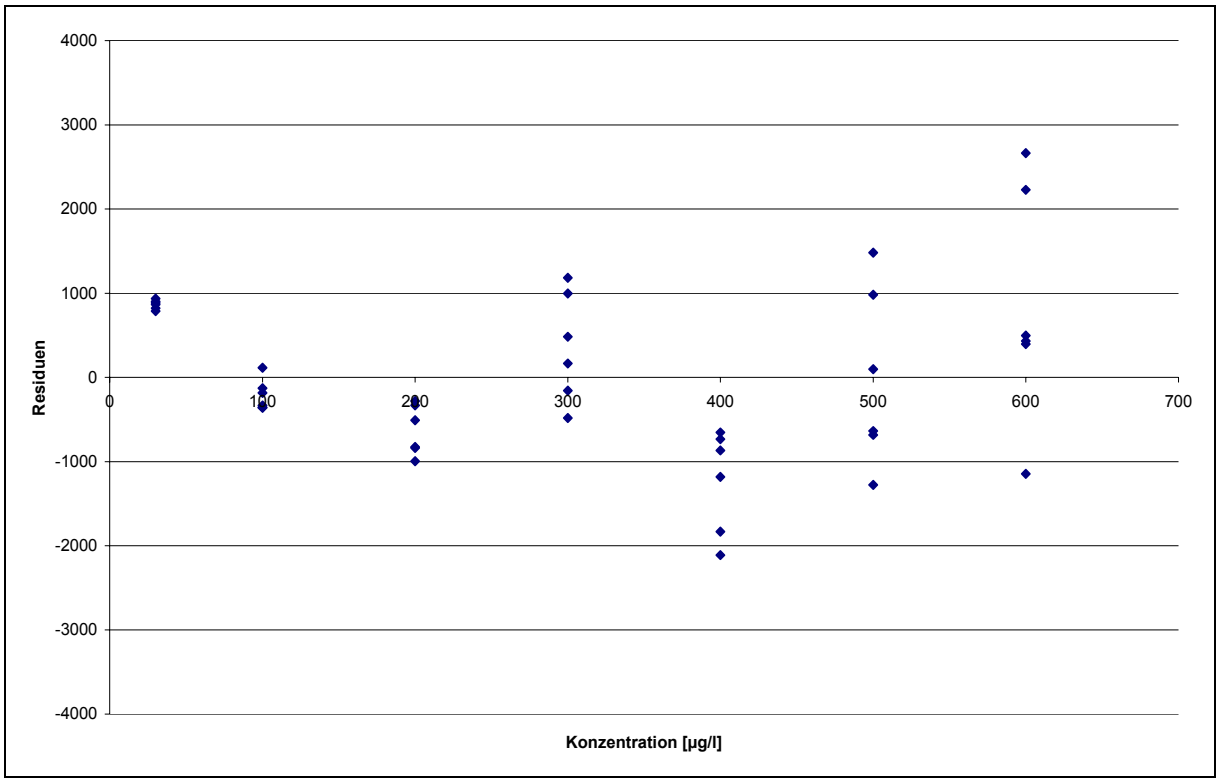


Abbildung 8-3 Residuenplot für Rhodamin 123

Tabelle 8-4 Richtigkeit für Rhodamin 123

Soll [µg/l]	450	250	100
Ist [µg/l]	454,54	234,74	95,04
	428,92	244,71	96,32
	457,67	239,14	95,76
Mittelwert [µg/l]	447,04	239,14	95,71
SD [µg/l]	15,77	5,00	0,64
Relative SD [%]	3,52	2,09	0,67
Wiederfindung [%]	99,34	95,81	95,71
mittlere Wiederfindung [%]		96,95	
mittlere relative SD [%]		2,07	

Tabelle 8-5 Systempräzision für Rhodamin 123

Soll-Konzentration [µg/l]	Ist-Konzentration [µg/l]
200	196,48
	194,09
	192,81
	197,81
	198,19
	194,00
Mittelwert [µg/l]	195,57
SD [µg/l]	2,23
Relative SD [%]	1,14

8.3 GERÄTE UND VERBRAUCHSMATERIALIEN

Tabelle 8-6 Chemikalien

Bezeichnung	Hersteller/Lieferant
Cavasol W7 M Pharma	Wacker Chemie AG
D(+)-Glucose p. a.	Merck KGaA
2-Deoxyglucose ≥ 98 %	Fluka
HEPES (4-(2-Hydroxyethyl)piperazin-1-ethansulfonsäure)	Fluka
Calciumchlorid p. a.	Merck KGaA
Di-Natriumhydrogenphosphat-Dihydrat p. a.	Merck KGaA
Natriumdihydrogenphosphat-Dihydrat p. a.	Merck KGaA
Kaliumchlorid p. a.	Merck KGaA
Kaliumdihydrogenphosphat p. a.	Merck KGaA
Magnesiumchlorid-Hexahydrat p. a.	Merck KGaA
Magnesiumsulfat-Heptahydrat p. a.	Merck KGaA
Natriumchlorid p. a.	Merck KGaA
Ortho-Phosphorsäure 85 % (m/m)	Merck KGaA
Titrisol für 1000 ml 1,0 N NaOH	Merck KGaA
Salzsäure konz. 37 %	Merck KGaA
Natriumhydroxid 1 mol/l	Grüssing GmbH
Folin-Ciocalteu's Phenolreagenz	Merck KGaA
Kupfer(II)sulfat-Pentahydrat p. a.	Merck KGaA
Kaliumnatriumtartrat-Tetrahydrat p. a.	Merck KGaA
Natriumcarbonat wasserfrei p. a.	Merck KGaA

Tabelle 8-7 Lösungsmittel und Reagenzien

Bezeichnung	Hersteller/Lieferant
Dichlormethan ≥ 99,8 %	VWR international
Methanol HPLC grade ≥ 99,8 %	Fisher Scientific GmbH
Isopropanol	Brenntag GmbH
Certipur Pufferlösungen (pH 4,01 / 7,00 / 9,00)	Merck KGaA

Tabelle 8-8 Geräte und Verbrauchsmaterialien

Gerät	Hersteller/Lieferant
Sicherheitswerkbank HERAsafe, Klasse 2 Typ H	Heraeus/Kendro
CO_2-Brutschrank	WTB Binder Labortechnik GmbH
Waage Mettler AE 200	Mettler-Toledo GmbH
Waage Mettler XP205 Delta Range	Mettler-Toledo GmbH
Zentrifuge Megafuge 1.0 R	Heraeus/Kendro
Zentrifuge MiniSpin	Eppendorf GmbH
Stuart Vortex Mixer SA8	Barloworld Scientific
Eppendorf Research Pipetten (10, 20, 100, 200 und 1000 µl) mit Eppendorf Pipettenspitzen	Eppendorf GmbH
Eppendorf Reference Pipette (1000 µl) mit Eppendorf Pipettenspitzen	Eppendorf GmbH
Multipette plus	Eppendorf GmbH
Combitips plus 10 ml / 25 ml	Eppendorf GmbH
Combitips plus, 10 ml, steril	Eppendorf GmbH
Pipettierhilfe Eppendorf Easypet 4420	Eppendorf GmbH
Pipettierhilfe pipetus-akku	Hirschmann GmbH & Co. KG
Pipetten mit Spitze (10 ml / 25 ml), steril	Greiner Bio-One GmbH
Petrischale steriplan 150/30 mm	Schott Instruments GmbH
Parafilm M	Brand GmbH & Co. KG
Objektträger	Menzel Gläser GmbH & Co. KG
Deckgläser (18 x 18 mm)	Menzel Gläser GmbH & Co. KG
Stereolupe Stemi SV8	Carl Zeiss AG
Inverses Mikroskop Axiovert 25	Carl Zeiss AG
Zeiss AxioImager Z.1 mit AxioCam HRc und ApoTome-Einheit Software: AxioVision Rel. 4.5	Carl Zeiss AG
Plattenreader BioTek SynergyHT mit Software KC4 V3.4	BioTek Instruments GmbH
Halbmikroosmometer	Knauer GmbH
S20 SevenEasy pH-Meter	Mettler-Toledo GmbH
EVOM (Epitheliales Voltohmmeter)	World Precision Instruments Inc.
Magnetrührer Heidolph MR 3001 K (heizbar)	Heidolph GmbH & Co. KG

Filterhalter Edelstahl, Ø 25 mm	Sartorius AG
Celluloseacetat Membranfilter 0,45 µm, Ø 25 mm	Sartorius AG
Braun Injekt Einmalspritzen (5 / 20 ml)	B. Braun Melsungen AG
Ultraschallbad Bandelin Sonorex Super RK 510 H	Bandelin GmbH & Co. KG
Ultraschallprozessor UP200S mit Mikrospitze S2	Hielscher Ultrasonics GmbH
Schüttelwasserbad 1083	GFL Gesellschaft für Labortechnik mbH
Umkehrosmose-Anlage Hemo-RO	Millipore GmbH
Muldestor	Wagner & Munz GmbH
Reinstwasser-Anlage Purelab Option-Q	ELGA Labwater
Tiefkühltruhe (-70 °C)	GFL Gesellschaft für Labortechnik mbH
Gefrierschrank (-30 °C) Siemens Öko Plus	Siemens AG
Kühl- und Gefrierkombination Liebherr Premium	Liebherr GmbH
Stickstoff-Lagerbehälter GT 38	Air Liquide Deutschland GmbH

Tabelle 8-9 Verwendete Puffer und Lösungen für die Immunfluoreszenz

Bezeichnung	Zusammensetzung	
Waschpuffer	D-PBS	
Fixierungslösung: Paraformaldehyd 4 %	PFA Aqua bidest.	4 g 100 ml
Antikörperverdünnungslösung	BSA Triton X-100 in D-PBS pH 7.4	1.0 % 0.2 %
Primär- und Sekundärantikörper	Verdünnung in Antikörperverdünnungslösung	
Eselnormalserum	10 % in Antikörperverdünnungslösung	
DAPI-Stammlösung	DAPI Aqua bidest.	200 µg 1 ml
	Lösung 1:2 mit Glycerin mischen	
DAPI-Färbelösung (1 µg/ml)	1:200 mit Antikörperverdünnungslösung	
Eindeckmedium	Glycergel DABCO	15 ml 390 mg

8.4 IMMUNCHEMISCHES FÄRBEPROTOKOLL

Fixierung

- Zellen kurz mit D-PBS (37 °C) waschen
- Inkubation für 10 min in 4 % PFA (bei Raumtemperatur)
- 2 x 5 min mit D-PBS waschen

Immunfluoreszenz

- Präinkubation mit 500 µl 10 % Eselnormalserum in Antikörperverdünnungslösung für 30 min
- Nicht spülen; Deckglas aus dem Well nehmen und abtupfen

Die Inkubation mit Primärantikörper wird in einer Petrischale, die mit einem feuchten Schwammtuch ausgelegt ist, durchgeführt:

- Inkubation mit 150 µl Primärantikörper (1:50 in Antikörperverdünnungslösung) auf dem Orbitalschüttler (Stuart Vortex Mixer SA8) bei kleinstmöglicher Bewegung für 4 Stunden bei RT
- 3 x 5 min in D-PBS waschen
- mit 450 µl Sekundärantikörper (1:1000 in Antikörperverdünnungslösung) in einer 6 Well-Platte für 1 Stunde inkubieren (dunkel)
- 3 x 5 min in D-PBS waschen

- Zur Kernfärbung mit 500 µl DAPI (1 µg/ml) für 1 min inkubieren (dunkel)
- 2 x 5 min in D-PBS waschen

- in Glycergel-DABCO eindecken
- bei 4 °C dunkel lagern

Sämtliche im Färbeprotokoll aufgeführten Lösungen finden sich in Tabelle 8-9.

8.5 FIRMENVERZEICHNIS

Adobe Systems GmbH, Georg-Brauchle-Ring 58, 80992 München

Air Liquide Deutschland GmbH, Hans-Günther-Sohl-Str. 5, 40235 Düsseldorf

Bandelin GmbH & Co. KG, Heinrichstr. 3-4, 12207 Berlin

Barloworld Scientific, Beacon Road, Stone, Staffordshire, ST15 0SA, UK

B. Braun Melsungen AG, Carl-Braun-Str. 1, 34212 Melsungen

Beckman Coulter GmbH, Europark Fichtenhain B13, 47807 Krefeld

BioTek Instruments GmbH, Kocherwaldstr. 34, 74177 Bad Friedrichshall

Brand GmbH & Co. KG, Otto-Schott Str. 25, 97877 Wertheim

Brenntag GmbH, Stinnes-Platz 1, 45472 Mülheim

Carl Roth GmbH & Co. KG, Schoemperlenstr. 1-5, 76185 Karlsruhe

Carl Zeiss MicroImaging GmbH, Königsallee 9-21, 37081 Göttingen

C. Bruno Bayha GmbH, Dr. Karl Storz Str. 14, 78532 Tuttlingen

Corning B. V., Koolhovenlaan 12, 1119 NE Schiphol-Rijk, NL

DAKO Deutschland GmbH, Hamburger Str. 181, 22083 Hamburg

Dianova GmbH, Mittelweg 176, 20148 Hamburg

Hielscher Ultrasonics GmbH, Warthestr. 21, 15513 Teltow

ELGA Labwater, Lückenweg 5, 29227 Celle

Eppendorf GmbH, Peter-Henlein-Str. 2, 50389 Wesseling-Berzdorf

Fisher Scientific GmbH, Im Heiligen Feld 17, 58239 Schwerte

Fluka (siehe Sigma-Aldrich Chemie GmbH)

GFL Gesellschaft für Labortechnik mbH, Schulze-Delitzsch-Str. 4, 30938 Burgwedel

GraphPad Software, Inc., 11452 El Camino Real # 215, San Diego, CA 92130 USA

Greiner Bio-One GmbH, Maybachstr. 2, 72636 Frickenhausen

Grüssing GmbH, An der Bahn 4, 26849 Filsum

Heidolph GmbH & Co. KG, Walpersdorfer Str. 12, 91126 Schwabach

Heraeus / Kendro (siehe Thermo Electron Corp.)

Hirschmann GmbH & Co. KG, Hauptstr. 7-15, 74246 Eberstadt

Invitrogen GmbH, Emmy-Noether-Str. 10, 76131 Karlsruhe

Knauer GmbH, Hegauer Weg 38, 14163 Berlin

Liebherr GmbH, Memminger Str. 77, 88411 Ochsenhausen

Macherey-Nagel GmbH & Co. KG, Neumann-Neander-Str. 6-8, 52355 Düren

MDL Information Systems GmbH, Theodor-Heuss-Allee 108, 60486 Frankfurt

Menzel Gläser GmbH & Co. KG, Saarbrückener Str. 248, 38116 Braunschweig

Merck KGaA, Frankfurter Str. 250, 64293 Darmstadt

Mettler-Toledo GmbH, Ockerweg 3, 35396 Gießen

Microsoft Deutschland GmbH, Konrad-Zuse-Str. 1, 85716 Unterschleißheim

Millipore GmbH, Am Kronberger Hang 5, 65824 Schwalbach

Molecular Probes (siehe Invitrogen GmbH)

Nunc GmbH & Co. KG, Hagenauer Str. 21a, 65203 Wiesbaden

Paesel + Lorei Pharma GmbH, Im Freihafen 8, 47138 Duisburg

Paul Marienfeld-GmbH & Co. KG, Am Wöllerspfad 4, 97922 Lauda-Königshofen

Sartorius AG, Weender Landstr. 94-108, 37075 Göttingen

Schott Instruments GmbH, Hattenbergstr. 10, 55122 Mainz

Siemens AG, Wittelsbacherplatz 2, 80312 München

Sigma Aldrich Chemie GmbH, Eschenstr. 5, 82024 Taufkirchen

Thermo Electron Corp. (Kendro), Robert-Bosch-Str. 1, 63505 Langenselbold

VWR international, Hilpertstr. 20a, 64295 Darmstadt

Wacker Chemie AG, Hanns-Seidel-Platz 4, 81737 München

Wagner & Munz, In der Rosenau 4, 81829 München

World Precision Instruments Inc., Liegnitzer Str. 15, 10999 Berlin

WTB Binder Labortechnik GmbH, Postfach 102, 78502 Tuttlingen

Zymed Laboratories (siehe Invitrogen GmbH)

Meine akademischen Lehrer waren die Damen und Herren:

Daniels, Eisenhut, Fricker, Jäschke, Hilgenfeldt, Lindel, Ludwig, Metzler-Nolte, Mier, Reich, Reichling, Wahl, Wieland, Wießler, Wink.

LEBENSLAUF

1979	Geboren am 26.02. in Karlsruhe
1989-1998	Gymnasium Karlsbad Allgemeine Hochschulreife im Juni 1998
1998-1999	Einjähriger Auslandsaufenthalt in Littleton, Colorado (USA) Tätigkeit als Aupair
1999-2004	Studium der Pharmazie an der Ruprecht-Karls-Universität Heidelberg
2002	Erster Abschnitt der Pharmazeutischen Prüfung
2004	Zweiter Abschnitt der Pharmazeutischen Prüfung
2004	Praktikum bei der Dr. Willmar Schwabe GmbH & Co. KG in Karlsruhe
2004/2005	Praktikum in der Marien Apotheke in Immenstadt im Allgäu
2005	Dritter Abschnitt der Pharmazeutischen Prüfung; Approbation zur Apothekerin
Seit 2005	Wissenschaftliche Angestellte am Lehrstuhl für Pharmazeutische Technologie und Biopharmazie der Eberhard-Karls-Universität Tübingen Beginn der Dissertation zum Thema „Mechanismen und Stereoselektivität der Ofloxacinpermeation durch Caco-2/TC7 Monolayer“ unter der Anleitung von Herrn Prof. Dr. M. A. Wahl
Seit 2006	Weiterbildung zum Fachapotheker für Pharmazeutische Technologie