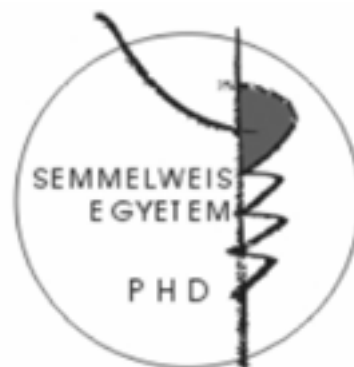


Gyógyszerek felszívódásának és agyi penetrációjának előrejelzése

Doktori tézisek

Dr. Hellinger Éva

Semmelweis Egyetem
Gyógyszertudományi Doktori Iskola



Témavezető: Dr. Tihanyi Károly osztályvezető, Ph.D.
Konzulens: Dr. Vastag Monika osztályvezető, Ph.D.

Hivatalos bírálók:

Prof. Dr. Tekes Kornélia egyetemi tanár, Ph.D.
Dr. Jemnitz Katalin laboratórium vezető, Ph.D.

Szigorlati bizottság elnöke:

Prof. Dr. Török Tamás egyetemi tanár, D.Sc.

Szigorlati bizottság tagjai:

Prof. Dr. Klebovich Imre tanszékvezető, egyetemi tanár, D.Sc.
Dr. Krizbai István tudományos főmunkatárs, laborvezető, Ph.D.

Budapest, 2012

1. BEVEZETÉS

A P-glikoprotein (P-gp, MDR1) az egyik legjelentősebb efflux transzporter, amely a gyógyszerek penetrációját limitálja. Az intesztinális endotélium és a vér-agy gát (blood-brain barrier; BBB) polarizált sejteinek apikális membránjában elhelyezkedő P-gp jelentősen gátolja a szubsztrátjai agyba való bejutását, valamint befolyásolja az alacsony permeabilitású és/vagy rossz oldékonyságú szubsztrátok felszívódását. Ez alacsony vagy variábilis plazmaszintet és nem-lineáris kinetikát eredményezhet.

Az újonnan szintetizált vegyületek és gyógyszerjelölt molekulák penetrációjának szűrése a preklinikai vizsgálatok fontos része, ami a molekulák intesztinális felszívódásának és az agyi penetrációjának előrejelzése miatt szükséges.

A Caco-2 egy gyakran alkalmazott, hatékony humán abszorpciós modell, de a P-gp szubsztrátokat nem elég érzékenyen, nem elég biztonsággal mutatja ki. Ezáltal a modell prediktivitása sem kielégítő a szubsztrát gyógyszerek *in vivo* penetrációjára. A Caco-2 problémáját felismerve számos kutatócsoport foglalkozott már a sejtek P-gp szintjének és funkcionalitásának javításával.

A gyógyszerkutatás korai fázisában nagy szükség van olyan *in vitro* agyi penetrációs modellekre, amelyekben megfelelő passzív permeabilitás mérhető, elegendő efflux transzporter funkcionalitással rendelkeznek, emellett jó humán prediktivitással is. A korai vér-agy gát penetrációs szkrín során az epitél alapú penetrációs modellek kevésbé költséges, könnyebben kivitelezhető alternatívái lehetnek a primer agyi kapilláris endotél alapú modelleknek. Az epitelsejt alapú MDCK-MDR1 modellel a BBB modellhez hasonlóan jó korrelációt mutattak ki az *in vitro* – *in vivo* agyi permeabilitás között. Egyre többször vizsgálják a natív Caco-2 kultúrával történő agyi permeabilitás előrejelzésének lehetőségét is.

Jelenleg nincs általánosan elfogadott modell a gyógyszerek agyi penetrációjának előrejelzésére. Kevés olyan vizsgálatot publikáltak, ami a különböző BBB modellek (agy kapilláris endotél, illetve epiteliális alapú) összehasonlításával foglalkozik, különösképpen, amely a transzporterek funkcionalitását is vizsgálja.

2. CÉLKITŰZÉS

Céljaink a következők voltak:

- Egy stabil és magas P-gp funkcionalitást mutató kultúra létrehozása a Caco-2 módosításával.
- Tartós vinblasztin kezelés hatásának vizsgálata a Caco-2 P-gp expressziójára és funkcionalitására (VB-Caco-2).
- Az így létrejött VB-Caco-2 modell jellemzése gyógyszer penetrációs szkrínvizsgálatokban, P-gp szubsztrátok és gátlók kimutatására kétirányú transzport esszében és Calcein-AM esszében.
- A vinblasztin P-gp szintet emelő hatásmechanizmusának tisztázása.
- A primer agyi kapilláris endotél alapú BBB modell és az epiteliális sejt alapú modellek (Caco-2, VB-Caco-2, MDCK-MDR1) összehasonlítása a kritikus vér-agy gát tulajdonságokat figyelembe véve (hézagmentes sejtközötti /paracelluláris kapcsolatok, vér-agy gáthoz hasonló tartományban mért transzcelluláris penetráció, P-gp expresszió és funkcionalitás).
- Az *in vivo* agyi penetráció epiteliális és endotél modellekkel történő predikciója.
- A VB-Caco-2 és a széles körben elfogadott MDCK-MDR1 modell összehasonlítása a molekulák permeabilitását illetően.

3. MÓDSZEREK

Sejttenyésztés

Caco-2 sejtek: A Caco-2 sejteket (HTB-37) az ATCC-től (American Type Culture Collection, MD, USA) vettük 17-es passzázs számmal. A sejteket normál, MEM-alapú (Minimal Essential Medium) sejttenyésztő médiumban tartottuk fenn, amely 20% főtális marha szérumot, penicillint (100 egység/ml), sztreptomicint (0,1 mg/ml) és nátrium-piruvátot (1mM) tartalmazott.

VB- Caco-2 sejtek: A VB-Caco-2 kultúrát a Caco-2-ből hoztuk létre úgy, hogy a sejteket 10 nM vinblasztint tartalmazó médiumban tartottuk fenn mind a tenyésztési periódusban a flaskában, mind a differenciálódási időszakban a Transwell inzertekben. A transzport esszéhez, a Western blothoz, az RT-PCR-hez, a CYP aktivitás méréshez és az elektronmikroszkópos vizsgálatokhoz 5×10^5 sejtet ültettünk ki az EC Matrix-szal fedett (ATCC, USA) $1,12 \text{ cm}^2$ felületű Costar Transwell inzertekre (polikarbonát, 12 mm átmérő, $0,4 \mu\text{m}$ pórusméret; Corning Incorporated, Corning, NY, USA), és a 19-21. napon használtuk fel. A kísérleteinkben használt VB-Caco-2 sejtvonallal passzázs száma 48 és 201 között változott, míg a Caco-2-nek 35 és 93 között.

MDCK sejtek: Az alap (parent) és a humán MDR1 transzfektált Madin-Darby kutya vese epitél sejteket Hollandiából vettük (Netherlands Cancer Institute, Amszterdam). A sejteket DMEM-alapú (4,5 g/l glükóz tartalmú Dulbecco's Modified Eagle's Medium) médiumban tartottuk fenn, amely 10% főtális marha szérumot, penicillint (50 egység/ml) és sztreptomicint (0,05 mg/ml) tartalmazott. A sejteket a 20-30. passzálásig használtuk, amíg az eredeti tulajdonságaikat megőrizték. A transzport esszéhez és a Western blothoz 5×10^5 sejtet ültettünk ki a $1,12 \text{ cm}^2$ felületű Costar Transwell inzertekre, és az esszékhez a 3-4. napon használtuk fel.

Patkány BBB modell: A patkány agyi kapilláris endotél sejteket hármass kultúra modellben használtuk. A primer agyi endotél sejtek, az asztriciták és a periciták tenyésztését, valamint a hármass modell kialakítását Nakagawa és munkatársai

(Nagaszaki Egyetem, Japán), valamint Deli Mária és csoportja (MTA Szegedi Biológiai Központ) végezték. A sejteket kollagénnel és fibronektinnel bevont Costar Transwell polikarbonát membránokra (12 mm átmérő, 3 µm pórusméret) ültették ki a permeabilitás mérésekhez.

A sejtek morfológiája

A flaskában tenyésztett natív és a Transwell inzertekre kiültetett, toluidin késsel festett Caco-2, VB-Caco-2 és MDCK sejteket folyamatosan vizsgáltuk inverz fáziskontraszt mikroszkóppal. A mikroszkópos képeket T75 flaskában tenyésztett sejtekről készítettük. Az inzertek membránjain növesztett sejteket fixálás után Hitachi 7100 transmissziós elektronmikroszkóppal (Hitachi Ltd., Tokió, Japán) vizsgáltuk.

Immunfestés

A poliészter membránon tenyésztett sejtek junkcionális fehérjéit festettük meg; a β-katenint, a ZO-1-et és a klaudin-1-et, -4-et és -5-öt, valamint az üveg fedőlemezen növesztett sejtek P-glikoproteinjét festettük, majd fixáltuk. 3% BSA-s blokkolás után a sejteket inkubáltuk az elsődleges antitestekkel (anti-β-katenin, ZO-1, klaudin-1, -4, -5, 1:200 hígításban és P-glikoprotein 1:100 hígításban) másfél órán keresztül. A másodlagos ellenanyaggal történő inkubálás Cy3-jelölt anti-nyúl IgG-vel vagy anti-egér-IgG-Alexa 488-cal egy órán keresztül tartott, 1:500 hígításban.

Valós idejű PCR

A flaskában és Transwell inzerteken tenyésztett sejtekből RNeasy Mini Kit (Qiagen, Hilden, Németország) segítségével vontuk ki az RNS-t. A reverz transzkripció egy Gene ATAQ Controller Thermal Cycler (Pharmacia LKB, Svédország) készülékben történt. A PCR reakcióhoz a PE Applied Biosystems által tervezett valós idejű PCR primereket használtunk az MDR1-hez és 18S riboszómális RNS-hez (belső standard gén). A reakció 96-lyukú lemezekben zajlott ABI Prism 7000 Sequence Detection System (PE Applied Biosystems) készülékben.

Western blot

A Western blothoz 25 µg fehérje tartalmú sejtlizátumot vittünk fel 7.5% Tris-HCl Ready Gélekre (BioRad Laboratories, CA, USA), és polivinilidén difluorid membránra blottoltuk. A blotpapírokat ezután az elsődleges ellenanyagokkal inkubáltuk; egér anti-P-glikoprotein monoklonális ellenanyaggal (Clone C219, Calbiochem, La Jolla, CA, USA 1:100 illetve 1:20 hígításban), vagy nyúl anti-aktin poliklonális ellenanyaggal (1:200, Sigma-Aldrich), ami töltési kontrollként szolgált. A másodlagos ellenanyagokkal történő inkubáció 1 órán keresztül tartott (kecske anti-egér HRP-konjugált IgG; 1:10 000; Calbiochem, az anti-P-gp-hez; és kecske anti-nyúl HRP-konjugált IgG ellenanyag 1:3000, Bio-Rad, az anti-aktinhoz). Végül a P-gp-t kemilumineszcens módszerrel detektáltuk (SuperSignal West Pico Chemiluminescent Substrate), az aktint pedig 3,3'-diaminobenzidinnel hívtuk elő.

Kétirányú transzport esszé

A vizsgált anyagok permeabilitását kétirányú transzport esszé segítségével mértük meg, mind az apikális-bazolaterális (A-B), mind a bazolaterális-apikális irányban (B-A), 37 °C-on, mérsékelt rázatás mellett (120 rpm). A magas permeabilitású anyagoknál a koncentráció-grádiens fenntartása érdekében adott idő (15, 30 vagy 60 perc) után friss pufferbe, HBSS-Hepesbe (25 mM Hepes tartalmazó Hank's Buffered Salt Solution) raktuk át a sejtes inzerteket. B-A irányban mérve csak az inkubálás végén, egy időpontban vettünk mintát. A referencia vegyületek esetében minimum három független kísérletet (n = 3-3) végeztünk, mindkét irányban. A permeabilitási szkrínvizsgálatokban általában mindkét kompartmentben azonos pH-jú oldattal dolgoztunk ("izo pH"; pH 7,4_A-7,4_B). A permeabilitási kísérletek indítása előtt TEER-t (transz epiteliális elektromos rezisztencia) mértünk (EVOM-2, WPI Inc, Sarasota, FL). A kísérletek végén megvizsgáltuk a monolayerek sértetlenségét toluidinkék festékkel (1%). Továbbá két paracelluláris markert, a Lucifer Yellow-t és a nátrium fluoresceint (100 µM) alkalmaztuk a szoros kapcsolatok (tight junction) integritásának ellenőrzésére.

A legtöbb vizsgált molekula koncentrációját a mintákban HPLC-s elválasztást követően UV-VIS vagy fluoreszcens detektorral határoztuk meg. (Merck-Hitachi LaChrom). A látszólagos permeabilitást (Papp) a következő egyenlet alapján határoztuk meg:

$$P_{app} = \frac{(dQ/dt)}{A \times C_0}$$

ahol dQ/dt a permeabilitás sebessége, C_0 a kezdeti koncentráció a donor kompartmentben és A a membrán felülete (1.12 cm^2). Az efflux hányadost is meghatároztuk, amely a $P_{app_{B-A}}$ és a $P_{app_{A-B}}$ hányadosa. Általánosan elfogadott, hogy ha az efflux hányados 2,0-nél nagyobb, akkor a molekulát efflux transzporter szubsztrátnak tekintjük. Az efflux transzportereket verapamillal vagy kinidinnel gátoltuk ($100 \mu\text{M}$, 30 perc előinkubáció), ezzel igazoltuk, hogy a molekula szubsztrát.

Az MDCK-MDR1 modell esetében korrigált efflux hányadost is számoltunk úgy, hogy az MDCK-MDR1 sejteken mérhető efflux hányadost elosztottuk az MDCK alapkultúrán mérhető efflux hányadossal.

Egyensúlyi dialízis

A molekulák szabad agyi és plazma frakcióját 96-lyukú egyensúlyi dialízis módszerrel határoztuk meg $3,5 \text{ kDa}$ porúsátmérőjű membránok segítségével (HTDialysis LLC, USA). A Balb/C egerek vérének és agyi szövetének a kísérlet napján, frissen nyertük. A hígított agyi homogenizátumba és a plazmába pipettáztuk a vizsgálandó anyagot, melynek végső koncentrációja $10 \mu\text{M}$ volt. A dialízis PBS-sel szemben a 96-lyukú egyensúlyi dialízis kamrában $5,5$ órán keresztül tartott 37°C -on.

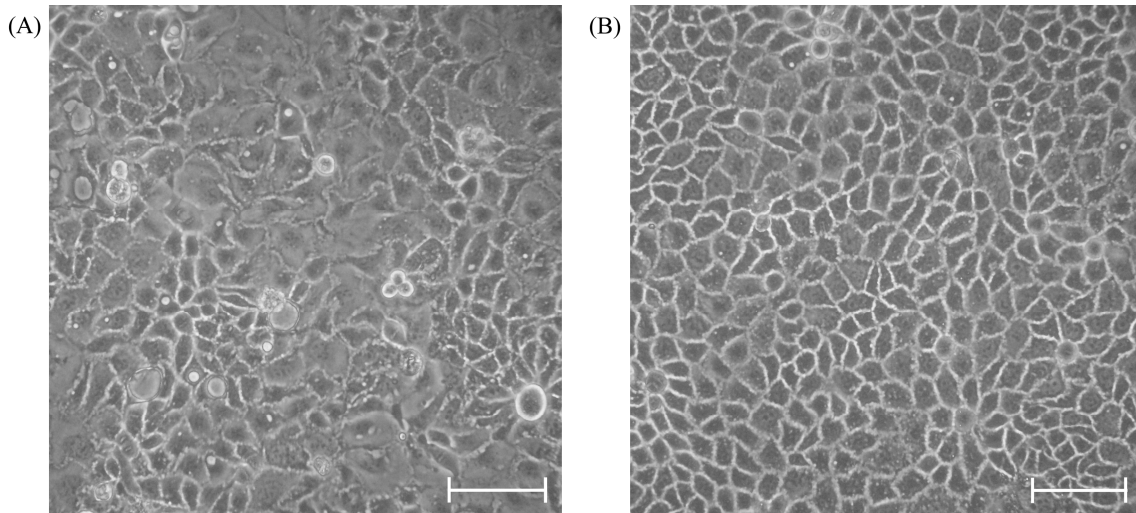
A plazma szabad frakciókat (f_u) és a látszólagos agyi szabad frakciókat pufferben lévő koncentráció és az agyi illetve plazma koncentráció hányadosából számoltuk. Az agyi szabad frakciót a hígítási faktor (D) segítségével számítottuk:

$$f_u = \frac{(1/D)}{\{[1/f_u(\text{apparent})] - 1\} + 1/D}$$

4. EREDMÉNYEK

A vinblasztinnal kezelt Caco-2 (VB-Caco-2) alapú penetrációs modell

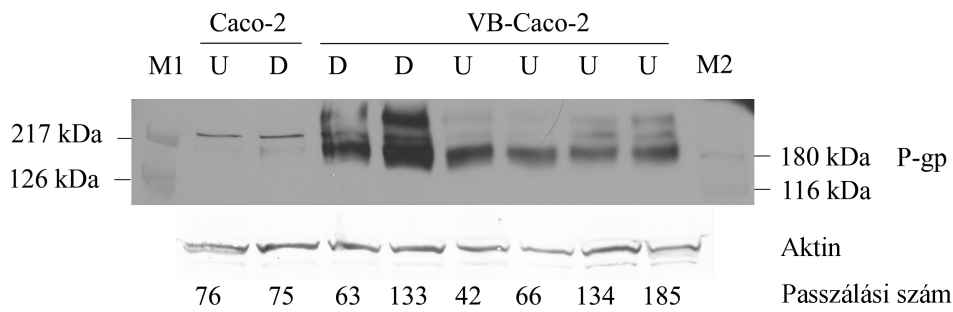
A VB-Caco-2 kultúrára jellemző kompakt, homogén morfológia (**1B. ábra**) már a 10 nM-os vinblasztinos kezelés megkezdése utáni körülbelül 6. passzálásra kialakult, és végig megmaradt a 200. passzálásig tartó megfigyelési periódusban. A kultúra főleg kis átmérőjű sejtekből áll, a normál (vinblasztin nélküli médiumban tartott) Caco-2-vel ellentétben, amely heterogén megjelenésű monolayert alkot, egyes részeken kis sejtekkel, máshol relatíve nagy átmérőjűekkel (**1A. ábra**).



1. ábra: A Caco-2 (A) és a VB-Caco-2 (B) monolayerek. A képeken differenciálatlan, flaskákban lévő, 4 napos konfluens kultúra látható. Fáziskontraszt kép, beosztás: 100 μm .

P-glikoprotein mRNS és fehérje szintek a VB-Caco-2 és a Caco-2 kultúrákban

A VB-Caco-2 kultúra MDR1 mRNS szintje 2,2-szer magasabb volt a differenciálódott, és 4,3-szor magasabb a differenciálatlan Caco-2 kultúrájánál. Az immunoblot (**2. ábra**) a VB-Caco-2 kultúrákban intenzív jelet mutatott a P-gp-re, míg a natív Caco-2 kultúrákban nem volt detektálható a P-gp fehérje ezzel a módszerrel.



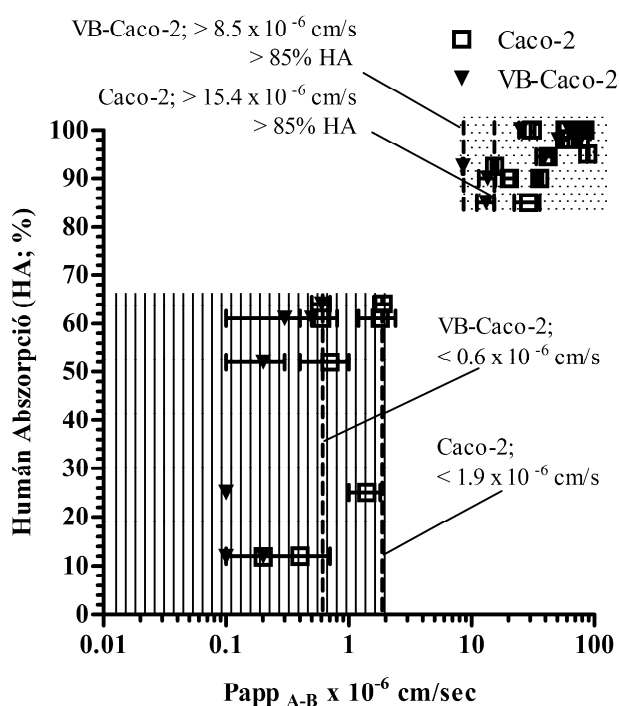
2. ábra: A P-gp kimutatása a differenciált (D) és a differenciálatlan (U) Caco-2 és VB-Caco-2 sejtlizátumokban Western blottal. M1 és M2: molekulatömeg markerek.

A VB-Caco-2 és a Caco-2 funkcionalitásának összehasonlítása: passzív penetráció

A passzívan penetráló referencia vegyületekre ($n = 12$) mért látszólagos permeabilitási értékek (P_{appA-B}) szorosan korreláltak ($r^2 = 0,9830$), ami azt mutatja, hogy nincs alapvető különbség a két modell között a passzív penetrációt illetően. Szintén hasonló penetrabilitás mérhető a két paracellulárisan átjutó molekulára, a Lucifer Yellow-ra és a nátrium fluoreszceinre.

Humán felszívódás predikciója

A referencia vegyületek (mind a passzívan penetrálók mind az effluxosak) irodalomból származó humán felszívódási értékét a VB-Caco-2 és Caco-2 modelleken mért látszólagos permeabilitás (P_{appA-B}) függvényében ábrázoltuk. Két csoport egyértelműen elkülönült egymástól; a magas permeabilitású vegyületek, magasabb, mint 85% humán felszívódással, minimum $8,5 \times 10^{-6}$ cm/s látszólagos permeabilitással VB-Caco-2 modell esetében, $15,4 \times 10^{-6}$ cm/s-mal a Caco-2 modellben; és az alacsony permeabilitású vegyületek, kisebb, mint $0,6 \times 10^{-6}$ cm/s és $1,9 \times 10^{-6}$ cm/s P_{appA-B} értékkel a VB-Caco-2 és a Caco-2 modellben vizsgálva. A Caco-2-n magasabb P_{app} határérték mérhető, mivel a modell a P-gp szubsztrátokra magasabb permeabilitást mutat (**3. ábra**).

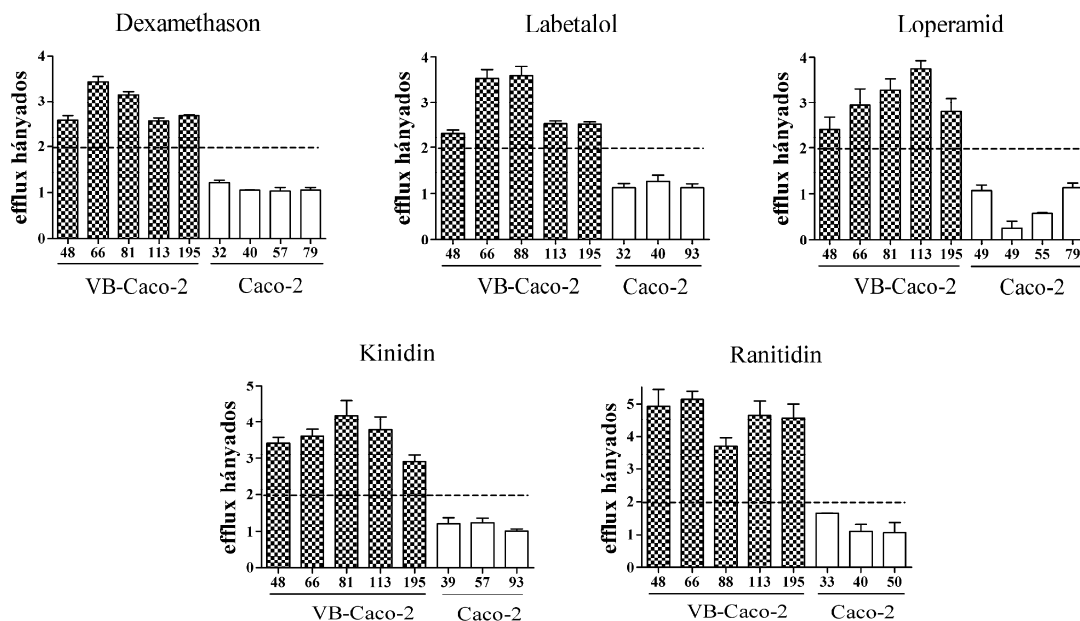


3. ábra: A referencia vegyületek humán felszívódási értéke (HA%) a VB-Caco-2 és Caco-2 kétirányú transzport esszéiben mért P_{appA-B} értékek (átlag \pm S.D.) függvényében. A modellekkel a gyógyszerek két csoportja különíthető el, kismértékben különböző határértékekkel (pontosított terület: magas permeabilitású vegyületek; vonalazott terület: alacsony permeabilitású vegyületek).

A VB-Caco-2 és a Caco-2 P-gp funkciójának összehasonlítása

A VB-Caco-2 kétirányú transzport esszéiben kimutatta az összes vizsgált P-gp szubsztrátot (efflux hányados > 2 , $n = 11$), az alacsony permeabilitásúakat (vinblasztin, cimetidín, ranitidín, chlorothiazid, atenolol és doxorubicin), valamint az összes magas permeabilitásút is (verapamil, kinidín, dexamethason, loperamid és labetalol). Ezzel szemben a Caco-2 egyik magas permeabilitású P-gp szubsztrátot sem ismerte fel, és két alacsony permeabilitásút, a ranitidint és az atenololt sem. A Caco-2 a többi alacsony permeabilitású P-gp szubsztrátot azonosította (vinblasztin, cimetidín, chlorothiazid és doxorubicin), de alacsonyabb efflux hányadossal, mint a jóval érzékenyebb VB-Caco-2.

A VB-Caco-2 P-gp funkcióját széles passzálási tartományon (35-195. passzálás) keresztül követtük végig. Ezalatt minden vizsgált P-gp szubsztrátot kimutatott 2-nél nagyobb efflux hányadossal minden kísérletben. (**4. ábra**).



4. ábra: P-gp szubsztrát gyógyszerek efflux hányadosai (átlag \pm S.D., $n = 3$) a különböző passzási számú VB-Caco-2 (sötét oszlopok) és Caco-2 (világos oszlopok) kultúrákon. A VB-Caco-2 modell nagyobb, mint 2 efflux hányadossal felismerte a P-gp szubsztrát gyógyszereket a teljes megfigyelési időszakban. Az oszlopok alatt a passzási számok láthatók.

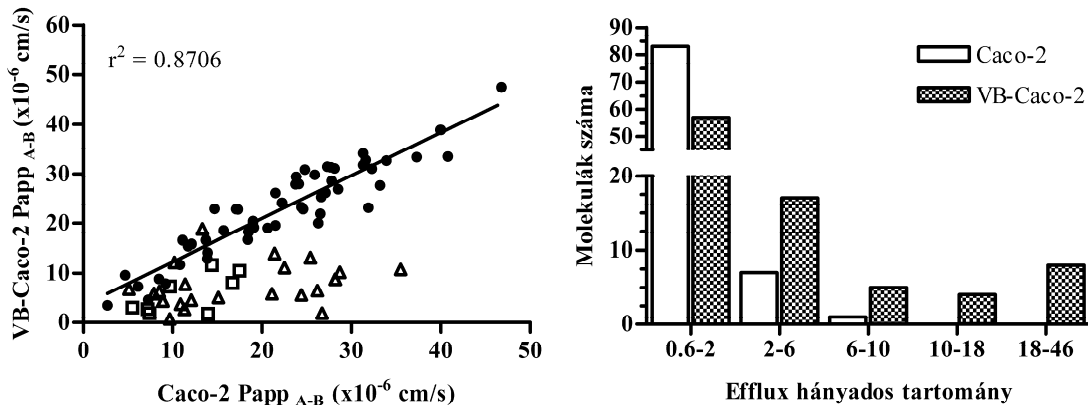
Vinblasztin megvonás hatása a VB-Caco-2 kultúra P-gp szintjére és funkciójára

Differenciálódott, és 70 passzáson keresztül vinblasztinnal kezelt VB-Caco-2 kultúráktól megvontuk a vinblasztint, és további 10, illetve 33 passzáson keresztül vinblasztin nélkül tenyésztettük a sejteket. Sem a P-gp szintje, sem a funkciója – referencia vegyületek vizsgálata alapján – nem csökkent a vinblasztin megvonás hatására a továbbra is vinblasztinnal kezelt kultúrához képest.

Újonnan szintetizált vegyületek szkrínvizsgálata a VB-Caco-2 és a Caco-2 alapú kétirányú transzport esszéiben

16 különböző szerkezeti családból származó, Richterben szintetizált új vegyület permeabilitását hasonlítottuk össze a VB-Caco-2 és Caco-2 modellekben. Míg a VB-Caco-2 modellben a 91 vegyületből 34 bizonyult efflux transzporter szubsztrátnak (efflux hányados > 2), a Caco-2 csak 8-at ismert fel, tehát a szubsztrátok 76%-át nem

mutatta ki (**5. ábra**). A passzívan penetráló vegyületek (efflux hányados < 2) hasonló permeabilitást mutattak a két modellben ($r^2 = 0.8706$).



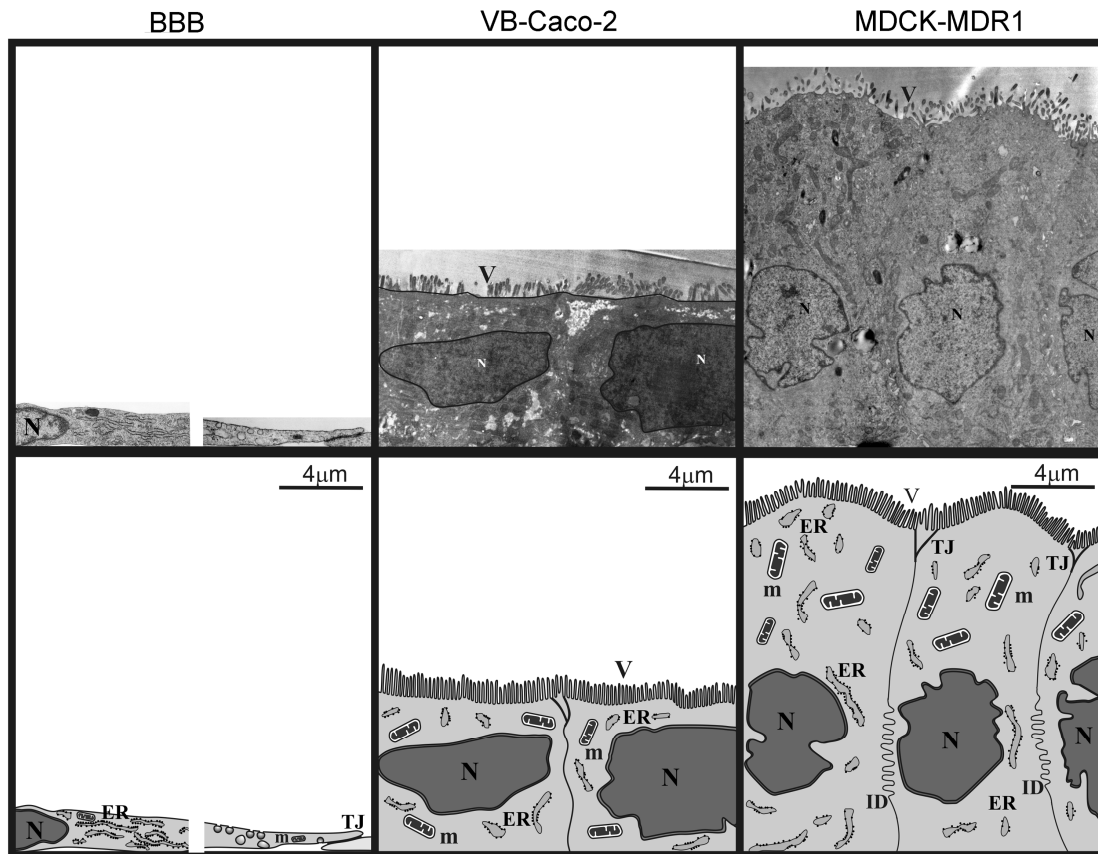
5. ábra: Új vegyületek ($n = 91$) permeabilitása ($Papp_{A-B}$) (A) és az efflux hányados értékek eloszlása a molekulák száma szerint (B) VB-Caco-2 és Caco-2 alapú kétirányú transzport esszéiben; telt kör: efflux hányados < 2 a VB-Caco-2 és Caco-2 modellben is ($n = 57$); nyílt háromszög: efflux hányados > 2 csak a VB-Caco-2 modellben ($n = 26$); nyílt négyzet: efflux hányados > 2 mindkét modellben ($n = 8$). A VB-Caco-2 több effluxos vegyületet ismert fel magasabb efflux hányadossal. A 0,6 - 2 efflux hányados tartományba a passzív penetrációjúnak azonosított vegyületek esnek.

Az agyi penetráció predikciójának megközelítése VB-Caco-2 modellel:

Agyi kapilláris endotél alapú és az azt helyettesítő epitelsejt alapú vér-agy gát (BBB) modellek összehasonlítása

Morfológia: elektronmikroszkópia és immunfestés

A pericitákkal és asztrocitákkal együtt tenyésztett endotélsejtek magassága mindössze 1,5-2 μm a perinukleáris régióban (**6. ábra**). Az átfedő membránok között találhatóak hosszú sorban a szoros kapcsolatok (tight junction, TJ). Az endotélsejtek felszíne sima, de sok helyen található rajta kaveola vagy kaveola-szerű betüremkedés. Az agyi kapilláris endotélsejtek esetében a zonula adherens és a dezmoszómák a szoros kapcsolatokkal funkcionális egységben találhatóak.



6. ábra: A patkány BBB, a VB-Caco-2 és az MDCK-MDR1 sejtek felépítésének elektronmikroszkópos képe. ER, endoplazmás retikulum; ID, interdigitáció; m, mitokondrium; N, sejtmag; TJ, intercelluláris szoros kapcsolatok; V, mikrobolyhok.

Az agyi kapilláris endotélsejtek pozitív festődést adtak az endotél-specifikus kladin-5-re, de az epitélre jellemző kladinokra (kladin-1 és -4) nem. A ZO-1 és a β -katenin is megfestődött a sejtekben (**1. táblázat**). Az agyi kapilláris endotélsejtek vékonyak, megnyúltak és örvénylő mintázatot mutatnak fénymikroszkópban.

1. táblázat: A patkány vér-agy gát (BBB) modell és az epitélsejtek (Caco-2, VB-Caco-2, MDCK-MDR1) sejtkapcsoló fehérjéinek immunfestési eredménye.

Modell	β -katenin	ZO-1	Kladin-1	Kladin-4	Kladin-5
patkány BBB	+	+	+/-	-	+
Caco-2	+	+	+	+	-
VB-Caco-2	+	+	+	+	-
MDCK-MDR1	+	+	+	+	-

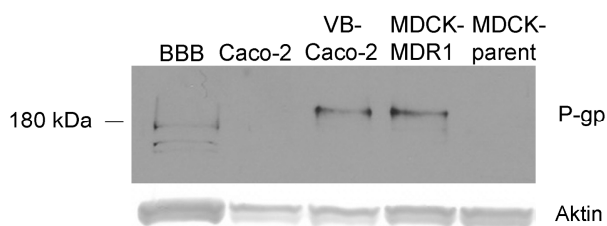
+: pozitív festődés, -: negatív festődés

A natív Caco-2, a VB-Caco-2 és a kutya vese epitél sejtek (MDCK, MDCK-MDR1) egymással nem átfedő monolayer-t képeznek, és kuboidális alakúak. Szembetűnő morfológiai különbség, hogy az MDCK sejtek átlagosan magasabbak, mint Caco-2 és VB-Caco-2 sejtek. Mindkét sejtípus jellemzője, hogy mikrobolyhokkal fedett. A szomszédos sejtek között a szoros kapcsolatok viszonylag rövid szakaszban találhatóak (0.3-1 μm) az apikális oldalon, és jól elkülönülnek a többi sejt kapcsoló struktúrától, mint a dezmoszóma és a zonula adherens (**6. ábra**).

Pozitív festődést mutattunk ki a klaudin-1-re és -4-re, valamint a citoplazmában elhelyezkedő, TJ-hez kapcsolt ZO-1 fehérjére, és a zonula adherenshez köthető β -kateninre a Caco-2, VB-Caco-2 és az MDCK sejtek esetében. Az endotél-specifikus klaudin-5 nem festődött meg az epiteliális sejt vonalakban. Az epitél sejtek jellegzetes "kockaköves" mintázatot mutatnak fénymikroszkóposan, azzal a különbséggel, hogy a VB-Caco-2 kultúra kisebb sűrűségben nő, mint az MDCK-MDR1 sejtek.

A P-glikoprotein expressziója a patkány BBB modellben és az epiteliális sejtekben

A Western blot analízis közel hasonló intenzitású jelet mutatott P-gp-re a VB-Caco-2 és a MDCK-MDR1 kultúrákban (**7. ábra**). Kevésbé intenzív a patkány agyi kapilláris endotélsejtekben kimutatható jel, és a csíkok valamivel alacsonyabb molekulatömegnél jelentkeznek, mint a többi sejt esetében. Az MDCK és a natív Caco-2 sejt kultúrákban a P-gp szintje a detektálhatóság határa alatt volt.



7. ábra: A P-gp kimutatása patkány agyi kapilláris endotél, natív Caco-2, VB-Caco-2, MDCK-MDR1 és MDCK sejt kultúrákban Western blottal.

A P-gp immunfestés a Caco-2-ben gyengébb festődést mutatott, míg a patkány BBB, a VB-Caco-2 és MDCK-MDR1 kultúrák esetében nem volt nyilvánvaló különbség a P-gp festődésében.

A modellek paracelluláris zártságának összehasonlítása

A patkány BBB, a natív Caco-2 és a VB-Caco-2 modellek TEER értéke jóval az elfogadható integritást jelentő $150\text{-}200\ \Omega\text{cm}^2$ fölött volt (**2. táblázat**). Az MDCK(II) és MDCK(II)-MDR1 kultúrák TEER értéke $100\ \Omega\text{cm}^2$ alatt volt. A paracelluláris integritási marker nátrium fluoreszceinre (NaF) nézve a VB-Caco-2 és az MDCK-MDR1 modellek voltak a legkevésbé átteresztők ($P_{\text{app}} = 0,47 \times 10^{-6}\ \text{cm/s}$ és $0,59 \times 10^{-6}\ \text{cm/s}$). A patkány BBB és a natív Caco-2 modellek kevésbé tűntek zártnak a szignifikánsan magasabb NaF permeabilitás alapján (patkány BBB: $2,72 \times 10^{-6}\ \text{cm/s}$; Caco-2: $1,34 \times 10^{-6}\ \text{cm/s}$; **2. táblázat**).

Referencia vegyületek effluxának és permeabilitásának összehasonlítása kétirányú transzport esszében

A vizsgált modellek közül az MDCK-MDR1 és a VB-Caco-2 mutatta ki a legtöbb efflux transzporter szubsztrátot nagyobb, mint 2 efflux hányadossal, tehát ezek a modellek érzékenyebbek a szubsztrátok felismerésében a többinél. Míg a hét ismert P-gp szubsztrátból az MDCK-MDR1 (korrigált efflux hányadossal vizsgálva) és a VB-Caco-2 modellek ötöt mutattak ki (**2. táblázat**, félkövér jelölés), a patkány agyi modell csak a digoxint ismerte fel.

In vitro - in vivo permeabilitás korrelációja; szöveti kötődés és P-gp hatása a korrelációra

A gyógyszerek plazmafehérje- és agyi szöveti kötődését egyensúlyi dialízis módszerrel mértük. Az agyi és a plazma szabad frakciók (fu) hányadosával korrigáltuk a totál koncentrációkból számolt *in vivo* Papp (fu-val nem korrigált *in vivo* Papp) értékeket, amelyeket korábban egér agyi disztribúciós modellben mértek Nakagawa és mtsai.

Az *in vitro* egyensúlyi dialízis alapján az antipirin, a koffein, a kinidin, az atenolol, a digoxin és a cimetidin alacsony plazmafehérje-kötődésűnek bizonyultak (kisebb, mint 75% kötődés), mivel az fu értékeik 0,25-nél magasabbak voltak.

2. táblázat: Patkány vér-agy gát (BBB) modellen, valamint natív Caco-2, VB-Caco-2, MDCK és MDCK-MDR1 modelleken mért gyógyszerek permeabilitása (Papp) és efflux hányadosa, és a modelleken mérhető transz epiteliális elektromos rezisztencia (TEER, Ωcm^2)

Vegyület	Fő transzport mechanizmus	Fő efflux transzporterek	Patkány BBB		Caco-2			VB-Caco-2			MDCK			MDCK-MDR1				
			Papp _{A-B}		efflux hányados	Papp _{A-B}		efflux hányados	Papp _{A-B}		efflux hányados	Papp _{A-B}		efflux hányados	korrigált efflux hányados			
			x10 ⁻⁶ cm/s			x10 ⁻⁶ cm/s			x10 ⁻⁶ cm/s			x10 ⁻⁶ cm/sec			x10 ⁻⁶ cm/s			
átlag		S.D.	átlag		S.D.	átlag		S.D.	átlag		SD	átlag		S.D.				
Antipirin	PT		51,8	1,5	0,88	82,3	3,5	0,8	78,1	2,5	0,97	72,6	2,3	0,98	74,6	3,1	0,96	0,98
Koffein	PT		64,9	1,9	0,92	84,7	1	0,94	85,7	3,0	0,84	79,3	3,2	0,98	78,5	5,6	0,98	1,00
Verapamil	PT/E	P-gp	23,4	2,2	1,36	44,6	8,9	1,33	40,0	7,9	1,60	25,6	10,6	1,59	15,2	0,3	2,78	1,75
Indometacin	PT		33,6	1,3	1,31	50,9	1,4	1,08	50,3	0,5	1,10	47,1	4,4	1,11	45,5	4,3	1,16	1,05
Kinidin	PT/E	P-gp	6,28	0,04	1,93	40,2	3,7	1,06	16,3	3,6	4,9	31,8	3,4	1,22	5,19	1,51	16,4	13,5
Loperamid	PT/E	P-gp	15,6	2,3	1,4	18,1	1,2	1,46	11,5	0,7	3,13	9,48	1,03	1,81	4,7	2,67	17,8	9,79
Atenolol	PP/E	P-gp	1,36	0,20	1,66	0,83	0,19	1,21	0,25	0,09	1,95	0,58	0,2	1,42	0,43	0,14	2,33	1,64
Vinblasztin	E	P-gp, MRP2	2,42	0,97	0,57	6,97	0,95	10,5	0,28	0,07	270,2	2,09	0,92	7,32	0,21	0,12	369,5	50,5
Cimetidin	E	P-gp, BCRP	3,86	0,73	0,72	1,97	0,24	2,23	0,96	0,56	3,90	1,04	0,18	1,32	0,78	0,10	4,54	3,45
Digoxin	E	P-gp	1,25	0,27	2,46	6,5	0,42	4,72	0,55	0,17	65,5	2,37	0,12	7,0	0,57	0,09	53,1	7,56
Na-fluoreszcein	PP		2,72	0,03		1,34	0,29		0,47	0,17		0,65	0,16		0,59	0,06		
			TEER (Ωcm^2), átlag \pm S.D.															
			548	125		1024	184		2012	347		74	4		84	8		

A gyógyszereket 10 μM -os, a nátrium fluoreszceint 100 μM -os koncentrációban alkalmaztuk. A kettőnél nagyobb efflux hányadosokat félkövér értékekkel jelöltük, ez valamilyen efflux mechanizmus érintettségét jelenti. A Caco-2, VB-Caco-2, MDCK és MDCK-MDR1 esetében legalább három független kísérletben mért értékek átlaga és szórása szerepel (kísérletenként 3-3 párhuzamossal). A patkány BBB modellben csak egy független mérés volt, 3 párhuzamos inzerttel. PT: passzív transzcelluláris; PP: passzív paracelluláris; E: Efflux

A verapamil, az indometacin, a loperamid és a vinblasztin pedig közepes, illetve magas plazmafehérje-kötődésű gyógyszerek (nagyobb vagy egyenlő, mint 90% a kötődés), kisebb vagy egyenlő, mint 0,1 szabad frakcióval.

A szintén egyensúlyi dialízissel mért szabad agyi frakciókat is figyelembe véve, az f_u agy és az f_u plazma hányadosa közel egy volt a koffein, az antipirin, az atenolol, a cimetidin és a digoxin esetében. A verapamil, a kinidin és a loperamid agyi szöveti kötődése valamivel magasabb volt, mint a plazmafehérje-kötődése; ezért az *in vivo* Papp korrekciója az f_u agy / f_u plazma hányadossal alacsonyabb értéket hozott létre, mint a totál koncentrációkból számolt *in vivo* Papp (2-3-szoros eltolódás). A legnagyobb változás az *in vivo* Papp értékben az f_u -val való korrekció hatására az indometacin (4,9-szeres növekedés) és a vinblasztin (8-szoros csökkenés) esetében volt. Az indometacinnak az agyi szöveti kötődéséhez (f_u agy: 0,082) képest magas a plazmafehérje-kötődése (f_u plazma: 0,017), a vinblasztinnak pedig magas az agyi szöveti kötődése (f_u agy: 0,013) a plazmafehérje kötődéséhez (f_u plazma: 0,105) képest; így ezeknél a vegyületeknél a szabad frakciók hányadosa jelentősen eltér 1-től, ami nagyban változtat az *in vivo* Papp értéken.

3. táblázat: A különböző sejtes modellekben mérhető *in vitro* permeabilitás (Papp) és az f_u agy/ f_u plazma hányadossal korrigált, illetve nem korrigált *in vivo* Papp közötti korrelációk r^2 értékei. BBB, vér-agy gát hármass kultúra modell.

Penetrációs modell	r^2 értéke	
	<i>in vitro</i> Papp vs. f_u agy / f_u plazma hányadossal korrigált Papp <i>in vivo</i>	<i>in vitro</i> Papp vs. szöveti kötődéssel nem korrigált Papp <i>in vivo</i>
Patkány BBB	0,7989	0,4391
Caco-2	0,6053	0,4430
VB-Caco-2	0,7206	0,3851
MDCK	0,6809	0,4217
MDCK-MDR1	0,7782	0,3352

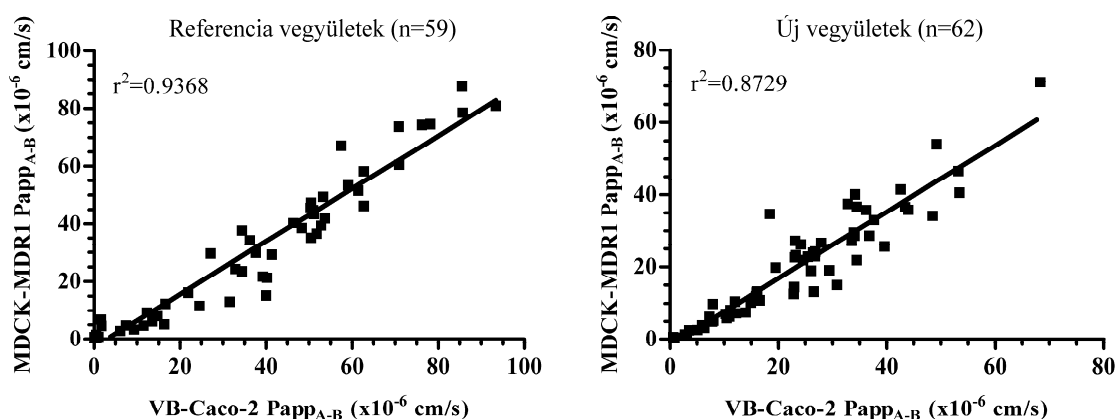
A referencia vegyületek f_u -val korrigált, és a totál koncentrációkból számolt, nem korrigált *in vivo* Papp értékeit ábrázoltuk a patkány BBB, a Caco-2, a VB-Caco-2, az MDCK és az MDCK-MDR1 modelleken mérhető *in vitro* Papp függvényében. A szöveti kötődéssel nem korrigált *in vivo* Papp értékeket használva egyik modell

esetében sem volt szignifikáns korreláció ($r^2 < 0,45$) (**3. táblázat**). Ezzel ellentétben, amikor a szabad frakciókkal korrigált *in vivo* értékekkel számoltunk, minden modell esetében tudtunk korrelációt kimutatni ($r^2 = 0,7989-0,6053$) (**3. táblázat**). Azok a vegyületek, amelyek fu agy/fu plazma hányadosa lényegesen eltér egytől, mint az indometacin (fu agy/fu plazma: 4,9) és a vinblasztin (fu agy/fu plazma: 0,12), rontották a totál koncentrációkból számolt *in vivo* és *in vitro* permeabilitás összefüggést, a korrekció azonban lényegesen javított a korreláción.

A **3. táblázatban** látható eredmények a jobb P-gp funkcionalitás pozitív hatását is mutatják az *in vitro* – *in vivo* korrelációra. A VB-Caco-2 és Caco-2 valamint az MDCK-MDR1 és MDCK modellek példáján megfigyelhető a magasabb P-gp funkciójú modell jobb prediktivitása (magasabb r^2 érték) az alacsony P-gp-jű megfelelőjéhez képest.

A magas P-gp aktivitású modellek összehasonlítása: VB-Caco-2 vs. MDCK-MDR1

Nagyszámú kémiai változatos gyógyszer ($n = 59$) és újonnan szintetizált vegyület ($n = 62$) *in vitro* permeabilitását (Papp) határoztuk meg VB-Caco-2 és MDCK-MDR1 modellekben, amelyet a preklinikai fázisban gyakran használnak agyi endotél helyettesítő vér-agy gát modellként. Erős korrelációt kaptunk a két modellben mért permeabilitás között (**8. ábra**).



8. ábra: Referencia ($n = 59$) és új vegyületek ($n = 62$) VB-Caco-2 és MDCK-MDR1 modellekben mért permeabilitása (Papp) közötti korreláció.

5. KÖVETKEZTETÉSEK

A Caco-2 krónikus vinblasztin kezelésével létrehoztuk a VB-Caco-2 kultúrát, és vizsgáltuk a Caco-2 kultúrával összehasonlításban. A VB-Caco-2 kultúra homogénebb, a Caco-2-höz hasonló passzív permeabilitást mutat kétirányú transzport esszéiben, de érzékenyebben kimutatja a P-gp szubsztrátokat, és stabil P-gp funkcionalitása miatt megbízhatóan használható igen hosszú passzálási tartományban. A sejtek alkalmasak kétirányú transzport esszéiben az abszorpció előrejelzésére és a P-gp által közvetített interakciók vizsgálatára. Megállapítottuk, hogy vinblasztin-megvonás hatására sem a P-gp fehérjeszintje, sem a P-gp funkciója nem csökken, ami a vinblasztin hatásának szelekciós mechanizmusát bizonyítja.

A továbbiakban összehasonlítottuk a VB-Caco-2-t és más epiteliális alapú modelleket, mint lehetséges agyi endotél helyettesítő BBB modelleket a primer kapilláris endotél alapú hármass kultúra modellel (EPA). A lényegesen eltérő morfológia ellenére a modellek hasonlóan alacsony permeabilitást mutatnak a paracelluláris markerekre, és hasonló transzcelluláris passzív penetrációt. Míg az agyi endotél modell gyenge P-gp funkcionalitást mutatott, a VB-Caco-2 és az MDCK-MDR1 modellek mutatták ki a legtöbb ismert P-gp szubsztrát gyógyszert. Az *in vitro* - *in vivo* agyi permeabilitás között mindegyik modellben szignifikáns korreláció áll fenn, ha az *in vivo* értékeket korrigáljuk az agyi és a plazma szabad frakciók hányadosával. Megállapítottuk nagyszámú referencia és új vegyület vizsgálata alapján, hogy erős korreláció áll fenn a magas P-gp expressziójú VB-Caco-2 és MDCK-MDR1 modellekben mérhető permeabilitás között.

Következésképpen a VB-Caco-2 sejt kultúra a gyógyszerek és gyógyszerjelöltek szkrínelésére kiválóan alkalmas modell. A magas és stabil P-gp expressziója miatt az interakciós potenciállal rendelkező P-gp szubsztrátok azonosítására, vizsgálatára is alkalmas. A VB-Caco-2 modell megfelelő szkrín alternatívája lehet a széles körben elfogadott agyi endotél helyettesítő MDCK-MDR1 modellnek, illetve a drága és nehezebben kivitelezhető agyi kapilláris endotél alapú modellnek.

6. SAJÁT PUBLIKÁCIÓK JEGYZÉKE

Disszertációhoz kapcsolódó közlemények:

Hellinger É, Veszelka S, Tóth AE, Walter F, Kittel Á, Bakk ML, Tihanyi K, Háda V, Nakagawa S, Dinh Ha Duy T, Niwa M, Deli MA, Vastag M. (2012) Comparison of brain capillary endothelial cell-based and epithelial (MDCK-MDR1, Caco-2 and VB-Caco-2) cell-based surrogate blood-brain barrier penetration models. Eur J Pharm Biopharm, 82: 340-351. IF₂₀₁₀: 4.304

Vastag M, **Hellinger É**, Bakk ML, Tihanyi K. (2011) Cell-based models of blood-brain barrier penetration. Ther Deliv, 2: 549-553.

Hellinger É, Bakk ML, Pócza P, Tihanyi K, Vastag M. (2010) Drug penetration model of vinblastine-treated Caco-2 cultures. Eur J Pharm Sci, 41: 96-106. IF: 3.291

Könyvfejezet: **Hellinger É**, Vastag M. Intestinal absorption and models of penetration. In: Tihanyi K, Vastag M, (szerk.), Solubility, delivery and ADME problems of drugs and drug-candidates. Bentham Science Publishers. 2011: 86-101.

Egyéb publikációk:

Tihanyi K, Bakk ML, **Hellinger É**, Vastag M. (2010) CYP inhibition-mediated drug-drug interactions. Curr Enzyme Inhib, 6: 130-145.

Boer K, **Hellinger É**, Hellinger A, Pocza P, Pos Z, Demeter P, Baranyai Z, Dede K, Darvas Z, Falus A. (2008) Decreased expression of histamine H1 and H4 receptors suggests disturbance of local regulation in human colorectal tumours by histamine. Eur J Cell Biol, 87: 227-236. IF: 3.955

Jókúti A, **Hellinger É**, Hellinger A, Darvas Z, Falus A, Thurmond RL, Hirschberg A. (2007) Histamine H4 receptor expression is elevated in human nasal polyp tissue. Cell Biol Int, 31: 1367-1370. IF: 1.547