

Charakterisierung und Beeinflussung des intestinalen Cephalosporintransportes

Dissertation



zur Erlangung des akademischen Grades

doctor rerum naturalium (Dr. rer. nat.)

vorgelegt der

Mathematisch-Naturwissenschaftlich-Technischen Fakultät
(mathematisch-naturwissenschaftlicher Bereich)
der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

von Frau Beate Bretschneider

geb. am: 06. 01. 1970 in: Halle (Saale)

Gutachterin bzw. Gutachter:

1. Prof. Dr. habil. Reinhard Neubert, Halle
2. Prof. Dr. habil. Klaus Neubert, Halle
3. Prof. Dr. habil. Hans-Hubert Borchert, Berlin

Halle (Saale), 15. 12. 1999

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

Ø	Durchmesser
$\Delta\psi$	Membranpotential
ΔpH	transmembranärer chemischer Gradient für Protonen
ΔpK	transmembranärer chemischer Gradient für Kalium-Ionen
ΔpNa	transmembranärer chemischer Gradient für Natrium-Ionen
[¹⁴ C]Gly-Sar	[Glycyl-1- ¹⁴ C]Glycylsarkosin
6-PG	6-Phosphogluconat
A	Fläche
Abb.	Abbildung
ACE-Hemmer	<i>angiotensin-converting-enzyme</i> -Hemmer
ADP	Adenosindiphosphat
Ap	Ampicillin
ATP	Adenosintriphosphat
ATPase	ATP abbauendes Enzym
BCDC	Benzylcetyldimethylammoniumchlorid
Bp	Benzylpenicillin
BTC	Benzyltriethylammoniumchlorid
C ₀	Ausgangskonzentration
C _{Akzeptor}	Konzentration im Akzeptor
cbu	Ceftibuten
ccl	Cyclacillin
C _{Donator}	Konzentration im Donator
cdr	Cefadroxil
cef	Cefodizim
cefi	Cefixim
cefu	Cefuroxim
cefua	Cefuroximaxetil
cep	Cefpirom
cesu	Cefsulodin
cet	Cefotaxim
C _{G(tn)}	gemessene Konzentration zur Zeit t _n
C _{K(tn)}	korrigierte Konzentration zur Zeit t _n
C _{K(tn-1)}	korrigierte Konzentration zur Zeit t _{n-1}
clo	Cephaloridin
clot	Cephalotin
cma	Cefamandol
CMC	kritische Micellbildungskonzentration
cmef	Cefmetazol
cph	Cephalexin
cpif	Cefepim
cpir	Cephapirin
CPM	<i>counts per minute</i>
crad	Cephradin
cta	Ceftazidim
CTB	Cetyltrimethylammoniumbromid
ctr	Ceftriaxon
C _w	Konzentration in der wässrigen Phase

cycl	Cyclacillin
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DOS	Desoxycholat-Natrium
DPM	<i>decays per minute</i>
dQ/dt	Permeationsrate
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
G-6-P	Glucose-6-Phosphat
h	Hill-Koeffizient
HEPES	N-2-hydroxyethylpiperazin-N'-2-ethansulfonsäure
HK	Hexokinase
HLB	<i>hydrophilic-lipophilic balance</i>
HPLC	Hochdruckflüssigchromatographie
IC ₅₀	Halbhemmkonzentration
INT(H)	(reduziertes) Iodonitrotetrazolchlorid
J _{m→a}	transepithelialer Flux
K _i	Hemmkonstante
K _t	Michaelis-Menten-Konstante
LTB	Lauryltrimethylammoniumbromid
Max	Maximum
MEM	Minimum Essential Medium
MES	2-[N-morpholino]ethansulfonsäure
Min	Minimum
n	Anzahl der Parallelbestimmungen
n.b.	nicht bestimmt
n.n.	nicht nachweisbar
NADP(H)	(reduziertes) Nicotinamidadenindinucleotidphosphat
NCP	N-Cetylpyridiniumbromid
P	Permeationskoeffizient
PEPT1	intestinaler Protonen/Peptid-Symporter
PMS(H)	(reduziertes) Phenazinmethosulfat
r	Korrelationskoeffizient
S	Substratkonzentration
SDS	Natriumdodecalsulfat
Tab.	Tabelle
TDOS	Taurodesoxycholat-Natrium
TEER	transepithelialer elektrischer Widerstand
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethanchlorid
V _A	Volumen im Akzeptor
VK	Verteilungskoeffizient
VL	Versuchslösung
V _{max}	maximale Aufnahmerate
V _P	Probenvolumen
VP	Versuchspuffer
Zn	Zinksulfat

INHALTSVERZEICHNIS

1	<i>Einleitung und Zielstellung</i>	2
1.1	Einleitung	2
1.1.1	Die Cephalosporine.....	2
1.1.2	Möglichkeiten der Permeation durch biologische Membranen.....	3
1.1.3	Resorption aus dem Gastrointestinaltrakt.....	5
1.1.3.1	Bauliche und funktionelle Grundlagen.....	5
1.1.3.2	Resorption der Cephalosporine aus dem Dünndarm.....	6
1.1.3.3	Erhöhung der oralen Bioverfügbarkeit.....	10
1.2	Zielstellung	12
2	<i>Material und Methoden</i>	13
2.1	Material	13
2.2	Methoden	14
2.2.1	Experimentelle Methoden.....	14
2.2.1.1	Experimente mit der humanen Colocarzinomzelllinie Caco-2.....	14
2.2.1.2	Bestimmung von Verteilungskoeffizienten im n-Octanol-Puffer (pH=7,5)-System.....	17
2.2.1.3	Bestimmung der Permeationskoeffizienten an einem Permeationsmodell mit künstlichen Lipidmembranen und an einem mit biologischen Membranen.....	18
2.2.2	Analytische Methoden.....	21
2.2.3	Mathematische Methoden.....	25
3	<i>Ergebnisse</i>	28
3.1	Untersuchungen zur Aufklärung des aktiven Transportweges	28
3.1.1	Vorversuche zur Etablierung der humanen Colocarzinomzelllinie Caco-2.....	28
3.1.1.1	Bestimmung des günstigsten Zeitraumes der Aufnahmeversuche.....	28
3.1.1.2	Zeit- und pH-Abhängigkeit der Aufnahme von [¹⁴ C]Gly-Sar in Caco-2-Zellen.....	29
3.1.1.3	Einfluß von Glycin bzw. von Mannitol auf die Aufnahme von [¹⁴ C]Gly-Sar.....	30
3.1.1.4	Bestimmung der optimalen Anzahl ausgesäter Zellen auf Transwells [®]	31
3.1.1.5	Dichtigkeit der Caco-2-Zellschicht in Transwells [®]	31
3.1.1.6	Überprüfung der Versuchspufferkapazität nach Zugabe der Inhibitoren.....	32
3.1.1.7	Stabilität der Versuchslösungen während der Versuche und bis zur HPLC-Analytik.....	32
3.1.2	Bestimmung der Affinität von 23 strukturell verschiedenen β -Lactamantibiotika zum H ⁺ /Peptid-Symporter PEPT1.....	32
3.1.3	Bestimmung des transepithelialen Flux von 23 strukturell verschiedenen β -Lactamantibiotika durch Caco-2-Zellen.....	35
3.1.4	Charakterisierung des Einflusses von Zink- und anderen Schwermetall-Ionen auf den H ⁺ /Peptid-Symporter PEPT1.....	38
3.1.4.1	Vergleich der akuten Hemmung der [¹⁴ C]Gly-Sar-Aufnahme durch Zinkchlorid und Zinksulfat.....	38
3.1.4.2	Einfluß der Vorbehandlung der Caco-2-Zellen mit 1 mM Zinksulfat auf die Aufnahme von [¹⁴ C]Gly-Sar.....	39
3.1.4.3	Ermittlung der Hemmung der [¹⁴ C]Gly-Sar-Aufnahme durch Zink-, Kupfer-, Cobalt-, Mangan(II)-, Nickel- und Eisen(II)-Ionen jeweils 150 μ M und 1 mM.....	40
3.1.4.4	Nachweis der Additivität der Hemmung der [¹⁴ C]Gly-Sar-Aufnahme durch Zink-Ionen und Ceftributen.....	41
3.1.4.5	Bestimmung der Glycylsarkosin-Aufnahmekinetik mit und ohne Zink-Ionen-Zugabe.....	42
3.1.4.6	Ermittlung der Fluxbeeinflussung ausgewählter Cephalosporine durch Zink-Ionen.....	43
3.2	Untersuchungen zur passiven Diffusion	44
3.2.1	Bestimmung der Verteilungskoeffizienten.....	44
3.2.2	Bestimmung der Permeationskoeffizienten an Hand des Permeationsmodells mit Dodecanol-Collodium-Membranen.....	47
3.2.3	Bestimmung der Permeationskoeffizienten an Hand des Permeationsmodells mit isoliertem Meerschweinchen-Dünndarm.....	52
3.2.4	Bestimmung der Permeationskoeffizienten an Hand des Permeationsmodells mit Caco-2-Zellen... ..	59
4	<i>Diskussion</i>	62
5	<i>Zusammenfassung</i>	79
6	<i>Literatur</i>	81

1 Einleitung und Zielstellung

1.1 Einleitung

1.1.1 Die Cephalosporine

Fleming entdeckte 1928, daß Kolonien von *Penicillium notatum* das Wachstum von Bakterien hemmen können. Penicillin, das diese Wachstumshemmung verursachte, konnte 1940 von Chain und Florey charakterisiert und in größeren Mengen aus *Penicillium notatum* isoliert werden. In der Folgezeit setzte eine intensive Suche nach weiteren Mikroorganismen ein, die in der Lage sind, wirksame antimikrobielle Substanzen zu produzieren [192].

Brotzu isolierte 1945 aus den Gewässern der Küste Sardinien *Cephalosporium acremonium*, mit dessen Extrakten erfolgreich Staphylokokken- und Streptokokkeninfektionen, Brucellosen und Typhus behandelt werden konnten. Der Extrakt enthält Cephalosporin N (ein Penicillinderivat), die Cephalosporine P₁ bis P₅ (antibakteriell wirksame Steroide) und Cephalosporin C, das nur eine relativ geringe antibiotische Aktivität aufweist. 1962 entwickelten Morin et al. [1] ein Verfahren, 7-Aminocephalosporansäure (siehe **Abb. 1**) aus Cephalosporin C herzustellen.

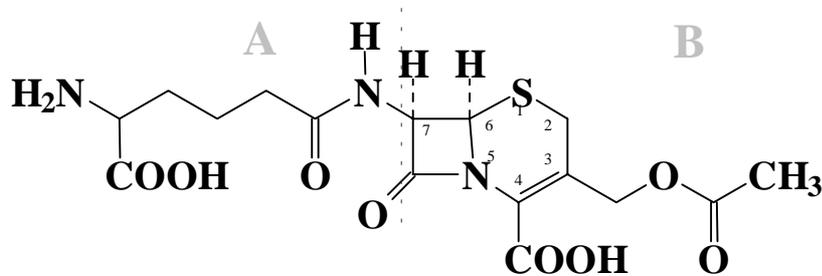


Abb. 1: Chemische Struktur von Cephalosporin C mit den Komponenten (A) D- α -Aminoadipinsäure und (B) 7-Aminocephalosporansäure

Damit stand ein neuer Antibiotikagrundkörper zur Verfügung, der durch Variation der Seitenketten in Position C3 und C7 zu den im Vergleich zu Cephalosporin C antibakteriell wirksameren Cephalosporinen führte [198]. Die Cephalosporine enthalten wie die Penicilline, die Monobactame und die Carbapeneme einen β -Lactamring und werden deshalb gemeinsam mit diesen zur Klasse der β -Lactamantibiotika zusammengefaßt [136].

β -Lactamantibiotika wirken auf proliferierende Bakterien bakterizid. Ihre Angriffsorte sind Peptidoglykansynthetasen (Mureinsynthetasen), die verschiedene konstruktive Funktionen beim Aufbau der Bakterienzellwand haben [136,158]. Die hauptsächliche Aufgabe der Mureinsynthetasen besteht in der Transpeptidierung: Sie katalysieren die Quervernetzung der Glycanstränge mit kurzen Peptidbrücken, um somit das Mureingerüst aufzubauen und zu stabilisieren. Das einem Substrat der Mureinsynthetasen (Acyl-D-Alanyl-D-Alanin) strukturverwandte β -Lactamgerüst [198] blockiert durch Acylierung die Mureinsynthetasen. Da Peptidoglykansynthetasen im menschlichen Organismus nicht vorhanden sind, sind β -Lactamantibiotika relativ gut verträglich [136].

Trotz des gleichen Wirkmechanismus existieren deutliche Unterschiede zwischen den β -Lactamantibiotika hinsichtlich ihrer antibakteriellen Aktivität und ihrer Wirkungsspektren. Die verminderte Empfindlichkeit einiger Bakterien gegenüber Antibiotika wird als Resistenz bezeichnet. Resistenz kann natürlich bestehen, das heißt, alle Stämme einer Spezies sind unem-

pfänglich gegenüber einzelnen Wirkstoffen, oder sie kann auf verschiedenen Wegen erworben werden [136]:

- (1) Spontane Mutationen innerhalb des Bakteriengenoms, die Antibiotikaresistenzen hervorrufen, führen zum Selektionsvorteil unter einer Antibiotikatherapie.
- (2) Eine wesentlich schnellere Ausbreitung der Resistenz unter Selektionsdruck gelingt durch die Übertragung von extrachromosomalem Erbmaterial, das eine Antibiotikaresistenz kodiert, unabhängig von der Zellteilung. Diese Weitergabe erfolgt auf verschiedene Weise. Bei der Transformation nehmen Bakterien DNA-Bruchstücke aus der Umgebung auf. Bei der Transduktion überbringen Bakteriophagen die Resistenzinformation. Gramnegative Bakterien können Genmaterial durch Konjugationen mittels Ausbildung einer Plasmabrücke (Sexpilus) innerhalb der Spezies und zwischen verschiedenen Spezies austauschen [151].

Resistenz von Bakterien gegenüber β -Lactamantibiotika ergibt sich (1.) aus dem Bakterienwandaufbau. Die Mureinsynthetasen befinden sich auf der Oberfläche der Zytoplasmamembran und werden nicht von allen β -Lactamantibiotika erreicht. Bei grampositiven Bakterien muß das Antibiotikum die Schleimkapsel und die relativ dicke Mureinschicht durchwandern und bei gramnegativen Bakterien zusätzlich die äußere Membran und den periplasmatischen Raum. (2.) Gramnegative Stäbchen-Bakterien können die Zellwandpermeabilität noch zusätzlich reduzieren. (3.) Verschiedene Bakterienspezies sind in der Lage, die Mureinsynthetasen und damit den eigentlichen Angriffspunkt der β -Lactamantibiotika zu verändern. (4.) Häufiger können die Bakterien β -Lactamasen synthetisieren, die den ungeschützten β -Lactamring aufspalten und somit zum Wirksamkeitsverlust der betroffenen β -Lactamantibiotika führen. Es gibt etwa 100 verschiedene β -Lactamasen.

Die Permeationsfähigkeit, die Wirkortaffinität und die β -Lactamase-Stabilität stellen somit die wichtigen Wirksamkeitsfaktoren der β -Lactamantibiotika dar [136]. In Folge der Resistenzentstehung und -verbreitung bei Bakterien ist eine ständige Weiterentwicklung der Antibiotika erforderlich [158].

Die *in vitro* gefundene Wirksamkeit eines Antibiotikums führt nur dann zum therapeutischen Erfolg, wenn die Antibiotikakonzentration am Infektionsort über der minimalen Hemmkonzentration bzw. über der minimalen bakteriziden Konzentration liegt, ohne in für den Patienten toxischer Dosierung angewendet werden zu müssen.

Da der Applikationsort der Antibiotika nur in seltenen Fällen dem Wirkort entspricht, ergibt sich die Konzentration am Wirkort, das heißt, im infizierten Gewebe, aus dem Zusammenspiel von Resorption, Verteilung und Elimination des Antibiotikums [46]. Dabei müssen die Antibiotika biologische Barrieren in Form von Zellverbänden permeieren. Dieses ist prinzipiell auf parazellulärem oder auf transzellulärem Weg möglich.

1.1.2 Möglichkeiten der Permeation durch biologische Membranen

Passive Diffusion

Bei der passiven Diffusion erfolgt der Stofftransport entlang eines Konzentrationsgefälles ohne Energieaufwand. Die pro Zeiteinheit diffundierte Stoffmenge ist nach dem 1. Fick'schen Diffusionsgesetz proportional zur Konzentrationsdifferenz, zur wirksamen Membranoberfläche und umgekehrt proportional zur Membrandicke. Außerdem hängt die Diffusionsgeschwindigkeit vom Verteilungskoeffizienten zwischen dem Membranmaterial und der umgebenden Flüssigkeit ab. Daraus folgt, daß die lipophilen Anteile der Membranen für hydrophile Substanzen nahezu

undurchlässig sind. Die Diffusion durch die wäßrige Phase der durch Membranproteine gebildeten Poren und Kanäle wird vor allem von der Molekülgröße der permeierenden Teilchen eingeschränkt (<180 Da) [46].

Bei ionisierbaren Stoffen ist nur der nichtionisierte Anteil zur Passage der Lipidmembran befähigt [74]. Ein Mechanismus, mit dem die Passage von ionisiert vorliegenden Substanzen durch Lipidmembranen erklärt werden kann, ist die Bildung von Ionenpaaren (siehe 1.1.3.3).

Erleichterte Diffusion

Bei dieser Sonderform der Diffusion wird der Transport durch die Membran durch Transportsysteme (Carrier) ermöglicht. Membranständige Transportproteine binden das Substrat reversibel, wodurch eine Konformationsänderung des Carriers hervorgerufen wird, und schleusen das Substrat durch die Membran. Die Passage verläuft ebenfalls ohne Energieverbrauch entlang des Konzentrationsgefälles, jedoch ist sie hemm- und sättigbar [76]. Einen Sonderfall der erleichterten Diffusion stellt der Ionenpaartransport dar (siehe 1.1.3.3).

Aktiver Transport

Hierbei werden Stoffe gegen den Konzentrationsgradienten transportiert, wofür Energie bereitgestellt werden muß. Beim primär aktiven Transport wird die Energie durch die simultane Hydrolyse von ATP aufgebracht. Beim sekundär aktiven Transport ist die treibende Kraft ein elektrochemischer Gradient von Ionen durch die Plasmamembran. Bei Säugetieren sind die aktiven Transportprozesse vor allem mit dem Na^+ -Gradienten gekoppelt [44]. Der Transport der Ionen in Richtung des Konzentrationsgefälles ist mit einem weiteren Transfer gegen das Konzentrationsgefälle verknüpft. Man unterscheidet bei diesem Cotransport Sym- und Antiport, je nachdem ob Substrat und Ionen gleichgerichtet oder entgegengesetzt transportiert werden [76, 77]. Ist ein weiterer Cotransport zur Translokation notwendig, wird dies als tertiär aktiver Transport bezeichnet. Die entsprechenden Transportproteine sind sättigbar und weisen eine hohe strukturelle Spezifität für ihre Liganden auf [46].

Vesikulärer Transport

Beim vesikulären Transport binden Substrate an Rezeptoren (rezeptorvermittelte Endozytose) oder unspezifisch an die Zytoplasmamembran. Unter ATP- Verbrauch können sich von der Zellmembran Vesikel abschnüren, dabei Partikel (Phagozytose) oder Flüssigkeiten (Pinozytose) umschließen und in die Zelle schleusen. Umgekehrt können im Vergleich zur Endozytose bei der Exozytose intrazelluläre Vesikel mit der Plasmamembran verschmelzen und so enthaltene Moleküle nach außen transportieren. Der transzelluläre Transport durch Zusammenspiel von Endo- und Exozytose wird als Transzytose bezeichnet [46].

Potozytose

Bei der Potozytose werden Plasmamembranabschnitte eingestülpt, die spezielle Ionenpumpen, Rezeptoren bzw. Transportproteine enthalten. Im so entstandenen begrenzten Raum wird ein Mikroklima ausgebildet, das die Bindung von Substraten an Carrierproteine ermöglicht [133].

Filtration

Die Filtration ist eine Form des konvektiven Transportes. Das Lösungsmittel wandert zusammen mit den gelösten Stoffen durch Poren, sofern die Moleküle nicht zu groß sind. Die treibenden Kräfte sind dabei hydrostatische Druck- oder Osmolaritätsdifferenzen von Flüssigkeiten [46].

1.1.3 Resorption aus dem Gastrointestinaltrakt

1.1.3.1 Bauliche und funktionelle Grundlagen

Unter Resorption ist die Aufnahme eines Stoffes aus dem Körperäußeren oder von einem lokal begrenzten Applikationsort im Körperinneren (z.B. intramuskuläre Injektion) in die Blut- oder Lymphbahn zu verstehen. Lediglich bei intravenöser, intraarterieller oder intrakardialer Applikation von Substanzen entfällt die Resorption. Die Applikationsart richtet sich nach dem therapeutischen Ziel, den physikochemischen und biochemischen Eigenschaften des Wirkstoffes und dem Zustand des Patienten. Im Allgemeinen, vor allem bei Dauertherapie, wird die orale Applikation angestrebt, da sie die größte Akzeptanz der Patienten bei kleinstmöglicher Risikobelastung aufweist [127].

Hauptresorptionsort im Gastrointestinaltrakt ist für Pharmaka der Dünndarm wegen der großen Oberfläche, der starken Vaskularisierung und der langen Passagezeit des Speisebreis [46]. Deshalb bleiben Mundhöhle, Magen, Dickdarm und Rektum bei den folgenden Betrachtungen unberücksichtigt.

Die potentiellen anatomischen Barrieren (siehe **Abb. 2**) bei der Arzneistoffresorption sind die Schleimschicht, die Luminal- und Serosalmembran der Enterozyten, *tight junctions*, die Basalmembranen und die Kapillarwände der Blut- und Lymphgefäße [190].

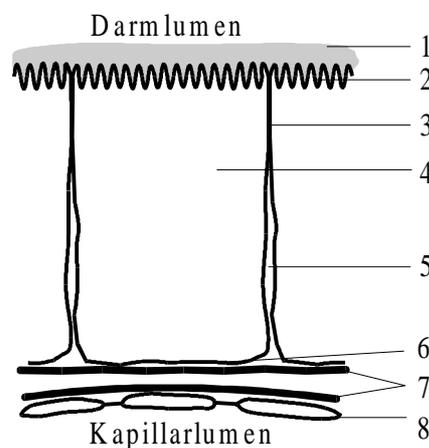


Abb. 2: Schematische Darstellung der intestinalen Resorptionsbarrieren

(1: Schleimschicht; 2: Luminalmembran; 3: *tight junction*; 4: Enterozyt; 5: interzellulärer Raum; 6: Serosalmembran; 7: Basalmembranen; 8: fenestriertes Kapillarendothel) [190]

Die Schleimschicht setzt sich aus Wasser, Glykoproteinen (Mucinen), Elektrolyten, Proteinen und Nucleinsäuren zusammen. Sie ist mit der Glykokalyx verbunden, dem Saum der Luminalmembran, der durch Kohlenhydratreste der Glykoproteine, Glykolipide und Mucopolysaccharide gebildet wird. Schleimschicht und Glykokalyx stellen ein entscheidendes Hindernis für lipophile Stoffe dar. Im Schleim herrscht ein saures Mikroklima (pH=6,0) [76, 94, 95, 101, 190]. Die Mucine sind wegen ihrer Sialin- und Schwefelsäurereste negativ geladen. Mobile Kationen

wie z.B. Wasserstoffionen oder ionisierte Basen können sich an diese Ladungen anlagern [41]. Dadurch wird der Kontakt mit der Resorptionsfläche erleichtert sowie durch Anreicherung ein größeres Konzentrationsgefälle aufgebaut, so daß die Resorption von beispielsweise quaternären Ammoniumverbindungen erleichtert werden kann [143]. Es wurde aber auch die Möglichkeit beschrieben, daß Arzneistoffe an den Schleim so stark gebunden werden, daß ihre Resorption dadurch behindert wird [Übersicht bei 190].

Die Zellmembranen auf der Luminal- und der Serosalseite, die wie alle Plasmamembranen aus Lipiden und Proteinen bestehen, bilden die entscheidenden Diffusionsbarrieren für hydrophile Substanzen. Die Lipide (Phospholipide, Glykolipide und Cholesterol) bilden dabei die Matrix der Membranstruktur in Form von Doppelschichten. Die Proteine sind mit den Membranen lose assoziiert, tauchen in die Membranen ein oder durchdringen diese. Sie sind für Transportvorgänge und die Verankerung des Cytoskeletts verantwortlich, oder sie haben als Enzyme katalytische Aufgaben [77]. Die Serosalmembran weist durch einen niedrigeren Gehalt an Glykosphingolipiden eine höhere Fluidität auf, so daß die Barrierefunktion deutlich geringer als die der Luminalmembran ausfällt [193].

Die *tight junctions* (*zonulae occludentes*) sind Kontaktregionen auf der luminalen Seite zwischen den Enterozyten. Durch sie können Substanzen mit einem Moleküldurchmesser bis zu 0,8 nm, das heißt, sphärisch geformte Moleküle bis zu einem Molekulargewicht von 150 g/mol und kettenförmige Moleküle bis 400 g/mol [74] diffundieren, sie sind jedoch weniger bis undurchlässig für makromolekulare Stoffe [41].

Die Basalmembranen der Dünndarmepithelzellen bzw. der Kapillarendothelien bestehen aus Glykoproteinen und Proteoglykanen [46], das Ausmaß der Resorptionslimitierung wurde bisher nicht genauer charakterisiert.

Die Blut- und Lymphkapillaren sind fenestriert [46], so daß die Kapillarwände nur für makromolekulare Stoffe ein nennenswertes Hindernis darstellen. Es wurde beschrieben, daß sehr hydrophile Substanzen langsamer als lipophile die Kapillarwände passieren [190].

Mit dem Speichel, aus den Magenwandzellen, aus dem Pankreas bzw. mit der Galle sezernierte oder im Bürstensaum der Enterozyten lokalisierte Verdauungsenzyme begünstigen normalerweise die Resorption durch Umwandlung makromolekularer Nährstoffe in niedermolekulare. Gallensäuren können durch Ionenpaarbildung mit ionisiert vorliegenden Substanzen oder durch micellaren Einschluß lipophiler Stoffe die passive Diffusion dieser Nahrungsbestandteile verbessern. Werden jedoch Arzneistoffe durch Enzyme abgebaut oder durch Aggregation mit Gallensäuren an der Resorption gehindert, stellen die physiologischen Resorptionsverbesserer eine biochemische „Resorptionsbarriere“ dar [76].

In den Darm sezernierte Immunglobuline (vor allem Immunglobulin A) können die Resorption von Arzneistoffen mit Antigencharakter ebenfalls verhindern (immunologische „Resorptionsbarriere“) [46, 76]

1.1.3.2 Resorption der Cephalosporine aus dem Dünndarm

Die meisten β -Lactamantibiotika werden nur in sehr geringen Mengen aus dem Gastrointestinaltrakt resorbiert und müssen deshalb intramuskulär oder intravenös appliziert werden. Gründe dafür sind vor allem die ausgeprägte Hydrophilie und die Ionisation bei physiologischen pH-Werten. Frühere Versuche, durch Einführung einer lipophilen Seitenkette an C7 bei den ersten parenteralen Cephalosporinen Cephalotin und Cephradin oral wirksame Cephalosporine zu erhalten, schlugen fehl [1].

Die heute im Handel befindlichen oral anwendbaren Cephalosporine lassen sich in drei Gruppen untergliedern: (a) Cefuroximaxetil-Typ, (b) Cephalexin-Typ und (c) Cefixim-Typ.

Die Gruppe des Cefuroximaxetil-Typs besteht aus den Ester- Prodrugs. Durch Veresterung der Carboxylgruppe an C4 parenteraler Cephalosporine (siehe **Abb. 1**) wird die Lipophilie soweit erhöht, daß dadurch die Resorption zu 40-60 % möglich ist [78]. Cephalosporine vom Cephalexin- Typ haben an der C7-Aminogruppe des Cephalosporingrundgerüsts (siehe **Abb. 1**) einen aromatisch substituierten Glycinrest peptidartig gebunden und werden deshalb auch zu den α -Amino-Cephalosporinen zusammengefaßt. Cephalosporine vom Cefixim-Typ sind von den Aminothiazol-Cephalosporinen abgeleitet und dadurch charakterisiert, daß in der 7-Amino-Seitenkette (siehe **Abb. 1**) eine zweite saure Komponente enthalten ist, entweder eine zweite Carboxylgruppe oder eine freie Oximgruppe.

Die Cephalosporine vom Cephalexin- und Cefixim- Typ werden trotz geringer Lipophilie aus dem Gastrointestinaltrakt sehr effizient resorbiert [81, 185]. Es konnte gezeigt werden, daß die hydrophilen oral applizierbaren Cephalosporine Substrate des physiologischen Transportsystems der Di- und Tripeptide sind [71, 122, 162, 168, 187].

Die α -Amino-Cephalosporine sind, wie in **Abb. 3** dargestellt, Strukturanaloga von Tripeptiden [83].

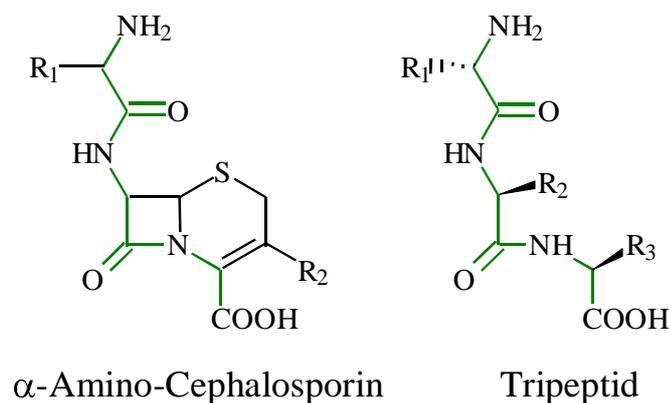


Abb. 3: Struktureller Vergleich von α -Amino-Cephalosporin und Tripeptid [181]

Zum besseren Verständnis der physiologischen Bedeutung des intestinalen Peptidtransporters PEPT1 wird im Folgenden kurz die Proteinverdauung und -resorption erläutert (siehe **Abb. 4**). Die mit der Nahrung aufgenommenen Proteine werden von Enzymen aus dem Magen und dem Pankreas hauptsächlich zu Oligopeptiden hydrolysiert. Die Oligopeptide werden weiter zu Di- und Tripeptiden und freien Aminosäuren durch membrangebundene Peptidasen der Luminalmembran der Enterozyten abgebaut. Etwa 80% der Nahrungsproteine [55] werden in Form von Di- und Tripeptiden in die Enterozyten aufgenommen. Die weitere Spaltung findet erst in den Enterozyten statt, da Di- und Tripeptidasen zum großen Teil in den Enterozyten lokalisiert sind [80]. Für die Aminosäuren stehen verschiedene gruppenspezifische aktive Transportsysteme zur Verfügung. Hauptsächlich gelangen intakte Di- und Tripeptide (Tetra- oder Pentapeptide werden nicht akzeptiert) mittels H⁺/Peptid-Symporter (PEPT 1) aus dem Lumen in die Zellen, wo sie zum großen Teil durch zytosolische Peptidasen zu freien Aminosäuren hydrolysiert werden. Die Hauptresorptionsprodukte der Nahrungsproteine sind freie Aminosäuren, da nur hydrolysebeständige Di- und Tripeptide die Enterozyten intakt verlassen [55, 190]. Passive Diffusion kann auf Grund der großen Hydrophilie der Di- und Tripeptide ausgeschlossen werden [181]. Es wird

auch in der Serosalmembran ein Transportsystem vermutet [37, 100, 175]. Immunlokalisationsstudien haben gezeigt, daß es sich nicht um das gleiche Transportprotein wie auf der Luminalseite handelt [139].

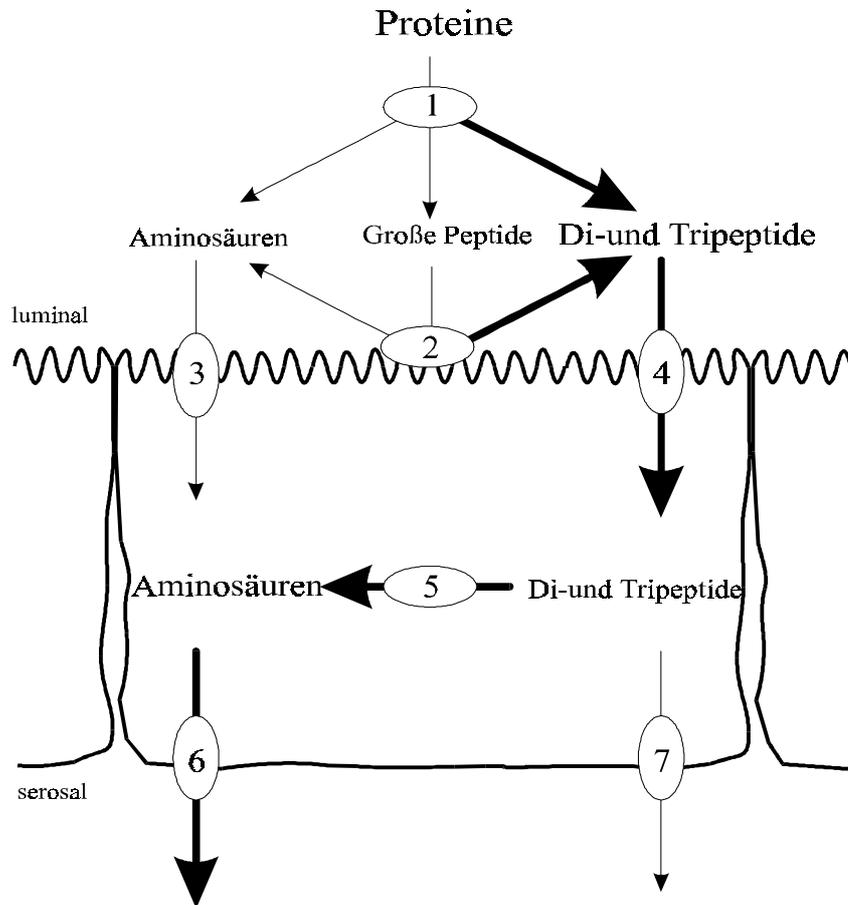


Abb.4: Verdauung und Resorption von Proteinen im Dünndarm

(1: Peptidasen im Lumen; 2: Peptidasen in der Luminalmembran; 3: Aminosäure-Transporter in der Luminalmembran; 4: Peptidtransporter in der Luminalmembran; 5: Peptidasen im Cytosol; 6: Aminosäure-Transporter in der Serosalmembran; 7: Peptidtransporter in der Serosalmembran)

Der intestinale Peptidtransporter PEPT1 ist ein tertiär aktives Transportsystem (siehe **Abb. 5**). Stoffwechselenergie in Form von ATP wird nicht direkt benötigt. Durch die Na^+/K^+ -ATPase in der Serosalmembran werden der zellauswärts gerichtete K^+ -Gradient und der zelleinwärts gerichtete Na^+ -Gradient aufrechterhalten. Die Konzentrationsdifferenz von Na^+ zwischen Zelläußeren und -innerem wird vom Na^+/H^+ -Austauscher ausgenutzt, der in der Luminalmembran lokalisiert ist [176]. Dadurch wird ein H^+ -Gradient aufgebaut, der vor allem für das saure Mikroklima im Bürstensaum verantwortlich ist. Gleichgerichtet mit dem Membranpotential wirkt der H^+ -Gradient als treibende Kraft für den Peptidtransport. Über das Transportsystem PEPT1, das sich in der Luminalmembran befindet, werden Peptide mit Protonen symportiert [54, 55, 177, 181]. Die entscheidenden Schritte des Transportvorgangs sind die Bindung bzw. die Dissoziation des H^+ am/vom Carrier und die damit verbundenen Konformationsänderungen [96]. Fei et al. [44] kalkulierten ein Flux-Verhältnis von 1:1 für Peptide : H^+ . Der H^+ /Peptid-Symporter PEPT1 stellt wie auch der zusätzlich in der Niere gefundene PEPT2 [91] die Verbindung zwi-

schen den prokariotischen H^+ -gekoppelten und den eukaryotischen Na^+ -gekoppelten Transportsystemen her [44].

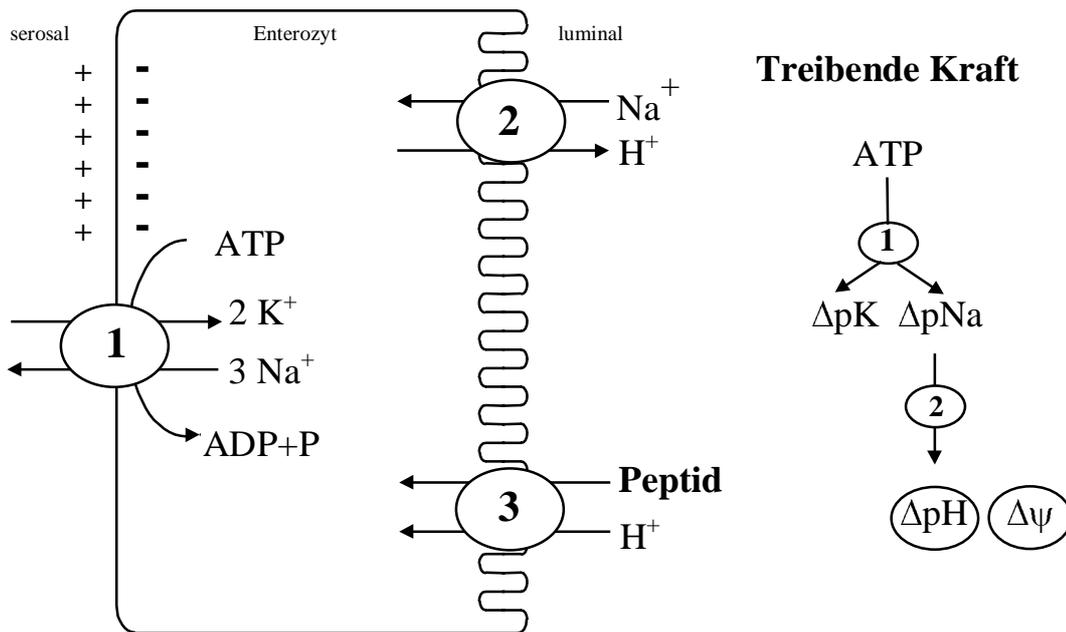


Abb. 5: Peptidtransport (3) in der intestinalen Luminalmembran und sein Verhältnis zum Na^+ - H^+ -Austauscher (2) und der Na^+ / K^+ -ATPase (1)

ΔpK , ΔpNa und ΔpH symbolisieren die transmembranären chemischen Gradienten für K^+ , Na^+ und H^+ und $\Delta \psi$ das Membranpotential [nach 55].

Der humane PEPT1 ist ein Protein mit einem Molekulargewicht von 78,81 kDa. Er setzt sich aus 708 Aminosäuren zusammen und weist 12 membrandurchspannende Regionen auf. Innerhalb der ungewöhnlich langen hydrophilen Schleife zwischen dem 9. und 10. transmembranären Bereich, die an sieben Stellen glykosyliert ist, wird das aktive Zentrum vermutet [89]. Histidylreste spielen eine entscheidende Rolle bei der katalytischen Funktion des Peptidtransporters [12, 170]. Durch Mutagenese konnte der Histidylrest in Position 57 als essentiell identifiziert werden [45]. Über die Konformation des aktiven Zentrums, das heißt, der Bindungsstelle des Peptidtransportes, ist bisher wenig bekannt. Deren Aufklärung und die Aufklärung des Bindungsmechanismus ist von pharmazeutischem Interesse, da neben den β -Lactamantibiotika ACE (*angiotensin converting enzyme*)-Hemmer, Renin-Hemmer, Bestatin, peptidartige Thrombinhemmer, 2- α -Methyldopa-L-Phe, Di- und Tripeptid- gebundene Prodrugs und Valacyclovir von PEPT1 transportiert werden [3, 9, 52, 60, 66, 155, 180, 181, 197]. Die genaue Kenntnis der Struktur- Affinitäts- Beziehung würde eine gezielte Arzneistoffentwicklung im Hinblick auf effektive orale Applikation ermöglichen.

Die neueren oralen Cephalosporine zeichnen sich durch eine erhöhte β -Lactamasestabilität aus und sind gegen die gramnegativen Keime der physiologischen Darmflora gut wirksam. Daraus ergibt sich die Störung der Darmflora durch den nicht resorbierten Anteil der oral verabreichten Cephalosporine. Deshalb wird die nahezu vollständige Resorption der Cephalosporine angestrebt. Ester- Prodrugs hingegen weisen keine intestinalen Nebenwirkungen auf, da die Wirkform im Darmlumen noch nicht freigesetzt wird [161].

Da nur die α -Amino-Cephalosporine eine fast 100%-ige Bioverfügbarkeit nach oraler Applikation aufweisen, erklärt sich das auch weiterhin große Bestreben, den Resorptionsmechanismus der Cephalosporine genauer zu charakterisieren und Möglichkeiten zu finden, die orale Bioverfügbarkeit zu verbessern.

1.1.3.3 Erhöhung der oralen Bioverfügbarkeit

Hinsichtlich der Resorption auf passivem Weg nach oraler Gabe unterscheidet man drei Problemgruppen von Pharmaka. Zum einen sind es stark lipophile Stoffe, die nur schlecht im wässrigen Milieu des Darmlumens in Lösung gehen und die wässrige Schleimschicht auf dem Bürstensaum kaum durchdringen können, um zum eigentlichen Resorptionsort, den Enterozyten, zu gelangen. Zum anderen sind es stark hydrophile Substanzen, deren polare Gruppen bei physiologischen pH-Bereichen ionisiert vorliegen können. Dadurch kann die lipophile Plasmamembran der Enterozyten nicht passiv überwunden werden, und für den Weg durch die Poren oder *tight junctions* sind die betreffenden Pharmaka meist zu groß. In der dritten Gruppe sind die chemisch labilen Arzneistoffe zusammengefaßt, die den Resorptionsort intakt nicht erreichen können [127].

Prodrugbildung

Nur selten gelingt es, durch Veränderung der chemischen Struktur des Wirkstoffes ein neues wirksames und zugleich besser resorbierbares Pharmakon zu erhalten. Eine Möglichkeit der Resorptionssteigerung ist die Herstellung eines Prodrug. Ein Prodrug ist selbst biologisch inaktiv, unterscheidet sich in seiner chemischen Struktur von der Wirkform und wird im Organismus enzymatisch oder nichtenzymatisch in die Wirkform umgewandelt. Am häufigsten erfolgt die Derivatisierung durch Veresterung von Carboxylgruppen oder von alkoholischen bzw. phenolischen Hydroxylgruppen [8]. Neuere Entwicklungen haben den Weg eröffnet, durch Konjugation der Pharmaka an physiologische Substrate wie Peptide oder Gallensalze deren aktive Transportsysteme zur Resorption zu nutzen [86, 155, 165, 197].

Enhancerwirkung

Mit dem Ziel, die intestinale Mucosa als Barriere für passiv schlecht resorbierbare Pharmaka zu beeinträchtigen, wurde in den letzten Jahren das Potential der Zugabe von einer Reihe von Substanzen geprüft, um die Permeabilität der Mucosa zu verändern. Stoffe mit positiven Effekten werden zu den Resorptionsverbesserern (Enhancer) zusammengefaßt. Resorptionsverbessernde Einflüsse wurden z.B. für natürliche und synthetische Tenside, Salicylate, EDTA (Ethyldiamintetraessigsäure), Methylxanthine und hyperosmolare Stimuli beschrieben [Übersicht bei 76, 148, 190]. Resorptionenhancer dürfen die Darmschichten nicht ernsthaft schädigen, so daß Resorptionsstudien immer auch die Auswirkungen auf die Mucosa bewerten sollten.

Untersuchungen mit Ratten ergaben, daß Salicylate die Mucosapermeabilität durch lokale Membraneffekte erhöhen. Sie weiten die interzellularen Verbindungen und die Poren in der Epithelzellschicht auf, ohne die Basalmembran oder andere subepitheliale Strukturen zu stören [82]. Auch wird angenommen, daß Na^+ -Salicylat durch Wechselwirkung mit Kopfgruppen der Phospholipide oder mit den Membranproteinen die Fluidität der Membran erhöht [154]. Beim Einsatz anderer nichtsteroidaler Antiphlogistika wurden ähnliche Effekte beobachtet [Übersicht bei 190], die jeweils im rektalen Bereich am stärksten ausgeprägt waren.

Hyperosmolare Stimuli erhöhen die Aufnahme von wasserlöslichen Substanzen, indem sie die *tight junctions* auflockern. Dieser osmotische Effekt ist reversibel [203].

Mit EDTA wird die parazelluläre Resorption begünstigt, indem den *tight junctions* durch Chelatbildung Ca^{2+} -Ionen entzogen werden, die für den Zusammenhalt essentiell sind [121, 179, 190].

Als oberflächenaktive Enhancer werden mit Rücksicht auf die Verträglichkeit neben den synthetischen Vertretern (anionische, nichtionische und kationische Tenside) und aus Pflanzen gewonnenen Seifen vorrangig physiologisch im Gastrointestinaltrakt vorkommende Amphiphile, wie Gallensalze und deren Derivate, mittelkettige Fettsäuren und mittelkettige Glyceride angewendet. Mit diesen oberflächenaktiven Substanzen konnte gezeigt werden, daß sie die Resorption sowohl der stark lipophilen als auch der hydrophilen Pharmaka verbessern können. Dies kommt durch die Wechselwirkungen mit den Barrierschichten zustande. Auf Grund ihrer oberflächenaktiven Eigenschaft können sie (1.) die Dicke des Schleimes und damit auch der unbewegten Wasserschicht reduzieren [131], (2.) die Permeabilität des parazellulären Weges erhöhen [75] und (3.) mit den Membranproteinen und -lipiden interagieren, so daß eine erhöhte Membranfluidität resultiert [69; 105]. Die Membranpermeabilität wird entweder durch Einbau der Enhancer in die Membran oder durch Herauslösen von Membranbausteinen verändert, so daß in jedem Fall die Membranstruktur gestört wird. Für Enhancer, die Kohlenwasserstoffketten enthalten, wird eine optimale Kettenlänge von 8-12 C-Atomen postuliert als Kompromiß zwischen zunehmender Enhancerwirkung und abnehmender Wasserlöslichkeit bei steigender Kettenlänge [191] bzw. als Ergebnis der günstigsten Destabilisierung der Membran [47]. Die genannten Effekte sind auf das monomere Vorliegen der Tenside zurückzuführen und korrelieren nicht mit der Größe des HLB-Wertes (*hydrophilic-lipophilic balance*) [190]. Erreicht die Tensidkonzentration in wäßriger Lösung einen bestimmten Wert, die sogenannte kritische Micellbildungskonzentration (CMC), assoziieren fast schlagartig etwa 50-160 monomere Moleküle zu meist sphärischen Gebilden. Die Micellen sind zur Aufnahme verschiedener Stoffe befähigt. Diese Micellbildung steigert im Zusammenspiel mit der besseren Benetzung die Auflösungsgeschwindigkeit schlecht wasserlöslicher Substanzen [128].

Zusätzlich zu den genannten Effekten wird für die Gallensalze, deren Derivate und für mittelkettige Fettsäuren vermutet, daß sie durch Komplexbildung mit mucosalen Ca^{2+} -Ionen die interzellulären Verbindungen aufweiten [67].

Ionenpaartheorie

Eine andere Möglichkeit der Verbesserung der Bioverfügbarkeit ionisiert vorliegender Arzneistoffe basiert auf der Theorie der Ionenpaarbildung. Ionenpaare sind Assoziate entgegengesetzt geladener Ionen, die entstehen, wenn ein kritischer Abstand zwischen den entgegengesetzten Ladungen unterschritten wird, so daß die Coulombsche Anziehung zu einem zeitweiligen Zusammentritt führt und die an der Bindung beteiligten Ladungen nach außen neutralisiert. Dieses stark vereinfachte Modell berücksichtigt nicht den Einfluß anderer Faktoren auf die Ionenpaarbildung, wie Dipol- und Dispersionskräfte, hydrophobe Wechselwirkungen in wäßrigem Milieu, Einflüsse der Solvataion und der Struktur der Ionen [90].

Die Bildung eines lipophilen Ionenpaares ist eine Gleichgewichtsreaktion, die durch die Assoziationskonstante charakterisiert wird. Diese sollte eine optimale Größe haben, denn ist sie zu klein, ist die Absorptionsrate unbedeutend klein. Ist sie jedoch zu groß, ist die freie Menge des dissoziierten Wirkstoffes im Blut zu klein, um therapeutisch nützlich zu sein [74].

Eine Zusammenstellung von *in vitro*-Untersuchungen des Ionenpaartransportmodelles finden sich bei Neubert [117] und von *in vivo*-Ergebnissen bei Amlacher et al. [4]. Es existieren zwei Möglichkeiten der Membranpassage:

1. Die Ionenpaare permeieren die Lipidmembran in äquimolaren Mengen.
2. Das lipophile Gegenion reichert sich in der Membran an und dient dort als Carrier für das hydrophile Arzneistoffion. Zur Wahrung der Elektroneutralität muß für jedes Ion aus dem Donator ein gleichgeladenes Ion aus dem Akzeptor zurücktransportiert werden [120].

1.2 Zielstellung

Ziel der vorliegenden Arbeit ist die nähere Charakterisierung der Resorptionsmöglichkeiten von β -Lactamantibiotika nach oraler Applikation. Zu diesem Zweck sollen die Struktur-Affinitäts-Beziehung von 20 Cephalosporinen und 3 Penicillinen zum intestinalen aktiven H^+ /Peptid-Symporter PEPT1 und die daraus resultierende Permeationsfähigkeit dieser Antibiotika in und durch intestinales Gewebe überprüft werden. Dazu muß die humane Colonicarcinomzelllinie Caco-2 als Modell für die intestinale Resorptionsbarriere in der Arbeitsgruppe Neubert des Instituts für Pharmazeutische Technologie und Biopharmazie in Halle eingeführt werden. Die Differenzierung und die Funktionsfähigkeit der Caco-2-Zellen sind in zwei verschiedenen Modellsystemen zu testen, um die Stoffaufnahme in die Zellen und den Stofftransport durch die Zellen zu bestimmen. Es soll überprüft werden, wie Schwermetallionen den PEPT1 beeinflussen und wie sich der Einfluß auf die Permeationsraten von ausgewählten Cephalosporinen durch die Caco-2-Zellen auswirkt.

Im weiteren Teil der Arbeit ist zu untersuchen, ob Ionenpaarbildung von ausgewählten Cephalosporinen mit amphiphilen Gegenionen zur Resorptionsverbesserung führt. Ausgehend von den Verteilungskoeffizienten im n-Octanol-Puffer-System wird an künstlichen bzw. biologischen Membranen überprüft, inwieweit sich eine Lipophilieänderung durch Wechselwirkung zwischen Cephalosporinen und Tensiden auf die Permeation der Testantibiotika in und durch die Modellmembranen auswirkt und welchen Einfluß die Micellenbildung der Tenside auf die Diffusion der Cephalosporine ausübt. Abschließend soll geklärt werden, wie die Ergebnisse der unterschiedlichen Modellsysteme miteinander korrelieren, um deren Einsatzfähigkeit und Aussagekraft besser einschätzen zu können.

2 Material und Methoden

2.1 Material

[Glycyl-1-¹⁴C]Glycylsarkosin ([¹⁴C]Gly-Sar) mit einer spezifischen Radioaktivität von 53 mCi/mmol und D-[1-¹⁴C]Mannitol ([¹⁴C]Mannitol) mit einer spezifischen Radioaktivität von 57 mCi/mmol wurden von Amersham International (Großbritannien) bezogen. D-[6-³H]Glucose mit einer spezifischen Aktivität von 43,4 Ci/mmol wurde von Du Pont de Nemours (Deutschland) gekauft.

Cefadroxil, Cefamandol, Cephradin, Cefaclor, Cephalotin, Cephalexin, Ampicillin, Cephapirin, Cefmetazol, Ceftazidim, Benzylpenicillin, Ceftriaxon, Cefaloridin, Cefsulodin, Taurodesoxycholat-Natrium und Desoxycholat-Natrium wurden von Sigma (Deutschland) bezogen. Cefodizim, Cefuroxim, Cefpirom und Cefotaxim wurden von Hoechst (Deutschland) zur Verfügung gestellt. Cefuroximaxetil wurde von Glaxo-Wellcome (Deutschland) geliefert. Cefepim war eine Gabe von Bristol-Myers Squibb (Deutschland). Ceftibuten, Cyclacillin und Cefixim waren Geschenke von Prof. Dr. F.H. Leibach, Medical College of Georgia in Augusta (USA).

N-Cetylpyridiniumbromid wurde von Merck (Deutschland) gekauft. Lauryltrimethylammoniumbromid, Cetyltrimethylammoniumbromid, Benzoldimethylcetylammmoniumchlorid und Benzyltriethylammoniumchlorid waren Geschenke von Bode-Chemie (Deutschland).

Der Flüssigszintillator (Ultima GoldTM XR[®] LSC-Coctail) wurde von Packard (USA) gekauft.

Das Glucose-Testset bestehend aus Glucose-Farbreagenz, Glucose-Enzymreagenz und Glucose-Standard (5,56 mmol/l) wurde von Sigma Diagnostics (Deutschland) bezogen.

Das 2N Folin-Ciocalteu's-Phenol-Reagenz und die Puffersubstanzen (siehe Methoden) sowie Natriumcarbonat, Natriumhydroxid, Kalium-Natriumtartrat, Eisen(II)-chlorid, Mangan(II)-chlorid, Nickelchlorid, Cobaltchlorid, Kupfer(II)-chlorid und Kupfer(II)-sulfat waren Produkte von Sigma (Deutschland).

Zinksulfat, Zinkchlorid, Dodecylalkohol, Ether und Ethanol sowie Acetonitril für die HPLC wurden von Merck (Deutschland) bezogen.

Die 4%ige Collodiumlösung DAC 1986 wurde von Caesar & Lorenz GmbH (Deutschland) gekauft.

Die humane Colonicarcinomzelllinie Caco-2 wurde von der Deutschen Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen Braunschweig (Deutschland) geliefert. Die Zellkulturmedien und -zusätze (siehe Methoden) wurden von Life Technologies, Inc. (Deutschland) gekauft. Die isolierten Meerschweinchen-Dünndärme (Charles-River-Meerschweinchen) wurden vom Julius-Bernstein-Institut für Physiologie, Universität Halle-Wittenberg zur Verfügung gestellt.

2.2 Methoden

2.2.1 Experimentelle Methoden

In der Arzneimittelforschung haben in den letzten Jahrzehnten die *in vitro*-Transportuntersuchungen große Bedeutung erlangt, da das Verständnis der Transportmechanismen hilft, den Arzneimitteleinsatz zu optimieren und damit die Arzneimittelsicherheit zu erhöhen. Diese Bestrebungen haben eine Vielfalt von unterschiedlichen Modellsystemen hervorgebracht [Übersichten über Methoden, Möglichkeiten und Mechanismen bei 76; 116; 119].

Um Probleme wie die aufwendige Präparation oder die *in vitro*-Lebensfähigkeit bei Modellsystemen mit intestinalem Gewebe (z.B. *everted sacs*, intestinale Ringe oder isolierte Zellen) zu umgehen, wurde nach Alternativen gesucht. Die Kultivierung von reifen Epithelzellen war auf Grund der Differenzierung wenig erfolgreich [65]. In der Zwischenzeit weitverbreitet ist die Verwendung der humanen Colocarzinomzelllinie Caco-2 als intestinales Modell für Aufnahme- und Transportuntersuchungen.

2.2.1.1 Experimente mit der humanen Colocarzinomzelllinie Caco-2

Die humane Colocarzinomzelllinie Caco-2 wurde aus einem primären Adenocolocarzinom kultiviert, das 1974 einem 72-jährigen Patienten entfernt wurde [48, 70]. Diese ursprünglichen Colonozyten entwickeln sich in der Kultur aus undifferenzierten Zellen (mit relativ wenig charakteristischen Proteinen) über ein Zwischenstadium (mit charakteristischem Proteinmuster von Colonozyten und Enterozyten) zu polarisierten, säulenförmigen Enterozyten. Etwa 3 Tage nach Konfluenz bilden sich die Colonozyten-Proteine zurück und die Konzentration der Enterozyten-Proteine nimmt weiter zu [40]. Die ausdifferenzierten Caco-2-Zellen weisen gut entwickelte Microvilli und eine polarisierte Verteilung der Zellmembran-Enzyme auf [130]. Die Caco-2-Zellen wachsen adhärent auf Plastikuntergrund und bilden sogenannte Dome aus, ein Zeichen für normal transportierendes Epithel [65]. Weiterhin wurde gezeigt, daß Caco-2-Zellen auch auf Polycarbonatmembranen eine in Zellmorphologie und Polarität dem intestinalen Epithel entsprechende Zellmonoschicht formen. Diese Zellschicht ist für Transportuntersuchungen einsetzbar [63]. Sie enthält im Intestinum physiologisch vorkommende Transportsysteme [65], wie z.B. den H⁺/Peptid-Symporter PEPT1 [13]. Beim Vergleich von Caco-2-Zellen aus unterschiedlichen Passagen (Passagenummern um Nr. 40 verglichen mit Passagenummern um Nr. 110) wurde festgestellt, daß Zellen mit höherer Passagenummer eine größere Proliferationsrate, einen größeren transepithelialen elektrischen Widerstand, inter- und intrazelluläre Lumina aufweisen und zur Bildung von zum Teil multiplen Zellschichten neigen. Diese morphologischen und physiologischen Unterschiede haben aber keinen Einfluß auf die Permeationsrate von dem parazellulären Diffusionsmarker D-Mannitol, von dem transzellulären Diffusionsmarker Hydrocortison und von dem carrier-vermittelten transzellulären Transportmarker Glycylsarkosin [93].

Die Caco-2-Zelllinie wurde innerhalb der vorliegenden Arbeit sowohl zu Aufnahme- als auch zu Transportuntersuchungen eingesetzt.

Deutschland) wurde der Zeitpunkt bestimmt, bei dem die Zellen beginnen, sich voneinander und vom Untergrund zu lösen (nach etwa 3-4 min). Nachdem die Trypsinlösung entfernt wurde, wurden die Zellen durch Klopfen von der Flaschenwand gelöst und in 10 ml frischem Medium suspendiert. Die Caco-2-Zellen wurden dann im Verhältnis 1:6 weiter kultiviert oder in die entsprechenden Versuchsgefäße ausgesät, nachdem die benötigte Zellzahl eingestellt wurde. Dazu wurden die Zelldichte in einer Zählkammer unter dem Mikroskop bestimmt und entsprechend weiterverdünnt.

Zusammensetzung der Versuchspuffer

Der Versuchspuffer pH =6,0 (**VP 1**) war zusammengesetzt aus (in mM) 25 MES/ Tris, 140 NaCl, 5,4 KCl, 1,8 CaCl₂, 0,8 MgSO₄ und 5 Glucose.

Der Versuchspuffer pH= 7,5 (**VP 2**) war zusammengesetzt aus (in mM) 25 HEPES/ Tris, 140 NaCl, 5,4 KCl, 1,8 CaCl₂, 0,8 MgSO₄ und 5 Glucose.

Bestimmung der Aufnahme von [¹⁴C]Gly-Sar in die Caco-2-Zellen (siehe Abb. 6)

Vorbereitung: Für die Aufnahmebestimmungen von [¹⁴C]Gly-Sar in die Caco-2-Zellen wurden 750000 Zellen/ 2 ml Medium in 35 mm-Petrischälchen (Falcon[®], Becton Dickinson, Großbritannien) gesät. Am Tag nach der Aussaat waren die Zellen konfluent. Das Medium wurde an diesem Tag, dann zweitäglich und am Tag vor dem Versuch gewechselt. Am 5.-7. Tag nach der Aussaat wurden die Aufnahmemessungen durchgeführt. Die Versuchslösung bestand dazu aus **VP 1** mit 10 µM [¹⁴C]Gly-Sar und:

- steigende Konzentrationen von Glycylsarkosin (0-31,6 mM) (**VL 1**)
- steigende Konzentrationen von Glycin (0-31,6 mM) bzw. Mannitol (0-100 mM) (**VL 2**)
- steigende Konzentrationen der β-Lactamantibiotika (0-31,6 mM bzw. maximale Löslichkeitskonzentration) (**VL 3**)
- steigende Konzentrationen von Zinksulfat oder -chlorid (0-31,6 mM) (**VL 4**)
- Schwermetallsulfate (0 mM; 150 µM, 1 mM) (**VL 5**)
- 150 µM Zinksulfat und steigende Konzentrationen von Glycylsarkosin (0-31,6 mM) (**VL 6**).

Versuchsablauf: Bei Raumtemperatur wurde aus den Petrischälchen das Medium entfernt, für 1 min 1 ml **VP 1** zugegeben und diesen dann durch 1ml der jeweiligen Versuchslösung (**VL 1-6**) ersetzt (10 min Einwirkzeit). Danach wurde viermal mit eiskaltem **VP 1** gespült. Anschließend wurden die Zellen durch 1 ml einer 0,2M NaOH-Lösung mit 1% Natriumdodecylsulfat (SDS) lysiert und für die Analytik vorbereitet.

Bestimmung des transepithelialen Fluxes durch die Caco-2-Zellschicht (siehe Abb. 6)

Vorbereitung: Für die Messung des transepithelialen Fluxes kamen 24 mm-Transwells[®] (Costar, Deutschland) mit Porendurchmessern von 3 µm in der Polycarbonatmembran zur Anwendung. Das Gehäuse enthält 6 Vertiefungen für die Akzeptoren, in die Filtereinsätze eingehängt werden, so daß Donator und Akzeptor durch eine Polycarbonatmembran getrennt werden, auf der der dichte Zellrasen wächst. Für die Aussaat mußten die Transwells[®] mit Medium vorinkubiert werden (jeweils 20 min mit 2,6 ml unter der Membran und dann auch mit 1,5 ml auf der Membran), damit die Luft aus der Membran entweichen konnte. In der Zwischenzeit konnten Zellen aus den Kulturflaschen suspendiert und auf eine Konzentration von 200000 Zellen/ 1,5 ml Medium eingestellt werden. In die Akzeptorkompartimente wurden 2,6 ml Medium gegeben und in die Donatorkompartimente 1,5 ml der Zellsuspension. Der Mediumwechsel fand zweitäglich mit

den angegebenen Volumina statt, am Tag vor dem Versuch wurde Medium ohne Penicillin/Streptomycin verwendet. Die Versuche fanden am 17.-23. Tag nach der Aussaat statt. Die Versuchslösungen im Donator setzten sich wie folgt zusammen:

- **VP 1** mit 30 μM [^{14}C]Gly-Sar (**VL 7**)
- **VP 1** mit 1 mM β -Lactamantibiotikum (bei einigen Versuchen zusätzlich Zinksulfat 150 μM) (**VL 8**)
- **VP 1** mit 5 μM [^{14}C]Mannitol (**VL 9**)
- **VP 2** mit 1 mM β -Lactamantibiotikum und 250 μM eines der Tenside Cetyltrimethylammoniumbromid, Desoxycholat-Na und N-Cetylpyridiniumbromid (**VL 10**)
- **VP 2** mit 5 μM [^{14}C]Mannitol und 250/500 μM eines der Tenside Benzyldimethylcetylammoniumchlorid, Cetyltrimethylammoniumbromid, N-Cetylpyridiniumbromid und Desoxycholat-Na (**VL 11**)

Versuchsablauf: Nach Entfernung des Mediums wurden die Kompartimente mit 1,5/2,6 ml 37°C warmem **VP 2** 1 min gespült. Danach wurden in die Akzeptoren 2,6 ml vortemperierter **VP 2** und in die Donatoren 1,5 ml der entsprechenden vortemperierten Versuchslösungen (**VL 7-11**) eingefüllt. Während der gesamten Versuchszeit wurden die Transwells[®] in einem auf 37°C temperierten Schüttelwasserbad (Gesellschaft für Labortechnik, Deutschland) mit einer Geschwindigkeit von 55 min^{-1} bewegt. Da die Akzeptoren direkt unter den Membranen nur eine Höhe von etwa 1 mm haben, wurden die Membraneinsätze aller 10min, direkt vor und nach der Probenentnahme zur guten Durchmischung angehoben. Um eine mögliche Verdünnung, hervorgerufen durch unvollständige Entfernung des Spülpuffers, zu überprüfen, wurde den Donatoren direkt nach Versuchsstart jeweils 100 μl zur Analytik entnommen und durch 100 μl frische vortemporierte Versuchslösung ersetzt. Zur Gehaltsbestimmung in den Akzeptoren wurden nach 10, 30, 60 und 120 min jeweils 200 μl entnommen und durch frischen vortemperierten **VP 2** ersetzt. Deshalb ist eine Korrekturrechnung erforderlich (siehe Kapitel 2.2.2.3). Aus den Donatoren wurden nach Versuchsende nochmals Proben zu Analytik entnommen. Die Membranen wurden nach 120 min viermal mit eiskaltem **VP 2** gespült, aus den Einsätzen ausgeschnitten und mit 0,5 ml destilliertem Wasser bei -21°C eingefroren, damit die Zellen zur Vorbereitung auf die HPLC-Analytik zerstört wurden.

2.2.1.2 Bestimmung von Verteilungskoeffizienten im n-Octanol-Puffer (pH=7,5)-System

Als Maß für die Lipophilie von Cephalosporinen bzw. deren Gemische mit anionen- und kationenaktiven Tensiden wurden die Verteilungskoeffizienten im n-Octanol-Puffer (pH=7,5)-System herangezogen.

Versuchsvorbereitung: Es wurde der Sörensen-Phosphatpuffer pH=7,5 (**VP 3**) verwendet, der sich aus 84,98 ml Lösung A und 15,02 ml Lösung B zusammensetzte, oder Sörensen-Phosphatpuffer pH=6,0 (**VP 4**) bestehend aus 12,1 ml Lösung A und 87,9 ml Lösung B. Lösung A bestand dabei aus 11,876 g Na_2HPO_4 und Lösung B aus 9,078 g KH_2PO_4 jeweils in 1 l destilliertem Wasser. Gleiche Volumina von **VP 3 bzw. 4** und n-Octanol wurden 1 h lang bei Raumtemperatur geschüttelt, um sich gegenseitig zu sättigen. Die Versuchslösungen enthielten:

* mit n-Octanol gesättigten **VP 3** mit:

- 200 $\mu\text{g/ml}$ Cefodizim allein oder kombiniert mit einem der Tenside Cetyltrimethylammoniumbromid, N-Cetylpyridiniumbromid, Benzyldimethylcetylammouimchlorid, Taurodesoxycholat-Na oder Desoxycholat-Na im molaren Verhältnis 1:2, 1:10, 1:20,

oder mit Lauryltrimethylammoniumbromid im molaren Verhältnis 1:2, 1:10, 1:20 und 1:50 (**VL 12**)

- 200 µg/ml Cefuroxim allein oder kombiniert mit einem der Tenside Cetyltrimethylammoniumbromid, N-Cetylpyridiniumbromid, Benzyldimethylcetylammouimchlorid, Taurodesoxycholat-Na oder Desoxycholat-Na im molaren Verhältnis 1:1, 1:5, 1:10 oder mit Lauryltrimethylammoniumbromid im molaren Verhältnis 1:2, 1:5, 1:10, 1:20, 1:40 und 1:50 (**VL 13**)
- 200 µg/ml Cefpirom allein oder kombiniert mit einem der Tenside Benzyldimethylcetylammouimchlorid, Benzyltriethylammoniumchlorid, N-Cetylpyridiniumbromid, Desoxycholat-Na oder Taurodesoxycholat-Na im molaren Verhältnis 1:1, 1:5 und 1:10 (**VL 14**)

* mit n-Octanol gesättigten **VP 4** mit:

- 200 µg/ml Cefodizim kombiniert mit Lauryltrimethylammoniumbromid im molaren Verhältnis 1:2, 1:5, 1:10, 1:20, 1:40 und 1:50 (**VL 15**)

Bei den größten molaren Verhältnissen lagen die Konzentrationen der Tenside jeweils oberhalb deren kritischen Micellbildungskonzentrationen (CMC).

Versuchsablauf: Zur Ermittlung der Verteilungskoeffizienten wurden zweimal drei Parallelbestimmungen durchgeführt. Dazu wurden jeweils 2ml puffergesättigtes (**VP 3 bzw. 4**) n-Octanol mit 2 ml der entsprechenden Versuchslösung (**VL 12-15**) in Glasampullen eingeschmolzen. Diese wurden horizontal in einem Schüttelwasserbad (Gesellschaft für Labortechnik, Deutschland), das auf 37°C temperiert war und sich mit einer Geschwindigkeit von etwa 55 min⁻¹ bewegte, 12 h lang geschüttelt. Nachdem sich die Phasen wieder getrennt hatten (durch den Zusatz von Tensiden entstanden zum Teil Emulsionen), wurde die wäßrige Phase zur Analytik entnommen.

2.2.1.3 Bestimmung der Permeationskoeffizienten an einem Permeationsmodell mit künstlichen Lipidmembranen und an einem mit biologischen Membranen

Permeationsmodell mit Dodecanol-Collodium-Membran

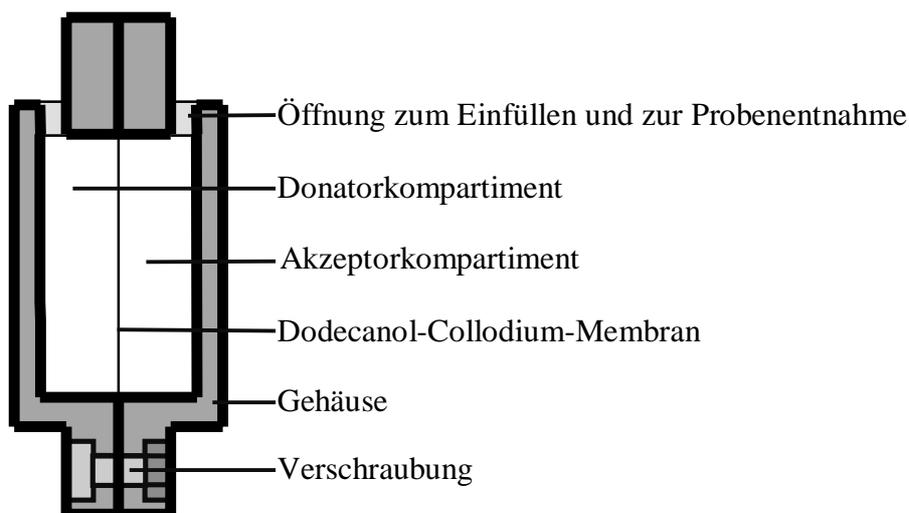


Abb. 7: Schematische Darstellung einer Einzelzelle des Permeationsmodells mit Dodecanol-Collodium-Membran

Zur Bestimmung der Permeationskoeffizienten durch künstliche Membranen kam das Permeationsmodell von Fürst und Neubert [118] zur Anwendung. Eine Einzelzelle dieses Modells (siehe **Abb. 7**) besteht aus zwei Kompartimenten, die durch eine Dodecanol-Collodium-Membran voneinander getrennt sind.

Versuchsvorbereitung: Für die Herstellung der Dodecanol-Collodium-Membranen wurde eine Lösung aus:

- 4 g Dodecanol ergänzt auf 100 g mit einer Mischung aus 8,5 Volumenteilen Ether und 1,5 Volumeneinheiten unvergälltem Ethanol
- vermischt mit 100 g 4%-iger Collodiumlösung

vorbereitet, von der jeweils 2 ml in mit Ramsayfett auf einer Glasplatte abgedichtete Glasringe ($\varnothing=6$ cm) gegossen wurden. Die Lösungsmittel dampften unter dem Abzug etwa 24 h lang ab. Die fertigen trocken von der Glasplatte entfernten Membranen wurden in einem Durchmesser von 4 cm ausgeschnitten und in einem Exsikkator über Silikagel aufbewahrt.

Die Versuchslösungen im Donator setzten sich wie folgt zusammen:

* **VP 3** mit:

- 200 $\mu\text{g/ml}$ Cefodizim allein oder kombiniert mit einem der Tenside Cetyltrimethylammoniumbromid, N-Cetylpyridiniumbromid, Benzyldimethylcetylammoniumchlorid, Taurodesoxycholat-Na oder Desoxycholat-Na im molaren Verhältnis 1:2 oder 1:20, oder mit Lauryltrimethylammoniumbromid im molaren Verhältnis 1:2, 1:10, 1:20, 1:40 oder 1:50 (**VL 16**)
- 200 $\mu\text{g/ml}$ Cefuroxim allein oder kombiniert mit einem der Tenside Cetyltrimethylammoniumbromid, N-Cetylpyridiniumbromid, Benzyldimethylcetylammoniumchlorid, Taurodesoxycholat-Na oder Desoxycholat-Na im molaren Verhältnis 1:1 oder 1:10 oder mit Lauryltrimethylammoniumbromid im molaren Verhältnis 1:1, 1:10 oder 1:40 (**VL 17**)
- 200 $\mu\text{g/ml}$ Cefpirom allein oder kombiniert mit einem der Tenside Benzyldimethylcetylammoniumchlorid, Benzyltriethylammoniumchlorid, N-Cetylpyridiniumbromid, Desoxycholat-Na oder Taurodesoxycholat-Na im molaren Verhältnis 1:1 oder 1:10 (**VL 18**)

* **VP 4** mit:

- 200 $\mu\text{g/ml}$ Cefodizim mit Lauryltrimethylammoniumbromid im molaren Verhältnis 1:2 und 1:20 (**VL 19**)

Versuchsablauf: Vier der oben beschriebenen Einzelzellen wurden in einer Halterung befestigt, die es ermöglichte, die Einzelzellen in einem Wasserbad (Prüfgerätewerk Medingen, Deutschland) auf 37°C zu temperieren und mit Hilfe eines Vibrators (Labortechnik Ilmenau, Deutschland), der auf Stufe 5 eingestellt war, die Lösungen in den Kompartimenten gleichmäßig zu durchmischen.

In die Akzeptoren wurden jeweils 20ml vortemperierter **VP 3** und in die Donatoren 20 ml der entsprechenden vortemperierten Versuchslösungen (**VL 16-19**) eingefüllt. Nach 30, 60, 90, 120, 180 und 240 min wurden aus den Akzeptoren jeweils 2 ml Proben entnommen und sofort durch frischen vortemperierten **VP 3** ersetzt. Deshalb mußten die gemessenen Gehalte korrigiert werden (siehe Kapitel 2.2.3). Nach 240 min wurden auch den Donatoren Proben zur Analytik entnommen. Die Membranen wurden nach Versuchsende vorsichtig aus den Modellen entfernt und in 20 ml bidestilliertem Wasser 30 min lang ausgeschüttelt, um den Gehalt an zu untersuchender Substanz in und an den Membranen nachzuweisen.

Die Versuche wurden zweimal mit je 4 Parallelbestimmungen durchgeführt

Permeationsmodell mit isoliertem Meerschweinchen-Dünndarm

Zur Bestimmung der Permeationskoeffizienten durch biologische Membranen kam ein innerhalb der Arbeitsgruppe Neubert des Instituts für Pharmazeutische Technologie und Biopharmazie in Halle [195] entwickeltes Modell (siehe **Abb. 8**) zur Anwendung.

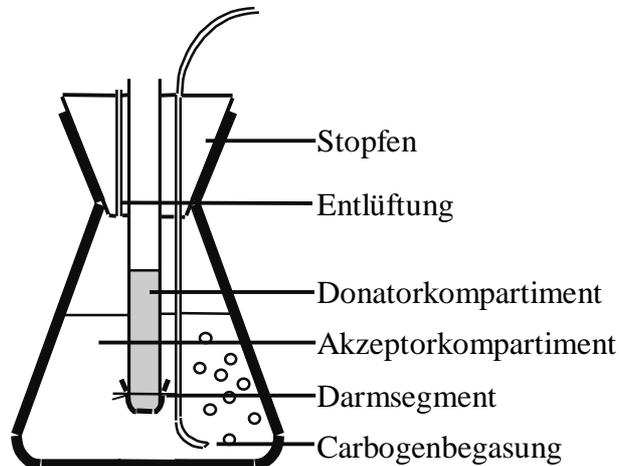


Abb. 8: Schematische Darstellung einer Einzelzelle des Permeationsmodells mit isoliertem Meerschweinchen-Dünndarm

Hierbei wird das Akzeptorkompartiment von einem 25 ml-Iodzahlkolben umschlossen. Die untere Öffnung eines Plastikhohlzylinders wird mit einem Darmsegment verschlossen und bildet so das Donatorkompartiment. Ein Gummistopfen fixiert das Donatorkompartiment im Iodzahlkolben.

Versuchsvorbereitung: Möglichst nüchterne Charles-River-Meerschweinchen mit einem Gewicht von 300-400 g wurden durch cerebrale Dislokation getötet. Der Bauchraum wurde median eröffnet, und unter Auslassung der ersten 5 cm beginnend am Magenausgang wurden etwa 30 cm Dünndarm entnommen. Das Mesenterium wurde abgestreift. Etwa 1 cm lange, homogen erscheinende Darmstücke wurden ausgewählt, vorsichtig aufgeschnitten und auf einem Objektträger ausgebreitet. Die Mucosa durfte dabei nicht beschädigt werden. In Einzelfällen mußten noch anhaftende Nahrungsreste mit Versuchspuffer (siehe unten) abgespült werden. Die untere Öffnung eines Donatorzylinders wurde zentral auf ein Darmsegment gesetzt, die überstehenden Gewebeteile nach oben geklappt und mit Catgut-Faden festgebunden.

Als Versuchspuffer pH=7,5 (**VP 5**) wurde modifizierter Krebs-Bicarbonat-Puffer mit der Zusammensetzung (in mM) 5 KCl, 1 KH₂PO₄, 26 NaHCO₃ und 122 NaCl eingesetzt. Die Versuchslösungen in den Donatoren setzten sich wie folgt zusammen:

* **VP 5** mit

- 200 µg/ml Cefodizim allein oder kombiniert mit einem der Tenside Cetyltrimethylammoniumbromid, N-Cetylpyridiniumbromid oder Benzyltrimethylammoniumchlorid im molaren Verhältnis 1:2 oder 1:20 und Lauryltrimethylammoniumbromid im molaren Verhältnis 1:2, 1:20 oder 1:50 (**VL 20**)
- 200 µg/ml Cefuroxim allein oder kombiniert mit einem der Tenside Cetyltrimethylammoniumbromid, N-Cetylpyridiniumbromid oder Benzyltrimethylammoniumchlorid

im molaren Verhältnis 1:1 oder 1:10 und Lauryltrimethylammoniumbromid im molaren Verhältnis 1:1, 1:10 oder 1:40 (**VL 21**)

- 200 µg/ml Cefpirom allein oder kombiniert mit einem der Tenside Benzyltrimethylammoniumchlorid, Benzyltriethylammoniumchlorid, N-Cetylpyridiniumbromid, Desoxycholat-Na oder Taurodesoxycholat-Na im molaren Verhältnis 1:1 oder 1:10 (**VL 22**)

* **VP 1** mit:

- 200 µg/ml Cefodizim mit Cetyltrimethylammoniumbromid im molaren Verhältnis 1:2 (**VL 23**)

Um die Beeinflussung der Integrität der Darmschleimhaut durch Tensidzusatz zu messen, setzen sich die Versuchslösungen wie folgt zusammen:

- Versuch mit D-[³H]Glucose:

Im Akzeptor: **VP 5** mit 40 mM D-Glucose (**VP 6**)

Im Donator: **VP 5** mit 10 mM D-Glucose und 30 mM Mannitol markiert mit 100 µl der D-[³H]Glucose-Stammlösung (0,023 µmol/ml) auf 10 ml „kalte“ Lösung (**VL 24**)

- Versuche mit Tensidzusatz:

Im Akzeptor: **VP 5** mit 10 mM Mannitol (**VP 7**)

Im Donator: **VP 5** mit 10 mM D-Glucose allein oder kombiniert mit einem der Tenside Benzyltrimethylammoniumchlorid (5 mM), Benzyltriethylammoniumchlorid (5 mM), Cetyltrimethylammoniumbromid (5 mM), Lauryltrimethylammoniumbromid (5/ 20 mM), N-Cetylpyridiniumbromid (5 mM), Desoxycholat-Na (5/ 15 mM) oder Taurodesoxycholat-Na (5/ 15 mM) (**VL 26**)

In die Akzeptorkompartimente wurden 5 ml der entsprechenden vortemperierten Versuchspuffer (**VP 5-7**) eingefüllt, die Donatoren eingehängt und mit 0,5 ml der entsprechenden vortemperierten Versuchslösungen (**VL 20-26**) gefüllt. Zur Verlängerung der Lebensfähigkeit der Darmsegmente und zur gleichmäßigen Durchmischung der Lösungen wurden die Akzeptoren über ein Schlauchsystem mit Carbogen (95% O₂ und 5% CO₂) begast (siehe **Abb. 8**). Wegen des Tensidzusatzes in der Donatorlösung wurden die Donatoren nur alle 10 min kurzzeitig begast. Die Versuchskolben wurden in einem auf 37°C temperierten Wasserbad befestigt. Nach 30, 60, 120 und 180 min wurden aus den Akzeptoren jeweils 200 µl Proben zur Gehaltsbestimmung (bei der D-Glucosebestimmung mittels Enzymtest waren es jeweils 1 ml) entnommen und durch frische vortempertierte Versuchslösung ersetzt. Deshalb mußten die gemessenen Konzentrationen korrigiert werden (siehe Kapitel 2.2.3). Nach 180 min wurden den Donatoren ebenfalls Proben entnommen. Die Darmsegmente wurden nach Versuchsende vorsichtig aus dem Modell entfernt, und auf feuchten Zellstoff gelegt, um noch anhaftende Versuchslösung zu entfernen. Danach wurde mit einem Skalpell die Mucosa vom Binde- und Muskelgewebe getrennt. Die so erhaltenen Gewebestücke wurden in jeweils 1 ml Methanol 30 min ausgeschüttelt und zur Analytik vorbereitet. Bei den D-Glucose-Permeationsuntersuchungen fand keine Gewebeanalytik statt. Auf diese Weise wurden jeweils zweimal 3 Parallelbestimmungen durchgeführt.

2.2.2 Analytische Methoden

Proteingehaltsbestimmung nach Lowry [92]

Die Aufnahme von [¹⁴C]Gly-Sar in die Caco-2-Zellen wurde entweder in Prozent angegeben oder auf den Gesamtproteingehalt der Zellen bezogen. Um diesen zu bestimmen, wurde pro Versuch eine Petrischale aus dem gleichen Zellansatz mit 1 ml destilliertem Wasser bei -21°C

eingefroren. Nach dem Auftauen wurden die Zellen von dem Untergrund abgeschabt, und durch mehrmaliges Aufziehen in eine 1 ml Spritze mit einer 150 µm-Kanüle wurde die Suspension aus Zellbestandteilen und destilliertem Wasser homogenisiert. Zur Proteinbestimmung mußte das Lowry-Reagenz (bestehend aus 3 Lösungen) hergestellt werden. Lösung A ist eine 2%-ige Na₂CO₃-Lösung in 0,1N NaOH, Lösung B eine 0,2%-ige K⁺-Na⁺-Tartrat-Lösung und Lösung C eine 1%-ige CuSO₄*5H₂O-Lösung, die im Verhältnis A:B:C=100:1:1 gemischt werden. 100 µl Zellsuspension werden mit 900 µl destilliertem Wasser und 5 ml des Lowry-Reagenz versetzt (je zweimal als Doppelbestimmung). Als Blindwert werden 1 ml destilliertes Wasser ebenfalls mit 5 ml Lowry-Reagenz gemischt. Diese Gemische werden 10min stehen gelassen, bevor 0,5 ml des 1N Folin-Ciocalteu's Phenol-Reagenz zugesetzt und sofort damit durchgemischt werden. Nach weiteren 30 min wird die Absorption bei 725 nm bezogen auf den gleichbehandelten Blindwert gemessen (Spectronic 601, Milton Roy Company, USA). Zur Berechnung des Proteingehaltes diente die innerhalb der Arbeitsgruppe Neubert des Instituts für Pharmazeutische Technologie und Biopharmazie in Halle erstellte Bezugskurve mit folgender Formel:

$$\text{Proteingehalt } [\mu\text{g/ml}] = \frac{3,167 \cdot \text{Absorption}}{2,57 - \text{Absorption}} \cdot 2 \quad (1)$$

Die beiden Parallelbestimmungen wurden gemittelt.

Gehaltsbestimmungen mittels Hochdruckflüssigchromatographie

Bei der Hochdruckflüssigchromatographie (HPLC) wird die Probenauftrennung durch unterschiedliche Verteilung zwischen mobiler und stationärer Phase mit anschließender Detektion (z.B. mittels Dioden-Array-Detektor) kombiniert. Da die zu untersuchenden β-Lactamantibiotika sehr hydrophil sind, kam die Methode der Umkehrphasenchromatographie zur Anwendung, das heißt, die Oberfläche des Kieselgels in der Säule (Nucleosil 100 RP-18, Ø_{innen}=4 mm, l=12,5 cm, Packmaterial Ø=5 µm, Säulentechnik Knauer, Deutschland) ist mit C₁₈-Kohlenwasserstoffketten modifiziert, die Laufmittel sind sehr hydrophil.

Probenvorbereitung: Aus den eingesetzten Versuchslösungen wurden 3 Verdünnungen hergestellt, die dann als Standard verwendet wurden. Die Proben aus den Akzeptoren der Permeationsmodelle konnten direkt vermessen werden, die Proben aus den Donatoren mußten zum Teil verdünnt werden (bis 1:8) ebenso die Proben von der Verteilungskoeffizientenbestimmung. Die tiefgefrorenen Polycarbonatmembranen mit dem Caco-2-Zellrasen wurden wieder aufgetaut und bei 12000 min⁻¹ 10 min zentrifugiert (Megafuge 1.0 R, Heraeus Instruments, Deutschland). Aus dem Überstand konnte je eine Probe entnommen werden, die direkt analysierbar war. Ebenso wurden die Überstände der in Wasser ausgeschüttelten Dodecanol-Collodium-Membranen und der Dünndarmstücke in Methanol behandelt.

Zum Teil wurde nicht sofort im Anschluß an die Versuche gemessen. Die Proben wurden in diesen Fällen bei -21°C eingefroren und erst kurz vor der Analyse wieder aufgetaut, um Meßfehler durch Zerfall der zu bestimmenden Substanzen zu umgehen.

Messung: Zur Analytik wurde ein HPLC-System (Kontron, Deutschland) bestehend aus Autosampler, Hochdruckpumpe, Dioden-Array-Detektor und Rechner mit Software verwendet. Die Laufmittelzusammensetzungen und die eingestellten Detektionswellenlängen sind der **Tab. 1** zu entnehmen.

Tab. 1: Laufmittelzusammensetzung für die HPLC- Analytik.

x ml Acetonitril + (100-x) ml Wasser + 0,5 ml konzentrierte Phosphorsäure, in Klammern die verwendete Detektionswellenlänge

x= 15 ml	x= 17 ml	x= 20 ml	x= 22 ml	x= 25 ml	x= 30 ml	x= 40 ml
Cefepim (260 nm)	Ceftazidim (260 nm)	Cefaclor (260 nm)	Ampicillin (210 nm)	Cefodizim (265 nm)	Cefamandol (260 nm)	Cefuroxim- axetil (260 nm)
CEFPIROM (270NM)	Cefsulodin (260nm)	Cephradin (260nm)			Cefmetazol (260nm)	
Cephalexin (260 nm)		Cephaloridin (260 nm)			Cefuroxim (260 nm)	
Cefadroxil (260 nm)		Ceftriaxon (260 nm)			Benzylpeni- cillin (210 nm)*	
Cefixim (260 nm)		Cephapirin (260 nm)			Cephalotin (260 nm)	
Cyclacillin (210 nm)		Cefotaxim (260 nm)				
Ceftibuten (210 nm)						

* Laufmittel ohne Phosphorsäure

20 µl Probe wurden jeweils in das System injiziert. Bei einem Flow von 1 ml/min lagen die Retentionszeiten zwischen 2 und 5 min. Die den gleichen Versuchsbedingungen ausgesetzten Versuchslösungen dienten zur Erstellung der Bezugskurven.

Gehaltsbestimmungen mittels Flüssigszintillationsmessung

Die bei den Versuchen eingesetzten radioaktiven Verbindungen waren mit Kohlenstoff-14 oder mit Tritium markiert. Beide Isotope sind β-Strahler, das heißt, bei deren Zerfall entstehen Elektronen. Diese Energie erzeugt im Flüssigszintillator Lichtblitze (Lumineszenzen), die in einem Photovervielfacher in Spannungsimpulse umgewandelt werden [35]. Diese Spannungsimpulse werden registriert als CPM (counts per minute) oder nach Quench-Korrektur als DPM (decays per minute) [135].

Probenvorbereitung: Bei den Versuchen zur Bestimmung der [¹⁴C]Gly-Sar-Aufnahme wurden die in 1 ml 0,2M NaOH/ 1%SDS lysierten Zellen mit Hilfe einer 1 ml-Eppendorfpipette in 5 ml-Szintillationsgefäße (Packard, USA) überführt und mit 3 ml Flüssigszintillator (Ultima GoldTM XR[®]) versetzt. Bei den Versuchen zur Bestimmung der Permeation von [³H]Glucose durch die Dünndarmschichten oder von [¹⁴C]Mannitol bzw. [¹⁴C]Gly-Sar durch die Caco-2-Zellschicht wurden die entnommenen Proben direkt in Szintillationsgefäße gefüllt und mit 3 ml Flüssigszintillator versetzt.

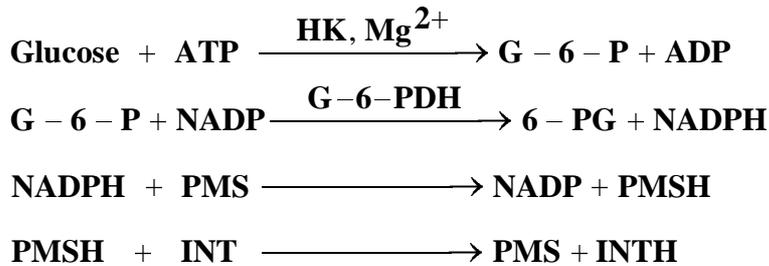
Messung: Nachdem die fertigen Proben etwa ½ h gestanden hatten, wurden sie jeweils 1 min in einem Flüssigszintillationsspektrometer (Tri-Carb-2100 TR, Packard, USA) vermessen. Zusammen mit den Proben wurde jeweils ein Standard vermessen, der 250 pmol [¹⁴C]Gly-Sar, 125 pmol [¹⁴C]Mannitol enthielt. Die Gehalte wurden aus dem Verhältnis $DPM_{Standard}/Gehalt_{Standard}$ berechnet. Bei dem Versuch mit [³H] wurde aus der Versuchslösung

eine Verdünnungsreihe im Bereich von 1:50 bis 1:2000 hergestellt, um aus den gemessenen DPM auf die Konzentration an unmarkierter D-Glucose schließen zu können. Es ergab sich eine Bezugskurve mit folgender Gleichung:

$$C [\text{nmol / ml}] = \frac{\text{DPM} - 917,1}{1274} \quad (2)$$

D-Glucosegehaltsbestimmung mittels enzymatischer Methode

Zum Nachweis der in den Akzeptor gelangten Menge an D-Glucose wurde ein enzymatischer Glucose-Test verwendet. Das Prinzip des Nachweises beruht auf folgenden Reaktionen [19]:



Glucose wird als erstes von Adenosintriphosphat (ATP) phosphoryliert. Diese Reaktion wird durch Hexokinase (HK) katalysiert. Glucose-6-Phosphat (G-6-P) wird zu 6-Phosphogluconat (6-PG) oxidiert, indem Nicotinamidadenindinucleotidphosphat (NADP) zu NADPH reduziert wird. Glucose-6-Phosphatdehydrogenase katalysiert diese Reaktion. NADPH reduziert Phenazinmethosulfat (PMS) und PMSH reduziert Iodonitrotetrazolchlorid (INT). Das entstehende INTH ist colorimetrisch meßbar bei einer Wellenlänge von $\lambda=520$ nm (Spectronic 601, Milton Roy Company, USA). Die Absorption ist proportional zur Glucosekonzentration.

Probenvorbereitung: Zur Herstellung des Reaktionsgemisches wurden 1 Flasche Glucose-Enzymreagenz mit 17 ml destilliertem Wasser aufgelöst, 4 ml Glucose-Farbreagenz zugefügt und durch Umschwenken gemischt. Die Zusammensetzung und Behandlung der zu messenden Lösungen ist **Tab. 2** zu entnehmen:

Tab. 2: Zusammensetzung und Behandlung der zu vermessenden Lösungen

	Reagenzienleerwert	Standard	Probe
Reaktionsgemisch	1 ml	1 ml	1 ml
Destilliertes Wasser	1 ml	0,98 ml	-
Standard	-	0,02 ml	-
Probe	-	-	1 ml
Mischen. 5-10 min bei Raumtemperatur (18-26°C) stehenlassen.			
Salzsäurelösung (0,1N)	10 ml	10 ml	10 ml
Mischen. Extinktion von Standard und Probe bei 520 nm gegen Reagenzienleerwert messen			

Der Glucosegehalt der Proben wurde mit der folgenden Gleichung berechnet:

$$\text{Glucosestoffmenge} [\text{nmol}] = \frac{\text{Absorption}_{\text{Probe}}}{\text{Absorption}_{\text{Standard}}} \cdot 111,2 \text{ nmol} \quad (3)$$

111,2 nmol verkörpern dabei die Stoffmenge an Glucose in 20 µl Standard, der errechnete Wert ergibt die Probenkonzentration [nmol/ml] und muß entsprechend Kapitel 2.2.3 korrigiert werden.

2.2.3 Mathematische Methoden

Die mathematische Auswertung der Versuchsergebnisse erfolgte unter Verwendung der Computerprogramme GraphPad Prism, Version 2.00 von GraphPad Software (USA) und Microsoft® Excel 97, Microsoft Corporation (USA). Folgende Parameter wurden ermittelt:

Ermittlung der Halbhemmkonzentrationen IC₅₀ durch nichtlineare Regression

Zur Auswertung der Versuche zur [¹⁴C]Gly-Sar-Aufnahme-Beeinflussung durch Zusatz potentieller Hemmstoffe wurden die gemessene [¹⁴C]Gly-Sar-Menge gegen die Hemmstoffkonzentration aufgetragen (halblogarithmisch zur besseren Anschaulichkeit). Den Meßpunkten wurde die Hemmkurve jeweils bestmöglich durch nichtlineare Regression angepaßt. Dazu wurde die Gleichung der allosterischen Hill-Kinetik in der folgenden Form verwendet:

$$Y = \frac{\text{Min} + (\text{Max} - \text{Min})}{1 + \left(\frac{S}{\text{IC}_{50}}\right)^{-h}} \quad (4)$$

Dabei bedeuten: Max.....maximal in die Zellen aufgenommene [¹⁴C]Gly-Sar-Menge
 Min.....minimal in die Zellen aufgenommene [¹⁴C]Gly-Sar-Menge
 S.....Substratkonzentration
 IC₅₀.....Halbhemmkonzentration
 h.....Hillkoeffizient

Dabei wurde das Maximum (Max) auf 100%, das Minimum (Min) auf 10,68% und der Hill-Koeffizient auf 1 festgelegt, so daß nur die Halbhemmkonzentration IC₅₀ (X₅₀) variabel blieb. Der diffusible und anhaftende Anteil (Min) von 10,68% ergab sich aus der Mittelung aller durchgeführten Aufnahmehemmungen von [¹⁴C]Gly-Sar durch 31,6 mM Glycylsarkosin, da von einer maximalen Hemmung des aktiven Transportes durch sich selbst in einer Konzentration ausgegangen werden kann, die die IC₅₀ mehr als das 5-Fache überschreitet. Die IC₅₀ gibt die Konzentration eines Hemmstoffes an, die notwendig ist, um die Aufnahme eines Substrates, das in einer bestimmten Konzentration angeboten wird, auf 50% zu senken. Damit erhält man eine indirekte Aussage über die Affinität des Hemmstoffes zu dem untersuchten Carrier. Um eine Aussage über die Affinität des Hemmstoffes unabhängig vom Substrat und dessen Angebotskonzentration zu treffen, kann die IC₅₀ in die Hemmkonstante K_i umgerechnet werden mit der Gleichung (bei kompetitiver Hemmung) [20]:

$$K_i = \frac{\text{IC}_{50}}{1 + \frac{S}{K_t}} \quad (5)$$

Dabei bedeuten: K_i.....Hemmkonstante
 K_t.....Michaelis-Menten-Konstante des Substrates

Kurvenanpassung mittels Michaelis-Menten-Gleichung

Zur Bestimmung der Transportkinetik wurde die in die Caco-2-Zellen aufgenommene [¹⁴C]Gly-Sar-Menge (korrigiert um den diffusiblen Anteil, der gleich der aufgenommenen [¹⁴C]Gly-Sar-Menge bei 10 mM Gesamtangebot ist) mit dem Verhältnis aus angebotener [¹⁴C]Gly-Sar-Konzentration (20 µM) und jeweilig angebotener Gesamt-Glycylsarkosin-Konzentration multipli-

ziert, um auf die insgesamt in die Zellen aufgenommene Glycylsarkosin-Menge zu schließen. Diese Aufnahme­rate wurde bezogen auf den Gesamtproteingehalt der Zellen graphisch gegen die insgesamt angebotene Glycylsarkosinkonzentration aufgetragen, und das Aufnahme­profil von Glycylsarkosin konnte mit nichtlinearer Regression den Meßpunkten bestmöglich angepaßt werden. Dazu wurde die Michaelis-Menten-Gleichung in der folgenden Form verwendet [194]:

$$V = \frac{V_{\max} \cdot S}{K_t + S} \quad (6)$$

Dabei bedeutet: V Aufnahme­rate des Substrates
 V_{\max}maximale Aufnahme­rate

Bei V_{\max} ist das Transportprotein gesättigt und K_t steht für die Substratkonzentration bei halb­maximaler Geschwindigkeit, das heißt, der Transporter ist zur Hälfte gesättigt [85]. Eine weitere Methode, V_{\max} und K_t zu bestimmen, ist die Kurventransformation nach Eadie-Hofstee, in dem die Aufnahme­rate V gegen den Quotienten aus V und der insgesamt angebotenen Glycylsarko­sinkonzentration S aufgetragen wird. V_{\max} ist dabei als Schnittpunkt mit der Abszisse und K_t als negativer Anstieg der linearen Regressionsgeraden definiert.

Konzentrationskorrekturrechnung für die Permeationsuntersuchungen

Da bei den Permeationsuntersuchungen die aus den Akzeptoren entnommenen Proben jeweils durch das gleiche Volumen frischer Akzeptorlösung ersetzt wurde, trat eine Verdünnung der eigentlich erreichten Konzentrationen auf. Deshalb mußten diese rechnerisch aus den gemessenen Konzentrationen ermittelt werden. Dazu wurde folgende Gleichung verwendet:

$$C_{K_{tn}} = C_{G_{tn}} + \frac{C_{K_{tn-1}} \cdot V_P}{V_A} \quad (7)$$

Dabei bedeutet: $C_{K(tn)}$korrigierte Konzentration zum Zeitpunkt der Entnahme
 $C_{G(tn)}$gemessene Konzentration zum Zeitpunkt der Entnahme
 $C_{K(tn-1)}$korrigierte Konzentration zum Zeitpunkt der vorhergehenden Entnahme
 V_P Volumen der entnommenen Probe und V_A das Volumen des Akzeptors.

Berechnung des transepithelialen Fluxes

Zur Berechnung des transepithelialen Fluxes wurde die in den Akzeptor gelangte Stoffmenge der zu untersuchenden Substanzen gegen die Zeit aufgetragen. Aus dem Anstieg der linearen Regressionsgeraden (Permeationsrate) ließ sich mit der folgenden Gleichung der transepitheliale Flux ($J_{m \rightarrow a}$) berechnen:

$$J_{m \rightarrow a} = \frac{dQ}{dt \cdot A} \quad (8)$$

Dabei bedeutet: $J_{m \rightarrow a}$transepithelialer Flux
 $\frac{dQ}{dt}$ Permeationsrate
 AMembranfläche (bei Transwells® $A=4,71 \text{ cm}^2$)

Berechnung der Verteilungskoeffizienten

Der Verteilungskoeffizient ist das Verhältnis zwischen der Konzentration in der lipophilen Phase und der Konzentration in der wäßrigen Phase. Da bei den durchgeführten Versuchen nur die Konzentration in der wäßrigen Phase bestimmbar war, wurde für die Konzentration im n-Octanol die Differenz aus der angebotenen Konzentration und der gemessenen Konzentration in der Wasserphase gebildet, so daß die folgende Gleichung zur Berechnung der Verteilungskoeffizienten (VK) verwendet wurde:

$$\mathbf{VK} = \frac{\mathbf{C}_0 - \mathbf{C}_w}{\mathbf{C}_w} \quad (9)$$

Dabei bedeutet: VK.....Verteilungskoeffizient
C₀.....angebotene Konzentration
C_w.....Konzentration in der wäßrigen Phase

Berechnung der Permeationskoeffizienten

Zur Berechnung der Permeationskoeffizienten wurde die in den Akzeptor permeierte Stoffmenge pro cm² Permeationsfläche gegen die Zeit aufgetragen. Durch lineare Regression wurde der Anstieg ermittelt, das heißt, die Permeationsrate bezogen auf die Fläche (dQ/dt*A). Aus dieser wurden mit der folgenden Gleichung die Permeationskoeffizienten (P) berechnet:

$$\mathbf{P} = \frac{\mathbf{dQ}}{\mathbf{dt} \cdot \mathbf{A} \cdot \mathbf{C}_0} \quad (10)$$

Dabei bedeutet: P.....Permeationskoeffizient
A.....Membranfläche
(bei Dodecanol-Colloidum-Membranen A= 13,9 cm² und
bei isoliertem Dünndarm A= 0,1963 cm²)

Statistische Auswertung

Zur statistischen Auswertung der Ergebnisse wurden folgende Methoden durchgeführt: Berechnung von Mittelwerten und deren Standardabweichungen, Durchführung von F-Test und t-Test nach Student (Irrtumswahrscheinlichkeit α=5%) zur Ermittlung signifikanter Unterschiede zwischen verschiedenen Mittelwerten [34]. Weiterhin wurden die einzelnen Meßreihen der Versuche unter Anwendung des nichtparametrischen zweiseitigen U-Tests nach Mann-Whitney (Irrtumswahrscheinlichkeit α=5%) auf signifikante Unterscheidung geprüft [13].

3 Ergebnisse

3.1 Untersuchungen zur Aufklärung des aktiven Transportweges

3.1.1 Vorversuche zur Etablierung der humanen Colocarzinomzelllinie Caco-2

3.1.1.1 Bestimmung des günstigsten Zeitraumes der Aufnahmeversuche

Um die humane Colocarzinomzelllinie Caco-2 als intestinales Transportmodell zu verwenden, mußten Vorversuche durchgeführt werden. Dazu wurde überprüft, wie sich die Caco-2-Zellen in den Petrischalen, den Versuchsgefäßen für die Aufnahmeversuche, entwickeln. Am Tag nach der Zellaussaat war der Zellrasen in den Petrischalen im mikroskopischen Bild konfluent, das heißt, die Zellen hatten sich soweit vermehrt, daß die gesamte Petrischalengrundfläche vollständig mit einer Zellschicht bedeckt war und sich die Zellzahl nicht mehr wesentlich verändern konnte.

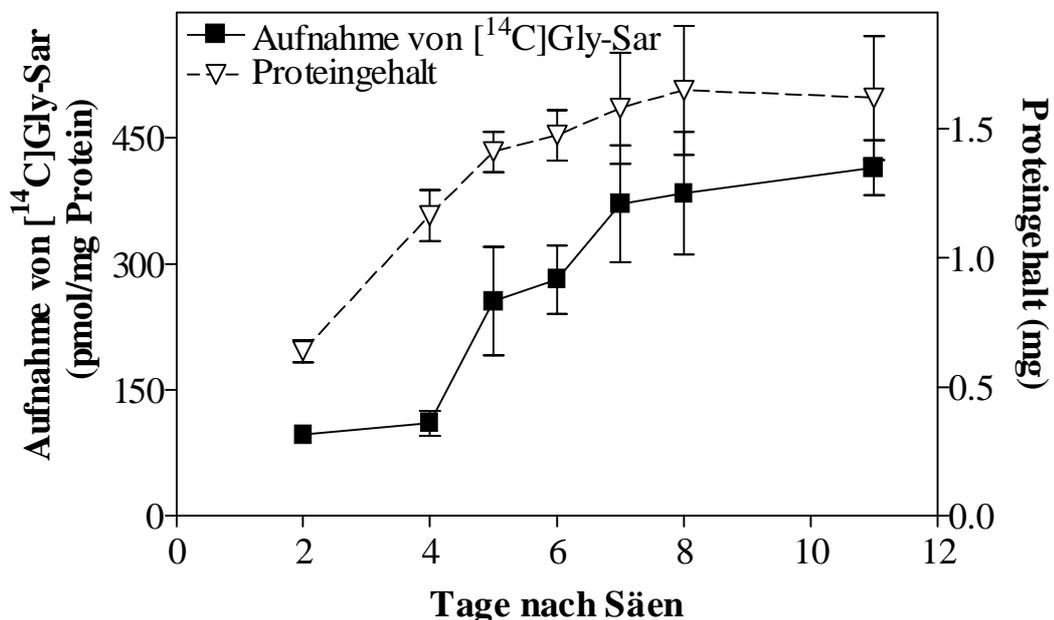


Abb. 9: Abhängigkeit des Proteingehaltes und der Aufnahme von $[^{14}\text{C}]\text{Gly-Sar}$ von der Zeit nach dem Aussäen der Caco-2-Zellen. Dargestellt sind jeweils Mittelwerte und Standardabweichungen des Proteingehaltes pro Petrischälchen (Dreiecke, bezogen auf die rechte Ordinate) und der $[^{14}\text{C}]\text{Gly-Sar}$ Aufnahme in die Caco-2 Zellen bezogen auf den Proteingehalt (Vierecke, bezogen auf die linke Ordinate). Die Verbindung der Symbole hat keine biologische Signifikanz. Anzahl der Aufnahmemessungen: n=6-48; Anzahl der Proteinbestimmungen = Anzahl der unterschiedlichen Passagen: n=3-12; Passagen 9-22. Versuchspuffer pH=6,0 mit 10 μM $[^{14}\text{C}]\text{Gly-Sar}$)

Als Maß der Differenzierung der Caco-2-Zellen wurde der Gesamtproteingehalt pro Schälchen in Abhängigkeit von der Zeit nach der Zellaussaat bestimmt (siehe **Abb. 9**). Der Proteingehalt der Zellen nimmt bis Tag 5 nach der Zellaussaat stark zu und nähert sich dann einem Grenzwert (Plateau). Nach etwa 5 Tagen erreichen die Caco-2-Zellen ihren maximalen Differenzierungsgrad. In parallelen Versuchen wurde die Aufnahme des hydrolysebeständigen Dipeptids $[^{14}\text{C}]\text{Gly-Sar}$ [175] in die Caco-2-Zellen gemessen und auf den Proteingehalt bezogen (**Abb. 9**). Die Aufnahme von $[^{14}\text{C}]\text{Gly-Sar}$ in Caco-2-Zellen ist ein starkes Indiz dafür, daß die Zellen den PEPT1 (H^+ /Peptid-Symporters) funktionsfähig exprimieren. Die Vergrößerung der $[^{14}\text{C}]\text{Gly-Sar}$

Sar-Aufnahme korreliert nicht mit der Proteinzunahme, bis Tag 4 ist die [¹⁴C]Gly-Sar-Aufnahme sehr gering, am Tag 5 ist ein großer Zuwachs der Aufnahme zu verzeichnen. Die maximale [¹⁴C]Gly-Sar-Aufnahme und damit die maximale Funktionsfähigkeit des PEPT1 Transporters wird ab Tag 7 erreicht.

Im Folgenden wurde getestet, welchen Einfluß die zunehmende Zelldifferenzierung auf die Funktionsweise von PEPT1 hat. Das Ergebnis der dazu durchgeführten Versuche ist in **Abb. 10** gezeigt.

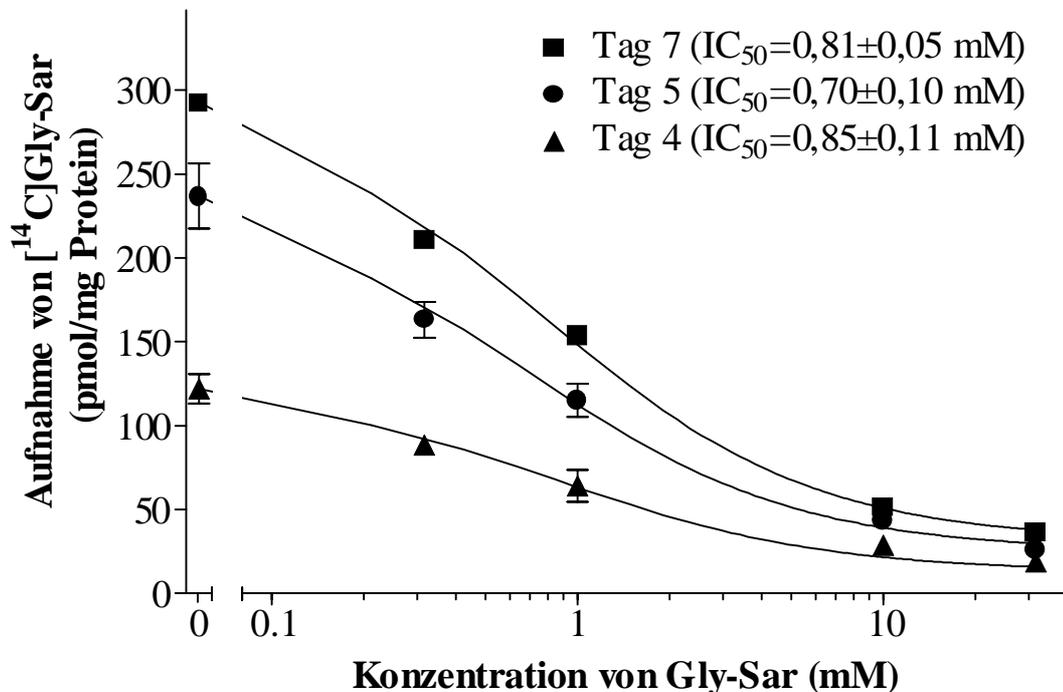


Abb. 10: Vergleich der Hemmkurven von [¹⁴C]Gly-Sar durch unmarkiertes Gly-Sar am 4., 5. bzw. 7. Tag nach der Aussaat. Hemmkurven wurden mittels Gleichung (4) durch nichtlineare Regression bestimmt. (Passagen 9-15, 67-68; n=4, Versuchspuffer pH=6,0 mit 10 µM [¹⁴C]Gly-Sar)

Es wurde die Hemmung der Aufnahme von [¹⁴C]Gly-Sar durch unmarkiertes Gly-Sar in verschiedenen Konzentrationen 4, 5 bzw. 7 Tage nach der Zellaussaat bestimmt. Die IC₅₀ wurden mit Hilfe der Gleichung (4) berechnet und die so erhaltenen Hemmkurven mit abgebildet. Es konnte gezeigt werden, daß sich die Aufnahmeraten für [¹⁴C]Gly-Sar an den verschiedenen Tagen zwar signifikant unterscheiden, aber fast identische IC₅₀-Werte für Glycylsarkosin als Maß für die Affinität zum Carrier erhalten wurden.

Die folgenden Aufnahme-Bestimmungen wurden 5-8 Tage nach der Zellaussaat durchgeführt, um das Kontaminationsrisiko der Caco-2-Zellen so gering wie möglich zu halten und gleichzeitig eine ausreichende Meßbarkeit der aufgenommenen [¹⁴C]Gly-Sar-Menge in die Caco-2-Zellen zu nutzen.

3.1.1.2 Zeit- und pH-Abhängigkeit der Aufnahme von [¹⁴C]Gly-Sar in Caco-2-Zellen

Im Folgenden wurde überprüft, welchen Einfluß die Versuchsdauer und der pH-Wert des Versuchsmediums auf die Aufnahme von [¹⁴C]Gly-Sar in die Zellen hat.

Es wurde der [¹⁴C]Gly-Sar-Gehalt in Caco-2-Zellen analysiert, auf die ein Versuchsmedium mit pH=6,0 bzw. pH=7,5 mit 10 µM [¹⁴C]Gly-Sar 5, 10, 15, 20 und 30 min einwirkte. In **Abb. 11** ist

die Aufnahme von [¹⁴C]Gly-Sar [pmol/mg Protein] gegen die Zeit [min] aufgetragen. Die unterbrochenen Linien verbinden die Mittelwerte der Meßpunkte, um den Gehaltsverlauf zu kennzeichnen. Die aufgenommene [¹⁴C]Gly-Sar-Menge nimmt bis etwa 15 min proportional zur Einwirkzeit zu (veranschaulicht durch die Regressionsgeraden), danach hat die Verlängerung der Einwirkzeit nicht mehr im gleichen Maße die Erhöhung der Aufnahme von [¹⁴C]Gly-Sar zur Folge, da die Kapazität der Zellen, [¹⁴C]Gly-Sar aufzunehmen, erschöpft ist. Im Folgenden wurde bei allen Aufnahmeversuchen die Versuchslösungen 10 min einwirken gelassen.

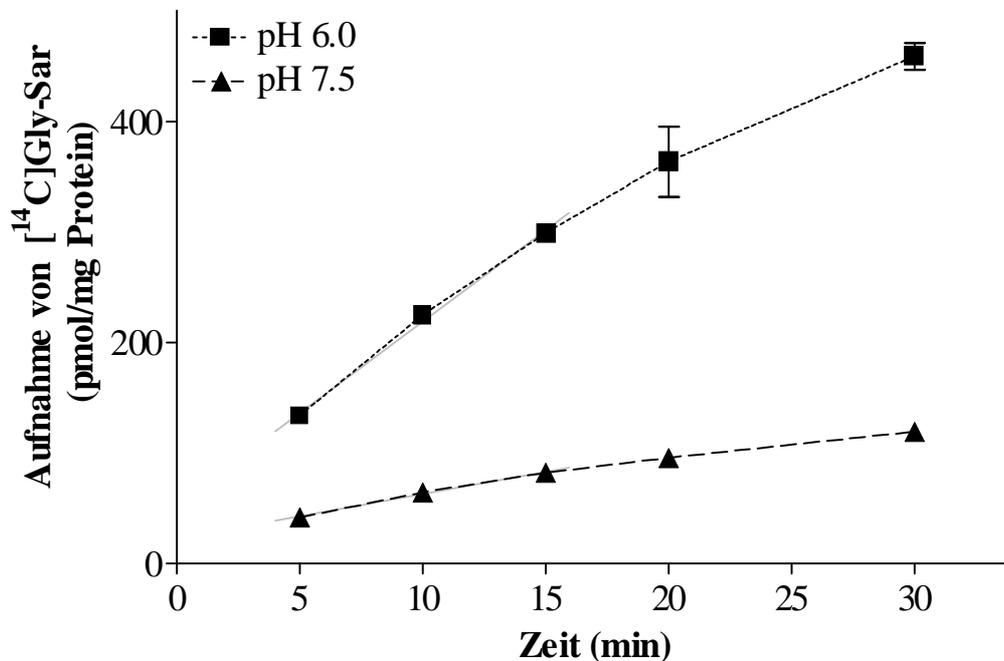


Abb. 11: Einfluß der Einwirkzeit auf die Aufnahme von [¹⁴C]Gly-Sar in Caco-2-Zellen in unterschiedlichem pH. Unterbrochene Linien: Verbindung der Mittelwerte. Geraden: lineare Regression bis 15 min ($r_{\text{pH}=6,0}=0,9962$; $r_{\text{pH}=7,5}=0,9919$) (Passage 18, Versuchspuffer pH=6,0 bzw. pH= 7,5 mit 10 μM [¹⁴C]Gly-Sar) (n=3)

Die Aufnahme von [¹⁴C]Gly-Sar ist pH-abhängig. Ein zelleinwärts gerichteter Protonengradient (Versuchspuffer pH=6,0) verbessert die Aufnahme von [¹⁴C]Gly-Sar um den Faktor 3,5 im Vergleich zum leichten Protonenüberschuß in den Zellen (Versuchspuffer pH=7,5).

3.1.1.3 Einfluß von Glycin bzw. von Mannitol auf die Aufnahme von [¹⁴C]Gly-Sar

Um die vom Hersteller angegebene 95%-ige Reinheit von [¹⁴C]Gly-Sar zu überprüfen, wurde das Hemmpotential von Glycin, des markierten Aminosäurebausteins von [¹⁴C]Gly-Sar, bis zu einer Konzentration von 31,6 mM getestet.

Die Säulen in **Abb. 12** verkörpern den prozentualen Anteil der [¹⁴C]Gly-Sar-Aufnahme bezogen auf den Kontrollversuch ohne potentiellen Inhibitor. Der Reinheitsgrad konnte bestätigt werden, da Glycin die Aufnahme vom eingesetzten Versuchslabel nicht stärker als 5% hemmen kann.

Um osmotische Effekte ausschließen zu können (bei der Bestimmung der Hemmkurven wurden die potentiellen Inhibitoren bis zu 31,6 mM eingesetzt), wurde der Einfluß von Mannitol als osmotisches Agens auf den [¹⁴C]Gly-Sar-Transport bis zu 100 mM getestet und festgestellt, daß der Dipeptidtransport davon ungestört bleibt (siehe **Abb. 12**).

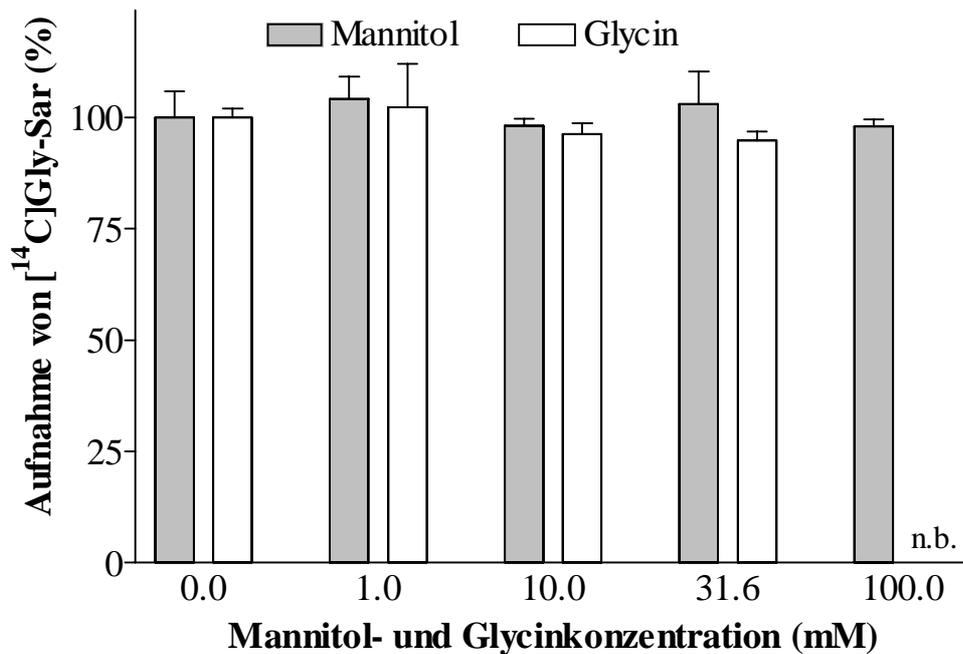


Abb. 12: Einfluß von Mannitol (bis 100 mM) und Glycin (bis 31,6 mM) auf die Aufnahme von $[^{14}\text{C}]\text{Gly-Sar}$. (Passagen 9-11, 13, 40; Versuchspuffer pH=6,0 mit $10\ \mu\text{M}$ $[^{14}\text{C}]\text{Gly-Sar}$ und angegebener Inhibitorkonzentration) (n=4)

3.1.1.4 Bestimmung der optimalen Anzahl ausgesäter Zellen auf Transwells[®]

Für die Versuche zur Flux-Bestimmung wurde getestet, ob auf die in der Literatur [63] beschriebene Kollagenierung der Polycarbonatfilter verzichtet werden kann, um unnötige Kontaminierungsmöglichkeiten zu vermeiden. Dazu wurde das Wachstum der Caco-2-Zellen in Transwells[®] mit 6 verschiedenen Anfangszelldichten zwischen 40 000 und 360 000 Zellen/Filter 17 Tage makroskopisch und mikroskopisch verfolgt. Es konnte festgestellt werden, daß die Caco-2-Zellen auch direkt auf den Polycarbonatfiltern ohne vorherige Behandlung mit Rattenkollagen wachsen. Bei geringerer Zellzahl sind die Zellen fester im Filtermaterial verankert (es schwimmen kaum abgestoßene Zellen im Kulturmedium), es dauert aber mit abnehmender Zellzahl länger bis zur Konfluenz und damit bis zum Beginn der Differenzierung. Daraus ergab sich die unter den angewendeten Kulturbedingungen optimale Anfangszelldichte von 200 000 Zellen pro Transwell[®].

3.1.1.5 Dichtigkeit der Caco-2-Zellschicht in Transwells[®]

Um zu überprüfen, ob die Caco-2-Zellen auf den Polycarbonatfiltern in den Transwells[®] ein „dichtes“ Epithel ausbilden, das heißt, daß keine unphysiologischen Öffnungen verblieben sind, wurde der Flux von $[^{14}\text{C}]\text{Mannitol}$ durch die Caco-2-Zellschicht bestimmt. Dazu wurde im Donator $5\ \mu\text{M}$ $[^{14}\text{C}]\text{Mannitol}$ angeboten und über 2h der Konzentrationsanstieg im Akzeptor verfolgt. Es konnte festgestellt werden, daß $0,07 \pm 0,002\ \%/(\text{cm}^2 \cdot \text{h})$ bezogen auf die angebotene $[^{14}\text{C}]\text{Mannitol}$ menge in den Akzeptor übertritt, was einem Permeationskoeffizienten von $3 \cdot 10^{-9}\ \text{m/s}$ entspricht. Unter den gleichen Versuchsbedingungen ergab sich für $[^{14}\text{C}]\text{Gly-Sar}$ nach $30\ \mu\text{M}$ Angebot ein Permeationskoeffizient von $57 \cdot 10^{-9}\ \text{m/s}$, so daß von einem „dichten“ Zellrasen ausgegangen werden kann.

3.1.1.6 Überprüfung der Versuchspufferkapazität nach Zugabe der Inhibitoren

Zur Bestimmung der Aufnahmemehmung von [^{14}C]Gly-Sar durch potentielle Inhibitoren wurden letztere zum Teil bis zu einer Konzentration von 31,6 mM zugesetzt, so daß überprüft werden mußte, ob die Pufferkapazität des Versuchspuffers ausreicht. Bei 5 Verbindungen mußte der pH-Wert durch Zugabe von Tris korrigiert werden (bei Cefpirom, Cefotaxim, Cefepim, Cefixim und Cephalixin). Alle anderen β -Lactame ließen den pH-Wert unverändert. Bei den Versuchen zur Flux-Bestimmung wurden die Cephalosporine und Penicilline nur in einer Konzentration von 1 mM eingesetzt, der pH-Wert mußte bei keiner Verbindung korrigiert werden.

3.1.1.7 Stabilität der Versuchslösungen während der Versuche und bis zur HPLC-Analytik

Als Voraussetzung zur HPLC-Analytik war es notwendig zu klären, wie stabil die zu untersuchenden Substanzen in den Versuchspuffern sind. Es wurde dabei festgestellt, daß die β -Lactamantibiotika bei Zimmertemperatur über 10 Stunden unverändert nachweisbar waren, während bei 37°C nach 4 Stunden ein maximaler Verlust von 7,4% im Vergleich zur Ausgangskonzentration zu verzeichnen war. Deshalb wurde für jeden Versuch der zu vermessende Standard den Versuchstemperaturbedingungen ausgesetzt. Um eventuelle Zersetzungen innerhalb des Modellsystems auszuschließen, wurden die Antibiotikagehalte am Versuchsende im Donator und Akzeptor sowie in den Modellmembranen bestimmt, deren Summe nie kleiner als 85% ausfiel. Nur für Cefuroximaxetil konnte festgestellt werden, daß es zum Teil in den Caco-2-Zellen zu Cefuroxim umgesetzt wurde, so daß zur Bestimmung der Permeationsrate die Gehalte an Cefuroxim und Cefuroximaxetil addiert wurden.

Da die Proben zum Teil nicht sofort nach Versuchsende vermessen werden konnten, wurden sie bis zu 7 Tagen bei -21°C aufbewahrt und kurz vor der Analyse wieder aufgetaut. Diese Methode führte zu keinen meßbaren Verlusten.

3.1.2 Bestimmung der Affinität von 23 strukturell verschiedenen β -Lactamantibiotika zum H^+ /Peptid-Symporter PEPT1

Es wurde für 20 Cephalosporine und 3 Penicilline (chemische Strukturen siehe **Tab. 3**) getestet, in welchem Ausmaß sie von PEPT1 als Substrat erkannt werden. Dafür stand nur eine indirekte Methode zur Verfügung. Es wurde die Aufnahme von [^{14}C]Gly-Sar in die Caco-2-Zellen nach Zugabe von unterschiedlichen Konzentrationen an potenziellen Hemmstoffen (β -Lactamantibiotika) gemessen. Durch nichtlineare Regression mittels Gleichung (4) wurden die Hemmkurven ermittelt, die in **Abb. 13** dargestellt sind. Zur Vergleichbarkeit der Versuche untereinander wurden die aufgenommenen [^{14}C]Gly-Sar-Mengen in Prozent angegeben bezogen auf die Kontrollbestimmungen ohne Zusatz von Hemmstoff und gegen die eingesetzten Inhibitorkonzentrationen aufgetragen. Die notwendigen Inhibitorkonzentrationen zur Senkung der [^{14}C]Gly-Sar-Aufnahme auf 50% (IC_{50}) wurden mit Gleichung (5) in die Hemmkonstanten K_i umgerechnet als substrat-([^{14}C]Gly-Sar)-unabhängiges Maß für die Affinität der Hemmstoffe zum Transportprotein. Die Kurvenverläufe sind bis maximal 31,6 mM durch Meßwerte gesichert, darüber hinaus handelt es sich um Schätzungen. Infolge von schlechter Löslichkeit waren zum Teil nur kleinere Konzentrationen möglich: 15 mM bei Cefixim, 10 mM bei Cyclacillin, Cefaclor, Cephalotin, Cephapirin und Ceftazidim und 5 mM bei Ceftibuten und Cefuroximaxetil. Die aus den Meßdaten errechneten K_i sind in **Tab. 3** aufgelistet.

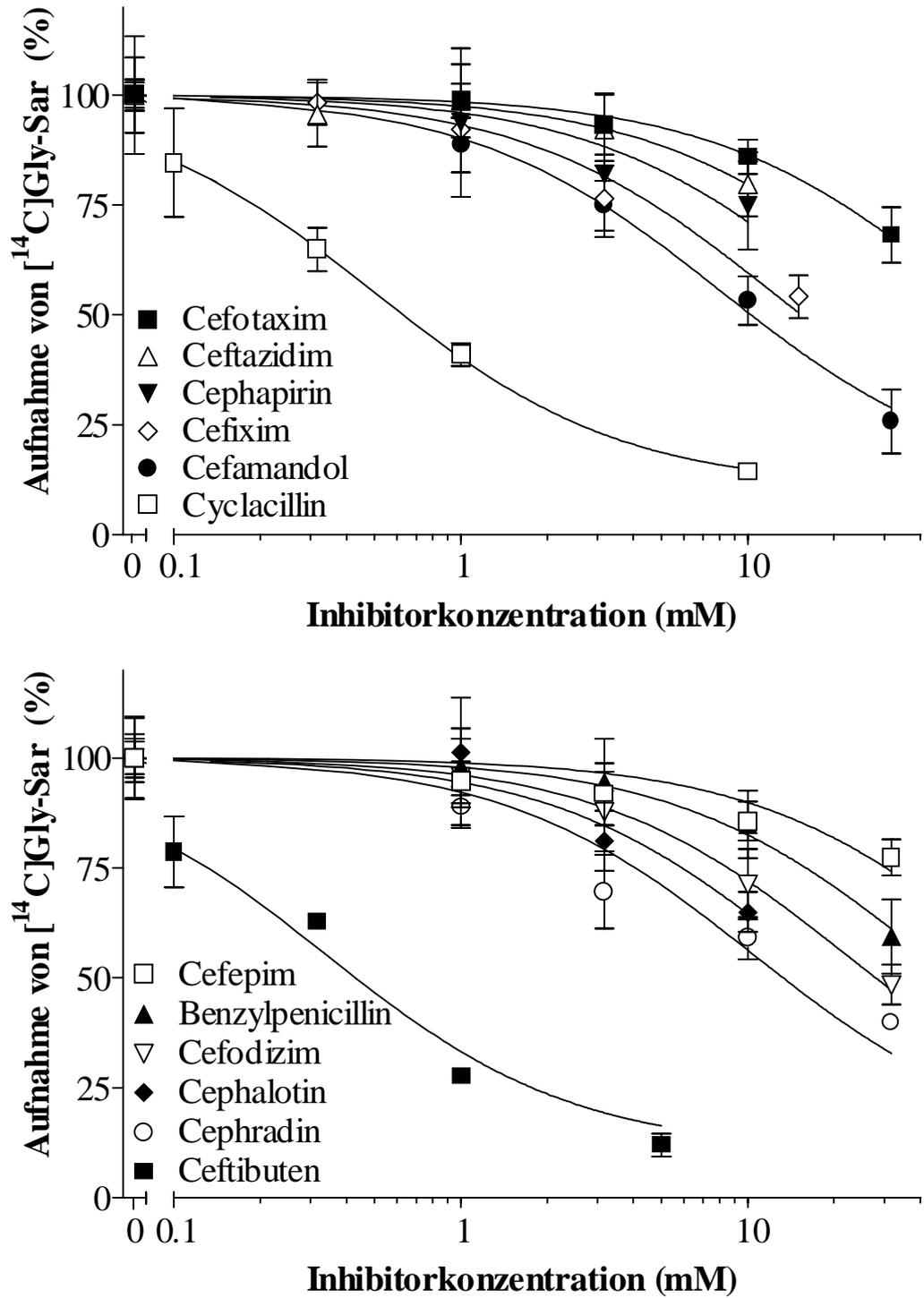
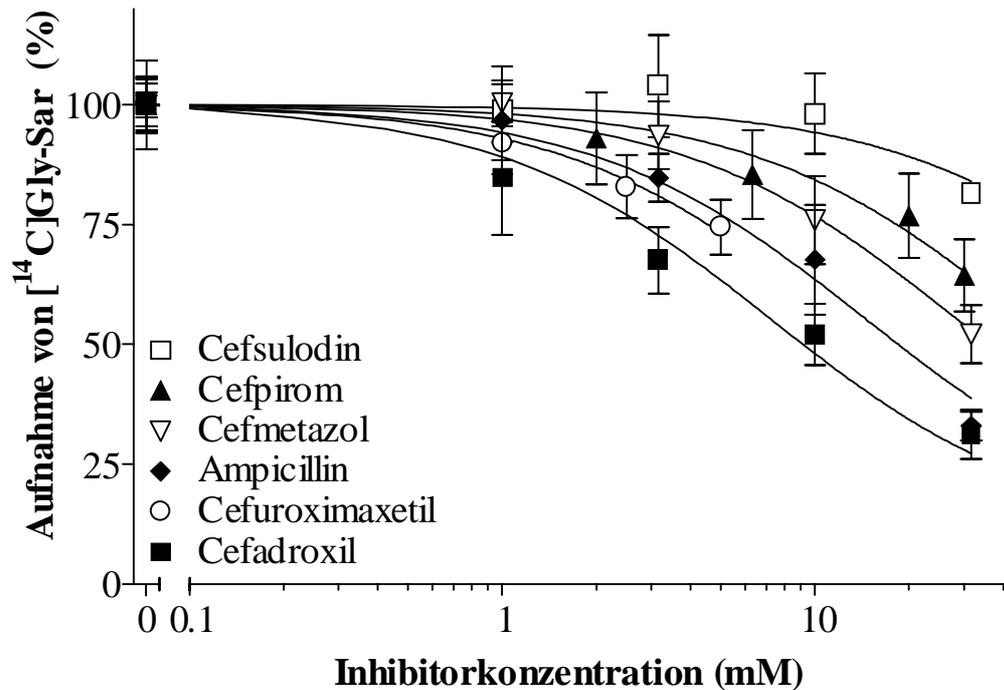
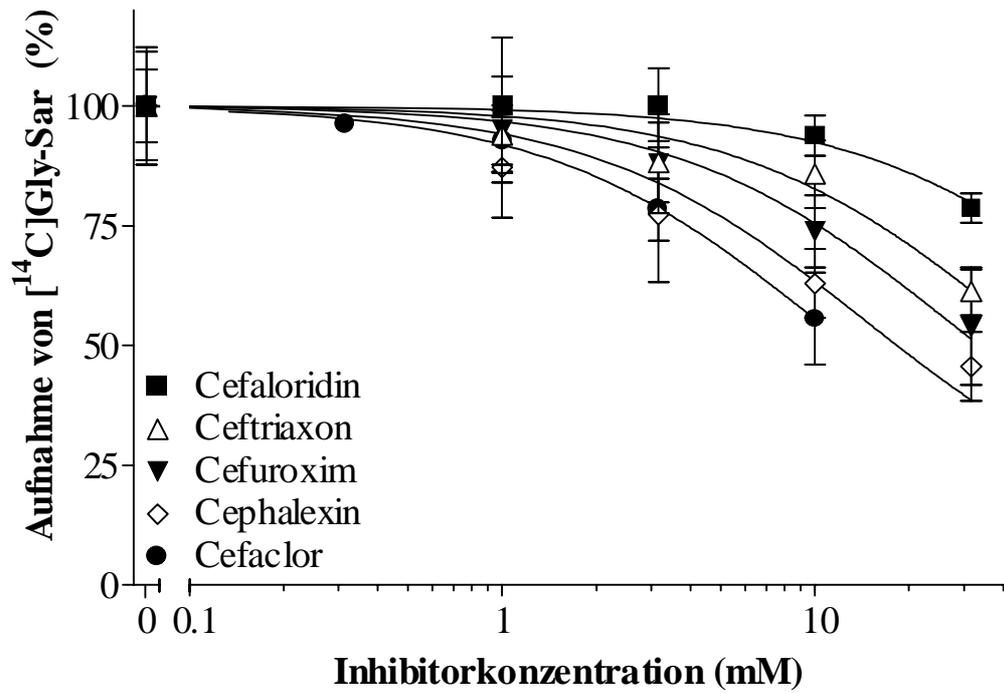


Abb. 13: Einfluß potentiellen Inhibitoren in verschiedenen Konzentrationen auf die Aufnahme von ¹⁴C]Gly-Sar in Caco-2-Zellen. Die Hemmkurven wurden mit Gleichung (4) durch nichtlineare Regression ermittelt. Zur besseren Übersichtlichkeit wurden die Hemmkurven der 23 untersuchten Substanzen in 4 Diagrammen aufgetragen (siehe auch nächste Seite). (Passagen 9-55; Versuchspuffer pH=6,0 mit 10 µM ¹⁴C]Gly-Sar und angegebener Inhibitorkonzentration) (n=4)



Fortsetzung Abb. 13

Am besten konnten Ceftributen und Cyclacillin $[^{14}\text{C}]$ Gly-Sar von PEPT1 verdrängen. Sie sind etwa doppelt so affin wie Gly-Sar. Etwa 10-20 mal weniger affin als Gly-Sar sind die oral anwendbaren Cephalosporine Cefadroxil, Cephadrin, Cefaclor, Cefuroximaxetil, Cefixim und Cephalexin und das Penicillin Ampicillin sowie die parenteral anwendbaren Cephalosporine Cefamandol und Cephalotin. Die K_i -Werte liegen zwischen 7 und 14 mM. Unter den β -Lactamantibiotika mit K_i -Werten über 20 mM befinden sich ausschließlich parenteral anwendbare. Mit aufsteigenden K_i -Werten ergibt sich in dieser Gruppe folgende Reihenfolge: Cephapirin, Cefodizim, Cefuroxim, Cefmetazol, Ceftazidim, Benzylpenicillin, Ceftriaxon, Cefpirom, Cefotaxim, Cefepim, Cefaloridin und Cefsulodin.

3.1.3 Bestimmung des transepithelialen Flux von 23 strukturell verschiedenen β -Lactamantibiotika durch Caco-2-Zellen

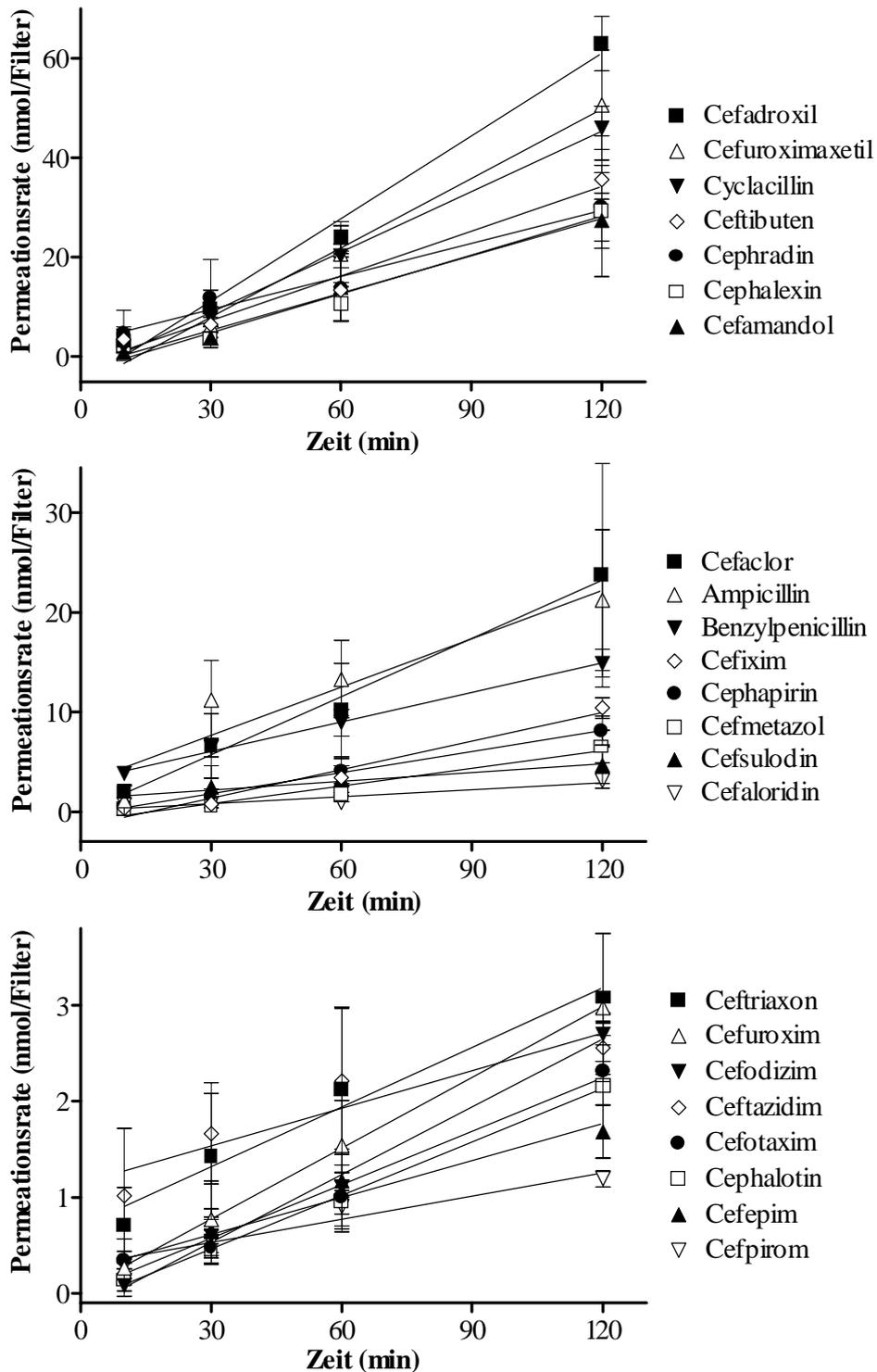


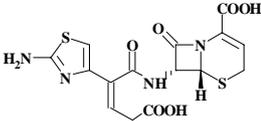
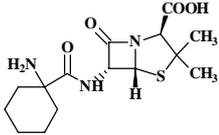
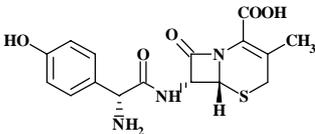
Abb. 14: Permeation von 23 β -Lactamantibiotika aus dem Donator durch die Caco-2-Zellschicht in den Akzeptor. Die Anstiege der linearen Regressionen dienen zur Fluxbestimmung mittels Gleichung (8) ($r > 0,9279$) (Passagen 49-81; Versuchspuffer im Donator pH=6,0 mit 1 mM β -Lactamantibiotikum; Versuchspuffer im Akzeptor pH=7,5) (n=4)

Die an Hand der Aufnahmehemmung von [14 C]Gly-Sar ermittelten Affinitäten der β -Lactamantibiotika sagen nichts über das Ausmaß und die Geschwindigkeit ihrer Aufnahme in die Caco-2-

Zellen aus. Deshalb wurde als weiterer Parameter zur Beurteilung des Aufnahmemechanismus der transepitheliale Flux durch die Caco-2-Zellschicht bestimmt. Dazu wurde zu verschiedenen Zeiten analysiert, welche Konzentration das jeweilige Antibiotikum im Akzeptor erreicht hat, nachdem im Donator jeweils 1 mM angeboten wurden. **Abb. 14** zeigt die zeitlichen Konzentrationsverläufe und die linearen Regressionen zur Ermittlung der Fluxe. Zur besseren Anschaulichkeit wurden die β -Lactamantibiotika in der Abbildung so gruppiert, daß die Permeationsraten gleiche Größenordnungen aufweisen. Die unterschiedliche Ordinatoreinteilung ist dabei zu beachten. Die Fluxe wurden mit Gleichung (8) berechnet. Die β -Lactamantibiotika können hinsichtlich ihres Fluxes durch die Caco-2-Zellschicht in drei Gruppen eingeteilt werden. Die Vertreter mit größeren Fluxen [von $\approx 7,5$ nmol/(cm²*h) bis $\approx 2,5$ nmol/(cm²*h)] sind der Größe nach Cefadroxil, Cefuroximaxetil, Cyclacillin, Ceftibuten, Cephalexin, Cefamandol, Cephradine, Cefaclor und Ampicillin. Den mittleren Bereich bilden Cefixim, Benzylpenicillin, Cephapirin und Cefmetazol mit Fluxen von $\approx 1,2$ nmol/(cm²*h) bis $\approx 0,8$ nmol/(cm²*h). Die dritte Gruppe mit Fluxen bis $\approx 0,4$ nmol/(cm²*h) setzt sich aus Cefsulodin, Cefuroxim, Cefodizim, Cefaloridin, Ceftriaxon, Cephalotin, Cefotaxim, Ceftazidim, Cefepim und Cefpirom zusammen. Die genauen Fluxe sind der **Tab. 3** zu entnehmen.

In dieser Tabelle sind die aus den Meßwerten errechneten Hemmkonstanten K_i und Fluxe enthalten. Angegeben sind die sich aus der Berechnung ergebenden Standardfehler. Zusätzlich sind die β -Lactamantibiotikagehalte ($C_{Membran}$) aufgeführt, die nach 2 Stunden Versuchsdauer in der Zellschicht pro Filter gemessen wurden. Diese liegen bei den oral anwendbaren Cephalosporinen um eine 10-er Potenz höher als die der parenteral zur Verfügung stehenden. Im Unterschied dazu sind die Membrangehalte der oral anwendbaren Penicilline mit denen der besseren parenteralen Cephalosporine vergleichbar. Diesen experimentellen Daten sind die Strukturformeln der Verbindungen und die Bioverfügbarkeiten -soweit bekannt- und die sich daraus ergebenden Applikationen gegenübergestellt.

Tab. 3: Gegenüberstellung der Hemmkonstanten am PEPT1, der transepithelialen Fluxe der β -Lactamantibiotika und der Zellkonzentrationen je Filter nach 2h mit den Strukturformeln [112] und der durch die Bioverfügbarkeit [136, 156, 161, 198] bedingten Applikation [129]

Name	Strukturformel	K_i [mmol/l]	$J_{m \rightarrow a}$ [nmol/cm ² *h]	$C_{Membran}$ [nmol/cm ² *2h]	Applikation (Bioverfügbarkeit)
Ceftibuten		$0,34 \pm 0,03$	$3,8 \pm 0,4$	$10,7 \pm 1,3$	Oral (84%)
Cyclacillin		$0,5 \pm 0,05$	$5,2 \pm 0,2$	$1,0 \pm 0,1$	Oral (70%)
Cefadroxil		$7,2 \pm 0,8$	$7,0 \pm 0,6$	$12,3 \pm 0,7$	Oral ($\approx 100\%$)

Fortsetzung **Tab. 3**

Name	Strukturformel	K_i [mmol/l]	$J_{m \rightarrow a}$ [nmol/cm ² *h]	$C_{Membran}$ [nmol/cm ² *2h]	Applikation (Bioverfügbarkeit)
Cefamandol		$8,1 \pm 0,8$	$3,2 \pm 0,2$	$0,2 \pm 0,1$	Parenteral (<1%)
Cephradin		$9,8 \pm 1,2$	$2,8 \pm 0,4$	$7,2 \pm 0,4$	Oral (≈100%)
Cefaclor		>10 (≈11)	$2,5 \pm 0,2$	$5,9 \pm 0,3$	Oral (≈100%)
Cefuroxim-axetil		>5 (≈12)	*	*	Oral (40-50%)
Cefixim		12 ± 1	$1,2 \pm 0,2$	$2,4 \pm 0,2$	Oral (40-50%)
Cephalotin		>10 (≈14)	$0,24 \pm 0,01$	$0,07 \pm 0,03$	Parenteral (<5%)
Cephalexin		$14,4 \pm 2,4$	$3,3 \pm 0,4$	$5,3 \pm 0,7$	Oral (≥95%)
Ampicillin		$14,5 \pm 1,7$	$2,1 \pm 0,4$	$0,32 \pm 0,08$	Oral (30-40%)
Cephapirin		>10 (≈20)	$0,90 \pm 0,04$	$0,19 \pm 0,01$	Parenteral
Cefodizim		22 ± 3	$0,30 \pm 0,02$	$0,28 \pm 0,07$	Parenteral
Cefuroxim		26 ± 4	$0,31 \pm 0,01$	$0,12 \pm 0,01$	Parenteral (<1%)

* zum Teil als Cefuroxim gemessen

Fortsetzung **Tab. 3**

Name	Strukturformel	K_i [mmol/l]	$J_{m \rightarrow a}$ [nmol/cm ² *h]	$C_{Membran}$ [nmol/cm ² *2h]	Applikation (Bioverfügbarkeit)
Cefmetazol		28 ± 3	0,75 ± 0,12	0,12 ± 0,02	Parenteral
Ceftazidim		>10 (≈40)	0,25 ± 0,07	0,17 ± 0,02	Parenteral (<1%)
Benzylpenicillin		>30 (≈40)	1,3 ± 0,05	n.n.	Parenteral
Ceftriaxon		>30 (≈40)	0,26 ± 0,03	0,17 ± 0,03	Parenteral (<5%)
Cefpirom		>30 (≈45)	0,10 ± 0,02	0,17 ± 0,02	Parenteral
Cefotaxim		>10 (≈50)	0,24 ± 0,02	0,10 ± 0,01	Parenteral (<2%)
Cefepim		>30 (≈70)	0,16 ± 0,02	n.n.	Parenteral
Cefaloridin		>30 (≈100)	0,29 ± 0,08	0,12 ± 0,02	Parenteral (<5%)
Cefsulodin		>30 (≈150)	0,38 ± 0,06	0,16 ± 0,05	Parenteral

3.1.4 Charakterisierung des Einflusses von Zink- und anderen Schwermetall-Ionen auf den H⁺/Peptid-Symporter PEPT1

3.1.4.1 Vergleich der akuten Hemmung der [¹⁴C]Gly-Sar-Aufnahme durch Zinkchlorid und Zinksulfat

Am Beispiel von Zink sollte der Einfluß von Schwermetall-Ionen, die mit der Nahrung in Spuren aufgenommen werden, auf den intestinalen H⁺/Peptid-Symporter überprüft werden. Um ausschließen zu können, daß eventuell auftretende Effekte durch die Anionen der Schwermetall-

salze hervorgerufen werden, wurden zum Vergleich die Hemmkonstanten für Zinkchlorid und Zinksulfat durch Ermittlung der Hemmung der [^{14}C]Gly-Sar-Aufnahme durch zunehmende Zink-Ionenkonzentrationen bestimmt. In **Abb. 15** sind die in die Caco-2-Zellen aufgenommenen Stoffmengen an [^{14}C]Gly-Sar bezogen auf den Proteingehalt der Zellen gegen die zugesetzte Zink-Ionenkonzentration dargestellt.

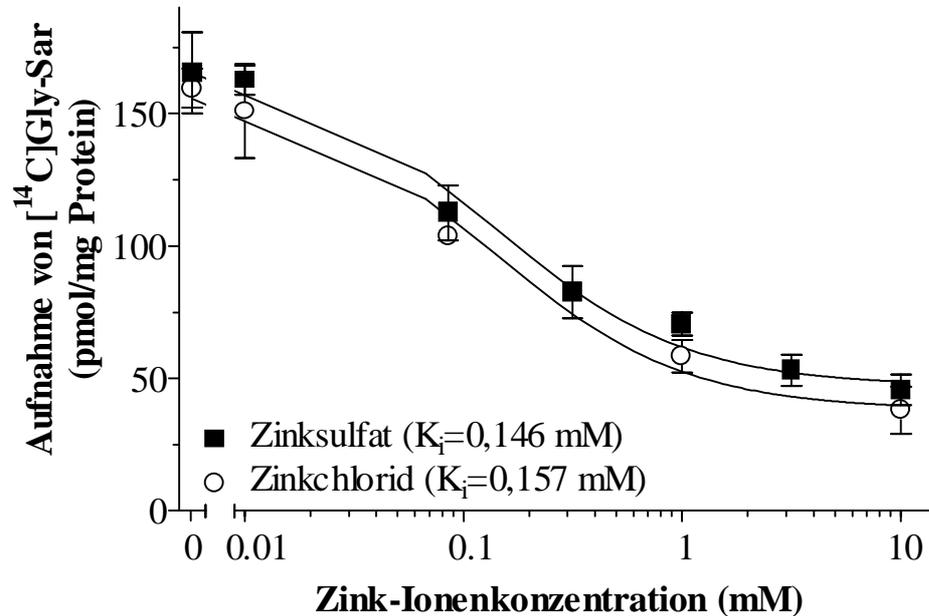


Abb. 15: Einfluß von Zinksulfat bzw. Zinkchlorid auf die Aufnahme von [^{14}C]Gly-Sar. Die Hemmkurven wurden mit Gleichung (4) mittels nichtlinearer Regression bestimmt. (Passagen 65-68; Versuchspuffer pH=6,0 mit 10 μM [^{14}C]Gly-Sar und angegebener Inhibitorkonzentration) (n=4)

Es konnte gezeigt werden, daß sowohl Zinksulfat als auch Zinkchlorid die Aufnahme von [^{14}C]Gly-Sar hemmen. Die Meßwerte weichen nicht signifikant voneinander ab, so daß der Hemmeffekt allein auf die Zink-Ionen zurückzuführen ist. Im Folgenden wird für Zink-Ionen eine Hemmkonstante $K_i=150 \mu\text{M}$ (aus den IC_{50} mit Gleichung (5) errechnet) angewendet.

3.1.4.2 Einfluß der Vorbehandlung der Caco-2-Zellen mit 1 mM Zinksulfat auf die Aufnahme von [^{14}C]Gly-Sar

Im Vergleich zur akuten Aufnahmehemmung von [^{14}C]Gly-Sar durch die gleichzeitige Gabe von Zink-Ionen wurde überprüft, welchen Einfluß eine Vorbehandlung der Caco-2-Zellen mit 1mM Zinksulfat auf die nachfolgende Aufnahme von [^{14}C]Gly-Sar ausübt. Dazu wurden die Zellen bis zu 3 h mit 1 mM Zinksulfat enthaltenden Versuchspuffer pH=7,5 inkubiert. Um abschätzen zu können, welchen Anteil am resultierenden Effekt die Behandlung mit Versuchspuffer hat, der vom Kultivierungsmedium in seiner Zusammensetzung abweicht, wurden parallel dazu Caco-2-Zellen mit reinem Versuchspuffer pH=7,5 inkubiert. In **Abb. 16** ist die prozentuale [^{14}C]Gly-Sar-Aufnahme bezogen auf die [^{14}C]Gly-Sar-Aufnahme ohne Vorbehandlung gegen die Vorbehandlungszeit aufgetragen.

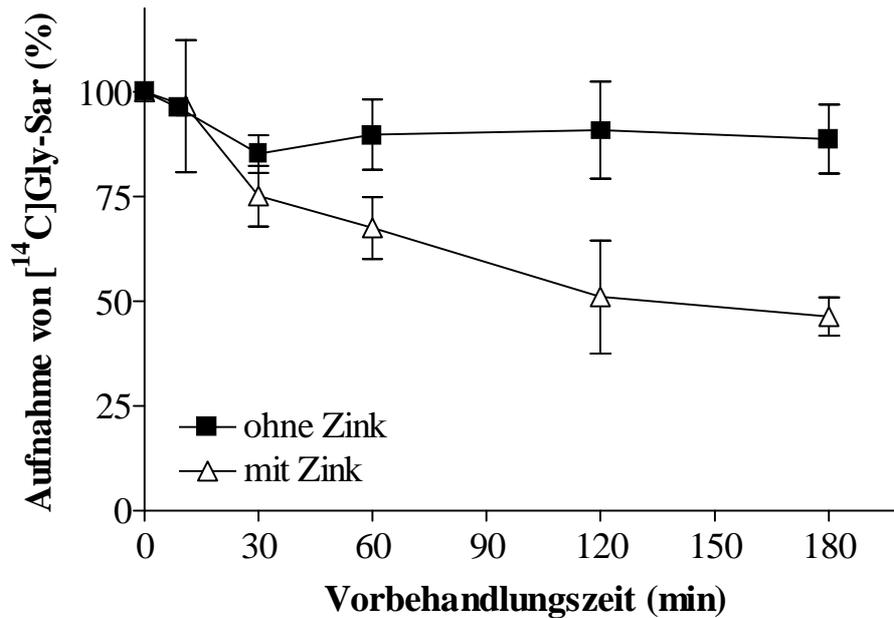


Abb. 16: Aufnahmehemmung von [¹⁴C]Gly-Sar durch Vorbehandlung der Caco-2-Zellen mit 1mM ZnSO₄ im Vergleich zur gleichen Vorbehandlung ohne ZnSO₄. Die 10min-Werte sind um 2 min nach links bzw. nach rechts verschoben, um das Übereinanderliegen zu verdeutlichen. (*mit Zink*: Vorbehandlung der Caco-2-Zellen mit 1mM ZnSO₄ enthaltenden Versuchspuffer pH=7,5 im Inkubator in der angegebenen Zeit; Aufnahmeversuch mit Versuchspuffer pH=6,0 mit 10 μM [¹⁴C]Gly-Sar ; *ohne Zink*: Vorbehandlung der Caco-2-Zellen mit Versuchspuffer pH=7,5 im Inkubator in der angegebenen Zeit; Aufnahmeversuch mit Versuchspuffer pH=6,0 mit 10 μM [¹⁴C]Gly-Sar) (Passagen 78-79) (n=4)

Es stellte sich heraus, daß sich die Vorbehandlung der Caco-2-Zellen mit 1 mM Zinksulfat hemmend auf die [¹⁴C]Gly-Sar-Aufnahme auswirkt. Auch die Vorbehandlung mit Versuchspuffer pH=7,5 beeinflusst die [¹⁴C]Gly-Sar-Aufnahme negativ, aber in viel geringerem Ausmaß. Dies macht sich ab 30 min deutlich bemerkbar. Mit zunehmender Vorbehandlungszeit nimmt die [¹⁴C]Gly-Sar-Aufnahme ab und erreicht nach 3 h nur noch etwa 46% der aufgenommenen Menge ohne Vorbehandlung. Etwa ein Viertel der Hemmung verursacht dabei die Vorbehandlung mit Versuchspuffer pH=7,5 als Ersatz für das normale Kulturmedium. Die meßbare Hemmung durch Vorbehandlung ist aber bedeutend geringer als die akute Hemmung durch gleichzeitigen Zusatz von 1 mM Zinksulfat während des Aufnahmeversuches, wodurch nur noch etwa 28% [¹⁴C]Gly-Sar in die Caco-2-Zellen aufgenommen werden können (siehe Kap. 3.1.4.3).

3.1.4.3 Ermittlung der Hemmung der [¹⁴C]Gly-Sar-Aufnahme durch Zink-, Kupfer-, Cobalt-, Mangan(II)-, Nickel- und Eisen(II)-Ionen jeweils 150 μM und 1 mM

Im Weiteren wurde die [¹⁴C]Gly-Sar-Aufnahmehemmung durch Zink-Ionen mit der Hemmung durch Cobalt-, Eisen(II)-, Kupfer-, Mangan(II)- und Nickel-Ionen verglichen. Dazu wurden die Salze der zweiwertigen Metalle 150 μM (Hemmkonstante von Zink-Ionen) und 1 mM eingesetzt. **Abb. 17** zeigt die prozentuale Hemmung der [¹⁴C]Gly-Sar-Aufnahme durch die verschiedenen Ionen (ungehemmte Aufnahme von [¹⁴C]Gly-Sar =100%). Es stellte sich heraus, daß nur Kupfer-Ionen den [¹⁴C]Gly-Sar-Transport in die Zellen stärker als Zink-Ionen (etwa Faktor 2) hemmen. Nickel-Ionen verursachen in einer Konzentration von 1mM nur eine Hemmung auf

etwa 75%. Für Eisen(II)-Ionen deutet sich ein Hemmpotential an, das sich erst in höheren Konzentrationen deutlicher bemerkbar machen wird. Für Cobalt- und Mangan(II)-Ionen zeichnet sich keine Wechselwirkung mit PEPT1 ab, die eine Aufnahmehemmung eines Substrates von PEPT1 verursacht.

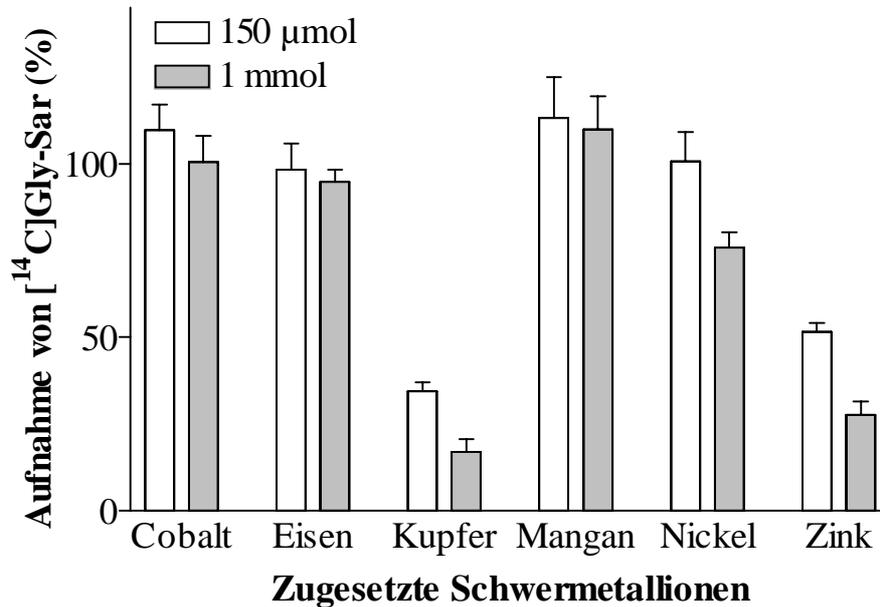


Abb. 17: Einfluß von verschiedenen Schwermetall-Ionen auf die Aufnahme von $[^{14}\text{C}]$ Gly-Sar. (Passagen 69-77, 115; Versuchspuffer pH=6,0 mit 10 μM $[^{14}\text{C}]$ Gly-Sar und angegebenen Inhibitorkonzentrationen) (n=4)

3.1.4.4 Nachweis der Additivität der Hemmung der $[^{14}\text{C}]$ Gly-Sar-Aufnahme durch Zink-Ionen und Ceftibuten

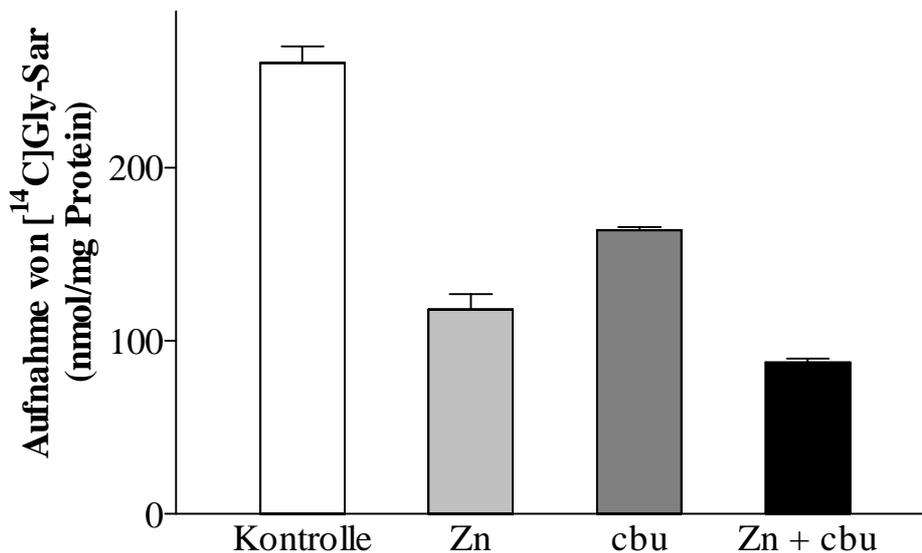


Abb. 18: Additivität der $[^{14}\text{C}]$ Gly-Sar-Aufnahmehemmung durch Zinksulfat (Zn) und Ceftibuten (cbu). (Passage 79, Versuchspuffer pH=6,0 mit 10 μM $[^{14}\text{C}]$ Gly-Sar, 150 μM Zinksulfat und/oder 300 μM Ceftibuten) (n=3)

Um herauszufinden, wie sich die Aufnahme von $[^{14}\text{C}]$ Gly-Sar verändert, wenn ein Cephalosporin und Zink-Ionen um PEPT1 konkurrieren, wurde jeweils die Aufnahme von $[^{14}\text{C}]$ Gly-Sar gemessen, wenn (a) 10 μM $[^{14}\text{C}]$ Gly-Sar, wenn (b) 10 μM $[^{14}\text{C}]$ Gly-Sar und 150 μM Zinksulfat,

wenn (c) 10 μM [^{14}C]Gly-Sar und 300 μM Ceftibuten und wenn (d) 10 μM [^{14}C]Gly-Sar, 150 μM Zinksulfat und 300 μM Ceftibuten im Versuchspuffer pH=6,0 enthalten waren. Die in **Abb. 18** dargestellten Säulen veranschaulichen die in die Zellen aufgenommenen [^{14}C]Gly-Sar-Mengen bezogen auf den Proteingehalt der Zellen. Wie erwartet hemmen Zinksulfat und Ceftibuten einzeln die [^{14}C]Gly-Sar-Aufnahme (Zinksulfat auf etwa 45% und Ceftibuten auf etwa 62%). Durch Kombination beider konnte ihre Hemmwirkung noch verstärkt werden, es konnten nur noch etwa 33% [^{14}C]Gly-Sar in die Caco-2-Zellen gelangen.

3.1.4.5 Bestimmung der Glycylsarkosin-Aufnahmekinetik mit und ohne Zink-Ionen-Zugabe

Um die Wechselwirkung von Zink-Ionen mit dem PEPT1 genauer charakterisieren zu können, wurde die Kinetik der Gly-Sar-Aufnahme mit und ohne Zugabe von Zinksulfat bestimmt. Das heißt, es wurde gemessen, wieviel von 10 μM [^{14}C]Gly-Sar bei steigender Gly-Sar-Konzentration in die Caco-2-Zellen aufgenommen wird in An- und Abwesenheit von 150 μM Zinksulfat. Die [^{14}C]Gly-Sar-Aufnahme wurde um den diffusiblen Anteil korrigiert (siehe Kapitel 2.2.3), um auf die insgesamt in die Zellen aktiv aufgenommene Gly-Sar-Menge zu schließen. In **Abb. 19** ist dieser korrigierte Gly-Sar-Gehalt in den Caco-2-Zellen in Abhängigkeit von der angebotenen Gly-Sar-Konzentration dargestellt. Die Aufnahmekurve wurde mittels Michaelis-Menten-Gleichung (6) den Meßpunkten bestmöglich angepaßt.

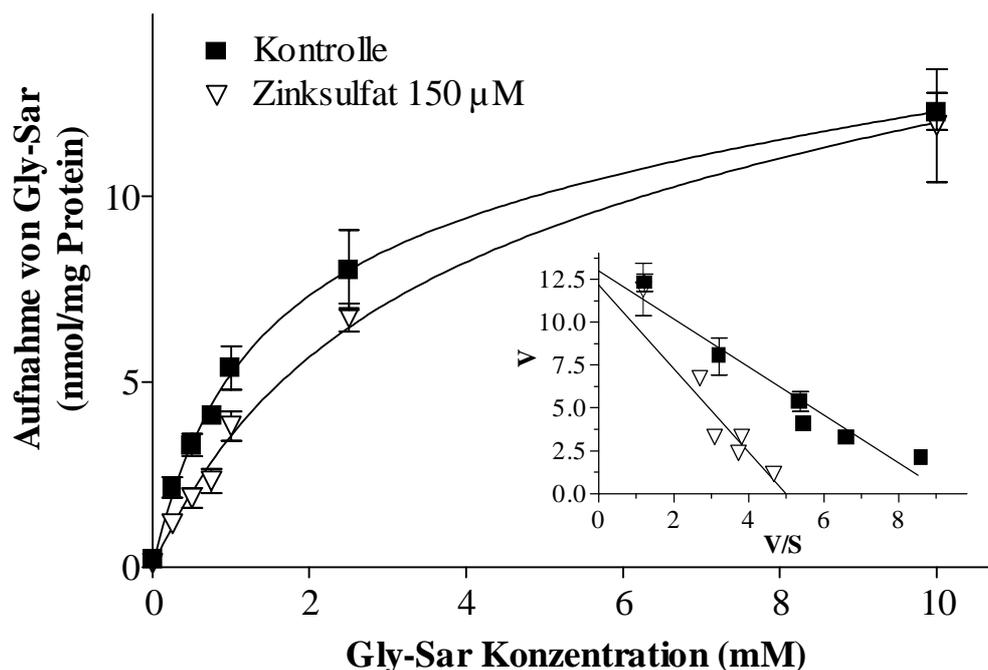


Abb. 19: Gly-Sar-Aufnahmekinetik mit und ohne Zinkzusatz. Die Aufnahmedaten sind um den diffusiblen Anteil korrigiert. Einschub: Eadie-Hofstee-Diagramm (V =Aufnahmerate von Gly-Sar ($\mu\text{mol}/(\text{mgProtein}\cdot 10\text{min})$); S =angebotene Gly-Sar-Konzentration (mM)). Die Kurvenanpassung erfolgte mit Gleichung (6) bzw. lineare Regression ($r_{\text{Kontrolle}}=0,968$; $r_{\text{Zink}}=0,883$). (Passagen 67-68; Versuchspuffer pH=6,0 mit 10 μM [^{14}C]Gly-Sar und angegebener Gly-Sar-Konzentration) ($n=4$)

Sowohl aus der Aufnahmekurve erhalten aus Michaelis-Menten-Gleichung (6) als auch aus der linearen Regression im Eadie-Hofstee-Diagramm ergab sich, daß durch Zink-Ionenzugabe die maximale Aufnahmegeschwindigkeit V_{max} nahezu unbeeinflusst bleibt (siehe **Tab. 4**).

Tab. 4: Vergleich der Auswertungen nach Michaelis-Menten und Eadie-Hoffstee

	Michaelis-Menten	Eadie-Hoffstee
$V_{max_{Kontrolle}}$ ($\mu\text{mol}/(\text{mgProtein} \cdot 10\text{min})$)	$10,8 \pm 0,3$	$11,0 \pm 1,2$
$V_{max_{Zink}}$ ($\mu\text{mol}/(\text{mgProtein} \cdot 10\text{min})$)	$11,8 \pm 0,6$	$11,1 \pm 4,1$
$K_t_{Kontrolle}$ (mM)	$1,2 \pm 0,1$	$1,1 \pm 0,2$
K_t_{Zink} (mM)	$2,6 \pm 0,3$	$2,2 \pm 1,1$

3.1.4.6 Ermittlung der Fluxbeeinflussung ausgewählter Cephalosporine durch Zink-Ionen

Mit den bisherigen Versuchen wurde nachgeprüft, inwiefern Zink-Ionen und andere Schwermetall-Ionen mit PEPT1 in Wechselwirkung treten und dadurch die [^{14}C]Gly-Sar-Aufnahme beeinträchtigen. Im Folgenden wurde getestet, ob der Cephalosporintransport durch Zink-Zusatz gestört wird. Dazu wurde der transepitheliale Flux der Cephalosporine mit und ohne Zink-Zusatz durch die Caco-2-Zellschicht bestimmt.

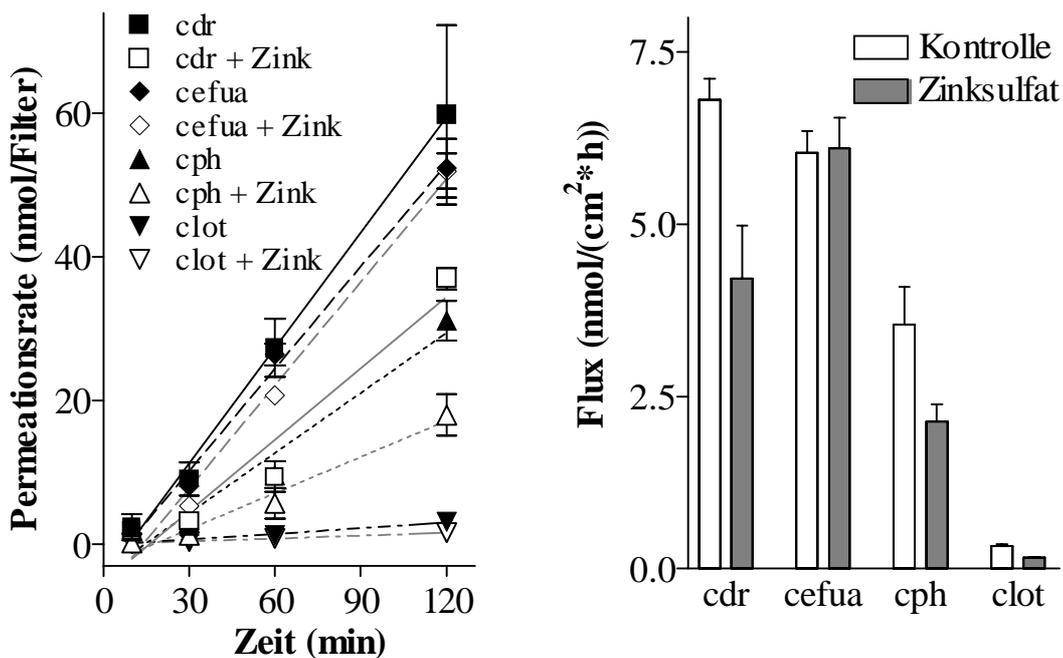


Abb. 20: Einfluß der Zugabe von Zinksulfat auf den Flux von Cefadroxil (cdr), Cefuroximaxetil (cefua), Cephalexin (cph) und Cephalotin (clot). Links: zeitlicher Konzentrationsverlauf im Akzeptor. Rechts: aus den Anstiegen ($r > 0,968$) mittels Gleichung (8) errechnete Fluxe. (Passagen 81-89; Versuchspuffer im Donator pH=6,0 mit 1 mM Cephalosporin mit bzw. ohne 1 mM Zinksulfat; Versuchspuffer im Akzeptor pH=7,5) (n=4)

Stellvertretend für die bisher betrachteten β -Lactamantibiotika wurden Cefadroxil und Cephalexin als Cephalosporine mit einer freien Aminogruppe und einer freien Carboxylgruppe, Cephalotin als Cephalosporin mit einer freien Carboxylgruppe und Cefuroximaxetil als Cephalosporin ohne freie Aminogruppe und ohne freie Carboxylgruppe ausgewählt. Die Permeationsraten

wurden jeweils nach 1 mM Angebot an Cephalosporin im Donator (pH=6,0) nach 0 bis 120 min im Akzeptor (pH=7,5) bestimmt. Parallel dazu wurden die Permeationsraten auf gleiche Weise ermittelt, jedoch wurde dem Donator noch 1 mM Zinksulfat zugesetzt. In **Abb. 20** sind die Resultate gezeigt. Im linken Diagramm sind die gemessenen Konzentrationen im Akzeptor gegen die Zeit aufgetragen. Die durch lineare Regression ermittelten Anstiege führen mittels Gleichung (8) zu den rechts abgebildeten Fluxen. Es ist erkennbar, daß die Fluxe von Cefadroxil, Cephalixin und Cephalotin durch den Zink-Ionenzusatz um mehr als ein Drittel gesenkt wurden, während der Flux von Cefuroximaxetil nahezu unbeeinflusst bleibt (Unterschied ist nicht signifikant).

3.2 Untersuchungen zur passiven Diffusion

Mit den bisher dargestellten Versuchen wurde der aktive Transportmechanismus von β -Lactamantibiotika mittels H^+ /Peptid-Symporters PEPT1 in Enterozyten charakterisiert. Da bei der Mehrzahl der β -Lactamantibiotika die passive Diffusion als Permeationsmöglichkeit im Vordergrund steht, sollte im Folgenden dieser Weg durch künstliche und biologische Membranen untersucht und eine Möglichkeit getestet werden, die passive Diffusion zu begünstigen. Dazu wurden 3 Cephalosporine ausgewählt, die zu PEPT1 keine Affinität aufweisen und sich in ihrer molekularen Struktur unterscheiden:

- Cefodizim ist mit einer 2-(2-Amino-4-thiazoyl)-2-methoxyiminoacetamido-Gruppe in Position 7 und mit einer [5(Carboxymethyl)-4-methyl-2-thiazolyl]-thio-methyl-Gruppe in Position 3 substituiert und enthält somit zwei saure Carboxylgruppen und eine basische Aminothiazolgruppe.
- Cefpirom ist ebenfalls mit einer 2-(2-Amino-4-thiazoyl)-2-methoxyiminoacetamido-Gruppe in Position 7 substituiert, so daß eine basische Aminothiazolgruppe im Molekül enthalten ist. Die quarternäre Ammoniumstruktur der (2,3-Trimethylenpyridinio)-methyl-Gruppe in Position 3 kann mit der sauren Carboxylgruppe des Cephem-Grundkörpers ein Zwitterion ausbilden.
- Cefuroxim ist in Position 7 mit einer 2-(2-Furyl)-2-methoxyiminoacetamido-Gruppe und in Position 3 mit einer Carbamoyloxymethylgruppe substituiert und hat damit eine saure Carboxylgruppe im Molekül.

Als charakteristische Größen wurden die Verteilungskoeffizienten im n-Octanol-Puffer (pH=7,5)-System und die Permeationskoeffizienten an Hand von Modellen mit künstlichen bzw. biologischen Membranen bestimmt.

Da die 3 Testcephalosporine keine Substrate von PEPT1 sind, ist die passive Diffusion der wahrscheinliche Mechanismus, der dem transepithelialen Flux durch die Caco-2-Zellschicht zu Grunde liegt (siehe Kap. 3.1.3), so daß die zu bestimmenden Koeffizienten an Hand ausgewählter Versuche jeweils in Versuchspuffern pH=6,0 und pH=7,5 durchgeführt und miteinander verglichen wurden.

3.2.1 Bestimmung der Verteilungskoeffizienten

Im n-Octanol-Puffer (pH=7,5)-System

Die Verteilungskoeffizienten der Testsubstanzen im n-Octanol-Puffer (pH=7,5)-System wurden als Maß für die Lipophilie bestimmt, die einen entscheidenden Einfluß auf die Diffusion hat. Es wurde die Verteilung der ausgewählten Cephalosporine allein oder kombiniert mit verschiede-

nen Tensiden bestimmt, wobei sich die Auswahl der eingesetzten molaren Verhältnisse zum einen nach der Anzahl der sauer bzw. basisch reagierenden Gruppen in den Cephalosporinmolekülen richtete und zum anderen nach den kritischen Micellbildungskonstanten (CMC) der Tenside. Es wurde mit mindestens jeweils einer Kombination die Verteilung der Cephalosporine in Gegenwart von Micellen bestimmt.

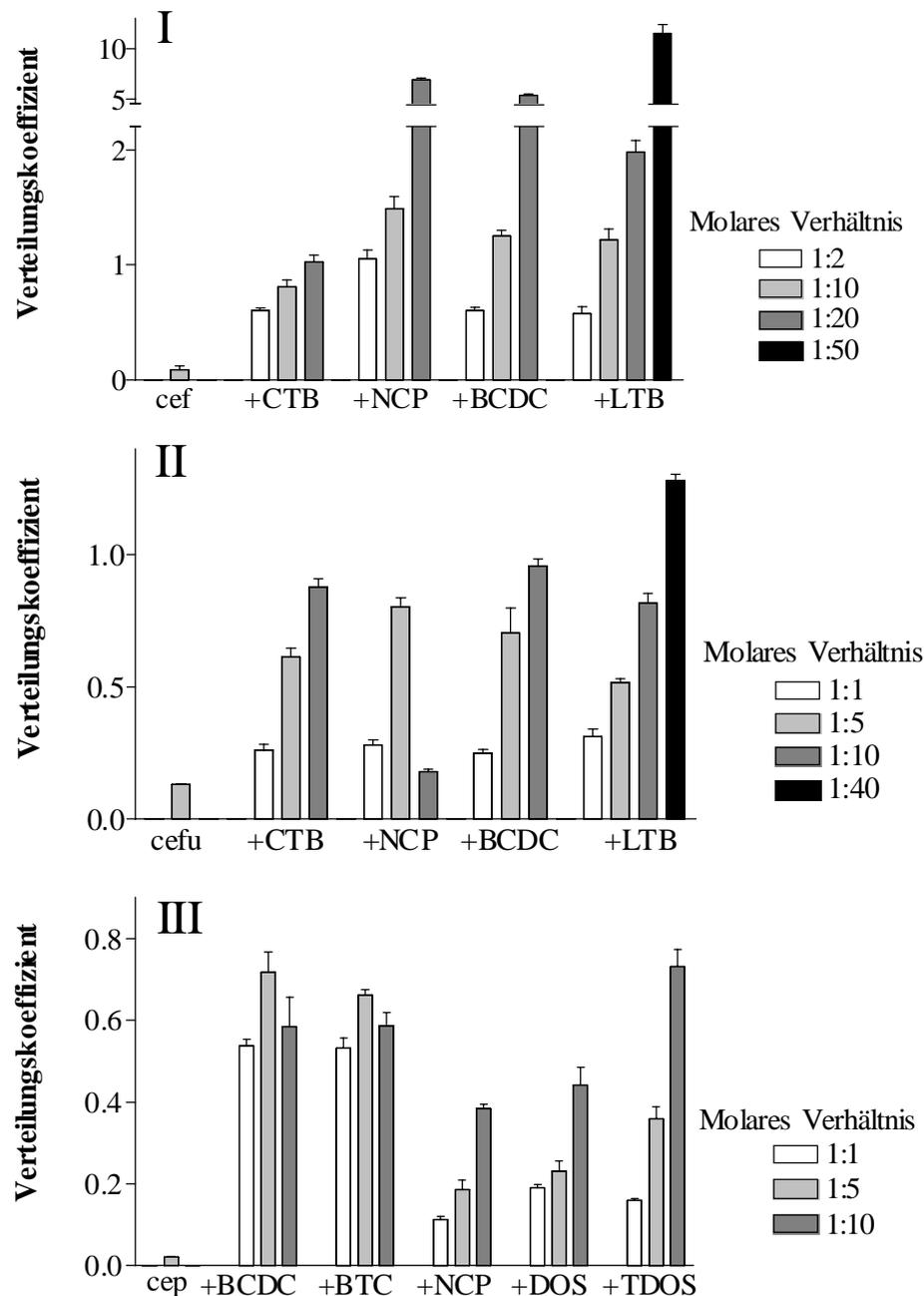


Abb. 21: Verteilungskoeffizienten im n-Octanol-Puffer (pH=7,5)-System von I:Cefodizim (cef), II:Cefuroxim (cefu) bzw. III:Cefpirom (cep) allein oder kombiniert mit ausgewählten Tensiden in unterschiedlichen molaren Verhältnissen. Tenside: Benzyltriethylammoniumchlorid (BTC), Benzylcetyldimethylammoniumchlorid (BCDC), Cetyltrimethylammoniumbromid (CTB), Lauryltrimethylammoniumbromid (LTB), N-Cetylpyridiniumbromid (NCP), Desoxycholat-Na (DOS) und Taurodesoxycholat-Na (TDOS). Das größte molare Verhältnis lag jeweils oberhalb der CMC der Tenside. (Ausgangskonzentration der Cephalosporine war jeweils 200 µg/ml. n=6)

In **Abb. 21** sind auszugsweise die Verteilungskoeffizienten der in Zusammenarbeit mit Mrestani (ebenfalls Arbeitsgruppe Neubert, Institut für Pharmazeutische Technologie und Biopharmazie in Halle) getesteten Cephalosporin-Tensid-Kombinationen dargestellt, die die größten Lipophilieveränderungen hervorgerufen haben und deshalb in die nachfolgenden Betrachtungen eingegangen sind.

Die 3 untersuchten Cephalosporine sind wie alle β -Lactamantibiotika (abgesehen von Prodrugs) sehr hydrophil, wie es auch die verhältnismäßig kleinen Verteilungskoeffizienten von 0,08 für Cefodizim, 0,13 für Cefuroxim und 0,02 für Cefpirom zeigen. Mit Cefodizim kombinierte gleichionige Zusätze wie z.B. Taurodesoxycholat oder Desoxycholat (in **Abb. 21** nicht dargestellt) konnten die Verteilung des Cefodizims zu Gunsten der lipophilen Phase nicht beeinflussen, während die gezeigten gegenionigen Tenside (siehe **Abb. 21/I**) die Anreicherung im n-Octanol zum Teil erheblich steigern konnten. Die Verteilungskoeffizienten wurden bei steigendem molarem Verhältnis signifikant größer auch in Gegenwart von Micellen. In den molaren Verhältnissen unterhalb der CMC der Tenside konnten die Lipophilie von Cefodizim zwischen 7-fach (in Kombination mit Cetyltrimethylammoniumbromid, Benzylcetyldimethylammoniumchlorid bzw. Lauryltrimethylammoniumbromid jeweils 1:2) und 25-fach gesteigert werden (Cefodizim in Kombination mit Lauryltrimethylammoniumbromid 1:20). In den Kombinationen mit Tensiden oberhalb deren CMC kam es zu einer sprunghaften Vergrößerung der Verteilungskoeffizienten: bei N-Cetylpyridiniumbromid auf das etwa 85-fache, bei Benzylcetyldimethylammoniumchlorid auf das etwa 68-fache und bei Lauryltrimethylammoniumbromid auf das etwa 140-fache. Nur bei Cetyltrimethylammoniumbromid oberhalb der CMC blieb die Verteilung des Cefodizims im Vergleich zur Verteilung in Kombination mit den dargestellten Tensiden unterhalb deren CMC im gleichen Bereich.

Die Kombination des Cefuroxims mit anionischen Tensiden war wie auch beim Cefodizim ohne Einfluß auf dessen Verteilung zwischen Puffer (pH=7,5) und n-Octanol. Die kationischen Tenside hingegen bewirkten auch hierbei eine konzentrationsabhängige Lipophilieerhöhung für Cefuroxim (siehe **Abb. 21/II**), die Unterschiede waren signifikant. Unterhalb der CMC der Tenside lagen die Ergebnisse im Bereich von einer 2-fachen Steigerung (Cefuroxim in Kombination mit Benzylcetyldimethylammoniumchlorid 1:2) bis zu einer 8-fachen Steigerung (Cefuroxim in Kombination mit N-Cetylpyridiniumbromid 1:10). Oberhalb der CMC von N-Cetylpyridiniumbromid sank die Lipophilieerhöhung wieder auf das 1,5-fache, während bei den anderen Tensiden die Verteilungskoeffizienten von Cefuroxim weiter zunahmen bis auf das 10-fache.

Bei Cefpirom führten sowohl anionische als auch kationische Tenside zur Lipophilieerhöhung. In Kombination mit N-Cetylpyridiniumbromid, Desoxycholat-Na und Taurodesoxycholat-Na wurden die Verteilungskoeffizienten unabhängig von der CMC bei Konzentrationszunahme signifikant größer, während das Vorhandensein von Micellen aus Benzyltriethylammoniumchlorid bzw. Benzylcetyldimethylammoniumchlorid die weitere Zunahme der Lipophilie verhinderte. Die Verteilungskoeffizienten von Cefpirom in Kombination mit Tensiden waren zwischen 5-mal (mit N-Cetylpyridiniumbromid 1:2) und 35-mal (mit Taurodesoxycholat-Na 1:10) größer.

Vergleich der Verteilungskoeffizienten im n-Octanol-Puffer-System bei pH=6,0 bzw. pH=7,5 in der wäßrigen Phase

Der Einfluß der pH-Verhältnisse im Puffer (pH=6,0 bzw. pH=7,5) des n-Octanol-Puffer-Systems auf die Verteilung wurde an Hand der Kombination von Cefodizim mit Lauryltrimethylammoniumbromid in verschiedenen molaren Verhältnissen überprüft. In **Abb. 22** sind die resultierenden Verteilungskoeffizienten bei pH=6,0 bzw. pH=7,5 jeweils nebeneinander dargestellt.

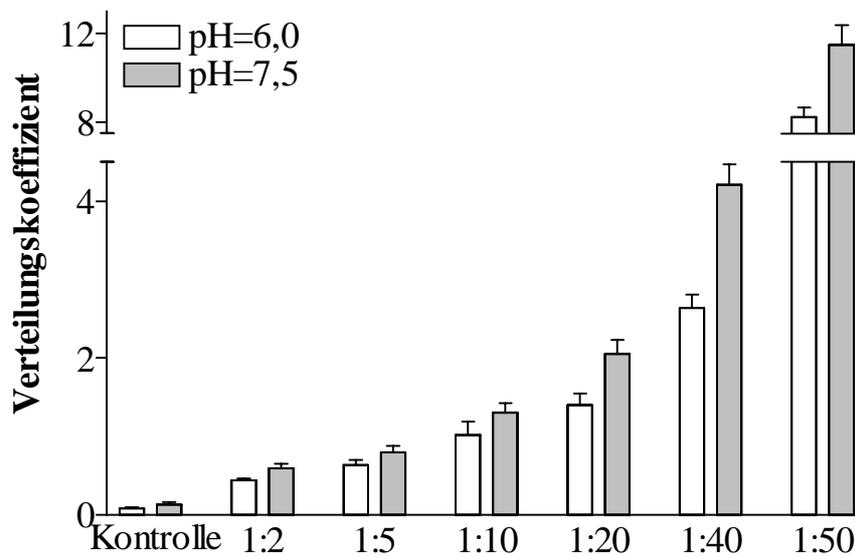


Abb. 22: Verteilungskoeffizienten bei pH=6,0 bzw. pH=7,5 in der wäßrigen Phase von Cefodizim allein oder kombiniert mit Lauryltrimethylammoniumbromid in verschiedenen molaren Verhältnissen
(Ausgangskonzentration des Cefodizims war jeweils 200 µg/ml. n=4)

Die Verteilung des Cefodizims wird in Kombination mit Lauryltrimethylammoniumbromid auch bei einem pH-Wert pH=6,0 in der wäßrigen Phase zu Gunsten der lipophilen Phase verschoben, jedoch ist die Lipophiliesteigerung bei pH=7,5 etwa 1,2-1,5 Mal stärker (signifikant).

3.2.2 Bestimmung der Permeationskoeffizienten an Hand des Permeationsmodells mit Dodecanol-Collodium-Membranen

Permeation bei pH=7,5 im Donatorkompartiment

Mit dem Permeationsmodell, bei dem Donator und Akzeptor durch eine Dodecanol-Collodium-Membran getrennt sind, stand ein einfaches Modellsystem zur Verfügung, mit dem die Permeation der 3 Testcephalosporine allein und in Kombination mit den oben aufgeführten Tensiden untersucht werden konnte. Bei gleicher Ausgangskonzentration der Cephalosporine wurden die molaren Verhältnisse der Tenside variiert. Die jeweils zu verschiedenen Zeiten gemessenen in die Akzeptoren diffundierten Cephalosporinmengen sind in den **Abb. 23-25/I** graphisch dargestellt. Aus der mittleren Permeationsrate pro Zeit, das heißt, den Anstiegen der linearen Regressionen, konnten mit Gleichung (10) die Permeationskoeffizienten als Maß für die Membrangängigkeit berechnet werden (siehe **Abb. 23-24/II**). Weiterhin sind in den **Abb. 23-25/III** die Membrangehalte der jeweiligen Cephalosporine nach 4-stündiger Versuchsdauer dargestellt.

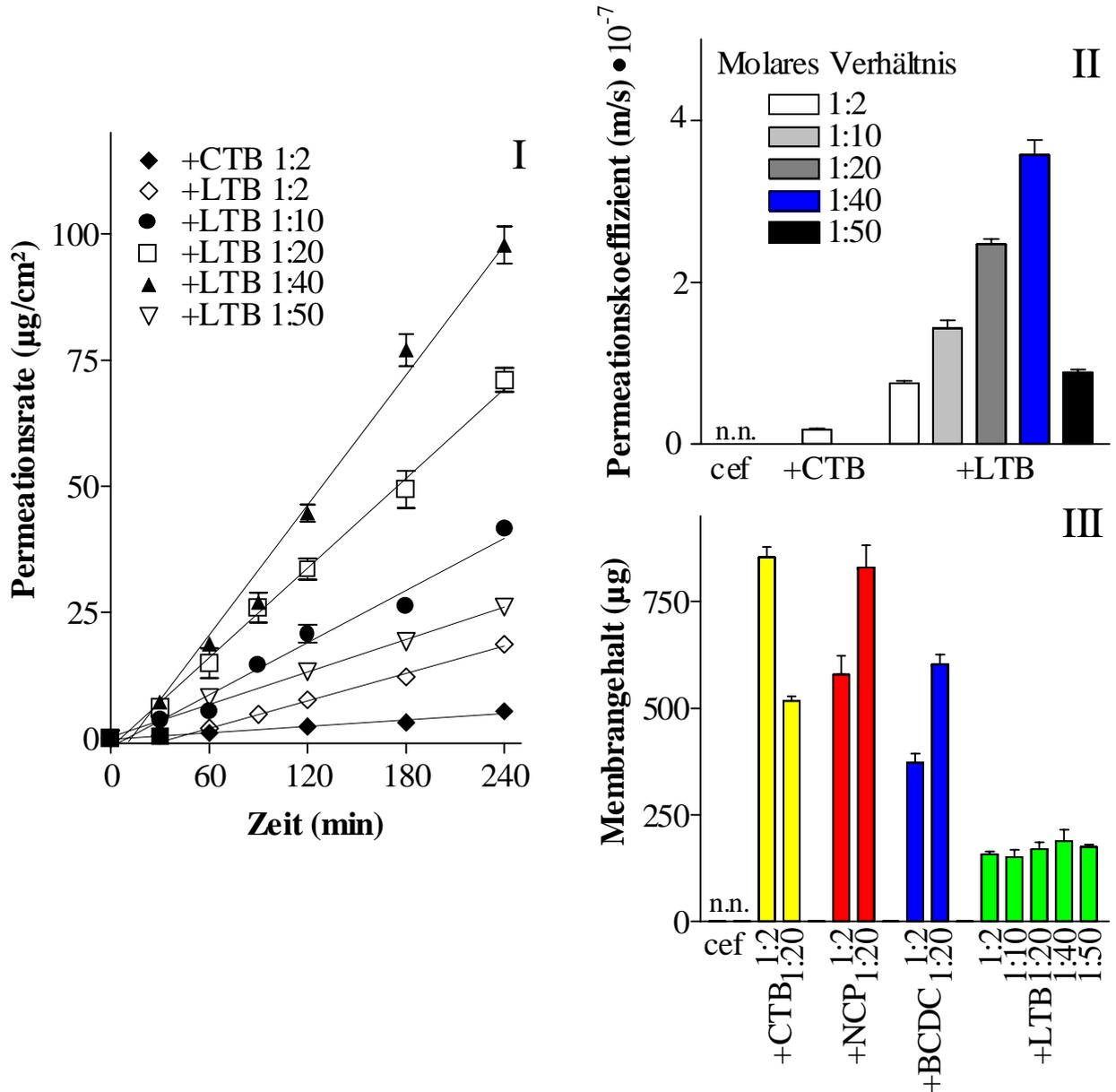


Abb. 23: Permeation durch und Membrananreicherung nach 4 h in Dodecanol-Collodium-Membranen von Cefodizim (cef) allein und kombiniert mit Tensiden.

Tenside: Cetyltrimethylammoniumbromid (CTB), N-Cetylpyridiniumbromid (NCP), Benzylcetyldimethylammoniumchlorid (BCDC) und Lauryltrimethylammoniumbromid (LTB). Im größten molaren Verhältnis liegen die Konzentrationen der Tenside jeweils oberhalb der CMC. (Ausgangskonzentration des Cefodizims war jeweils 200 µg/ml. n=8)

In **Abb. 23** sind die Ergebnisse für Cefodizim dargestellt. Mit den Versuchen ohne Tensidzusatz konnte gezeigt werden, daß Cefodizim nicht durch oder in die lipophile Membran gelangen konnte. Auch die Zugabe von Desoxycholat-Na bzw. Taurodesoxycholat-Na änderte daran nichts. In Kombination mit Lauryltrimethylammoniumbromid unterhalb dessen CMC konnten nach 4 h konzentrationsabhängig vom Tensid bis zu einer Permeationsrate von 98 µg/cm² Membranfläche Cefodizim in den Akzeptor gelangen (bei einem molaren Verhältnis von 1:40), und es ergaben sich Permeationskoeffizienten von 0,8•10⁻⁷ bis 3,5•10⁻⁷ m/s; die Unterschiede sind signifikant. Oberhalb der CMC sank die Permeationsrate nach 4h wieder auf 26 µg/cm², und der resultierende Permeationskoeffizient war mit etwa 0,9•10⁻⁷ m/s vergleichbar mit dem des mola-

ren Verhältnisses 1:2. Die Membrananreicherung nach 4h lag bei allen molaren Verhältnissen zwischen 150 und 190 µg (das entspricht 3,75 bis 4,75%), eine Konzentrationsabhängigkeit war nicht erkennbar.

In Kombination mit Cetyltrimethylammoniumbromid bei einem molaren Verhältnis von 1:2 diffundierte Cefodizim nach 4 h nur mit einer Permeationsrate von bis zu 6 µg/cm² in den Akzeptor. Oberhalb der CMC des Cetyltrimethylammoniumbromids war gar keine Membranpassage möglich. Die Membrananreicherung nach 4 h war unterhalb der CMC des Cetyltrimethylammoniumbromids signifikant größer als oberhalb der CMC.

N-Cetylpyridiniumbromid und Benzylcetyldimethylammoniumchlorid konnten für Cefodizim weder unterhalb noch oberhalb der CMC die Permeation durch die Membran ermöglichen, jedoch war auch mit diesen beiden Tensiden eine Membrananreicherung zu verzeichnen, die unterhalb der jeweiligen CMC signifikant niedriger ausfiel als oberhalb.

Cefuroxim konnte ohne Tensidzusatz in einem geringen Ausmaß durch die Dodecanol-Colloidium-Membranen diffundieren und war auch geringfügig nach 4 h in der Membran nachweisbar (siehe **Abb. 24**). Desoxycholat-Na und Taurodesoxycholat-Na konnten dieses Ergebnis nicht signifikant verändern. Alle gegenionigen Tensidzusätze erhöhten sowohl das Ausmaß der Membranpassage als auch der Membrananreicherung signifikant. Unterhalb der CMC der Tenside war jeweils die Permeationsrate signifikant größer (nach 4 h im Bereich von 18 µg/cm² mit Lauryltrimethylammoniumbromid im molaren Verhältnis 1:1 bis 42 µg/cm² mit Lauryltrimethylammoniumbromid 1:10) als oberhalb der CMC (nach 4 h im Bereich von 4 µg/cm² mit N-Cetylpyridiniumbromid 1:10 bis 10 µg/cm² mit Benzylcetyldimethylammoniumchlorid 1:10). Die resultierenden Permeationskoeffizienten lagen zwischen $0,5 \cdot 10^{-7}$ m/s für Cefuroxim allein und $14 \cdot 10^{-7}$ m/s für Cefuroxim mit Lauryltrimethylammoniumbromid 1:10, so daß maximal eine 28-fache Permeationssteigerung zu verzeichnen war.

Die Membrananreicherung war in Kombination mit Cetyltrimethylammoniumbromid und Lauryltrimethylammoniumbromid unter- und oberhalb deren CMC nicht signifikant verschieden. Bei Zusatz von N-Cetylpyridiniumbromid und Benzylcetyldimethylammoniumchlorid war unterhalb der CMC der Tenside der größte Cefuroximgehalt (20 mal größer als ohne Zusatz) in der Membran und signifikant mehr Cefuroxim als oberhalb deren CMC nachweisbar.

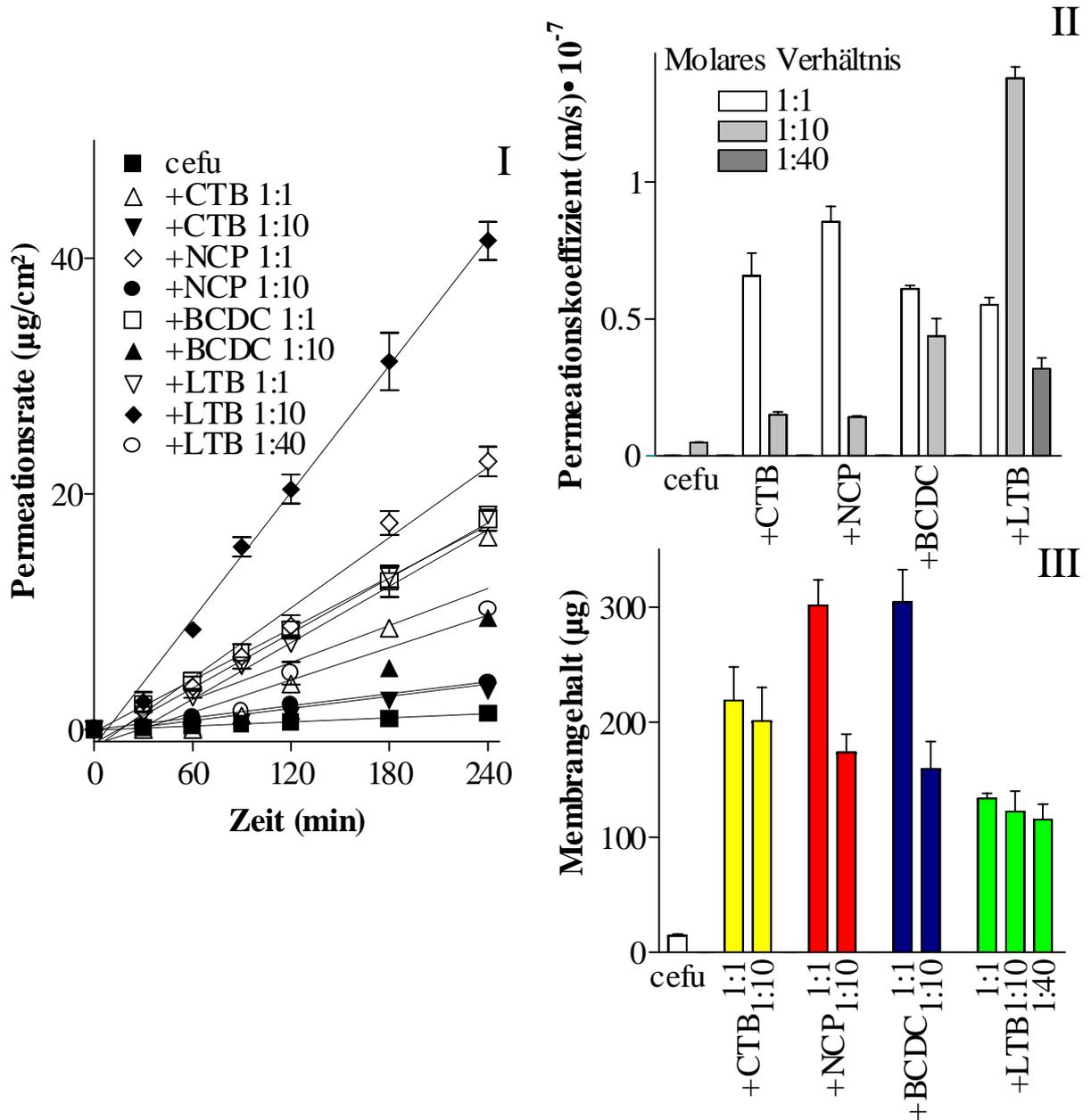


Abb. 24: Permeation durch und Membranenreicherung nach 4 h in Dodecanol-Colloidum-Membranen von Cefuroxim (cefu) allein und kombiniert mit Tensiden
Tenside: Cetyltrimethylammoniumbromid (CTB), N-Cetylpyridiniumbromid (NCP), Benzylcetyldimethylammoniumchlorid (BCDC) und Lauryltrimethylammoniumbromid (LTB). Im größten molaren Verhältnis liegen die Konzentrationen der Tenside jeweils oberhalb der CMC. (Ausgangskonzentration des Cefuroxims war jeweils 200 µg/ml. n=8)

Wie in **Abb. 25** dargestellt, konnte Cefpirom nur in Kombination mit N-Cetylpyridiniumbromid unterhalb dessen CMC mit einer Permeationsrate von 5 µg/cm² nach 4 h in den Akzeptor gelangen. Daraus resultierte ein Permeationskoeffizient von 0,19*10⁻⁷ m/s. Alle anderen sowohl kationischen als auch anionischen Tenside verursachten lediglich eine Anreicherung von Cefpirom in der Membran, wogegen Cefpirom ohne Zusatz dort nicht nachweisbar war. In Kombination mit Benzylcetyldimethylammoniumchlorid und N-Cetylpyridiniumbromid hatte sich oberhalb deren CMC signifikant mehr Cefpirom in der Membran angereichert als unterhalb. Mit Benzyltriethylammoniumchlorid, Desoxycholat-Na und Taurodesoxycholat-Na war der Unterschied

umgekehrt. Die geringsten Membrangehalte verursachten für Cefpirom Desoxycholat-Na und Taurodesoxycholat-Na, der größte Membrangehalt war mit 520 µg Cefpirom in der Kombination mit Benzyltriethylammoniumchlorid im molaren Verhältnis 1:1 feststellbar.

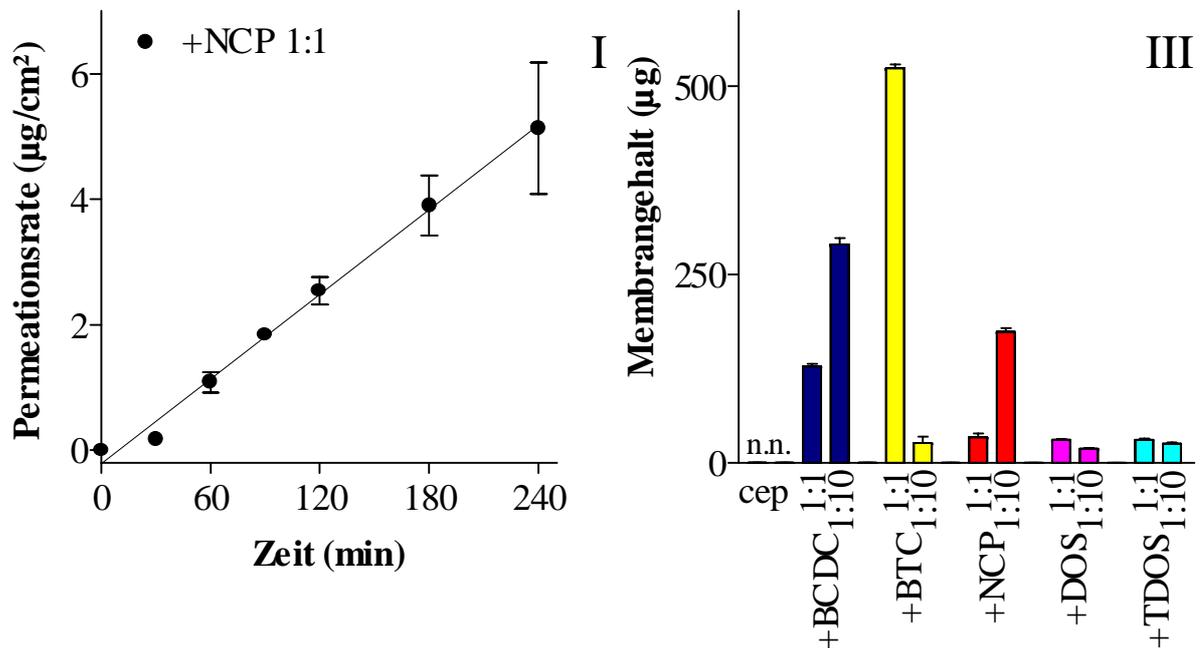


Abb. 25: Permeation durch und Membrananreicherung nach 4 h in Dodecanol-Collodium-Membranen von Cefpirom (cep) allein und kombiniert mit Tensiden
Tenside: Benzylcetyldimethylammoniumchlorid (BCDC), Benzyltriethylammoniumchlorid (BTC), N-Cetylpyridiniumbromid (NCP), Desoxycholat-Na (DOS) und Taurodesoxycholat-Na (TDOS). Im größten molaren Verhältnis liegen die Konzentrationen der Tenside jeweils oberhalb der CMC. (Ausgangskonzentration des Cefpiroms war jeweils 200 µg/ml. n=8)

Vergleich der Permeation bei pH=6,0 bzw. pH=7,5 im Donatorkompartiment

Aus dem gleichen Grund wie beim Verteilungsverhalten im n-Octanol-Puffer-System wurde an Hand des Permeationsmodells mit künstlicher Lipidmembran überprüft, wie sich der pH-Wert pH=6,0 im Donator auf die Permeation auswirkt, und mit den Ergebnissen bei pH=7,5 verglichen. Dazu wurde wieder stellvertretend die Kombination von Cefodizim mit Lauryltrimethylammoniumbromid ausgewählt jedoch nur in den molaren Verhältnissen 1:2 und 1:20.

Wie in **Abb. 26** dargestellt, ermöglichte die Kombination mit Lauryltrimethylammoniumbromid für Cefodizim auch bei pH=6,0 im Donator die Diffusion durch die Dodecanol-Membranen in den Akzeptor, jedoch waren auch bei diesem Modellsystem die Resultate (hier sowohl die Permeationsraten als auch die Membrangehalte nach 4h) bei pH=7,5 um das 1,2-fache bis 1,5-fache größer (signifikant).

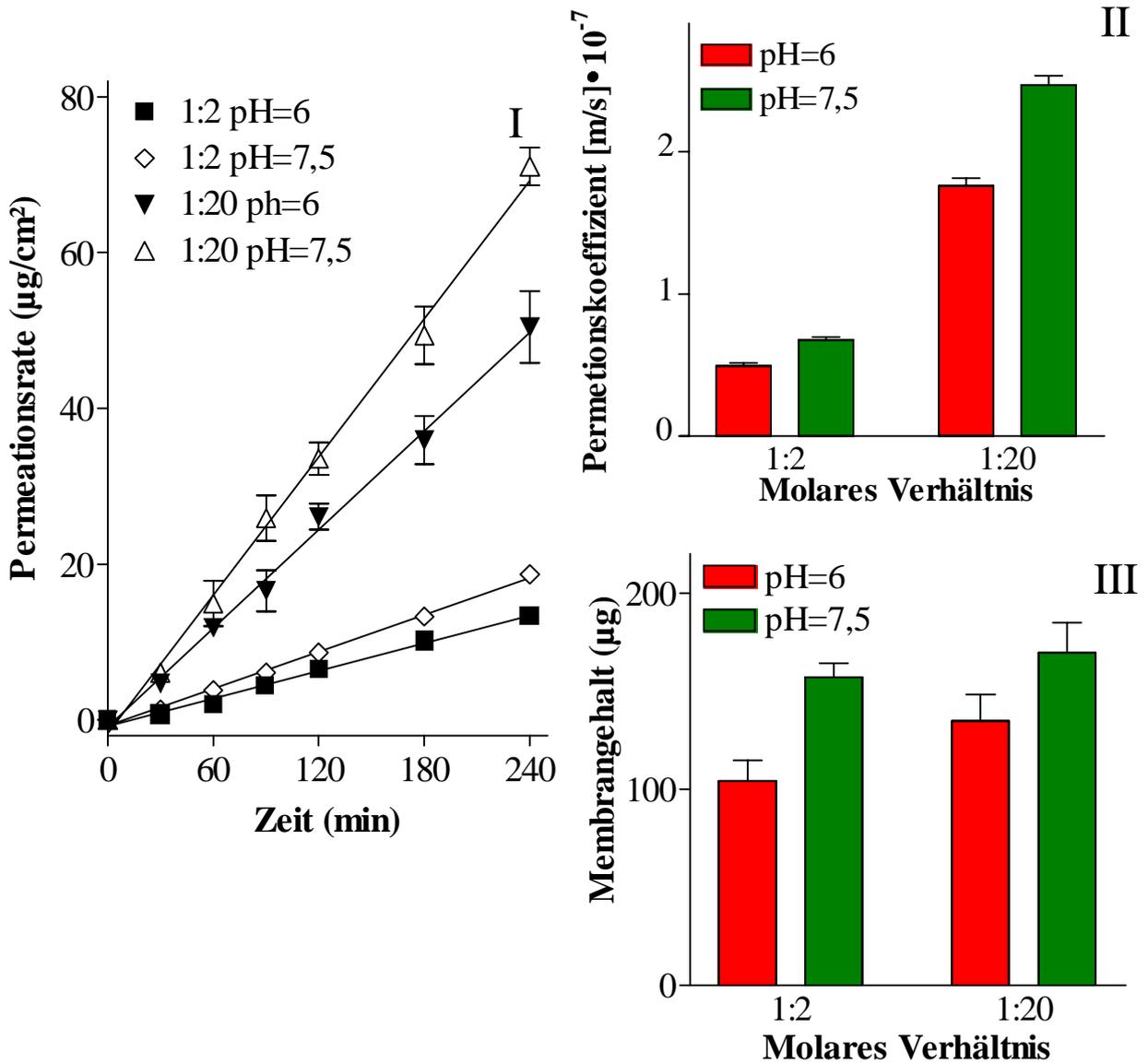


Abb. 26: Permeation durch und Membrananreicherung nach 4 h in Dodecanol-Colloidium-Membranen von Cefodizim (cef) kombiniert mit Lauryltrimethylammoniumbromid bei pH=6,0 und pH=7,5 im Donator. (Ausgangskonzentration des Cefodizims war jeweils 200 µg/ml. n=8)

3.2.3 Bestimmung der Permeationskoeffizienten an Hand des Permeationsmodells mit isoliertem Meerschweinchen-Dünndarm

Permeation bei pH=7,5 im Donatorkompartiment

Für die Untersuchung der Permeationsbeeinflussung der Cephalosporine durch Tensidzusatz wurde im Weiteren ein Modellsystem, bei dem Donatoren und Akzeptoren durch isolierte Meerschweinchen-Dünndarmsegmente getrennt sind, verwendet. Auch bei diesen Versuchen wurde der zeitliche Verlauf der Cephalosporinkonzentrationszunahme in den Akzeptoren überprüft, nachdem in den Donatoren jeweils die gleiche Cephalosporinkonzentration kombiniert mit variierenden Tensidmengen angeboten wurden. In den **Abb. 27-29** sind jeweils die Ergebnisse dargestellt: Im Teil I die korrigierten Cephalosporinmengen bezogen auf die Membranfläche

gegen die Zeit, im Teil II die aus Gleichung (10) resultierenden Permeationskoeffizienten und im Teil III die Gehalte in Schleimhaut und Bindegewebe nach Versuchsende.

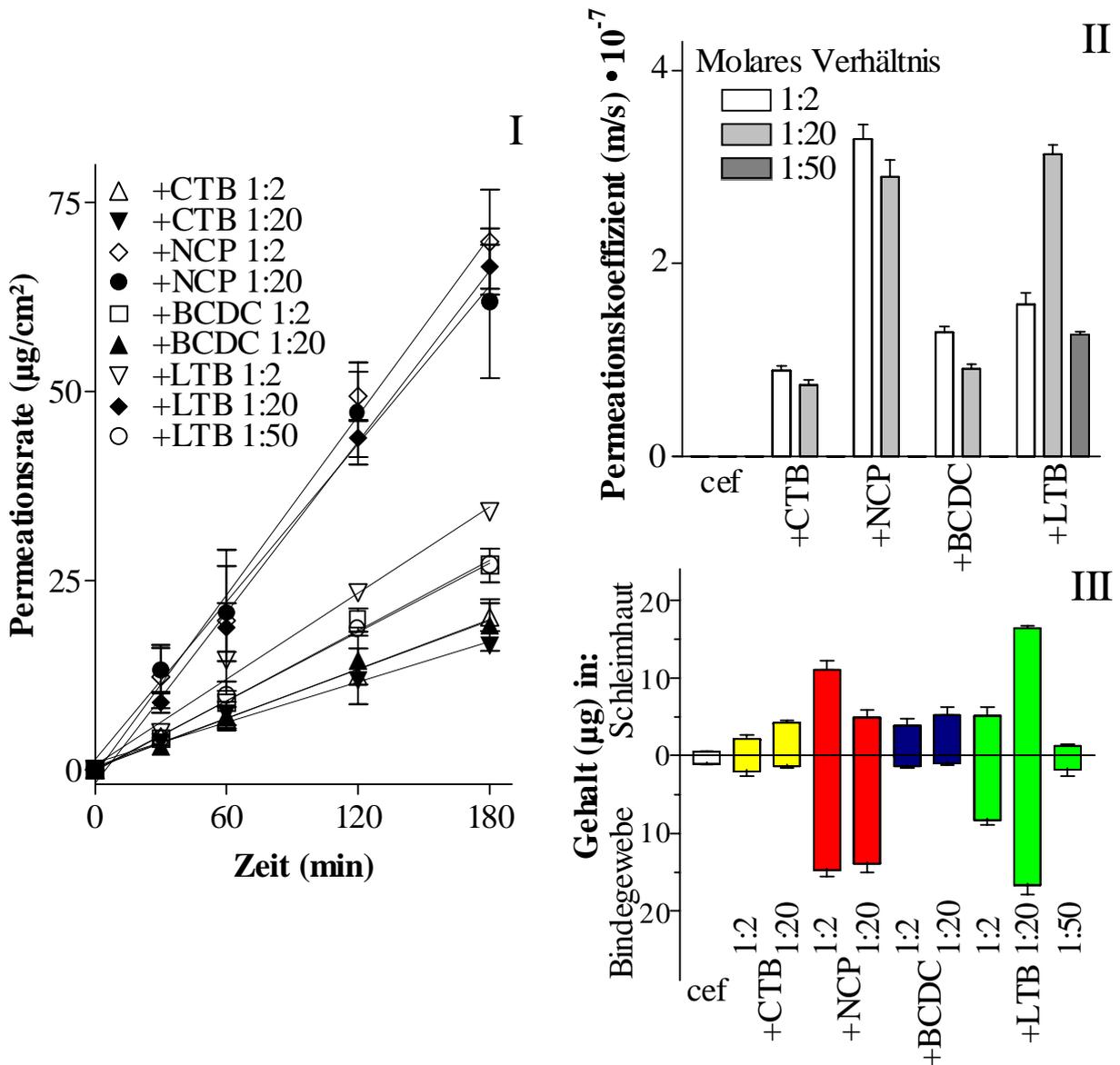


Abb. 27: Permeation durch und Anreicherung nach 3 h in den Darmschichten von Cefodizim (cef) allein und kombiniert mit Tensiden. Tenside: Cetyltrimethylammoniumbromid (CTB), N-Cetylpyridiniumbromid (NCP), Benzylcetyldimethylammoniumchlorid (BCDC) und Lauryltrimethylammoniumbromid (LTB). Im größten molaren Verhältnis liegen die Konzentrationen der Tenside jeweils oberhalb der CMC. (Ausgangskonzentration des Cefodizims war jeweils 200 µg/ml. n=8)

Cefodizim (siehe **Abb. 27**) konnte allein nicht in die Akzeptoren gelangen, jedoch war sowohl in der Schleimhaut als auch im Binde- und Muskelgewebe 0,5 bzw. 1,1 µg Cefodizim nach 3 h nachweisbar. Auch an Hand dieses Modellsystems konnten sowohl Desoxycholat-Na als auch Taurodesoxycholat-Na dieses Ergebnis nicht signifikant verändern. Die 4 getesteten kationischen Tenside ermöglichten alle für Cefodizim die Diffusion in die Akzeptoren, die unterhalb der CMC der Tenside ein signifikant größeres Ausmaß erreichte als oberhalb deren CMC. Die größte Permeationsrate erreichte N-Cetylpyridiniumbromid unterhalb der CMC mit etwa 70 µg/cm² Cefodizim nach 3 h, die geringste Permeationsrate war in Kombination mit Cetyltri-

methylammoniumbromid oberhalb dessen CMC zu verzeichnen mit etwa $16 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ Cefodizim nach 3 h, so daß die Permeationskoeffizienten im Bereich von $0,7$ bis $2,9 \cdot 10^{-7}$ m/s lagen.

Die Anreicherung von Cefodizim in den Darmschichten konnte zum Teil durch die Tenside erheblich gesteigert werden, in den Schleimhautstücken waren die Steigerungen mit allen Tensiden signifikant. Lauryltrimethylammoniumbromid im Verhältnis 1:20 erreichte mit etwa $16 \mu\text{g}$ Cefodizim das größte Ausmaß gefolgt von N-Cetylpyridiniumbromid im Verhältnis 1:2 mit $11 \mu\text{g}$. Mit diesen beiden Tensiden war die Anreicherung von Cefodizim in der Schleimhaut oberhalb der CMC der Tenside geringer als oberhalb. Mit Cetyltrimethylammoniumbromid und Benzylcetyldimethylammoniumchlorid war es umgekehrt. In den abgetrennten Bindegewebe- und Muskelschichten war die Steigerung des Cefodizimgehalts durch Kombination mit Tensiden außer in Kombination mit Cetyltrimethylammoniumbromid 1:20 und mit Benzylcetyldimethylammoniumchlorid signifikant. Bei allen Tensiden wirkte sich das Vorhandensein von Micellen in Bezug auf die Anreicherung in den Bindegewebe- und Muskelschichten nachteilig aus, aber nur bei Lauryltrimethylammoniumbromid war dieser Unterschied signifikant. Wie auch in den Schleimhautstücken war auch in den Bindegewebe- und Muskelschichten der Cefodizimgehalt durch Kombination mit Lauryltrimethylammoniumbromid 1:20 am größten mit fast $17 \mu\text{g}$ gefolgt von N-Cetylpyridiniumbromid 1:2 mit fast $15 \mu\text{g}$.

Wie Cefodizim war auch Cefuroxim (siehe **Abb. 28**) bei alleinigem Angebot im Akzeptor nicht und in den Darmschichten in geringem Ausmaß nachweisbar. In der Schleimhaut ist der Gehalt signifikant höher als in den Bindegewebe- und Muskelschichten. Im Gegensatz zu den Gallensalzen Desoxycholat-Na und Taurodesoxycholat-Na konnten die kationischen Tenside für Cefuroxim die Permeation durch die Darmschichten ermöglichen, wobei sich bei diesen Zusätzen die Micellbildung nachteilig bemerkbar macht (signifikant). Das größte Ausmaß der Cefuroximpermeationsrate rief Lauryltrimethylammoniumbromid (1:10) mit rund $45 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ nach 3 h gefolgt von N-Cetylpyridiniumbromid (1:1) mit rund $35 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ hervor. Die geringste Permeationsrate wurde auch hier mit Cetyltrimethylammoniumbromid 1:10 erreicht ($13 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ nach 3 h). Die Permeationskoeffizienten lagen somit zwischen $0,6$ und $2,1 \cdot 10^{-7}$ m/s.

Die Steigerung der Darmschichtengehalte an Cefuroxim ist nur zum Teil durch Kombination mit kationischen Tensiden signifikant, in der Schleimhaut mit Cetyltrimethylammoniumbromid im molaren Verhältnis 1:10, mit N-Cetylpyridiniumbromid 1:1 und 1:10, mit Benzylcetyldimethylammoniumchlorid 1:10 und mit Lauryltrimethylammoniumbromid 1:10 und 1:40; im Bindegewebe und Muskelgewebe mit Cetyltrimethylammoniumbromid und Lauryltrimethylammoniumbromid in allen molaren Verhältnissen. Es deutet sich an, daß die Steigerung der Schleimhautgehalte unabhängig von der Micellenbildung mit zunehmender Tensidkonzentration größer werden, jedoch sind die Unterschiede nicht signifikant, auch beim Vergleich der Tenside untereinander. Die Membrangehalte schwanken um $3 \mu\text{g}$. Auch bei der Cefuroximbestimmung in den Bindegewebe- und Muskelstücken waren keine signifikanten Unterschiede zwischen den molaren Verhältnissen der Cefuroxim-Tensid-Kombinationen feststellbar, jedoch war in Kombination mit Cetyltrimethylammoniumbromid bzw. Lauryltrimethylammoniumbromid signifikant mehr Cefuroxim nachweisbar als ohne Tensid bzw. in Kombination mit N-Cetylpyridiniumbromid und Benzylcetyldimethylammoniumchlorid.

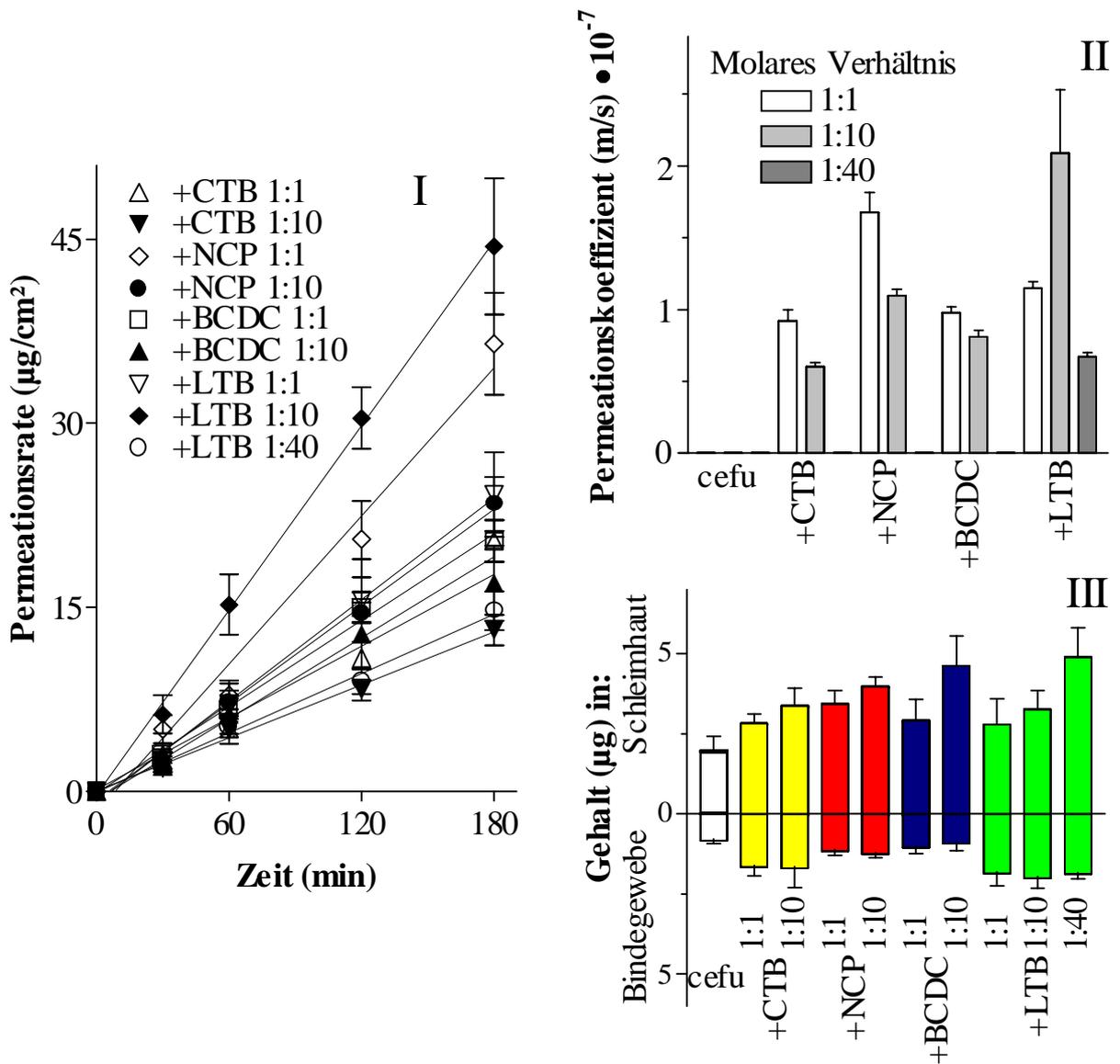


Abb. 28: Permeation durch und Anreicherung nach 3 h in den Darmschichten von Cefuroxim (cefu) allein und kombiniert mit Tensiden. Tenside: Cetyltrimethylammoniumbromid (CTB), N-Cetylpyridiniumbromid (NCP), Benzylcetyldimethylammoniumchlorid (BCDC) und Lauryltrimethylammoniumbromid (LTB). Im größten molaren Verhältnis liegen die Konzentrationen der Tenside jeweils oberhalb der CMC. (Ausgangskonzentration des Cefodizims war jeweils 200 µg/ml. n=8)

Wie in **Abb. 29** dargestellt ist, konnte Cefpirom ebenfalls die Dünndarmschichten allein nicht durchdringen, auch war nur sehr wenig in den Darmschichten nachweisbar. Wie auch mit den anderen Modellsystemen konnte auch an diesem festgestellt werden, daß sowohl anionische als auch kationische Tenside die Permeation von Cefpirom verbessern können. Alle 5 getesteten oberflächenaktiven Substanzen ermöglichten unterhalb ihrer CMC eine bessere Permeation in den Akzeptor als oberhalb, wobei die Unterschiede nur für N-Cetylpyridiniumbromid, Desoxycholat-Na und Taurodesoxycholat-Na signifikant sind. Mit Desoxycholat-Na wurde unterhalb dessen CMC die beste Permeationsrate von Cefpirom mit etwa 37 µg/cm² Permeationsfläche nach 3 h erreicht gefolgt von N-Cetylpyridiniumbromid und Taurodesoxycholat-Na jeweils unterhalb ihrer CMC mit etwa 35 µg/cm² nach 3 h. Oberhalb ihrer CMC waren in Kombination mit N-Cetylpyridiniumbromid bzw. Taurodesoxycholat-Na die schlechtesten Permeationsraten

mit etwa $15 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ nach 3 h erreicht. Es resultieren Permeationskoeffizienten im Bereich von $0,7$ bis $1,9 \cdot 10^{-7} \text{ m/s}$.

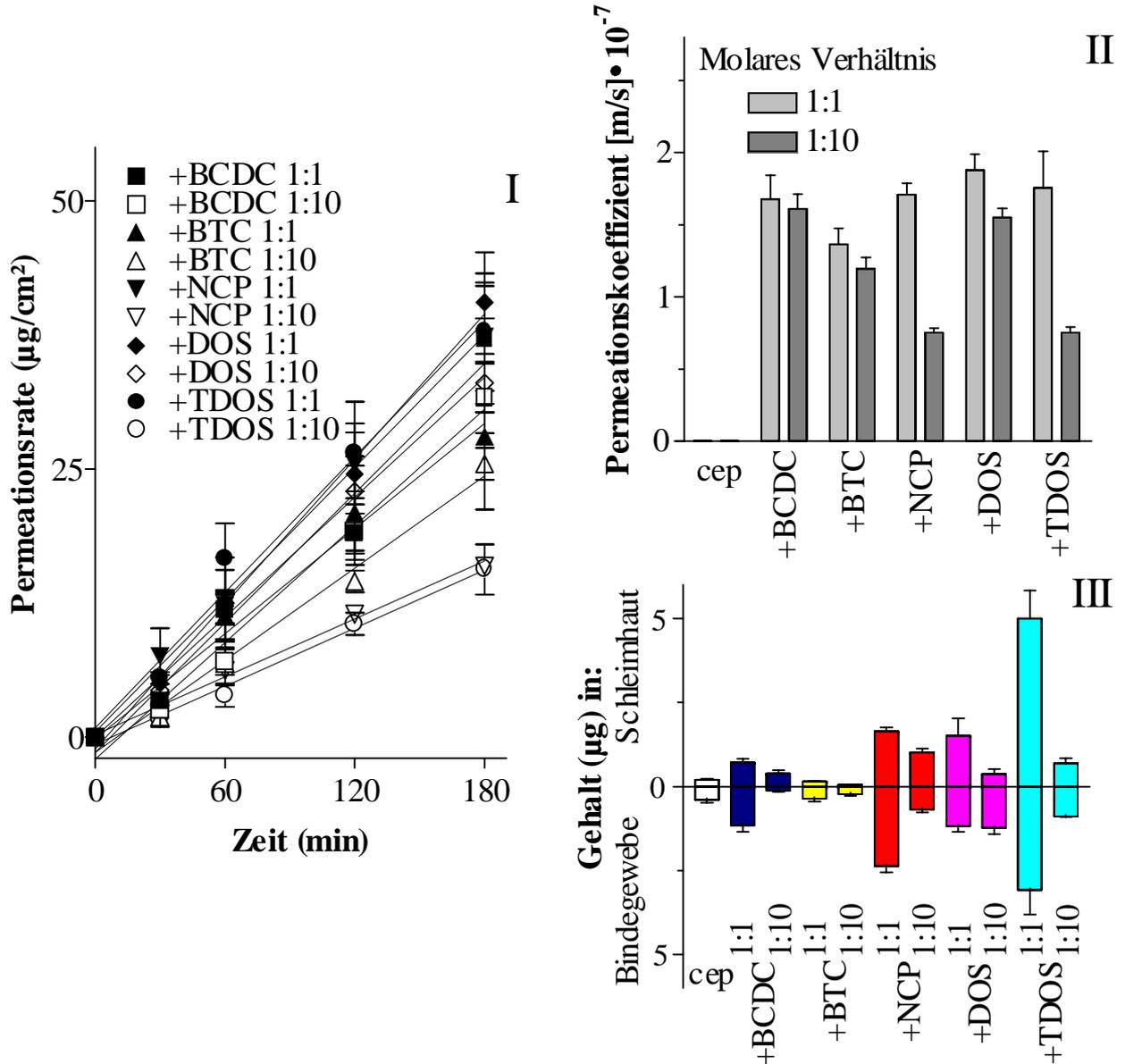


Abb. 29: Permeation durch und Anreicherung nach 3 h in den Darmschichten von Cefpirom (cep) allein und kombiniert mit Tensiden. Tenside: Benzylcetyldimethylammoniumchlorid (BCDC), Benzyltriethylammoniumchlorid (BTC), N-Cetylpyridiniumbromid (NCP), Desoxycholot-Na (DOS) und Taurodesoxycholot-Na (TDOS). Im größten molaren Verhältnis liegen die Konzentrationen der Tenside jeweils oberhalb der CMC. (Ausgangskonzentration des Cefpiroms war jeweils $200 \mu\text{g}/\text{ml}$. $n=8$)

Die Steigerungen der Cefpiromgehalte in den Darmschichten durch Tensidzusatz sind nur zum Teil signifikant: in den Schleimhautstücken mit Benzylcetyldimethylammoniumchlorid im molaren Verhältnis 1:1, mit N-Cetylpyridiniumbromid 1:1 und 1:10, mit Desoxycholot-Na 1:1 und mit Taurodesoxycholot-Na 1:1 und 1:10; in den Bindegewebe- und Muskelstücken mit Benzylcetyldimethylammoniumchlorid 1:1, mit N-Cetylpyridiniumbromid 1:1, mit Desoxycholot-Na 1:1 und 1:10 und mit Taurodesoxycholot-Na 1:1 und 1:10. Die größten Gehalte konnten sowohl in den Schleimhaut (etwa $7 \mu\text{g}$)- als auch in den Binde- und Muskelgewebestücken (etwa $5 \mu\text{g}$)

nachgewiesen werden, wenn Cefpirom mit Taurodesoxycholat-Na im Verhältnis 1:1 kombiniert wurde. In beiden isoliert analysierten Darmschichten waren die Gehalte niedriger, wenn die Tenside oberhalb ihrer CMC eingesetzt wurden, als bei den Kombinationen unterhalb der Tensid-CMC, jedoch waren die Unterschiede nur bei Benzylcetyldimethylammoniumchlorid (für Bindegewebe), N-Cetylpyridiniumbromid, Desoxycholat-Na (für Schleimhaut) und Taurodesoxycholat-Na (für Schleimhaut und Bindegewebe) signifikant.

Einfluß der Tensidzugabe auf den aktiven D-Glucosetransport

Um einschätzen zu können, ob die eingesetzten Tenside die Zellen schädigen und dadurch die Permeationssteigerung der Cephalosporine hervorrufen, mußte die Lebensfähigkeit und Funktionstüchtigkeit der Dünndarmsegmente überprüft werden. Dazu wurde untersucht, ob D-Glucose, die auf ein aktives Transportsystem angewiesen ist, die Darmschichten unter Versuchsbedingungen durchdringen kann und welchen Einfluß die Tensidzugabe darauf hat. Im ersten Schritt wurde getestet, ob D-Glucose gegen ein Konzentrationsgefälle (10 mM im Donator, 40 mM im Akzeptor) transportiert wird. Gemessen werden konnte die geringfügige Konzentrationszunahme im Akzeptor durch radioaktive Markierung. Im Einschub der **Abb. 30** ist das Ergebnis dieser Methode den Meßergebnissen gegenübergestellt, wenn im Akzeptor keine D-Glucose vorgelegt war und damit die transportierte D-Glucosemenge enzymatisch nachweisbar war. Es konnte festgestellt werden, daß die gemessenen Permeationsraten bei beiden Methoden nicht signifikant verschieden sind und daß unter den Versuchsbedingungen von Lebensfähigkeit und Funktionstüchtigkeit der Zellen ausgegangen werden kann.

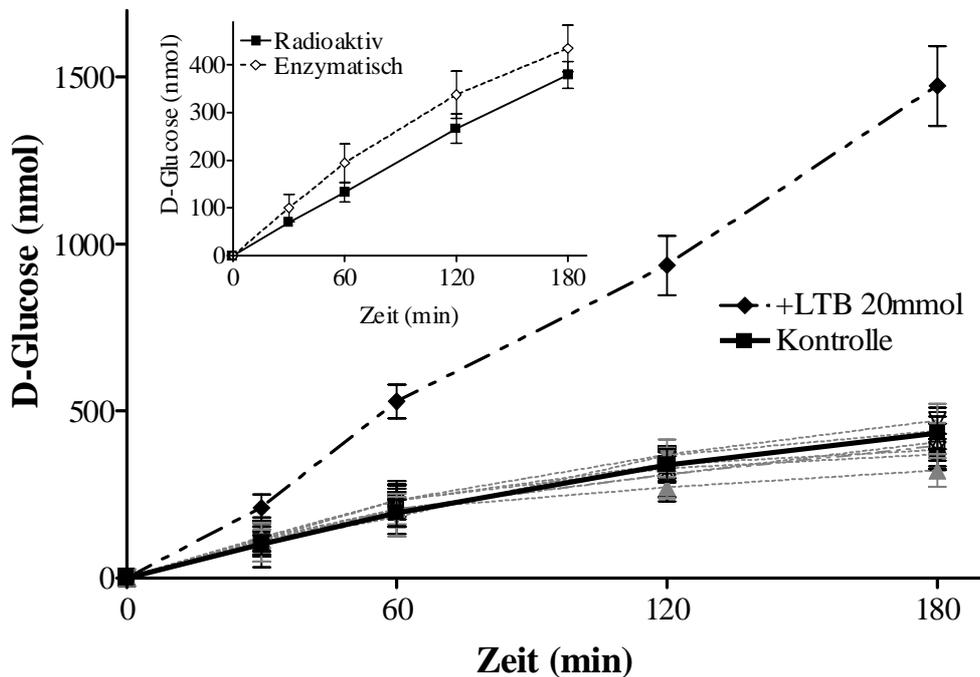


Abb. 30: Einfluß des Tensidzusatzes auf den D-Glucosetransport durch den Meer-schweinchen-Dünndarm. Einschub: Vergleich der radioaktiv markierten, zusätzlich in den Akzeptor transportierten D-Glucosemenge gegen ein Konzentrationsgefälle mit der enzymatisch nachweisbaren in den Akzeptor transportierten D-Glucosemenge ohne Konzentrationsgefälle bei gleicher Angebotskonzentration (10 mM). Getestete Tenside: Benzylcetyldimethylammoniumchlorid (5 mM), Benzyltriethylammoniumchlorid (5 mM), Cetyltrimethylammoniumbromid (5 mM), Lauryltrimethylammoniumbromid (LTB) (5 mM/20 mM), N-Cetylpyridiniumbromid (5 mM), Desoxycho-lat-Na (5 mM/15 mM), Taurodesoxycholat-Na (5 mM/15 mM). (n=4)

Mittels enzymatischer Auswertung wurde nun überprüft, welchen Einfluß zugesetzte Tenside auf den D-Glucosetransport ausüben. Wie in **Abb. 30** dargestellt ist, konnte keine signifikante Änderung des D-Glucosetransportes festgestellt werden mit einer Ausnahme: Lauryltrimethylammoniumbromid oberhalb seiner CMC (20 mM) schädigt die Zellen soweit, daß etwa die 3,5-fache D-Glucosemenge in den Akzeptor gelangt, auch war eine weiße Verfärbung der Darmschichten zu beobachten. Deshalb wurde Lauryltrimethylammoniumbromid als Modells substanz im Weiteren nicht mehr berücksichtigt.

Vergleich der Permeation bei pH=6,0 und pH=7,5 im Donatorkompartiment

Da Lauryltrimethylammoniumbromid die Dünndarmschleimhaut meßbar und sichtbar schädigt, wurde zum Vergleich der Permeation bei pH=6,0 und pH=7,5 im Donatorkompartiment die Kombination von Cefodizim und Cetyltrimethylammoniumbromid im molaren Verhältnis 1:2 herangezogen.

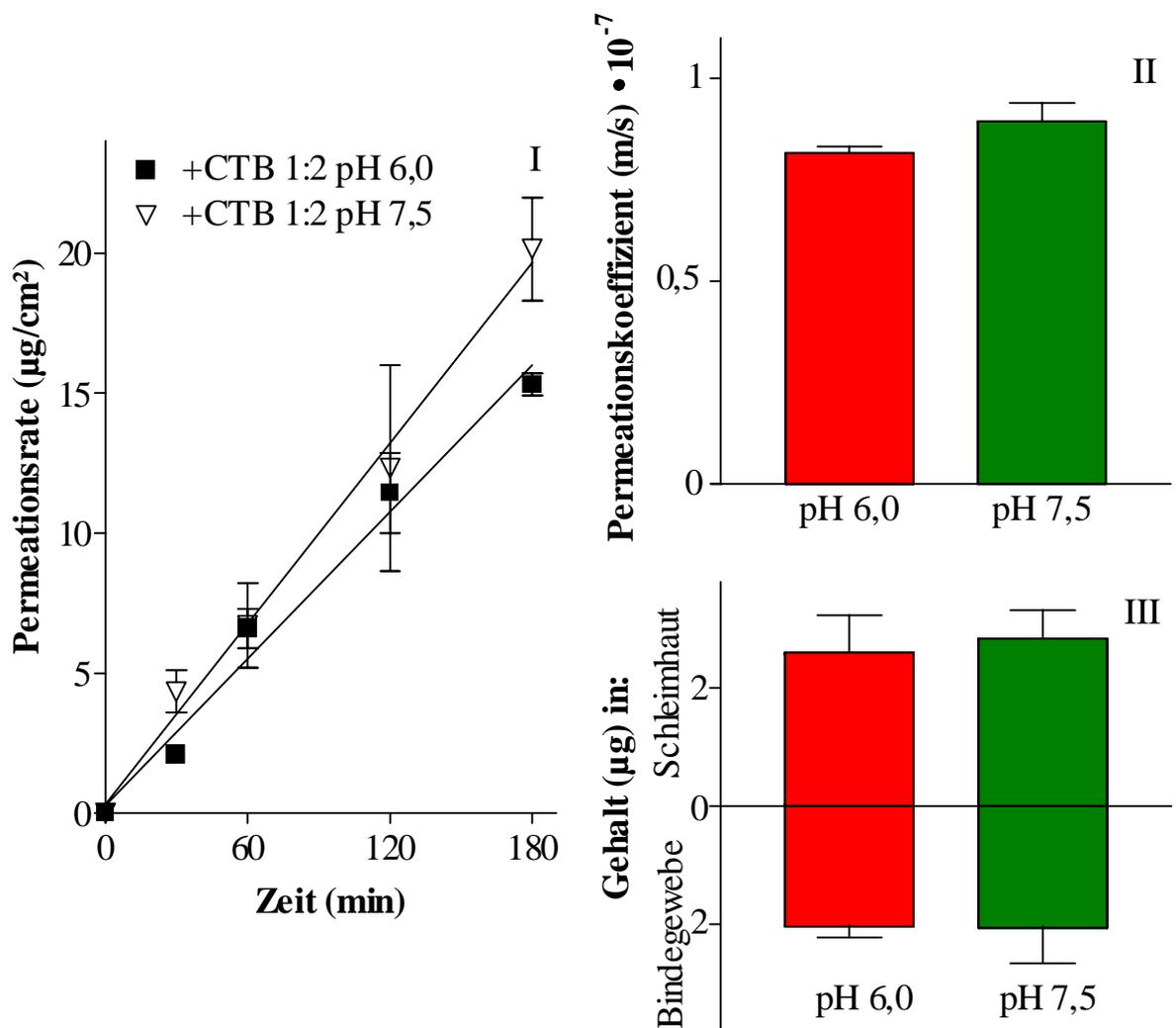


Abb. 31: Permeation durch und Anreicherung in den Darmschichten von Cefodizim (cef) kombiniert mit Cetyltrimethylammoniumbromid bei pH=6,0 und pH=7,5 im Donator. (Ausgangskonzentration des Cefodizims war jeweils 200 µg/ml. n=6)

Das Ergebnis ist in **Abb. 31** dargestellt. In der Tendenz waren sowohl die Permeation durch die als auch die Anreicherung in den Darmschichten bei pH=6,0 im Donator kleiner als bei pH=7,5, aber die Unterschiede sind nicht signifikant.

3.2.4 Bestimmung der Permeationskoeffizienten an Hand des Permeationsmodells mit Caco-2-Zellen

Bei Vorversuchen in Plastikpetrischälchen konnte beobachtet werden, daß sich die Caco-2-Zellen nach Tensideinwirkung weißlich verfärben und bei höheren Konzentrationen der Tenside von dem Plastikuntergrund ablösen, so daß die Konzentration der Testtenside bestimmt werden mußte, unterhalb der makroskopisch und mikroskopisch keine Veränderung der Caco-2-Zellschicht feststellbar war. In **Tab. 5** sind die Untersuchungsergebnisse zusammengefaßt:

Tab. 5: Makroskopische und mikroskopische Überprüfung der Tensidverträglichkeit. (am Tag 8 nach der Aussaat wurde auf Caco-2-Zellen in Petrischälchen 10 min Versuchspuffer pH=7,5 mit den Tensiden in den angegebenen Konzentrationen einwirken gelassen. Passage 56)

Konzentration	Desoxycholat-Na	Cetyltrimethylammoniumbromid	N-Cetylpyridiniumbromid
5 mM	Zellen weißlich verfärbt. Viele abgelöste Zellen im Puffer sichtbar		Zellen weißlich verfärbt. Wenig abgelöste Zellen.
1 mM	Zellen weißlich verfärbt, einige abgelöste Zellen	Zellen eingetrübt, kaum abgelöst.	Zellen leicht eingetrübt, nicht abgelöst Dome vorhanden
0,5 mM	Zellen kaum eingetrübt, nicht abgelöst, Dome vorhanden		
0,1 mM	Makroskopisch unauffällig, Dome vorhanden		

Permeation bei pH=7,5 im Versuchspuffer

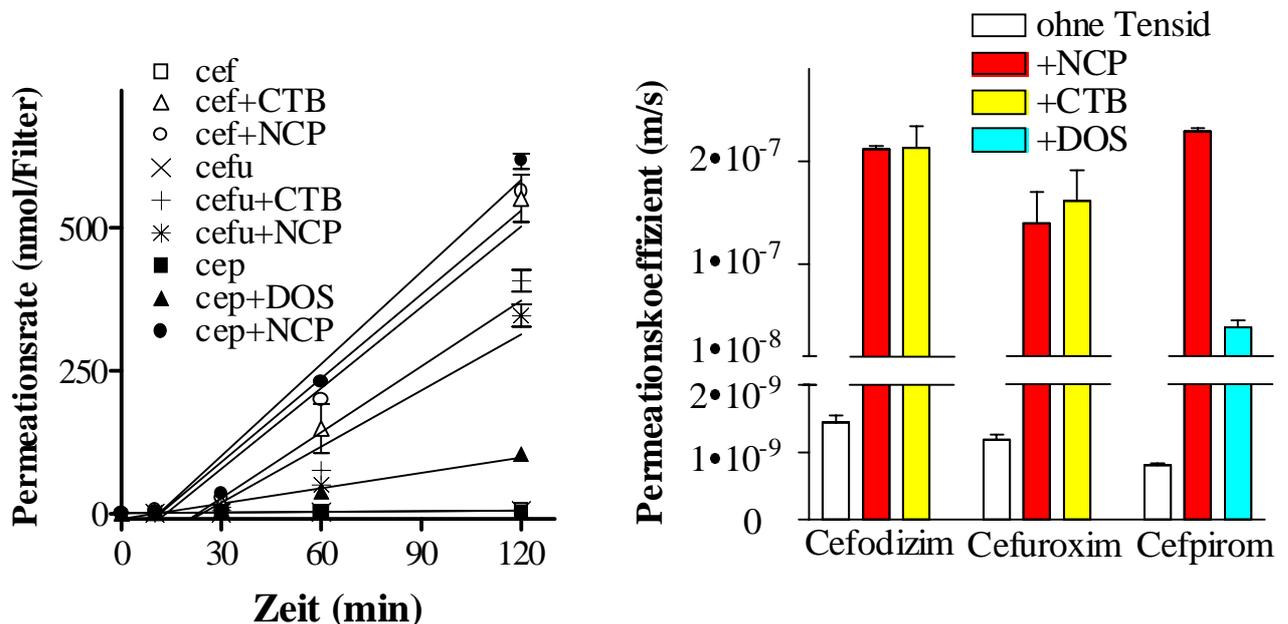


Abb. 32: Permeation von Cefodizim (cef), Cefuroxim (cefu) und Cefpirom (cep) durch die Caco-2-Zellschicht allein und in Kombination mit Tensiden. Tenside: N-Cetylpyridiniumbromid (NCP), Cetyltrimethylammoniumbromid (CTB) und Desoxycholat-Na (DOS) jeweils 0,25 mM. Ausgangskonzentration der Cephalosporine war jeweils 1 mM. (n=3)

Unter Verwendung von Transwells[®], auf deren Membranfiltern Caco-2-Zellschichten gewachsen sind, konnte die Beeinflussung der Cephalosporinpermeation an einem weiteren Modell mit biologischen Membranen als Diffusionshindernis überprüft werden. Da die Testtenside, wie

schon erläutert, die Caco-2-Zellschicht verändern können, wurden die Tenside nur in einer Konzentration von 0,25 mM eingesetzt. In **Abb. 32** sind die Permeationsraten gegen die Zeit (links) und die aus Gleichung (10) resultierenden Permeationskoeffizienten der Cephalosporine mit und ohne Tensidzusatz dargestellt.

Alle 3 Cephalosporine diffundieren bei einem pH-Wert pH=7,5 im Donator durch die Caco-2-Zellschicht, Cefodizim (Permeationskoeffizient= $1,5 \cdot 10^{-9}$ m/s) und Cefuroxim (Permeationskoeffizient= $1,2 \cdot 10^{-9}$ m/s) signifikant besser als Cefpirom (Permeationskoeffizient= $0,8 \cdot 10^{-9}$ m/s). Die Permeation von Cefodizim konnte sowohl durch N-Cetylpyridiniumbromid als auch durch Cetyltrimethylammoniumbromid auf etwa 120-fach gesteigert werden. Der Unterschied zwischen den Tensiden ist nicht signifikant. Ebenso fiel das Ergebnis mit Cefuroxim und diesen beiden Tensiden aus. Die Steigerung war etwa 100-fach. Für Cefpirom konnte wiederum festgestellt werden, daß sowohl das kationische N-Cetylpyridiniumbromid mit einer etwa 230-fachen Steigerung als auch das anionische Desoxycholat-Na mit einer etwa 40-fachen Steigerung die Permeation von Cefpirom durch die Caco-2-Zellschicht günstig beeinflussen konnten.

Einfluß der Tensidzugabe auf die parazelluläre Diffusion von [¹⁴C]Mannitol

Um zu überprüfen, ob die Tenside durch Störung des Zellzusammenhaltes die Permeation der Cephalosporine hervorrufen, wurde [¹⁴C]Mannitol als parazellulärer Diffusionsmarker eingesetzt, und es wurde allein oder in Kombination mit den Tensiden der zeitliche Mannitol-Konzentrationsverlauf in den Akzeptoren verfolgt. Zusätzlich wurden auch Benzylcetyldimethylammoniumchlorid und Taurodesoxycholat-Na in diesen Test mit aufgenommen, um eventuell Rückschlüsse auf das Modell mit isoliertem Dünndarm ziehen zu können.

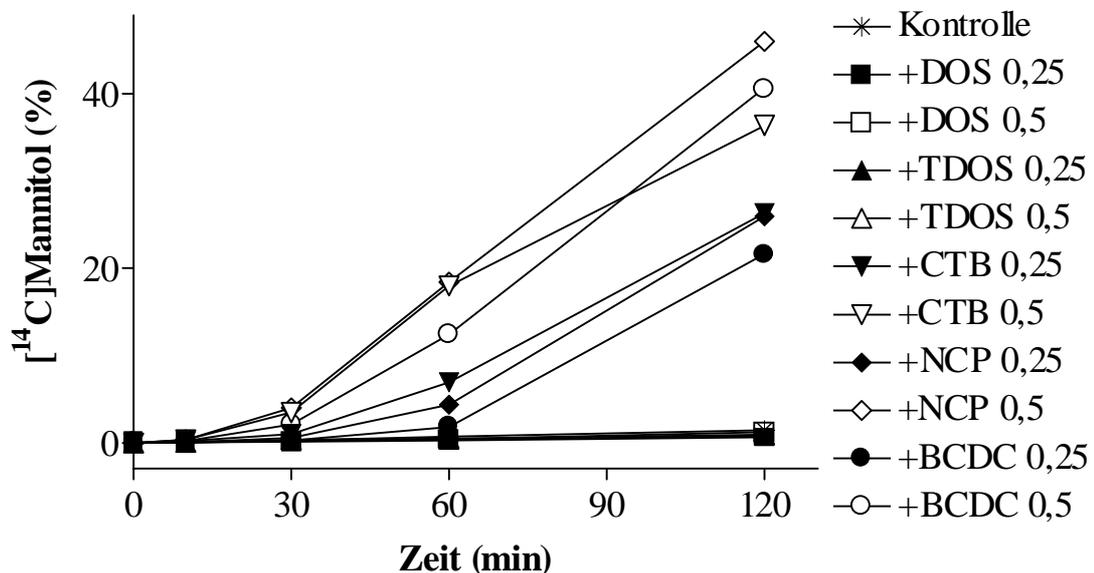


Abb. 33: Einfluß des Tensidzusatzes auf die Permeation von [¹⁴C]Mannitol durch die Caco-2-Zellschicht. Tenside: Desoxycholat-Na (DOS), Taurodesoxycholat-Na (TDOS), Cetyltrimethylammoniumbromid (CTB), N-Cetylpyridiniumbromid (NCP) und Benzylcetyldimethylammoniumchlorid (BCDC). Ausgangskonzentration von [¹⁴C]Mannitol war 5 µM. (n=1)

Es konnte festgestellt werden, daß die anionischen Tenside die [¹⁴C]Mannitol-Diffusion nicht beeinflussen, während die kationischen Tenside die Durchlässigkeit der Zellschicht für Mannitol konzentrationsabhängig bis auf das 30-fache erhöhten.

Vergleich der Permeation bei pH=6,0 und pH=7,5 im Donatorkompartiment

Um den Einfluß des pH-Wertes im Donatorkompartiment (pH=6,0 oder pH=7,5) zu beurteilen, konnten die Ergebnisse der Ermittlung des transepithelialen Fluxes (siehe **Abb.14 /Tab.3**) mit denen der Ermittlung der Permeationsbeeinflussung durch Tensidzusatz für die 3 Cephalosporine verglichen werden. Zur besseren Übersichtlichkeit sind in **Abb. 34** die jeweiligen Permeationskoeffizienten und zusätzlich die meßbaren Membrangehalte nach 2 h dargestellt.

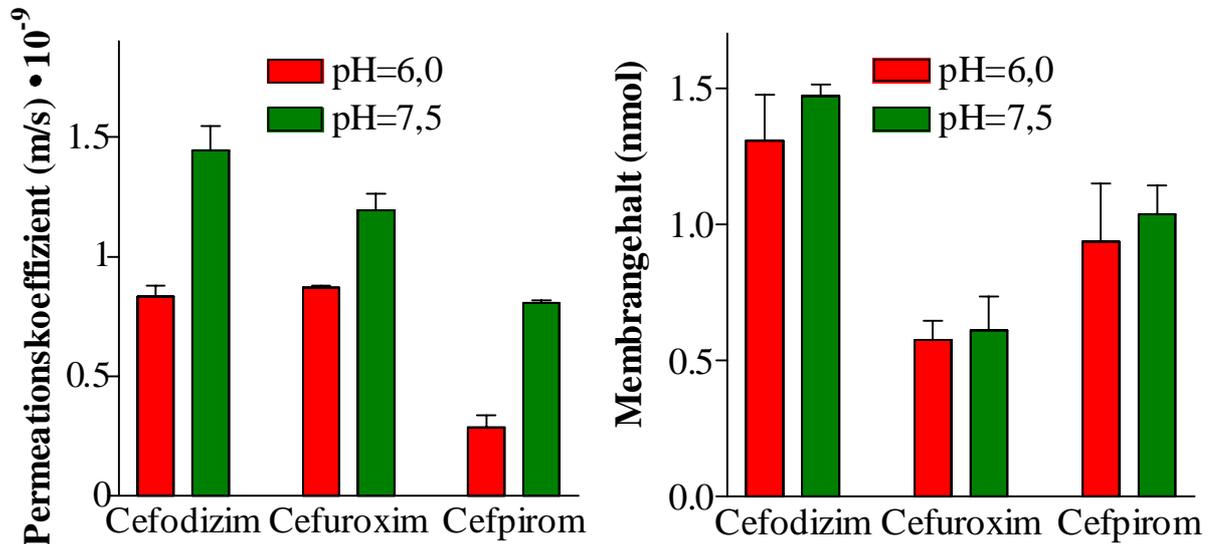


Abb. 34: Permeation durch und Anreicherung in der Caco-2-Zellschicht von Cefodizim, Cefuroxim und Cefpirom bei pH=6,0 und pH=7,5 im Donator. Ausgangskonzentration der Cephalosporine war jeweils 1 mM. (für pH=6: n=4; für pH=7,5: n=3)

Aus **Abb. 34** ist zu entnehmen, daß alle 3 Cephalosporine aus dem Donator mit einem pH-Wert pH=6,0 signifikant schlechter durch die Caco-2-Zellschicht in den Akzeptor diffundieren als aus dem Donator mit einem pH-Wert pH=7,5. Auch ist der Membrangehalt nach 2 h bei pH=6,0 kleiner als bei pH=7,5, aber der Unterschied ist nicht signifikant.

4 Diskussion

Für das rationale Design oral wirksamer Arzneistoffe ist das Verständnis der Resorptionsmechanismen dieser Arzneistoffe aus dem Gastrointestinaltrakt notwendig. Es ist bekannt, daß einige β -Lactamantibiotika trotz ihrer Hydrophilie, die die passive Resorption limitiert [185], nach oraler Applikation aus dem Darmlumen resorbiert werden. Diese oral verfügbaren Penicilline und Cephalosporine sind Substrate des tertiär aktiven H^+ /Peptid-Symporters PEPT1 [71; 122; 162; 168; 187], der physiologisch für den Transport von Di- und Tripeptiden verantwortlich ist. Obwohl 20 natürlich vorkommende Aminosäuren 400 verschiedene Dipeptide und 8000 verschiedene Tripeptide bilden können und zusätzlich verschiedene Peptidomimetika als Substrate akzeptiert werden, wird im Intestinum auf Grund von molekularbiologischen Studien nur ein Transportcarrier angenommen [28; 89].

Mit der vorliegenden Arbeit (vergleiche auch Bretschneider et al. [14]) wurde ein Beitrag dazu geleistet, die strukturellen Voraussetzungen für oral verfügbare Cephalosporine und Penicilline einzugrenzen, um vom PEPT1 als Substrate akzeptiert zu werden. Dazu wurde die humane Colocarzinomzelllinie Caco-2 als biologisches Material in zwei Modellsystemen verwendet, da die Zellen nachweislich den intestinalen H^+ /Peptid-Symporter exprimieren können. Die Caco-2-Zellen wurden zum einen in Petrischälchen auf Plastikuntergrund für Aufnahmeuntersuchungen und zum anderen auf Polycarbonatmembranen in Transwells[®] für Fluxbestimmungen kultiviert. Die Ausbildung von konfluenten Zellmonoschichten konnte mittels Umkehrmikroskop beobachtet werden. Die Einsatzfähigkeit der Caco-2-Zelllinie mußte für die geplanten Experimente durch Vorversuche sichergestellt werden.

Bei der Kultivierung bis zum Versuch wurde am Tag vor dem Versuch auf Penicillin/Streptomycin-Zusatz im Medium verzichtet, der bis dahin Kontaminationen verhindern sollte, da nicht ausgeschlossen werden konnte, daß das β -Lactamantibiotikum Penicillin G (Benzylpenicillin) im eventuell nicht vollständig abgespülten Mediumrest als potentielles Substrat das Versuchsergebnis stört. Auch ist für Penicillin G ein Einfluß auf die Insertion des PEPT1 nachgewiesen [2]. Ebenso ist bekannt, daß andere β -Lactamantibiotika wie Cephadrin und Cefaclor die Aktivität der enterozytären Na^+/K^+ -ATPase, die maßgeblich zur Energiebereitstellung für PEPT1 beiträgt, reduzieren [68].

Als Testsubstrat für alle Aufnahmeversuche diente das hydrolysebeständige Dipeptid [^{14}C]Gly-Sar. Damit konnte die funktionsfähige Expression von PEPT1 in den verwendeten Caco-2-Zellen bestätigt werden. Unter der Annahme eines interzellularen Volumens von 3,65 μ l bezogen auf 1 mg Proteingehalt [10, 13, 100] ergab sich am Tag 5 nach der Aussaat bei einem Proteingehalt von 1,4 mg je Petrischälchen und einer [^{14}C]Gly-Sar-Aufnahme von 360 pmol je Petrischälchen nach 10 μ M Angebot eine Anreicherung von 1:7. Am Tag 2 nach der Aussaat betrug das Verhältnis 1:2,6 und steigerte sich bis zum Tag 11 nach der Aussaat auf eine Anreicherung von 1:11. Ein Transport gegen das Konzentrationsgefälle als Zeichen des aktiven Transportes war für das Dipeptid [^{14}C]Gly-Sar sicher ab Tag 2 nach der Aussaat nachweisbar.

Die Entwicklung der Caco-2-Zellen wurde durch den Proteingehalt der Zellen und die Aufnahme von [^{14}C]Gly-Sar nach 10 min an den verschiedenen Tagen nach der Aussaat charakterisiert. Konfluent waren die Zellen einen Tag nach der Aussaat. Der Gesamtproteingehalt als Maß der Ausdifferenzierung nahm stetig bis zum Erreichen eines Plateaus zu (etwa ab Tag 6), wie es auch Ergebnisse von Hidalgo et al. [63] zeigen. Hingegen nahm die Konzentration des funk-

tionsfähigen PEPT1 erst ab Tag 4 sprunghaft zu und ging ebenfalls ab Tag 6 in eine Plateauphase über. Dieses kann mit den Ergebnissen von Engle et al. [40] erklärt werden, die die Konzentrationszunahme der enterozytischen Proteine ab dem 3. Tag nach Konfluenz nachwiesen. Obwohl somit die Ausdifferenzierung der Zellen ab Tag 6 nach der Aussaat gezeigt wurde, konnten die Aufnahmeversuche schon eher stattfinden, ohne die resultierenden Affinitäten zu beeinflussen. Auf Grund der Nachweisbarkeit von [^{14}C]Gly-Sar wurde mindestens Tag 5 abgewartet.

Die [^{14}C]Gly-Sar-Aufnahme wurde durch einen einwärtsgerichteten pH-Gradienten stimuliert und nahm bis zu 15 min Inkubationszeit linear zu und stimmt somit mit den Ergebnissen von Ganapathy et al. [53] überein. Ein anteiliger osmotischer Einfluß auf die später zu untersuchende [^{14}C]Gly-Sar-Aufnahmehemmung durch potentielle Inhibitoren konnte ausgeschlossen werden, da eine maximal 100 mM Mannitolzugabe den [^{14}C]Gly-Sar-Transport nicht in nennenswertem Ausmaß beeinflussen konnte.

Im Ergebnis dieser Vorversuche konnte die [^{14}C]Gly-Sar-Aufnahme in die Caco-2-Zellen auf den funktionstüchtigen H^+ /Peptid-Symporter PEPT1 zurückgeführt werden.

Im Gegensatz zu Hidalgo et al. [63] wurde gezeigt, daß Caco-2-Zellen auch auf Polycarbonatfiltern, die nicht mit Rattenkollagen vorbehandelt wurden, eine funktionsfähige Epithelschicht in vergleichbarer Zeit ausbilden. Dazu stellten Hilgers et al. [65] zusätzlich fest, daß die Kollagenmatrix die Migration durch das Filtermaterial und damit die Depolarisation der Zellen beschleunigt und somit eher ungünstig ist.

Die physiologische Dichtigkeit des Caco-2-Epithels wurde durch Fluxbestimmung des parazellulären Diffusionsmarkers [^{14}C]Mannitol sichergestellt, wobei sich ein Permeationskoeffizient von $3 \cdot 10^{-9}$ m/s ergab [104]. Dieser entspricht dem Ergebnis von Chong et al. [21]. Im Vergleich dazu war der Flux von [^{14}C]Gly-Sar bei den gleichen experimentellen Bedingungen 20 mal größer (Permeationskoeffizient $P=57 \cdot 10^{-9}$ m/s). Dies ist auch ein eindeutiger Beleg für den hauptsächlich aktiven Transport des Dipeptids, da D-Mannitol und Glycylsarkosin laut Saitoh und Inui [142] gleiche molekulare Radien und deshalb gleiche Diffusionsraten auf parazellulärem Weg aufweisen.

Affinitätsbestimmung von 23 β -Lactamantibiotika

Zur Bestimmung der Affinität wurde in Gegenwart eines einwärtsgerichteten pH-Gradienten die konzentrationsabhängige Hemmung der [^{14}C]Gly-Sar-Aufnahme durch 20 Cephalosporine und 3 Penicilline in Caco-2-Zellen gemessen. Aus den daraus resultierenden Aufnahmedaten wurde mittels nichtlinearer Regression mit Gleichung (4) die Halbhemmkonzentrationen IC_{50} bestimmt. Ohne Festsetzung der Variablen wurden Hill-Koeffizienten im Bereich $0,82 < h < 1,18$ erhalten. Zur Vergrößerung der Berechnungsgenauigkeit der gesuchten IC_{50} wurde der Hill-Koeffizient bei der nichtlinearen Regression auf 1 fixiert, da davon ausgegangen werden kann, daß die β -Lactamantibiotika alle kompetitive Hemmer sind und PEPT1 über nur eine Bindungsstelle für Di- und Tripeptide oder Peptidomimetika verfügt. Auch stellten Daniel et al. [29], Fei et al. [44] und Adibi [2] nur eine Bindungsstelle für Protonen fest, so daß Substrat und Proton im Verhältnis 1:1 symportiert werden. Das im Gegensatz dazu postulierte Transportverhältnis 1:2 von anionischen Substraten zu Protonen [159] könnte damit erklärt werden, daß das am Carrier bindungsfähige Proton mit einem protonierten Substratmolekül symportiert wird. Dieser transportable protonierte Substratanteil dissoziiert im Cytosol stärker auf Grund der pH-Unterschiede und somit gelangt 1 freies Proton mehr pro Substratmolekül in die Zelle [199]. Diese

Hypothese erklärt auch die Feststellung, daß das pH-Optimum anionischer Substrate niedriger ist als bei neutralen oder kationischen Substraten [71, 109], da mit zunehmender Protonenkonzentration das Dissoziationsgleichgewicht zugunsten des protonierten Anteils verschoben wird. Zur Umrechnung der Halbhemmkonzentration IC_{50} in die substratunabhängige Hemmkonstante K_i wurde die Michaelis-Menten-Konstante von $K_t=1,1$ mM für $[^{14}C]$ Gly-Sar eingesetzt. Damit wurden die Ergebnisse von Adibi [2] und Brandsch et al. [13] bestätigt.

Die Hemmkonstanten K_i zeigen, daß das Cephalosporin Cefitbuten und das Penicillin Cyclacillin die $[^{14}C]$ Gly-Sar-Aufnahme vergleichbar mit natürlichen Dipeptiden hemmten. Dieses Ergebnis bestätigt die Studien von Muranushi et al. [110, 109], Matsumoto et al. [100], Naasani et al. [111], Ganapathy et al. [51, 53] und Terada et al. [171]. Die anderen β -Lactamantibiotika mit K_i -Werten zwischen 7 und 14 mM waren bedeutend weniger affin, wie auch Eddy et al. [39] zeigten. Bei Substanzen mit Hemmkonstanten $K_i > 20$ mM strebt die Interaktion mit PEPT1 gegen Null. Einige veröffentlichte Ergebnisse weichen stark voneinander ab [30; 32; 51; 197; 199]. Delie und Rubas [32] machen dafür die Herkunft der Caco-2-Zellen und die speziellen Kultur- und Versuchsbedingungen wie extrazellulärer pH-Wert, Temperatur sowie die Auswahl des Versuchsmodellsystems verantwortlich. Jedoch bestätigen auch einige Studien die Werte bzw. die Rangordnungen der vorliegenden Ergebnisse [32; 51; 110; 145; 171; 197]. Recht gute Übereinstimmungen liefern die Ergebnisse von Danzig et al. für Cefaclor [31], Inui et al. für Cephadrin [72], Ganapathy et al. für Cefixim [53] und Ganapathy et al. für Cefadroxil [51].

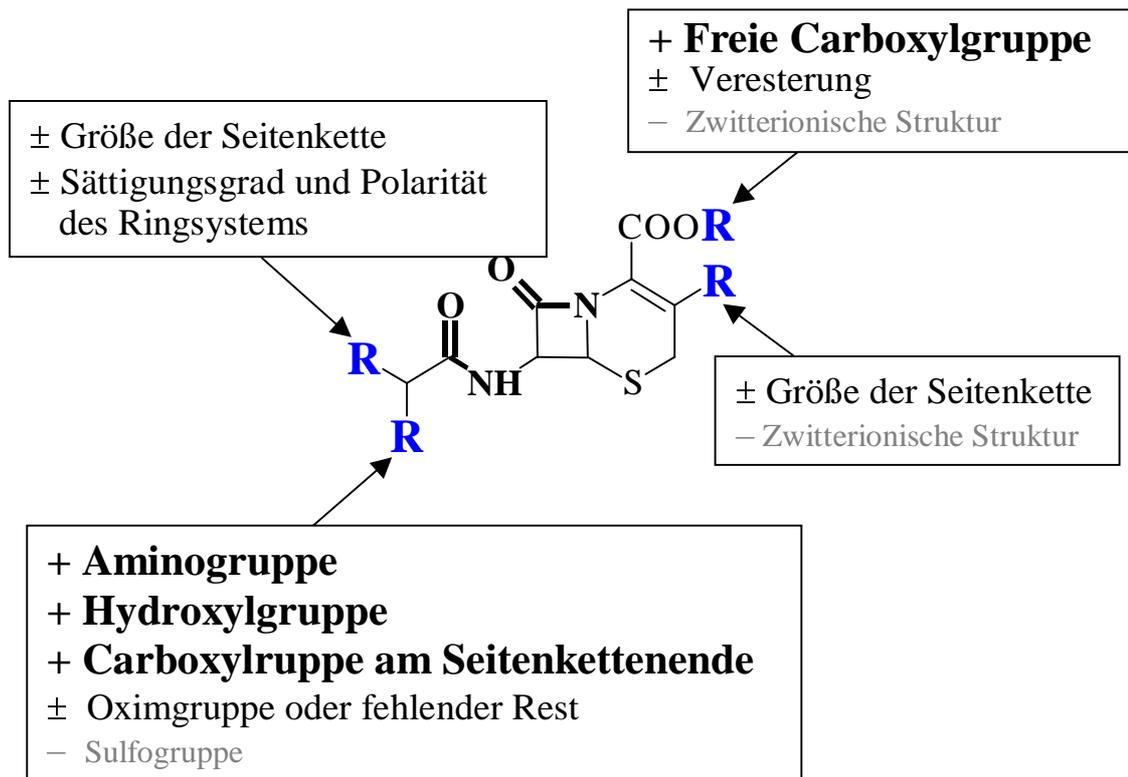


Abb. 35: Struktur-Affinitäts-Beziehung zum PEPT1

Strukturelle Merkmale, die einen positiven Einfluß auf die Affinität haben (+), Strukturelle Merkmale, deren Vorhandensein bzw. zunehmende Größe zur Verringerung der Affinität führen (±), Strukturelle Merkmale, die zum Verlust der Affinität führen (–)

Die vorgestellten Ergebnisse weisen darauf hin, daß folgende strukturelle Merkmale für die Erkennung durch PEPT1 von Bedeutung sind (siehe **Abb. 35**):

(a) Alle β -Lactamantibiotika ähneln in ihrer Grundstruktur einem Tripeptid, das heißt, zwei Peptidbindungen sind in den Molekülen enthalten. Jedoch stellt laut Döring et al. [36] eine ω -Aminofettsäure, bei der die ionisierten Kopfgruppen durch mindestens 4 Methylengruppen getrennt sind, die minimale Substratstruktur zur Erkennung durch PEPT1 dar. Zusätzliche Seitengruppen mit Wasserstoffbrückenbindungsstellen erhöhen die Affinität, sind aber nicht essentiell.

(b) Am N-terminalen Ende existiert eine α -Aminogruppe (bei Cyclacillin, Cefadroxil, Cephradin, Cefaclor, Cephalexin und Ampicillin), die auch durch eine Hydroxylgruppe (bei Cefamandol) oder eine Seitenkette mit zusätzlicher Carboxylgruppe (bei Ceftributen und Cefixim) ersetzt sein kann. Dies bestätigen auch die Ergebnisse von Tsuji et al. [187] und Muranushi et al. [109]. Terada et al. [169] postulieren, daß die α -Aminogruppe mit einem Histidin-Rest interagiert und somit für die Substraterkennung durch PEPT1 mitverantwortlich ist. Sakane et al. [147] fanden durch Computersimulation heraus, daß die Raumstruktur des α -Amino- β -Lactamantibiotikums Cephalexin im hydratisierten Zustand mit denen von Ceftributen und Cefixim gut übereinander gelagert werden können. Jedoch führen Methylierung, Acethylierung oder andere Modifikationen (z.B. Sulfogruppe bei Cefsulodin) der N-terminalen α -Aminogruppe zum Verlust der Affinität zum PEPT1, wie auch Bai und Amidon [9] feststellten. Ausnahmen sind in dieser Studie Cefuroximaxetil (Oximgruppe) und Cephalotin (ohne Substitution).

(c) Die C-terminale Peptidbindung kann sowohl in einem Cephem- als auch einem Penamgrundkörper eingebaut sein. Im Gegensatz dazu soll der renale Peptidtransporter PEPT2 laut Daniel und Adibi [27] zwischen Cephalosporin und Penicillin unterscheiden. (d) Am C-terminalen Ende ist eine freie Carboxylgruppe vorhanden. Diese darf nicht mit einer quarternären Ammoniumgruppe in der C3-Seitenkette eine zwitterionische Struktur ausbilden (vergleiche Cephalotin und Cephaloridin, bzw. Cefixim und Cefprozidim). Laut Walter et al. [197] und Hidalgo et al. [62] scheint die C-terminale Carboxylgruppe ein grundlegendes Strukturelement zu sein, welches eine ionische Bindung mit einem positiv geladenen Rest am PEPT1 ermöglicht. Jedoch ist die Carboxylgruppe laut Börner et al. [13] keine absolut notwendige Voraussetzung für die Substraterkennung, wie in der vorliegenden Studie Cefuroximaxetil zeigt. Dessen K_i -Wert von etwa 12 mM steht im Widerspruch zu Dantzig et al. [30], die für Cefuroximaxetil ausschließlich die passive Diffusion als Transportmechanismus annehmen, jedoch wiesen Ruiz-Balaguer et al. [138] auch den aktiven Transport nach.

(e) Die Substitution und die Sättigung des N-terminalen Ringsystems hat entscheidenden Einfluß auf die Affinitätsstärke zu PEPT1, wie auch Terada et al. [171] feststellten (vergleiche Cefadroxil, Cephradin und Cephalexin bzw. Cyclacillin und Ampicillin).

In Hinblick auf die Ionisation der β -Lactamantibiotika [106] unter den pH-Bedingungen im Intestinum ist es auch von Bedeutung, daß Eddy et al. [39] und Wootton und Hazelwood [204] zeigen konnten, daß der intestinale Peptidcarrier eine positive Ladung ohne nennenswerte Affinitätsänderung zu tolerieren scheint, während eine oder zwei negative Ladungen oder zwei positive Ladungen die Affinitäten beträchtlich verringern.

Um das Pharmakophor des intestinalen Peptidtransporters genauer zu charakterisieren, nutzten Swaan und Tukker [164] und Swaan et al. [163] eine computergestützte Konformationsanalyse, für die sie aus der Literatur gepoolte Daten verwendeten. Die daraus resultierenden strukturellen Voraussetzungen für das postulierte Pharmakophor stehen zum Teil im Widerspruch zu den vorliegenden Ergebnissen. Deshalb sollten für solche Modellierungen nur Daten verwendet

werden, die unter identischen experimentellen Bedingungen entstanden sind. Mit den vorliegenden Ergebnissen wäre auch die Interaktion mit PEPT1 direkt einbeziehbar.

Weiterhin wurde gezeigt, daß die Affinitäten, gemessen als Hemmung der [¹⁴C]Gly-Sar-Aufnahme in die Caco-2-Zellen, sehr gut mit den Bioverfügbarkeiten korrelieren. Mit Ausnahme von Cefamandol und Cephalotin sind alle β -Lactamantibiotika mit K_i -Werten <14 mM oral applizierbar, so daß davon ausgegangen werden kann, daß neu entwickelte Penicilline und Cephalosporine, die via PEPT1 oral verfügbar sein sollen, am beschriebenen Testmodell und unter vergleichbaren Bedingungen den Schwellenwert $K_i=14$ mM nicht überschreiten dürfen. Jedoch darf die antibiotische Aktivität nicht außer acht gelassen werden, denn wie Snyder et al. [157] zeigen konnten, sind die Struktur-Wirkungsbeziehung und die Struktur-Affinitätsbeziehung nicht identisch.

Bestimmung des transepithelialen Fluxes von 23 β -Lactamantibiotika

Zusätzlich zu den Ermittlungen der Hemmkonstanten als Affinitätsmaß zur Bindungsstelle an PEPT1 wurde der transepitheliale Transport über 2 h verfolgt und die Aufnahme in die Zellen nach 2 h gemessen. Die Eigenschaft eines Prodrugs, bei oder nach der Resorption zum eigentlichen Wirkstoff umgewandelt zu werden, wurde im Fall des Cefuroximaxetils berücksichtigt, da es in den Caco-2-Zellen schnell hydrolysiert wird, wie auch Dantzig et al. [30] feststellten. Der Gehalt in den Zellen und im Akzeptor wurde als Summe aus den Cefuroximaxetil- und Cefuroximkonzentrationen bestimmt. Alle anderen Verbindungen waren während des Versuches chemisch stabil.

Die Membrangehalte pro Filter nach 2-stündiger Versuchsdauer unterscheiden sich maximal um den Faktor 176 und waren bei den oral verfügbaren Cephalosporinen angeführt von Cefadroxil mindestens 10 mal größer als bei den parenteral anwendbaren. Deutlich wird auch, daß die Membrangehalte der oral verfügbaren Penicilline nur etwa ein Zehntel der Membrangehalte der - bezogen auf die Affinität zu PEPT1 - vergleichbaren oral anwendbaren Cephalosporine erreichen und mindestens nur etwa 2-5 mal größer sind als die der parenteral anwendbaren Cephalosporine. Der mehrfach für Peptide und β -Lactamantibiotika, die von PEPT1 akzeptiert werden, beschriebene Transport gegen den Konzentrationsgradienten [13; 53; 100; 199] konnte gezeigt werden. Unter der Annahme eines intrazellulären Volumens von 3,65 μ l bezogen auf 1 mg Proteingehalt [10, 13, 100] und einem Proteingehalt von etwa 1,9 mg/Filter ergibt sich bei 1 mM Angebot eine intrazelluläre Anreicherung von 1:9 für Cefadroxil, 1:7 für Ceftributen, 1:5 für Cephadrin, 1:4 für Cephalixin sowie für Cefaclor. Diese Ergebnisse stimmen gut mit den Resultaten von Dantzig et al. [30], Matsumoto et al. [100] und Gochoco et al. [57] überein.

Den größten Flux durch die Caco-2-Zellschicht weist Cefadroxil mit 7,5 nmol/(cm²*h) auf. Die in Kapitel 3.1.3 vorgenommene Gruppierung der β -Lactamantibiotika hinsichtlich ihres Permeationsvermögens durch Caco-2-Zellen beruht auf dem Vergleich der Ergebnisse mit dem resultierenden Permeationskoeffizienten von [¹⁴C]Mannitol unter den gleichen Versuchsbedingungen, da die parazelluläre passive Diffusion für die β -Lactamantibiotika, die nicht aktiv transportiert werden, außer bei den lipophilen Prodrugestern der wahrscheinlichste Transportweg ist. In der ersten Gruppe sind die Vertreter zusammengefaßt, deren Permeationskoeffizienten ($21 \cdot 10^{-9}$ m/s $> P > 7 \cdot 10^{-9}$ m/s) deutlich größer sind als der des Mannitols ($P=3 \cdot 10^{-9}$ m/s), so daß der aktive Transport im Vordergrund stehen muß. Die Permeationskoeffizienten der Vertreter der zweiten Gruppe ($3,3 \cdot 10^{-9}$ m/s $> P > 2,2 \cdot 10^{-9}$ m/s) entsprechen annähernd dem des

Mannitols, und die Permeationskoeffizienten der dritten Gruppe ($1,1 \cdot 10^{-9} \text{ m/s} > P$) sind deutlich geringer als die des Mannitols. Beim Vergleich der Permeation der β -Lactamantibiotika mit der des $[^{14}\text{C}]\text{Gly-Sar}$ wird deutlich, daß Cefadroxil als bestes transportiertes β -Lactamantibiotikum mit einem Permeationskoeffizienten von $21 \cdot 10^{-9} \text{ m/s}$ nur etwa ein Drittel des Permeationskoeffizienten von $[^{14}\text{C}]\text{Gly-Sar}$ ($57 \cdot 10^{-9} \text{ m/s}$) erreicht. Die gezeigten Ergebnisse stimmen hinsichtlich Größenordnung und Rangfolge gut mit denen von Chong et al. [21], Matsumoto et al. [100] und Gochoco et al. [57] überein. Ein Widerspruch besteht jedoch zu dem Ergebnis von Hidalgo et al. [64], die feststellten, daß Benzylpenicillin nicht transportiert wird.

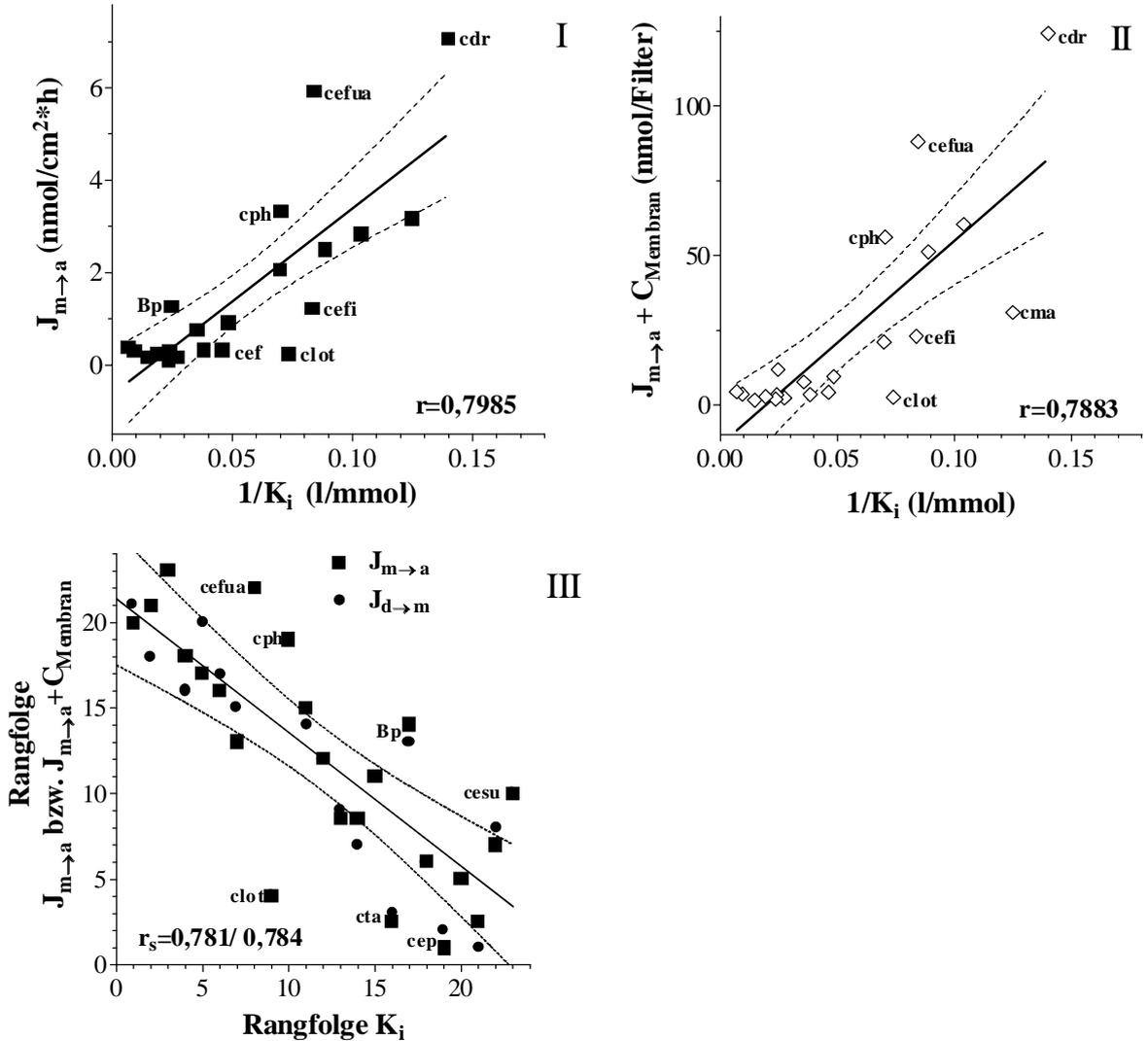


Abb. 36: Korrelation zwischen Hemmkonstante K_i und transepithelielen Flux $J_{m \rightarrow a}$ bzw. der Summe aus dem transepithelialen Flux $J_{m \rightarrow a}$ und dem Membrangehalt C_{Membran} . Es wurden die Werte entsprechend Tab. 3 zugrunde gelegt. In den Teilen I und II bleiben die Ergebnisse von Cefitibuten und Cyclacillin unberücksichtigt. Dargestellt sind die linearen Regressionen mit dem 95%-Vertrauensintervall (durchgezogene bzw. gestrichelte Linie). Bei den gekennzeichneten Ausreißern bedeuten Bp=Benzylpenicillin, cef=Cefodizim, cep=Cephalexin, clot=Cephalotin, cefua=Cefuroximaxetil, cefi=Cefixim, cdr=Cefadroxil, cma=Cefamandol, cta=Ceftazidim, cep=Cefpirom und cesu=Cefsulodin. Angegeben sind die Korrelationskoeffizienten r .

Die transepithelialen Fluxe und die intrazellulären Aufnahmen korrelieren bei einem linearen Korrelationskoeffizienten von $r=0,7696$ gut miteinander. Für die zukünftige Testung neu ent-

wickelter β -Lactamantibiotika ist es jedoch bedeutsamer, daß auch ein signifikanter indirekt proportionaler Zusammenhang zwischen Affinität zum PEPT1 und dem transepithelialen Transport sowohl mit als auch ohne Berücksichtigung der Membrananreicherung nachweisbar war. In **Abb. 36** ist die Korrelation zwischen den Hemmkonstanten K_i und dem absoluten transepithelialen Flux $J_{m \rightarrow a}$ bzw. dem totalen transepithelialen Flux $J_{d \rightarrow m}$ (Summe aus $J_{m \rightarrow a}$ und dem Membrangehalt C_{Membran}) dargestellt. Dabei wurden im Teil I $J_{m \rightarrow a}$ gegen $1/K_i$, im Teil II $J_{m \rightarrow a} + C_{\text{Membran}}$ gegen $1/K_i$ und im Teil III die Rangfolgen von $J_{m \rightarrow a}$ bzw. $J_{m \rightarrow a} + C_{\text{Membran}}$ gegen die Rangfolge von K_i aufgetragen. Gezeigt sind die linearen Regressionsgeraden (durchgezogene Linien) mit ihrem 95%-Vertrauensintervall (gestrichelte Linien) und die daraus resultierenden Korrelationskoeffizienten r . In den Teilen I und II blieben die Ergebnisse von Ceftributen und Cyclacillin unberücksichtigt, da auf Grund deren sehr guten Affinitäten zu PEPT1 wesentlich höhere Fluxe zu erwarten waren.

Die Korrelationen zwischen dem Reziproken von K_i und J_{ma} bzw. der Summe von J_{ma} und C_{Membran} ergaben lineare Korrelationskoeffizienten von $r=0,7985$ bzw. $r=0,7883$, wobei die Daten von Ceftributen und Cyclacillin fehlten. Deshalb wurden beide Korrelationen durch die Spearman-Rangkorrelation ergänzt (siehe **Abb. 36/III**), deren robustere Prozedur es erlaubt, auch deutliche Ausreißer mit einzubeziehen. Die Spearman-Rangkorrelationskoeffizienten von $r_s=0,781$ (für $J_{m \rightarrow a}$ gegen K_i) bzw. $r_s=0,784$ (für $J_{m \rightarrow a} + C_{\text{Membran}}$ gegen K_i) bestätigen das oben gezeigte Ergebnis.

Wie in der vorliegenden Studie Ceftributen, Cyclacillin, Cephalotin, Cefprozidim und Cefixim zeigen, haben aber nicht in allen Fällen gute Affinitäten auch gute Transportraten zur Folge. Das stellten auch Kramer et al. [84], Swaan und Tukker [164] und Walter et al. [197] fest. Laut Walter et al. [197] ist nicht nur die Affinität sondern auch die Geschwindigkeit wichtig, mit der der Transporter das Substrat durch die Membran schleust (V_{max}).

Die gute Korrelation zwischen Bioverfügbarkeit und Aufnahme in die Zellen, untersucht an Hand verschiedener Modellsysteme [156], führte zu der Hypothese, daß der luminale Membrantransport der geschwindigkeitsbestimmende Schritt bei der Resorption von via PEPT1 transportablen Molekülen darstellt. Jedoch konnte für Cephalotin und Glycylsarkosin gezeigt werden, daß die Passage der serosalen Membran den transepithelialen Transport limitiert [57; 174]. Aller Wahrscheinlichkeit nach stellt das noch nicht genauer charakterisierte Peptidtransportsystem, das in der Serosalmembran lokalisiert ist [37; 100; 172; 175], andere strukturelle Anforderungen zur Substraterkennung als PEPT1.

Zusätzlich dazu machen Burton et al. [18] ein in der Luminalmembran lokalisiertes sättigbares und substratspezifisches Transportsystem verantwortlich, für einige potentielle Substrate des PEPT1 den Flux von der luminalen zur serosalen Seite zu behindern und den Flux in umgekehrter Richtung zu begünstigen. Bisher nachgewiesen ist dieses Effluxsystem unter den Testsubstanzen dieser Studie für Ampicillin [140; 141], Benzylpenicillin und Cephaloridin [140]. Eine freie α -Aminogruppe reduziert die Affinität zum Efflux-System [140].

Im Gegensatz dazu gibt es in der vorliegenden Arbeit auch Beispiele wie Benzylpenicillin, Cefuroximaxetil, Cefadroxil und Cephalotin, deren transepitheliale Transportrate größer ausfiel, als es deren Hemmkonstanten erwarten ließen. Dies ist zum einen möglich, wenn der Anteil der passiven Diffusion an der Gesamtpermeation auf Grund von höherer Lipophilie im Vergleich zu den anderen β -Lactamantibiotika größer ist. Dies ist der Fall bei Cefuroximaxetil [30; 182; 184] und Benzylpenicillin [33].

Zum anderen wurde in verschiedenen Arbeiten die Möglichkeit getestet, ob andere spezifische Transportsysteme von β -Lactamantibiotika zusätzlich zum PEPT1 genutzt werden können. Tsuji et al. [186] identifizierte das *monocarboxylic acid cotransport*-System als alternativen Transportweg für monosaurer β -Lactamantibiotika. Dieser war beispielsweise auch für Cephadrin und Cefixim nachweisbar [181]. Iodate et al. [68] stellten fest, daß Cephadrin und Cefaclor den aktiven Anteil der intestinalen D-Galactose-Resorption beeinflussen.

Auf Grund der guten Korrelation zwischen Affinität zum PEPT1 und dem transepithelialen Flux darf trotz der zusätzlich möglichen Transportwege davon ausgegangen werden, daß der Transport via PEPT1 der Haupttransportweg für β -Lactamantibiotika ist, sofern sie von PEPT1 als Substrat akzeptiert werden. Dies wird durch die Studie von Tamai et al. [168] bestätigt.

Der transepitheliale Flux steht auch sehr gut mit der Applizierbarkeit der β -Lactamantibiotika im Einklang (mit Ausnahme von Cefamandol). Aus den Daten von **Tab. 3** ergibt sich, daß die orale Verfügbarkeit von mehr als 50% einen minimalen transepithelialen Flux von 2 nmol/(cm²*h) bei 1 mM Angebot voraussetzt.

Einfluß von zweiwertigen Metallionen auf PEPT1

Zusätzlich zu der beschriebenen Funktion des PEPT1, Di- und Tripeptide als physiologische Substrate und darüber hinaus Peptidomimetika in die Enterozyten zu schleusen, könnten auch andere physiologische Substrate von Bedeutung sein. Verschiedene Studien geben Hinweise darauf, daß sich Substrate von PEPT1 und zweiwertige Metallionen bei ihrer intestinalen Resorption beeinflussen. So fanden Steinhardt und Adibi [160] heraus, daß die intestinale Zinkresorption durch Zugabe von Glycylleucin erhöht wird, während die freien Aminosäuren keinen Einfluß hatten. Tacnet et al. [167] postulieren, daß Zink-Ionen durch Komplexbildung mit dem Tripeptid Gly-Gly-His via PEPT1 durch die Enterozytenmembran transportiert werden können. Auch wurde von Ueno et al. [188] die Komplexbildung von Eisen(II)-Ionen und dem oralen Cephalosporin Cefdinir beschrieben, die die Resorption des letzteren vermindert. Laut Glahn und Campen [56] beeinflussen wiederum Aminosäuren und Peptide, die aus der Proteinverdauung resultieren, die Eisenresorption aus dem intestinalen Lumen.

Zusätzlich konnten Daniel und Adibi [26] unter Verwendung von renalen Bürstensaumvesikeln zeigen, daß eine Vorinkubation mit Zink- und anderen Metallionen den renalen Transport von Dipeptiden und Cephalexin via PEPT1 und PEPT2 moduliert.

Auf Grund der naheliegenden Vermutung, daß die Bioverfügbarkeit von β -Lactamantibiotika durch zweiwertige Metallionen beeinflusst werden kann, wurde deren Wechselwirkung mit PEPT1 in der vorliegenden Arbeit anhand der Caco-2-Zelllinie überprüft.

Die von Company et al. [24] und Tomida et al. [178] beschriebene Zerstörung von β -Lactamantibiotika durch nicht-enzymatische Hydrolyse auf Grund der Anwesenheit von Zink-Ionen (oder anderen zweiwertigen Metallionen) und Tris konnte im Rahmen dieser Studie nicht festgestellt werden, da wahrscheinlich die Konzentration der freien Tris-Base bei den verwendeten pH-Bereichen zu gering war. Dadurch mußten die Versuchspuffer für diese Versuche nicht modifiziert werden.

Die Aufnahme von [¹⁴C]Gly-Sar in die Caco-2-Zellen wurde durch Zugabe sowohl von Zinkchlorid als auch von Zinksulfat gehemmt. Dieser Effekt konnte allein auf die Gegenwart der Zink-Ionen zurückgeführt werden, die Auswertung der Hemmkurven ergaben eine Hemmkonstante $K_i \approx 150 \mu\text{M}$. Auch die Vorbehandlung der Caco-2-Zellen mit 1 mM Zinksulfat führte zu einer Hemmung der [¹⁴C]Gly-Sar-Aufnahme, die jedoch nach 3-stündiger Vorbehandlung nur

etwa halb so effektiv war, wie die Coinkubation der Zellen mit der gleichen Zinksulfatkonzentration.

Versuche mit anderen Schwermetallionen ergaben, daß nur Kupfer-Ionen eine stärkere Hemmung der [¹⁴C]Gly-Sar-Aufnahme als Zink-Ionen hervorriefen, während Nickel- und Eisen(II)-Ionen nur leichte und Cobalt- und Mangan(II)-Ionen gar keine Hemmeffekte verursachten. Die akute Hemmwirkung von Zink-Ionen konnte durch zusätzliches Ceftributen vergrößert werden. Es kann von Additivität ausgegangen werden, da die Konzentrationen beider Hemmstoffe etwa ihren IC₅₀ für 10µM [¹⁴C]Gly-Sar entsprachen und die Kombination beider die [¹⁴C]Gly-Sar-Aufnahme auf 33% senkte.

Beim Vergleich der Aufnahmekinetik von [¹⁴C]Gly-Sar mit und ohne Zinksulfatzusatz wurde deutlich, daß Zink-Ionen die Michaelis-Menten-Konstante für Glycylsarkosin etwa verdoppeln, während die maximale Geschwindigkeit V_{max} nahezu unverändert blieb. Dieses entspricht einer kompetitiven Hemmung [194].

Bestimmungen des transepithelialen Fluxes ausgewählter Cephalosporine mit unterschiedlichen chemischen Strukturmerkmalen zeigten, daß durch Zinksulfatzusatz der Transport der Cephalosporine mit freier Carboxylgruppe am Cephem-Ringsystem wie Cefadroxil, Cephalexin und Cephalotin gesenkt wurde und der Flux vom veresterten Cefuroximaxetil nahezu unbeeinflusst blieb.

Diese vorgestellten Versuchsergebnisse zeigen deutlich, daß Zink-Ionen und vermutlich auch Kupfer-Ionen den Transport in und durch Caco-2-Zellen für Substrate des PEPT1 behindern. Dafür sind folgende Mechanismen denkbar: (a) Zink-Ionen binden an ein allosterisches Zentrum und verändern die aktive Bindungsstelle von PEPT1, jedoch sprechen die Ergebnisse der Kinetikanalyse dagegen. (b) Zink-Ionen sind selbst Substrat von PEPT1, die Struktur-Affinitäts-Untersuchungen lassen aber auch dies bezweifeln. (c) Zink-Ionen bilden mit Substraten von PEPT1 Komplexe, die niedriger affin sind als die freien Substrate. Diese Theorie wird unterstützt durch die Ergebnisse von Tacnet et al. [167]: Sie beobachteten bei zunehmender Tripeptidkonzentration eine Hemmung der Zinkaufnahme, die Hinweis darauf ist, daß das freie Tripeptid eine größere Affinität zum PEPT1 aufweist und dadurch bevorzugt transportiert wird im Vergleich zum Zinkkomplex. Ein zusätzliches positives Argument lieferte Mrestani [unveröffentlichte Mitteilung], der anhand von Kapillarelektrophorese feststellte, daß Cephalexin, Cefadroxil und Cephalotin mit Zink- und Kupferionen neutrale Komplexe bilden, während für Cefuroximaxetil keine Wechselwirkungen mit beiden Metallionen nachweisbar waren. Diese gezeigte Komplexbildung steht jedoch im Widerspruch zu den Ergebnissen von Daniel und Adibi [26].

Die festgestellte Transportbeeinflussung hat klinische Relevanz, sofern orale Cephalosporine mit freier Carboxylgruppe am C-terminalen Ende simultan zu einer Zinksubstitution gegeben werden müssen.

Passive Diffusion

Ausgehend von der Ionenpaartheorie nach Bjerrum [74] boten sich die in physiologischen Flüssigkeiten ionisiert vorliegenden Cephalosporine als Modellarzneistoffe an, die Möglichkeit der Resorptionsverbesserung durch Ionenpaarbildung anhand verschiedener Modellsysteme zu überprüfen, da diese Resorptionsbeeinflussung ionisierter Arzneistoffe in der Literatur kontrovers diskutiert wird [Übersicht bei 74, 117].

Ausgewählt wurden dazu 3 strukturell unterschiedliche Cephalosporine (Cefodizim, Cefuroxim und Cefpirom), die nicht als Substrat vom intestinalen H⁺/Peptid-Symporter PEPT1 akzeptiert

werden und für die auch keine anderen aktiven Transportmechanismen nutzbar sind. Diese Cephalosporine können also die biologischen Membranbarrieren nur durch passive Diffusion überwinden. Die ausgeprägte Hydrophilie der Testsubstanzen ist aber die Ursache für nicht relevante Resorptionsraten auf diesem Wege.

Als potentielle Ionenpaarbildner mit Modellcharakter wurden als Kationen verschiedene quarternäre Ammoniumsalze wie Benzylcetyldimethylammoniumchlorid, Benzyltriethylammoniumchlorid, Cetyltrimethylammoniumbromid, Lauryltrimethylammoniumbromid und N-Cetylpyridiniumbromid sowie als Anionen die physiologisch im Dünndarm vorhandenen Gallensalze Desoxycholat-Na und Taurodesoxycholat-Na getestet, die alle Tensidcharakter aufweisen. Der Eigenschaft von Tensiden, ab einer bestimmten Konzentration Micellen zu bilden, wurde durch Einsatz von Tensidkonzentrationen unter- und oberhalb der CMC Rechnung getragen. Die CMC der eingesetzten Tenside sind **Tab. 6** zu entnehmen.

Tab. 6: Übersicht über die CMC der eingesetzten Tenside

Tensid	BCDC	BTC	CTB	LTB	NCP	DOS	TDOS
CMC (mM)	6,9	5,7	0,92	14,4	0,58	≈2-5	3,4
[Quelle]	[*]	[128]	[128]	[50]	[128]	[123]	[128]

* [unveröffentlichte Mitteilung von Mrestani]

In der vorliegenden Arbeit wurde für die Cephalosporine der Einfluß der Tensidzugabe auf die Verteilung im n-Octanol-Puffer (pH=7,5)-System getestet, da die n-Octanol-Polarität derjenigen biologischer Membranen entspricht [90]. Weiterhin wurde die Membrananreicherung in und der Flux der Cephalosporine durch Modelllipidmembranen wie Dodecanol-Collodium-Membranen, isolierte Meerschweinchen-Dünndarmsegmente und Caco-2-Zellmonoschichten gewachsen in Transwells[®] mit und ohne Tensidzusatz untersucht. Dadurch wurden die Wechselwirkungen zwischen ionisierten β -Lactamantibiotika und ionisierten Testtensiden charakterisiert, die einer möglichen Verbesserung der Membranpassage zugrunde liegen.

Vorraussetzung für die passive Diffusion durch Lipidbarrieren ist eine optimale Lipophilie. Ist die Lipophilie zu gering, kann die Lipidmembran nicht passiert werden, ist sie zu groß, resultieren schlechte Löslichkeit, schlechte Diffusion zur Membran bzw. Anreicherung in der Membran [76].

Als Maß für die Lipophilie wurden in der vorliegenden Arbeit Verteilungskoeffizienten aus der Verteilung im n-Octanol-Puffer (pH=7,5)-System berechnet. Wie die polaren Gruppen der Cephalosporinstrukturen erwarten ließen, fielen die Verteilungskoeffizienten der 3 Testcephalosporine gering aus. Diese konnten für die bei pH=7,5 anionisch vorliegenden Cephalosporine Cefodizim und Cefuroxim [106] durch Kombination mit kationischen Tensiden konzentrationsabhängig zum Teil erheblich gesteigert werden. Diese Ergebnisse bestätigen die hohe Ionenpaarbildungstendenz quarternärer Ammoniumverbindungen im n-Octanol [90]. Der Zusatz von anionischen Gallensalzen führte bei beiden anionischen Modellcephalosporinen zu keiner signifikanten Lipophilieerhöhung. Cefpirom nahm durch Zusatz von sowohl kationischen als auch anionischen Tensiden die Konzentration im n-Octanol zu.

Im nächsten Schritt sollte gezeigt werden, ob sich die bessere Anreicherung der Cephalosporine in einer lipophilen Phase durch Kombination mit amphiphilen Gegenionen auch auf die Diffusion in oder durch Lipidmembranen auswirkt. Anhand der Membran-Modellsysteme mit Dodecanol-Collodium-Membran bzw. Meerschweinchendünndarm konnte festgestellt werden, daß

nicht jede Lipophilieerhöhung auch eine Membranpassage zur Folge hat. Am Modell mit künstlicher Lipidmembran war außer bei Cefuroxim vorrangig eine Anreicherung der Cephalosporine in bzw. an der Membran durch gegenionigen Tensidzusatz zu beobachten. Die gleichen Kombinationen ermöglichten den Testantibiotika sowohl die Anreicherung in den Dünndarmschichten als auch die Permeation in die Akzeptoren. Die Ergebnisse mit Lauryltrimethylammoniumbromid bestätigen, daß optimale Effekte durch Tenside mit einer C12-Kohlenwasserstoff-Seitenkette erreicht werden können [Übersicht bei 190], die wahrscheinlich die optimale Größe und Form aufweisen. Daß für die anionischen Cephalosporine auch anhand dieser Modellsysteme die Zugabe von gleichgeladenen Ionen ohne Einfluß blieb, unterstützt die Theorie der Ionenpaarbildung.

Es wird deutlich, daß die Micellenbildung der Tenside trotz zum Teil steigender Lipophilie die Membranpassage beeinträchtigt bzw. verhindert. Für die Kombinationen, bei denen die Diffusion der Testcephalosporine durch die Membran möglich war und bei denen die Konzentration der Tenside jeweils unterhalb deren CMC lag, war ein direkter Zusammenhang zwischen Verteilungskoeffizienten im n-Octanol-Puffer (pH=7,5)-System und dem resultierenden Permeationskoeffizienten feststellbar, wie in den **Abb. 37 / 38** dargestellt ist.

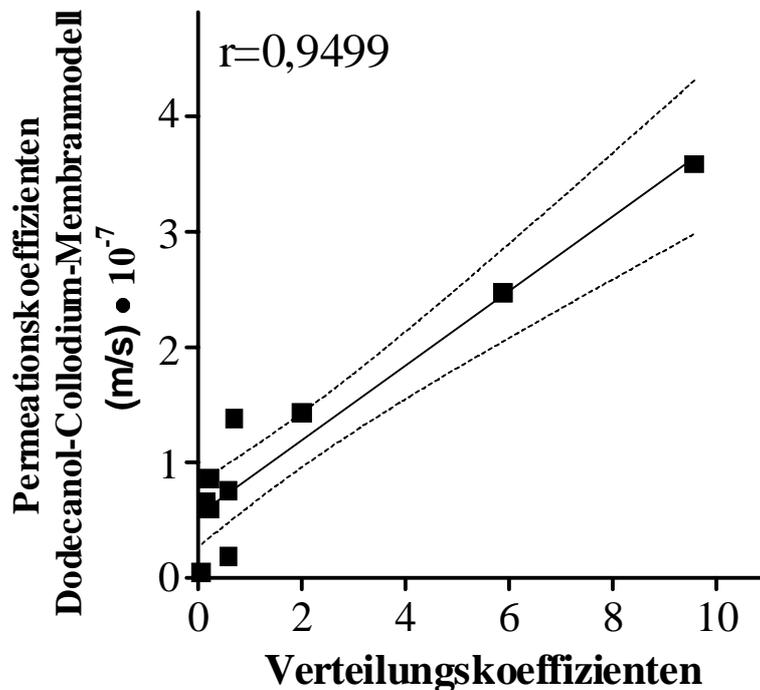


Abb. 37: Zusammenhang zwischen Verteilungskoeffizienten im n-Octanol-Puffer (pH=7,5)-System und Permeationskoeffizienten am Dodecanol-Collodium-Membran-Modell für Cephalosporine in Kombination mit monomeren amphiphilen Gegenionen

Eine lineare und doppel-logarithmische Korrelation zwischen Membranpermeationsrate und Verteilungskoeffizient konnte für Modellsubstanzen in Kombination mit Tensiden unterhalb deren CMC auch von Collado et al. [22] nachgewiesen werden.

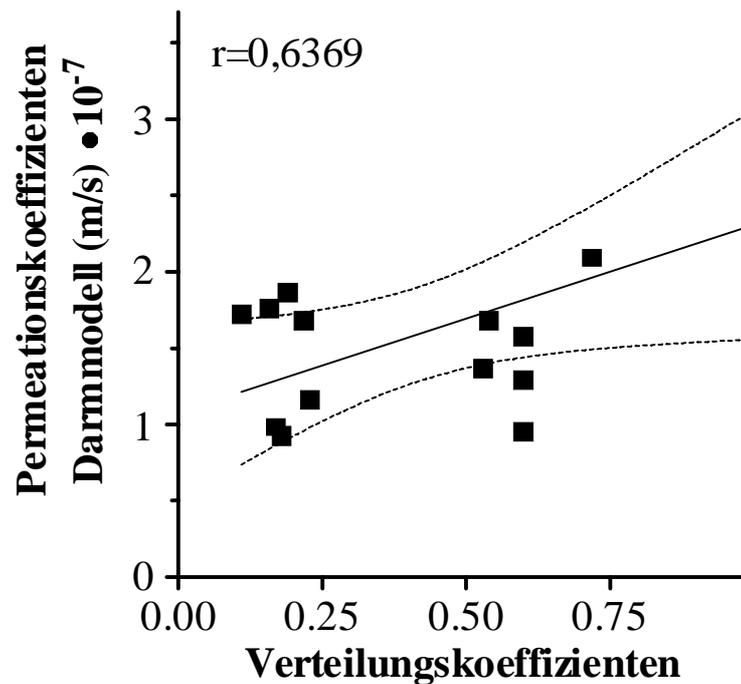


Abb. 38: Zusammenhang zwischen Verteilungskoeffizienten im n-Octanol-Puffer (pH=7,5)-System und Permeationskoeffizienten am Modell mit isolierten Meer-schweinchen-Dünndarmsegmenten für Cephalosporine in Kombination mit mono-meren amphiphilen Gegenionen

Daß die Inkorporation der Cephalosporine in gebildete Tensidmicellen ungünstig für die Membranpassage ist, zeigen auch Studien von Fabra-Campos et al. [42], Gouda et al. [58], Martinez et al. [99], Poelma et al. [132] und Sancho-Chust et al. [148], so daß davon ausgegangen werden sollte, daß die Interaktion von β -Lactamantibiotika mit physiologisch vorliegenden Mischmicellen aus Gallensalzen und Lipiden im Darmlumen die Resorption behindert [76]. konnten Tsuji et al. [183] feststellen, daß die micellare Lösung von Cetyltrimethylammoniumbromid β -Lactamantibiotika vor dem sauren Abbau schützt.

Die Möglichkeit der Verbesserung des Cephalosporinfluxes durch den Einsatz von tensidischen Gegenionen konnte auch anhand des Modellsystems mit einer Zellmonoschicht aus Caco-2-Zellen als Lipidbarriere für ausgewählte Kombinationen gezeigt werden. Jedoch waren die Zellen zu empfindlich um die gleichen Konzentrationsverhältnisse zu testen, wie bei den vorherigen Modellsystemen.

Die gezeigten Ergebnisse werden durch die Studie von Park et al. [124] unterstützt, die die nasale und intestinale Resorptionsverbesserung von Cefotaxim durch Ionenpaarbildung mit N-Cetylpyridiniumchlorid, Cetyltrimethylammoniumbromid und Benzalkoniumchlorid nachweisen konnten. Untersuchungen von Miyamoto [102] ergaben, daß Gallensalze die intestinale Resorption von Cefazolin nicht verbessern, so daß die fehlende Ionenpaarbildung auf Grund gleicher Ladung als Ursache angesehen werden kann. Für Cefpirom kann vermutet werden, daß auf Grund seiner zwitterionischen Struktur bei pH=7,5 [106] ionische Wechselwirkungen sowohl mit Kationen als auch mit Anionen möglich sind, jedoch stehen dagegen die Ergebnisse von Mrestani et al. [107]. Diese zeigten mittels Kapillarelektrophorese, daß Cefpirom nicht mit Lauryltrimethylammoniumbromid interagiert, während Cefuroxim als Anion mit Lauryltrimethylammoniumbromid Komplexe bildet, die konzentrationsabhängig neutral bzw. positiv geladen sind. Allerdings führte die Kombination von Cefpirom und Lauryltrimethylammoniumbromid

auch im Rahmen der vorliegenden Arbeit zu keiner Veränderung des Verteilungs- und Transportverhaltens von Cefpirom (Ergebnisse nicht gezeigt).

Die größeren Permeationsraten bei den biologischen Membranmodellen im Vergleich zum Modell mit künstlicher Lipidmembran lassen sich damit erklären, daß zum einen die biologischen Membranen komplexer aufgebaut sind und zum anderen neben der transzellulären Diffusion die parazelluläre Diffusion möglich ist. In der Literatur werden neben der Ionenpaarbildung auch andere Mechanismen diskutiert.

So machen Fabra-Campos et al. [42] die Erhöhung der Membranpolarität und die Einschränkung der Diffusionsdoppelschicht auf der Membran durch monomere Tenside für die beobachtete Permeationsverbesserung verantwortlich. Für die Permeationssteigerung von β -Lactamantibiotika durch Gallensalze wurde durch Shiga et al. [153], Sakai et al. [146] und Freel et al. [49] die Begünstigung des parazellulären Weges festgestellt, die laut Murakami et al. [108] auf Grund der Calziumbindungskapazität hervorgerufen wird.

Walde et al. [196] machen für die Permeationserhöhung durch konjugierte und unkonjugierte Gallensalze die Beeinträchtigung der Phospholipidordnung verantwortlich, auch wurden Effekte auf die Glycokalix beobachtet [190].

Ergebnisse von Nerurkar et al. [113] weisen darauf hin, daß oberflächenaktive Substanzen die intestinale Resorption von Arzneistoffen verbessern können, indem sie das in der Luminalmembran lokalisierte Effluxsystem hemmen, das für schlechte Resorptionsraten von Peptiden und peptidartigen Substanzen mit verantwortlich gemacht wird. Für die Permeationssteigerung aus diesem Grunde wird das monomere Vorliegen der Tenside verantwortlich gemacht, weil eine weitere Konzentrationserhöhung oberhalb der CMC keine zusätzliche Permeationssteigerung zur Folge hat [114]. Diese zusätzlich möglichen Mechanismen sind jedoch keine Erklärung dafür, daß für Cefodizim und Cefuroxim nur Gegenionen die Permeationsrate steigern, während die möglichen Interaktionen der Gallensalze mit den Membranen keinen günstigen Einfluß auf die Permeationsrate haben.

Zusätzlich wurde in der vorliegenden Arbeit gezeigt, daß sich die Vergrößerung des pH-Wertes in den Versuchslösungen und somit die weitere Verschiebung des Dissoziationsgleichgewichtes des Cefodizims zu Gunsten des unprotonierten (ionisiert vorliegenden) Anteils günstig auf die Membranpassage in Kombination mit Gegenionen auswirkt. Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit weisen also darauf hin, daß die Ionenpaarbildung als Mechanismus der Permeationsverbesserung im Vordergrund steht.

Für amphiphile organische Kationen wurde beschrieben, daß sie an einer unspezifischen Bindungsstelle an der luminalen Zellmembran durch hydrophobe und/oder hydrophile Wechselwirkungen binden können. Die Bindungsstärke nimmt mit der Alkylkettenlänge ab einer Länge von 7 Methylgruppen drastisch zu [144]. In der vorliegenden Arbeit wurden quarternäre Ammoniumverbindungen mit Kohlenwasserstoffketten von C12- bis C16-Länge eingesetzt, so daß folgender Transportmechanismus möglich wäre: 1. die kationischen Tenside binden an dieser Bindungsstelle der apikalen Zellmembran, 2. die Cephalosporine bilden mit diesen Kationen Ionenpaare und diffundieren 3. als Ionenpaare durch die Membran, 4. im wässrigen Milieu dissoziieren diese wieder.

Einfluß der Tensidzugabe auf die Lebensfähigkeit der biologischen Membranen

Die Lebensfähigkeit der Darmschichten unter den Versuchsbedingungen ist die Grundvoraussetzung für das Studium absorptiver Prozesse. Literaturangaben zufolge wird die Integrität und

Funktionalität des mucosalen Gewebes durch Permeabilitäts- und Transportuntersuchungen (z.B. Testung des Absorptionsverhaltens von Phenolrot [38, 149], FITC-Dextran [149], L-Histidin [126], O-Methylglucose [25], D-Glucose [59, 126,]), Messung elektrischer Zellpotentiale [205] und histologische Studien [149, 126] überprüft. Für die vorliegende Problematik der eventuellen Schädigung der Meerschweinchen-Dünndarmmucosa durch Tensidzusatz wurde die Überprüfung des aktiven D-Glucosetransportes, der auch für Meerschweinchen nachgewiesen ist [16, 15, 61, 98], herangezogen.

Die Ergebnisse zeigen, daß der Konzentrationsverlauf der D-Glucose im Akzeptor bei Anwendung der gleichen Ausgangskonzentrationen den Angaben in der Literatur [59, 73, 88, 195] entspricht. Im Gegensatz zu den Ergebnissen von Wagner [195] konnte kein signifikanter Unterschied zwischen rein aktivem Transportprozeß ($C_{\text{Donator}} < C_{\text{Akzeptor}}$) und dem Zusammenspiel von aktivem und passivem Transport ($C_{\text{Donator}} > C_{\text{Akzeptor}}$) festgestellt werden, jedoch zeichnet sich auch ein passiver Anteil am Transportmechanismus ab. Ursache für die unsignifikante Differenz ist wahrscheinlich die unterschiedliche Analytik. Im Gegensatz zu Grass und Sweetana [59], die nur eine 120-minütige Lebensfähigkeit des Versuchsgewebes als sicher annehmen, kann an Hand der vorliegenden Ergebnisse davon ausgegangen werden, daß die Funktionalität der Zellen über mindestens 180min aufrechterhalten wurde und daß das Modell für die angestrebten Versuche eingesetzt werden durfte.

Anhand der Überprüfung des Tensideinflusses auf den D-Glucose-Transport durch die Meerschweinchen-Dünndarmschichten zeigte nur die Zugabe von 20 mmol/l Lauryltrimethylammoniumbromid eine Zellschädigung; alle anderen Tenside beeinflussten den Glucosetransport in den eingesetzten Konzentrationen nicht signifikant. Im Gegensatz dazu zeigten Fasano et al. [43], daß schon 1 mM unkonjugierter Gallensäuren die aktive Resorption von Glucose behindern.

Für das Membranmodell mit Caco-2-Zellen wurde der Einfluß des Tensidzusatzes auf den zellulären Zusammenhalt überprüft, indem der Flux des parazellulären Diffusionsmarkers Mannitol gemessen wurde. Die „Dichtigkeit“ des Epithels wurde schon durch sehr geringe Tensidkonzentrationen (0,25-0,5 mmol/l) beeinträchtigt, so daß eine Schädigung der Zellen nicht ausgeschlossen werden kann. Anderberg und Artursson [5] konnten für Natriumdodecylsulfat zeigen, daß die Erhöhung der Caco-2-Permeabilität für Mannitol durch 20-minütige SDS-Einwirkung reversibel war, während eine 2-stündige Einwirkung von SDS die Mannitolpermeabilität irreversibel erhöhte. Wie Quan et al. [134] feststellten, verändern geringfügig zytotoxische Konzentrationen einiger Enhancer die TEER reversibel.

Durch eingehendere Untersuchungen als in der vorliegenden Arbeit konnten Anderberg et al. [6] für Taurodesoxycholat-Na konzentrationsabhängig Auswirkungen auf intrazelluläre Enzyme, die Membranpermeabilität und die Morphologie feststellen, die bei niedrigeren Konzentrationen nach bis zu 3 h wieder reversibel waren [166]. Miyamoto et al. zeigten, daß verschiedene Gallensalze in relativ geringen Konzentrationen (0,2%) die intestinale Mucosastruktur nicht angreifen [102]. Auch die Langzeittherapie mit Chenodeoxycholsäure (350-750 mg/Tag) zur Auflösung von Gallensteinen war nur mit geringen unerwünschten Nebenwirkungen verbunden [150]. Dazu konnten Shekels et al. [152] nachweisen, daß *in vitro* cytotoxische Gallensäurekonzentrationen die Mucinproduktion stimulieren, wodurch *in vivo* der Zellschutz erhöht wird. Weiterhin wird die *in vitro* beobachtete schädliche Wirkung der Gallensalze auf die intestinale Mucosa *in vivo* durch Bildung von Mischmicellen mit Lipiden verhindert [76]. Gleichzeitig muß berücksichtigt werden, daß nach einer Testmahlzeit und Entleerung der

Gallenblase eine durchschnittliche Gallensäurekonzentration im Duodenum von 14,5 mM erreicht wird [200], die zu keiner Schädigung führt.

Whitmore et al. [202] fanden heraus, daß die Steigerung der Permeationsrate von Testsubstanzen durch Zugabe synthetischer Tenside mit einer vergleichsweise geringen Freisetzung von Proteinen und einer bedeutend stärkeren von Phospholipiden aus dem Darmgewebe verbunden ist. Der Einfluß auf das Darmgewebe war bei den anionischen Tensiden größer als bei nichtionischen gefolgt von kationischen. So beeinträchtigt laut Malcchiodi-Albedi et al. [97] N-Cetylpyridiniumbromid nicht die Gewebemorphologie von humaner Colonmucosa. Cetyltrimethylammoniumbromid und N-Cetylpyridiniumbromid werden u.a. als lokale Mundantiseptika verwendet, die nach Verschlucken auch in Kontakt mit der Darmschleimhaut kommen [23], die physiologische Unbedenklichkeit muß im Rahmen des Zulassungsverfahrens eines Arzneimittels nachgewiesen worden sein.

In weiterführenden Arbeiten sollte nach geeigneten nachweislich physiologisch verträglichen Gegenionen gesucht werden, die ähnliche physikochemische Eigenschaften wie die in dieser Arbeit als Modellverbindungen eingesetzt, um die Resorptionsverbesserung durch Ionenpaarbildung therapierelevant ausnutzen zu können.

Vergleich der unterschiedlichen Membranmodelle

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, daß die Ergebnisse an Hand des Modellsystems mit künstlicher Lipidmembran gut mit denen des Meerschweinchen-Dünndarm-Modellsystems korrelieren. Dies ist in der **Abb. 39** dargestellt.

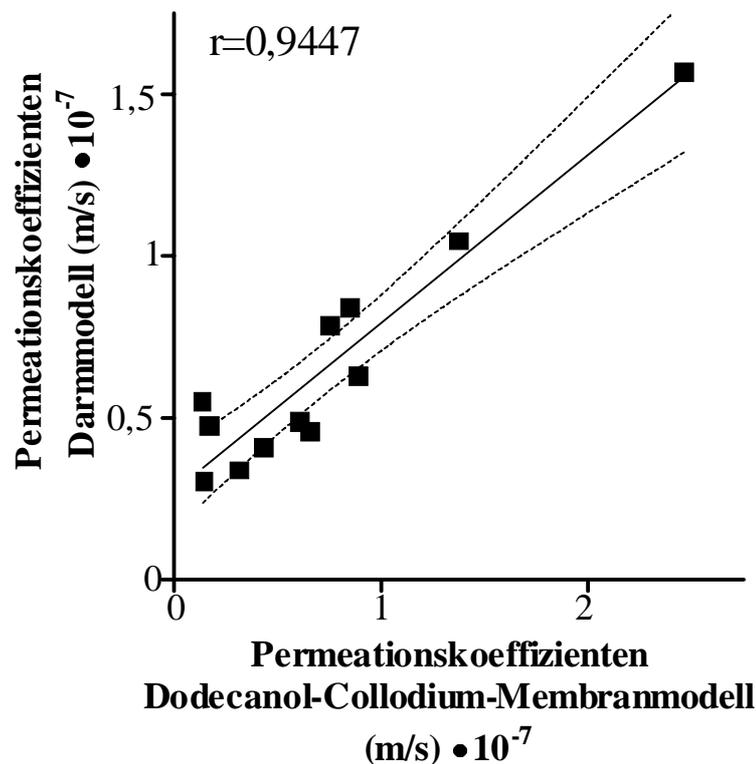


Abb. 39: Korrelation zwischen den Permeationskoeffizienten erhalten am Modell mit Dodecanol-Collodium-Membran und am Modell mit isoliertem Meerschweinchen-Dünndarm

Auf einen direkten Vergleich mit den Fluxdaten durch die Caco-2-Zellmonoschicht muß auf Grund der verschiedenen Konzentrationsverhältnisse verzichtet werden. Jedoch lassen sich die

Modellsysteme hinsichtlich praktischer Merkmale vergleichen, die in **Tab. 7** wertend zusammengefaßt sind:

Tab. 7: Vor- und Nachteile bei der Anwendung der Membranmodelle der vorliegenden Arbeit

<i>Modelle</i>	<i>System mit Dodecanol-Colloidium-Membran</i>	<i>System mit isoliertem Meerschweinchen-Dünndarm</i>	<i>Caco-2-Zellkultur</i>
<i>Vorteile</i>	-einfache Membranherstellung -einfache Handhabung -Vermeidung von Tierversuchen	-einfache Präparation, einfache Handhabung -physiologischer Zellverband mit anhaftendem Mucus	-sowohl passive als auch aktive Transportprozesse sehr gut untersuchbar -Modellierung der physiologischen Zellmonoschicht zwischen Lumen und Blutkapillaren
<i>Nachteile</i>	-nur passive Diffusion modellierbar	-unphysiologisches Überwinden der gesamten Darmschichten, für die Modellierung der passiven Diffusion ausreichend -Tötung der Versuchstiere erforderlich -relativ kleine Permeationsfläche	-Zellen ohne physiologische Schutzschicht (Mucus) -aufwendige und kostspielige Kultivierungsarbeit

Trotz der aufgeführten Nachteile waren die eingesetzten Membranmodelle für die bearbeitete Problemstellung einsetzbar, da die Grenzen ihrer Aussagefähigkeit berücksichtigt wurden. So wurde das Modellsystem mit isoliertem Meerschweinchen-Dünndarm nur für Versuche zur passiven Diffusion eingesetzt, obwohl die Lebensfähigkeit der Zellen und die Transportaktivität für D-Glucose nachweisbar war. Wie auch Perrier und Gibaldi [125] feststellten, ist isolierter Meerschweinchendünndarm als Modellsystem für aktive Transportprozesse weniger geeignet, da die resorptionsrelevanten Transportproteine nur in den Enterozyten lokalisiert sind, so daß das eigentliche Ausmaß der aktiven Permeation durch die Passage der nachfolgenden Zellschichten auf passivem Wege verwischt wird. Eine Alternative wäre die Verwendung der Ussing-Kammer [189], bei der isolierte Mucosa von beispielsweise Kaninchen (die Mucosa von Meerschweinchen und Ratten ist für die Präparation zu empfindlich) als resorptionsrelevante Zellschicht einsetzbar ist. Der Bedarf größerer Versuchstiere verteuert und verkompliziert jedoch dieses Modellsystem. Ein weiteres Modell mit isoliertem Versuchstierdünndarm ist das „*everted sac*“-System von Wilson und Wiseman [203], das im Vergleich zum Modell aus der vorliegenden Arbeit den Vorteil aufweist, daß eine größere Resorptionsfläche genutzt werden kann. Dagegen stehen aber die Nachteile, daß diese Fläche nicht genau definierbar ist und daß die Volumenbedingungen (Volumen ist im Donator größer als im Akzeptor) nicht den physiologischen Bedingungen entsprechen. Beim Modell unter Verwendung von intestinalen Ringscheiben [17] ist nur die Aufnahme in die Zellen bestimmbar, wobei nicht nur die luminale Darmseite der Testlösung ausgesetzt ist.

Der Vorteil des verwendeten Modellsystems mit isoliertem Meerschweinchendünndarm gegenüber Bürstensaummembranvesikeln [79] ist, daß die Darmzellen unter den Versuchsbedingungen im verwendeten Modell lebensfähig sind, wobei die Vesikel nach aufwendigen Präparationsschritten nur aus apikalen Zellmembranbestandteilen gebildet werden und serosale und intrazelluläre Bestandteile unberücksichtigt bleiben. Der Vorteil der Vesikel wiederum liegt in der Möglichkeit, gezielt die luminaire Aufnahme zu verfolgen.

Am vielseitigsten und zugleich aussagefähigsten ist das Modellsystem mit einer Zellmonoschicht aus Caco-2-Zellen als Transportbarriere, da sowohl passive als auch aktive Transportprozesse gezielt untersuchbar sind, die den physiologischen Bedingungen beim Menschen entsprechen. So empfehlen Quan et al. [134] das Modell unter Verwendung von Caco-2-Zellen als Screeningsystem für Effektivität und Toxizität von Enhancern. Jedoch schlußfolgerten Lennernäs et al. [87] aus ihrer Studie mit verschiedenen passiv und aktiv transportierten Modellsubstanzen, daß mit dem Caco-2-Testsystem der passive Arzneistofftransport beim Menschen vorhergesagt werden kann, während der aktive Transport jeweils um einen Faktor korrigiert werden muß, da das Ausmaß der Carrierexpression bei der Caco-2-Zelllinie geringer als Folge des colonalen Ursprungs der Zelllinie im Vergleich zum menschlichen Intestinum ist. Diese Besonderheit zeigen auch Ergebnisse von Artursson [7] und Rubas et al. [137].

5 Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wurden die Resorptionsmöglichkeiten für Cephalosporine aus dem Gastrointestinaltrakt charakterisiert. Trotz Hydrophilie ist die orale Applikation einiger Cephalosporine und Penicilline möglich, da der tertiär-aktive H⁺/Peptid-Symporter PEPT1 diese β -Lactamantibiotika gegen einen Konzentrationsgradienten in die Epithelzellen des Darmes transportieren kann. β -Lactamantibiotika werden auf Grund ihrer tripeptid-ähnlichen Struktur vom PEPT1 als Substrat erkannt. Zur genauen Untersuchung der strukturellen Erfordernisse an neue β -Lactamantibiotika, aktiv durch PEPT1 transportiert zu werden, wurden die Affinitäten von 20 Cephalosporinen und 3 Penicillinen zu diesem Carrier bestimmt. Die Transportstudien erfolgten an der humanen Colocarzinomzelllinie Caco-2. Aus der Messung der Aufnahmemhemmung des Referenzsubstrates [¹⁴C]Gly-Sar durch die Testsubstanzen ergaben sich Inhibierungskonstanten K_i als Maß für die Affinität der β -Lactamantibiotika zum PEPT1. Das Spektrum der Inhibierungskonstanten reicht von niedrigen Werten von 0,3-3 mmol/l – vergleichbar mit denen von natürlichen Di- und Tripeptiden – über einen mittleren Bereich von 8-40 mmol/l bis zu sehr hohen K_i-Werten >50 mmol/l. Für die letzte Gruppe kann davon ausgegangen werden, daß diese Vertreter keine Substrate von PEPT1 sind. Der Struktur-Affinitäts-Vergleich läßt darauf schließen, daß (1) die unveränderte Tripeptidstruktur mit freier N-terminaler Aminogruppe und freier C-terminaler Carboxylgruppe hohe Affinitäten bewirkt. Dabei ist es unerheblich, ob diese in ein Cephem- oder Penamgerüst intergriert ist. (2) Die Aminogruppe kann ohne Affinitätsverlust durch eine Hydroxylgruppe bzw. eine zusätzliche Carboxylgruppe ersetzt werden. (3) Die Substitution und der Sättigungsgrad des N-terminalen Ringsystems und dessen Abstand zum β -Lactamgerüst modifiziert die Affinität zum PEPT1. (4) Die Ausbildung einer zwitterionischen Struktur zwischen C-terminaler Carboxylgruppe und quarternärem Ammonium-Substituenten in Position C3 verhindert die Affinität zu PEPT1. Auf Grund der guten Korrelation zwischen Affinität zu PEPT1 und der oralen Bioverfügbarkeit kann davon ausgegangen werden, daß neu entwickelte β -Lactamantibiotika, die via PEPT1 oral verfügbar sein sollen, am beschriebenen Testmodell den Schwellenwert von K_i=14 mM nicht überschreiten dürfen. Wegen der Komplexität der strukturellen Bedingungen könnten die vorliegenden Ergebnisse einer computergestützten Konformationsanalyse unterzogen werden, um die orale Bioverfügbarkeit neuer Verbindungen noch besser vorhersagen zu können.

Im Folgenden wurden die Permeationsraten der getesteten β -Lactamantibiotika durch die Caco-2-Zellmonoschicht bestimmt und mit den ermittelten Affinitäten zu PEPT1 korreliert. Es ergab sich ein direkt proportionaler Zusammenhang. Daraus folgt, daß die intestinale Resorptionsrate von β -Lactamantibiotika maßgeblich durch die Ausnutzung des Transports via PEPT1 bestimmt wird. Abweichungen von dieser Korrelation können durch höhere Lipophilie und damit größeren diffusiblen Anteil am Gesamttransport, den Einfluß eines luminalen Effluxsystems, welches den Transport zurück in das Lumen begünstigt oder das noch nicht genauer charakterisierte Transportsystem für Di- und Tripeptide in der serosalen Membran erklärt werden. Die Ergebnisse zeigen, daß die orale Bioverfügbarkeit von mehr als 50% am verwendeten Testmodell einen minimalen Permeationskoeffizienten von $5,5 \cdot 10^{-9}$ m/s voraussetzt.

Bei der Untersuchung der Regulation und Modifikation des Transportsystems PEPT1 durch extrazelluläre Zusätze wurde festgestellt, daß Zink-Ionen und in stärkerem Maße Kupfer-Ionen den [¹⁴C]Gly-Sar-Transport kompetitiv hemmen. Durch Zink-Ionen-Zusatz wurde nur der

Transport von Cephalosporinen mit freier Carboxylgruppe am Cephem-Ringsystem, nicht jedoch mit veresterter Carboxylgruppe gehemmt. Wahrscheinlich bilden Zink-Ionen mit Substraten von PEPT1 Komplexe, die niedriger affin sind als die freien Substrate. Die festgestellte Transportbeeinflussung hat klinische Relevanz, sofern orale Cephalosporine mit freier Carboxylgruppe am C-terminalen Ende simultan zu einer Zinksubstitution gegeben werden müssen.

Die drei hydrophilen, strukturell unterschiedlichen Cephalosporine Cefodizim, Cefuroxim und Cefpirom, die alle keine Substrate von PEPT1 sind, wurden ausgewählt, um die Ionenpaarbildung mit amphiphilen Gegenionen (quarternäre Ammoniumsalze und Gallensalzderivate) als Möglichkeit der Permeationsverbesserung durch lipophile Modellmembranen zu testen. Die Bestimmung des Verteilungsverhaltens im n-Octanol-Puffer (pH=7,5)-System zeigte, daß die Zugabe von kationischen Ammoniumsalzen mit zunehmender Konzentration die Lipophilie der anionischen Cephalosporine Cefodizim und Cefuroxim zum Teil erheblich steigert, während die gleichgeladenen Gallensalzderivate ohne Einfluß bleiben. Infolge der zwitterionischen Struktur des Cefpiroms führten kationische und anionische Tenside zu einer deutlichen Lipophilieerhöhung.

Der Einfluß dieser Lipophiliebeeinflussung auf das Permeationsverhalten der drei Testcephalosporine wurde an den Modellsystemen mit Dodecanol-Collodium-Membranen, isoliertem Meerschweinchendünndarm und Caco-2-Zellmonoschichten als Modellmembranen überprüft. An Hand der beiden ersten Modellsysteme wurde festgestellt, daß die passive Diffusion der Cephalosporine durch Einschluß in Tensidmicellen behindert wird. Für die Kombinationen bei monomerem Vorliegen der Tenside konnte ein direkter Zusammenhang zwischen Lipophiliesteigerung und Permeationsrate nachgewiesen werden. Die Permeationsbegünstigung durch ausschließlich gegenionige Zusätze führte zu dem Schluß, daß sich auf Grund von ionischen Wechselwirkungen zwischen den Ladungen der Cephalosporine und den ionischen Tensiden Assoziate ausbilden, die die Permeation in und durch die Modellmembranen ermöglichen. Somit kann die Ionenpaarbildung die Resorption auf passivem Wege verbessern. Nur Lauryltrimethylammoniumbromid schädigte die Dünndarmmembranen, wie durch Überprüfung des aktiven D-Glucosetransportes nachgewiesen wurde. Die Permeationsbegünstigung durch ausgewählte Kombinationen mit Gegenionen konnte auch am Modell mit Caco-2-Zellmonoschichten gezeigt werden. Da jedoch die Bestimmung des Mannitolfluxes unter Zugabe der verschiedenen kationischen Tenside Hinweise auf einen verminderten Zellzusammenhalt gab, ist die Permeationsverbesserung durch diese Tenside zumindest teilweise durch eine Membranschädigung zu erklären. Deshalb müssen zur therapeutischen Ausnutzung der Ionenpaarbildung zur Resorptionsverbesserung lipophile, physiologisch verträgliche Gegenionen ausgewählt werden, die das Darmgewebe nicht oder nur reversibel beeinträchtigen.

Der Vergleich der eingesetzten Modellsysteme zeigte, daß die humane Colocarzinomzelllinie Caco-2 als Modellmembranbildner sowohl zur Untersuchung von aktiven als auch passiven Transportprozessen des Intestinums empfohlen werden kann, während die anderen Modellsysteme nur bedingt aussagefähig sind.

6 Literatur

1. Abraham EP: Cephalosporins 1945-1986. *Drugs*. 34 (1987) 1-14
2. Adibi SA: The oligopeptide transporter (Pept-1) in human intestine: biology and function. *Gastroenterology* 113 (1997) 332-340
3. Amidon GL und Lee HJ: Absorption of peptide and peptidomimetic drugs. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 34 (1994) 321-341
4. Amlacher R; Härtl A; Neubert R; Stöckel U und Wenzel K: Influence of ion- pair formation on the pharmacokinetic properties of drugs. Pharmacokinetic interactions of bretylium and hexylsalicylic acid in rabbits. *J. Pharm. Pharmacol.* 43 (1991) 794-797
5. Anderberg EK und Artursson P: Epithelial transport of drugs in cellculture. VIII: Effects of sodium dodecylsulfate on cell membrane and tight junction permeability in human intestinal epithelial (Caco-2) cells. *J. Pharm. Sci.* 82 (1993) 392-398
6. Anderberg EK; Nystrom C und Artursson P: Epithelial transport of drugs in cell culture. VII: Effects of pharmaceutical surfactants excipients and bile acids on transepithelial permeability in monolayers of human intestinal epithelial (Caco-2) cells. *J. Pharm Sci.* 81 (1992) 879-887
7. Artursson P: Epithelial transport of drugs in cell culture. I: A model for studying the passive diffusion of drugs over intestinal absorptive (Caco-2) cells. *J. Pharm Sci.* 79 (1990) 476-482
8. Auerhoff H; Knabe J und Höltje HD: *Lehrbuch der Pharmazeutischen Chemie*. Stuttgart: Wiss. Verl.-Ges. 12. Aufl. (1991) 51-58
9. Bai JP und Amidon GL: Structural specificity of mucosal-cell transport and metabolism of peptide drugs: implication for oral peptide drug delivery. *Pharm. Res.* 9 (1992) 969-978
10. Blais A; Bissonnette P und Berteloot A: Common characteristics for Na⁺-dependent sugar transport in Caco-2 cells and human fetal colon. *J. Membr. Biol.* 99 (1987) 113-125
11. Börner V; Fei YJ; Hartrodt B; Ganapathy V; Leibach FH; Neubert K und Brandsch M: Transport of amino acid aryl amides by the intestinal H⁺/peptide cotransport system, PEPT1. *Eur J Biochem.* 255 (1998) 698-702
12. Brandsch M; Brandsch C; Ganapathy ME; Chew CS; Ganapathy V und Leibach FH: Influence of proton and essential histidyl residues on the transport kinetics of the H⁺/peptide cotransport systems in intestine (PEPT1) and kidney (PEPT2). *Biochim. Biophys. Acta* 1324 (2) (1997) 251-262
13. Brandsch M; Miyamoto Y; Ganapathy V und Leibach FH: Expression and protein kinase C-dependent regulation of peptide/H⁺ co-transport system in the Caco-2 human colon carcinoma cell line. *Biochem. J.* 299 (1994) 253-260
14. Bretschneider B; Brandsch M und Neubert R: Intestinal transport of β -lactam antibiotics: Analysis of the affinity at the H⁺/peptide symporter (PEPT1), the uptake into Caco-2 cell monolayers and the transepithelial flux. *Pharm. Res.* 16 (1999) 55-61
15. Brot-Laroche E; Serrano MA; Delhomme B und Alvarado F: Temperature sensitivity and substrate specificity of two distinct Na⁺-activated D-Glucose transport systems in guinea pig jejunal brush border membrane. *J. Biol. Chem.* 261 (1986) 6168-6176
16. Burdett K und Lauterbach F: Gastric fundic inhibition of sugar transport across the intestinal mucosa of guinea pig. *Pflügers Archiv. European Journal of Physiology.* 426 (1994) 491-498
17. Burston D; Addison JM und Matthews DM: Uptake of dipeptides containing basic and acidic amino acids by rat small intestine in vitro. *Clin. Sci.* 43 (1972) 823-837

18. Burton PS; Conradi RA; Hilgers AR und Ho NF: Evidence for a polarized efflux system for peptides in the apical membrane of Caco-2 cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 190 (1993) 760-766
19. Carroll JJ; Smith N und Babson AL: A colorimetric serum glucose determination using hexokinase and glucose-6-phosphate dehydrogenase. *Biochem. Med.* 4 (1970) 171-180
20. Cheng YC und Prusoff WH: Relationship between the inhibition constant (K_I) and the concentration of inhibitor which causes 50 per cent inhibition (I_{50}) of an enzymatic reaction. *Biochem. Pharmacol.* 22 (1973) 3099-3108
21. Chong S; Dando SA; Soucek KM und Morrison RA: In vitro permeability through Caco-2 cells is not quantitatively predictive of in vivo absorption for peptide-like drugs absorbed via the dipeptide transporter system. *Pharm Res.* 13 (1996) 120-123
22. Collado EF; Fabra-Campos S; Peris-Ribera JE; Casabó VG; Martín-Villodre A und Plá-Delfina JM: Absorption-partition relationships for true homologous series of xenobiotics as a possible approach to study mechanisms of surfactants in absorption. II. Aromatic amines in rat small intestine. *Int. J. Pharm* 44 (1988) 187-196
23. Collins AE und Deasy P: Bioadhesive lozenge for the improved delivery of cetylpyridinium chloride. *J. Pharm Sci.* 79 (1990) 116-120
24. Company M; Benitez MJ und Jiménez JS: Degradation of β -lactam antibiotics in the presence of Zn^{2+} and 2-amino-2-hydroxymethylpropane-1,3-diol (Tris). A hypothetical non-enzymic model of β -lactamases. *Int. J. Biol. Macromol.* 13 (1991) 225-230
25. Csáky TZ und Hara Y: Inhibition of active intestinal sugar transport by digitalis. *Am. J. Physiol.* 209 (1965) 467-472
26. Daniel H und Adibi SA: Selective effect of zinc on uphill transport of oligopeptides into kidney brush border membrane vesicles. *FASEB J.* 9 (1995) 1112-1117
27. Daniel H und Adibi SA: Transport of β -lactam antibiotics in kidney brush border membrane. Determinants of their affinity for the oligopeptide/ H^+ symporter. *J. Clin. Invest.* 92 (1993) 2215-2223
28. Daniel H: Function and molecular structure of brush border membrane peptide/ H^+ symporters. *J. Membrane Biol.* 154 (1996) 197-203
29. Daniel H; Morse EL und Adibi SA: The high and low affinity transport systems for dipeptides in kidney brush border membrane respond differently to alterations in pH gradient and membrane potential. *J. Biol. Chem.* 266 (1991) 19917-19924
30. Dantzig AH; Duckworth DC und Tabas LB: Transport mechanisms responsible for the absorption of loracarbef, cefixime, and cefuroxime axetil into human intestinal Caco-2 cells. *Biochim. Biophys. Acta* 1191 (1994) 7-13
31. Dantzig AH; Tabas LB und Bergin L: Cefaclor uptake by the proton-dependent dipeptide transport carrier of human intestinal Caco-2 cells and comparison to cephalixin uptake. *Biochim. Biophys. Acta* 1112 (1992) 167-173
32. Delie F und Rubas W: A human colonic cell line sharing similarities with enterocytes as a model to examine oral absorption: advantages and limitations of the Caco-2 model. *Crit. Rev. Ther. Drug Carrier Syst.* 14 (1997) 221-286
33. Doddard AF; Erah PO; Barrett DA; Shaw PN und Spiller RC: The effect of protein binding and lipophilicity of penicillins on their in-vitro flux across gastric mucosa. *J. Antimicrob. Chemother.* 41 (1998) 231-236
34. Doerffel K: Statistik in der analytischen Chemie. Deutscher Verlag für Grundstoffindustrie. Leipzig. (1987)

35. Doerffel K; Geyer R und Müller H: Analytikum. Leipzig, Stuttgart: Deutscher Verlag für Grundstoffindustrie. (1994)
36. Döring F; Will J; Amasheh S; Clauss W; Ahlbrecht H und Daniel H: Minimal molecular determinants of substrates for recognition by the intestinal peptide transporter. *J. Biol. Chem.* 273 (1998) 23211-23218
37. Dyer J; Beechey RB; Gorvel JP; Smith RT; Wootton R und Shirazi-Beechey SP: Glycyl-L-proline transport in rabbit enterocyte basolateral-membrane vesicles. *Biochem. J.* 269 (1990) 565-571
38. Eastin WCJR und Birnbaum LS: Intestinal absorption of two glucose analogues in rats of different ages. *Experimental Gerontology* 22 (1987) 351-358
39. Eddy EP; Wood C; Miller J; Wilson G und Hidalgo IJ: A comparison for the affinities of dipeptides and antibodies for the di-/tripeptide transporter in Caco-2-Cells. *Int. J. Pharm.* 115 (1995) 79-86
40. Engle MJ; Goetz GS und Alpers DH: Caco-2 cells express a combination of colonocyte and enterocyte phenotypes. *J. Cell. Physiol.* 174 (1998) 362-369
41. Ewe K und Karbach U: Funktion des Magen- Darm- Kanals. In: *Physiologie des Menschen*. Hrsg: Schmidt RF und Thews G. Berlin, Heidelberg: Springer. 24. Aufl. (1990) 733-777
42. Fabra-Campos S; Real JV; Gomez-Meseguer V; Merino M und Pla-Delfina JM: Biophysical absorption models for phenyl-alkyl acids in the absence and in the presence of surfactants. *Studies in the rat small intestine. Eur. J. Drug Metab. Pharmacokinet.* 3 (1991) 32-42
43. Fasano A; Verga MC; Raimondi F und Guandalini S: Effects of deconjugated bile acids on electrolyte and nutrient transport in the rabbit small intestine in vitro. *J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr.* 18 (1994) 327-333
44. Fei YJ; Kanai Y; Nussberger S; Ganapathy V; Leibach FH; Romero MF; Singh SK; Boron WF und Heidiger MA: Expression cloning of mammalian proton-coupled oligopeptide transporter. *Nature.* 368 (1994) 563-566
45. Fei YJ; Liu W; Prasad PD; Kekuda R; Oblak TG; Ganapathy V und Leibach FH: Identification of the histidyl residue obligatory for the catalytic activity of the human H⁺/peptide transporters PEPT1 and PEPT2. *Biochemistry.* 36 (1997) 452-460
46. Fichtl B et al.: *Allgemeine Pharmakologie und Toxikologie*. In: *Allgemeine und spezielle Pharmakologie und Toxikologie*. Hrsg: Forth W; Henschler D; Rummel W und Starke K. Heidelberg, Berlin, Oxford: Spektrum, Akad. Verl. 7. Aufl. (1996) 3-102
47. Florence AT: Surfactant interactions with biomembranes and drug absorption. *Pure Appl. Chem.* 53 (1981) 2057-2068
48. Fogh J; Fogh JM and Orfeo T: One hundred and twentyseven cultured human tumor cell lines producing tumors in nude mice. *J. Natl. Cancer Inst.* 1 (1977) 936-941
49. Freel RW; Hatch M; Earnest DL und Goldner AM: Role of tight-junctional pathways in bile-salt induced increases in colonic permeability. *Am. J. Physiol.* 245 (1983) G816-G821
50. Fuhrhop, JH: *Bioorganische Chemie*. Stuttgart: Georg Thieme. 9. Aufl. (1982)
51. Ganapathy ME; Brandsch M; Prasad PD; Ganapathy V und Leibach FH: Differential recognition of β -lactam antibiotics by intestinal and renal peptide transporters, PEPT1 and PEPT2. *J. Biol. Chem.* 270 (1995) 25672-25677
52. Ganapathy ME; Huang W; Wang H; Ganapathy V und Leibach FH: Valacyclivir: a substrate for the intestinal and renal peptide transporters PEPT1 and PEPT2. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 246 (1998) 470-475

53. Ganapathy ME; Prasad PD; Mackenzie B; Ganapathy V und Leibach FH: Interaction of anionic cephalosporins with the intestinal and renal peptide transporters PEPT1 and PEPT2. *Biochim. Biophys. Acta* 1324 (1997) 296-308
54. Ganapathy V und Leibach FH: Is intestinal peptide transport energized by a proton gradient? *Am. J. Physiol.* 249 (1985) G153-G160
55. Ganapathy V; Brandsch M und Leibach FH: Intestinal transport of amino acids and peptides. In: *Physiology of the Gastrointestinal Tract*. Hrsg.: Johnson LR. New York: Raven Press. 3. Aufl. (1994) 1773-1793
56. Glahn RP und Van Campen DR: Iron uptake is enhanced in Caco-2 cell monolayers by cysteine and reduced cysteinyl glycine. *J. Nutr.* 127 (1997) 642-647
57. Gochoco CH; Ryan FM; Miller J; Smith PL und Hidalgo IJ: Uptake and transepithelial transport of the orally absorbed cephalosporin cephalexin, in the human intestinal cell line, Caco-2. *Int. J. Pharm.* 104 (1994) 187-202
58. Gouda MW; Khalafalah N und Khalil SA: Effect of surfactants on absorption through membranes V: Concentration-dependent effect of a bile salt (sodium deoxycholate) on absorption of a poorly absorbable drug, phenolsulfonphthalein, in humans. *J. Pharm. Sci.* 65 (1977) 727-728
59. Grass GM und Sweetana SA: In vitro measurement of gastrointestinal tissue permeability using a new diffusion cell. *Pharm. Res.* 5 (1988) 372-376
60. Han H; de Vruet RL; Rhie JK; Covitz KM; Smith PL; Lee CP; Oh DM; Sadee W und Amidon GL: 5'-Amino acid esters of antiviral nucleosides, acyclovir, and AZT are absorbed by the intestinal PEPT1 peptide transporter. *Pharm. Res.* 15 (1998) 1154-1159
61. Hanawa I und Saudo H: Effects of pectin and alginate on glucose absorption rates in the guinea pig ileum in vitro. *Wakayama-Ken Eisei Kogai Kentyu Senta Nenpos* 37 (1991) 23-29
62. Hidalgo IJ; Bhatnagar P; Lee CP; Miller J; Cucullino G und Smith PL: Structural requirements for interaction with the oligopeptide transporter in Caco-2 cells. *Pharm. Res.* 12 (1995) 317-319
63. Hidalgo IJ; Raub TJ und Borchardt RT: Characterization of the human colon carcinoma cell line (Caco-2) as a model system for intestinal epithelial permeability. *Gastroenterology.* 95 (1989) 736-749
64. Hidalgo IJ; Ryan FM; Marks GJ und Smith PL: pH-dependent transepithelial transport of cephalexin in rabbit intestinal mucosa. *Int. J. Pharm.* 98 (1993) 83-92
65. Hilgers AR; Conradi RA und Burton PS: Caco-2 cell monolayers as a model for drug transport across the intestinal mucosa. *Pharm. Res.* 7 (1990) 902-910
66. Hu M; Subramanian P; Mosberg HI und Amidon GL: Use of the peptide carrier system to improve the intestinal absorption of L-alpha-methyldopa: carrier kinetics, intestinal permeabilities, and in vitro hydrolysis of dipeptidyl derivatives of L-alpha-methyldopa. *Pharm. Res.* 6 (1989) 66-70
67. Hunt JN: Does Calcium mediate slowing of gastric emptying by fats in humans? *Am. J. Physiol.* 244 (1983) G89-G94
68. Idoate I; Mendizabal MV; Urdaneta E und Larralde J: Interactions of cephadrine and Cefaclor with the intestinal absorption of D-galactose. *J. Pharm. Pharmacol.* 48 (1996) 645-650
69. Imanidis G; Hartner KC und Mazer NA: Intestinal permeation and metabolism of a model peptide (leuprolide) and mechanisms of permeation enhancement by non-ionic surfactants. *Int. J. Pharm.* 120 (1995) 41-50

70. Informationsmaterial der Firma Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen Braunschweig (Deutschland)
71. Inui KI; Okano T; Maegawa H; Kato M; Takano M und Hori R: H⁺-coupled transport of p.o. cephalosporins via dipeptide carriers in rabbit intestinal brush border membranes: difference of transport characteristics between cefixime and cephadrine. *J. Pharmakol. Exp. Ther.* 247 (1988) 235-241
72. Inui KI; Yamamoto M und Saito H: Transepithelial transport of oral cephalosporins by monolayer of intestinal epithelial cell line Caco-2: Specific transport systems in apical and basolateral membranes. *J Pharmacol. Exp Ther.* 261 (1992) 195-201
73. Jezyk N; Rubas W und Grass GM: Permeability characteristics of various intestinal regions of rabbit, dog, and monkey. *Phar. Res.* 9 (1992) 1580-1586
74. Jonkman JHG und Hunt CA: Ion pair absorption of ionized drugs - fact or fiction? *Pharm. Weekbl. [Sci]* 5 (1983) 41-47
75. Kakemi K; Sezaki H; Muranishi S und Tsujimura Y: Absorption and excretion of drugs. XL. Enhancement of the rectal absorption of pharmaceutical amines with lauryl sulfate and saccharinate anions. *Chem. Pharm. Bull.* 17 (1969) 1641-1650
76. Kararli TT: Gastrointestinal absorption of drugs. *Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems.* 6 (1989) 39-86
77. Karlson P; Doenecke D und Koolmann J: *Kurzes Lehrbuch der Biochemie für Mediziner und Naturwissenschaftler.* Stuttgart, New York: Georg Thieme. 14. Aufl. (1994) 317-344
78. Kees F: Orale Cephalosporine. *Med. Mo. Pharm.* 15 (1992) 2-10
79. Keesler M; Acuto O; Storelli C; Murer H; Müller M und Semenza G: A modified procedure for the rapid preparation of efficiently transporting vesicles from small intestinal brush border membrane. *Biochim. Biophys. Acta* 506 (1978) 136-154
80. Kim YS; Birtwhistle W und Kim YW: Peptide hydrolases in the brush border and soluble fractions of small intestinal mucosa of rat and man. *J. Clin. Invest.* 51 (1972) 1419-1430
81. Kimura T; Yamamoto T; Mizuno M; Suga Y; Kitade S und Sezaki M: Charakterization of aminocephalosporin transport across rat small intestine. *J. Pharm. Dyn.* 6 (1983) 246-253
82. Kingham JGC; Whorwell PS und Loehry CA: Small intestinal permeability. I: Effects of ischemia and exposure to acetyl salicylate. *Gut.* 17 (1976) 354
83. Kramer W; Dechent C; Girbig F; Gutjahr U und Neubauer H: Intestinal uptake of dipeptides and β -lactam antibiotics. I. The intestinal uptake system for dipeptides and β -lactam antibiotics is not part of a brush border membrane peptidase. *Biochim. Biophys. Acta* (1990) 41-49
84. Kramer W; Girbig F; Leipe I und Petzoldt E: Direct photoaffinity labelling of binding proteins for β -lactam antibiotics in rabbit intestinal brush border membranes with [³H]benzylpenicillin. *Biochem. Pharmacol.* 37 (1988) 2435-2447
85. Kreutzig T: *Biochemie.* Gustav Fischer. Stuttgart-Jena-Ulm. (1997) 33-39
86. Lee CP; de Vruet RLA; und Smith PL: Transport of a prodrug of acyclovir, L-Val-acyclovir, via the oligopeptide transporter. *Proc. Int. Symp. Controlled. Release. Bioact. Mater.* 23 (1996) 47-48
87. Leeneräs H; Palm K; Fagerholm U und Artursson P: Comparison between active and passive drug transport in human intestinal epithelial (Caco-2) cells in vitro and human jejunum in vivo. *Int. J. Pharm.* 127 (1996) 103-107

88. Levet-Trafit B; Gryer MS; Marjanivic M und Chou RC: Estimation of oral drug absorption in man based on intestine permeability in rats. *Life Sci.* 58 (1996) PL359-PL363
89. Liang R; Fei YJ; Prasad PD; Ramamoorthy S; Han H; Yang-Feng MA; Heidiger V und Leibach FH: Human intestinal H⁺/peptide cotransporter. Cloning, functional expression, and chromosomal localisation. *J. Biol. Chem.* 270 (1995) 6456-6463
90. Lippold BC: Ionenpaare- ihre Bildung, Bestimmung und Bedeutung. *Pharmazie.* 28 (1973) 713-718
91. Liu W; Liang R; Ramamoorthy S; Fei YJ; Ganapathy ME; Heidiger MA; Ganapathy V und Leibach FH: Molecular cloning of PEPT2, a new member of the H⁺/peptide cotransport family, from human kidney. *Biochim. Biophys. Acta* 1235 (1995) 461-466
92. Lowry OH; Rosebrough, NJ; Farr AL und Randall RJ: Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193 (1951) 265-275]
93. Lu S; Gough AW; Borrowski WF und Steward BH: Transport properties are not altered across Caco-2 cells with hightened TEER despite underlying physiological and ultrastructural changes. *J. Pharm. Sci.* 85 (1996) 270-273
94. Lucas ML; Blai JA; Cooper BT und Cooke WT: Relationship of the acid micro-climate in rat and human intestine to malabsorption. *Biochem. Soc. Trans.* 4 (1976) 154-156
95. Lucas ML; Schneider W; Haberich FJ und Blair JA: Direkt measurement by pH-microelektrode of the pH microclimate in rat proximal jejunum. *Proc. R. Soc. Lond. B.* 192 (1975) 39-48
96. Mackenzie B; Loo DDF; Fei YJ; Liu W; Ganapathy V; Leibach FH und Wright EM: Mechanisms of the human intestinal H⁺-coupled oligopeptide transporter hPEPT1. *J. Biol. Chem.* 271 (1996) 5430-5437
97. Malchiodi-Albedi F; Ciaralli F und Guiliani A: Increased osmiophilia of glycosaminoglycan-like structures after fixation with cethylpyridinium chloride in human colonic mucosa. *J. Submicrosc. Cytol. Pathol.* 23 (1991) 415-418
98. Malo C: Ontogeny of Na⁺/D-Glucose cotransport in guinea-pig jejunal vesicles: only one system is involved at both 20 degrees C and 35 degrees C. *Biochim. Biophys. Acta* 1153 (1993) 299-307
99. Martinez Coscolla A; Miralles-Loyola E; Garrigues TM, Sirvent MD; Salinas E und Casabo VG: Studies on the reliability of a novel absorption-lipophilicity approach to interpret the effects of the synthetic surfactants on drug and xenobiotic absorption. *Arzneimittelforschung* 43 (1993) 699-705
100. Matsumoto SI; Saito H und Inui KI: Transcellular transport of oral cephalosporins in human intestinal epithelial cells, Caco- 2: Interaction with dipeptide transport systems in apikal and basolateral membranes. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 270 (1994) 498-504
101. McEwan GTA; Daniel H; Fett C; Burgess MN und Lucas ML: The effect of Escherichia coli Sta enterotoxin and other secretagogues on mucosal surface pH of rat small intestine in vivo. *Proc. R. Soc. Lond. B* 234 (1988) 219-237
102. Miyamoto E; Tsuji A und Yamana T: Effects of surfactants on the GI absorption of β -lactam antibiotics in rats. *J. Pharm. Sci.* 72 (1983) 651-654
103. Miyauchi M; Hirota T; Fujimoto K und Die J: Studies on orally active cephalosporin esters. IV: Effect of the C-3 substituent of cephalosporin on the gastrointestinal absorption in mice. *Chem. Pharm Bull.* 37 (1989) 3272-3276

104. Möbus K: Untersuchung aktiver transportmechanismen für die Resorption hydrophiler Arzneistoffe aus dem Gastrointestinaltrakt an der Zelllinie Caco-2. Diplomarbeit. FB Pharmazie, Halle (1998)
105. Morrow JS und Anderson RA: Shaping the too fluid bilayer. *Lab. Invest.* 54 (1986) 237-240
106. Mrestani Y; Neubert R; Munk A und Wiese M: Determination of dissociation constants of cephalosporins by capillary zone electrophoresis. *J. Chromatogr. A* 803 (1998) 273-278
107. Mrestani Y; Neubert R und Rüttinger HH: Charakterization of interaction between cephalosporins and charged surfactants using capillary zone electrophoresis. *J. Chromatogr. A* 802 (1998) 89-93
108. Murakami T; Sasaki Y; Yamajo R und Yata N: Effect of bile salts on the rectal absorption of sodium ampicillin in rats. *Chem. Pharm. Bull.* 32 (1984) 1948-1955
109. Muranushi N; Horie K; Masuda K und Hirano K: Characteristics of ceftibuten uptake in Caco-2 cells. *Pharm. Res.* 11 (1994) 1761-1765
110. Muranushi N; Yosikawa M; Yoshida M; Oguma T; Hirano K und Yamada H: Transport characteristics of ceftibuten, a new oral cephem, in rat intestinal brush-border membrane vesicles: relationship to oligopeptide and amino β -lactam transport. *Pharm Res.* 6 (1989) 308-312
111. Naasani I; Sato K; Iseki K; Sugawara M; Kobayashi M und Miyazaki K: Comparison of the transport characteristics of ceftibuten in rat renal and intestinal brush-border membranes. *Biochim. Biophys. Acta* 1231 (1995) 163-168
112. Negwer M: Organic-chemical drugs and their synonyms (an international survey). Akademie Verlag, Berlin. (1994)
113. Nerurkar MM; Burton PS und Borchardt RT: The use of surfactants to enhance the permeability of peptides through Caco-2 cells by inhibition of an apically polarized efflux system. *Pharm Res.* 13 (1996) 528-534
114. Nerurkar MM; Ho NFH; Burton PS; Vidmar TJ und Borchardt RT: Mechanistic roles of neutral surfactants on concurrent polarized and passive membrane transport of a model peptide in Caco-2 cells. *J. Pharm. Sci.* 86 (1997) 813-821
115. Neubert R und Fischer S: Influence of lipophilic counter ions on the transport of ionizable hydrophilic drugs. *J. Pharm. Pharmacol.* 43 (1991) 204-206
116. Neubert R und Fürst W: In vitro-Untersuchungen des Arzneistofftransportes. *Pharmazie in unserer Zeit.* 18 (1989) 112-122
117. Neubert R: Ion pair transport across membranes. *Pharm. Res.* 6 (1989) 743-746
118. Neubert R: Zur Bewertung des Permeations- und Resorptionsverhaltens von Arzneimitteln durch Modellmethoden. Dissertation A. Halle (1978)
119. Neubert R: In vitro-Modellsysteme zur Beurteilung der Resorption aus dem Gastrointestinal-Trakt – Resorptionsmodelle. *Pharmazie.* 45 (1990) 233-237
120. Neubert R; Fürst W und Schleiermacher H: Arzneimittelpermeation durch künstliche Lipidmembranen. *Pharmazie* 40 (1985) 426-427
121. Nishihata T; Tomida H; Frederick G; Rytting JH und Higuchi T: Comparison of the effects of sodium salicylate, disodium ethylenediaminetetraacetic acid and polyoxyethylene-23-lauryl ether as adjuvants for the rectal absorption of sodium cefoxitin. *J. Pharm. Pharmacol.* 37 (1985) 159-163

- 122.Okano T; Inui K; Maegawa H; Takano M und Hori R: H⁺ coupled uphill transport of aminocephalosporins via the dipeptide transport system in rabbit intestinal brush-border membranes. *J. Biol. Chem.* 261 (1986) 14130-14134
- 123.Ockner RK und Isselbacher KJ: Recent concepts of intestinal fat absorption. *Rev. Physiol. Biochem. Pharmacol.* 71 (1974) 107-146
- 124.Park GE; Jeon S und Lee KP: Effect of ion-pair on jejunal and nasal absorption of cefotaxime. *Yakche Hakhoechi.* 25 (1995) 353-363
- 125.Perrier D und Gibaldi M: Animal models for investigating intestinal drug absorption: Various antibiotics. *J. Pharm. Sci.* 62 (1973) 1486-1490
- 126.Perry DF; Walson PD und Blanchard J: Effect of pH on theophylline transfer across the everted rat jejunum. *J. Pharm. Sci.* 73 (1984) 320-325
- 127.Pfeifer S; Pfliegel P und Borchert HH: Biopharmazie: Pharmakokinetik - Bioverfügbarkeit - Biotransformation. Berlin, Wiesbaden: Ullstein Mosby GmbH. (1995)
- 128.Pfüller U: Micellen-Vesikel-Mikroemulsionen: Tensidassoziate und ihre Anwendung in Analytik und Biochemie. Berlin: Springer. (1986)
- 129.Pharmazeutische Stoffliste. Hrsg: Schroer C: Werbe-und Vertriebsgesellschaft Deutscher Apotheker mbH. Eschborn. (1998)
- 130.Pinto M; Robine-Leon S; Appay MD; Kedinger M; Triadou N; Dussaulx E; Lacroix B; Simon-Assmann P; Haffen K; Fogh J und Zweibaum A: Enterozyte-like differentiation and polarization of the human colon carcinoma cell line Caco-2 in culture. *Biol. Cell.* 47 (1983) 323-330
- 131.Plá-Delfina JM; Pérez Buendía MD; Casabó VG; Peris-Ribera JE; Sánchez-Mojano E und Martin-Villadre A: Absorption -partition relationship for two homologous series of xenobiotics as a possible approach to study mechanisms of surfactants in absorption. I: Aromatic amines in rat colon. *Int. J. Pharm.* 37 (1987) 49-64
- 132.Poelma FGJ; Tukker JJ und Crommelin DJA: The role of bile salts in the intestinal absorption of drugs. *Acta Pharm. Technol.* 36 (1990) 43-52
- 133.Prasad PD; Mahesh VB; Leibach FH und Ganapathy V: Functional coupling between a bacitracin A1- sensitive proton pump and a probenid- sensitive folate transporter in human placental choriocarcinoma cells. *Biochim. Biophys. Acta* 1222 (1994) 309-314
- 134.Quan YS; Hattori K; Lundborg E; Fujita T; Murakami M; Muranishi S und Yamamoto A: Effectiveness and toxicity screening of various absorption enhancers using Caco-2 cell monolayers. *Biol. Pharm. Bull.* 21 (1998) 615-620
- 135.Römpp Chemie Lexikon. Hrsg: Falbe J: und Regitz M. Georg Thieme Verlag. Stuttgart-New York. Bd. 5 (1992)
- 136.Rosin H und Henschler D: Antibiotika und Chemotherapeutika. In: Allgemeine und spezielle Pharmakologie und Toxikologie. Hrsg: Forth W; Henschler D; Rummel W und Starke K. Heidelberg, Berlin, Oxford: Spektrum, Akad. Verl. 7. Aufl. (1996) 677-787
- 137.Rubas W; Cromwell MEM; Shahrokh Z; Villagran J; Nguyen TN; Wellton M; Nguyen TH und Morsny RJ: Flux measurements across Caco-2 monolayers may predict transport in human large intestinal tissue. *J. Pharm. Sci.* 85 (1996) 165-169
- 138.Ruiz-Balaguer N; Nacher A; Casabo VG und Merino M: Nonlinear intestinal absorption kinetics of cefuroxime axetil in rats. *Antimicrob. Agents. Chemother.* 41 (1997) 445-448
- 139.Sai Y; Tamai I; Sumikawa H; Hayashi K; Nakanishi T; Amano O; Numata M; Iseki S und Tsuji A: Immunlocalization and pharmacological relevance of oligopeptide transporter PepT1 in intestinal absorption of β -lactam antibiotics. *FEBS Lett.* 392 (1996) 25-29

- 140.Saitoh H; Fujisaki H; Aungst BJ und Miyazaki K: Restricted intestinal absorption of some beta-lactam antibiotics by an energy-dependent efflux system in rat intestine. *Pharm Res.* 14 (1997) 645-649
- 141.Saitoh H; Gerard C und Aungst BJ: The secretory intestinal transport of some beta-lactam antibiotics and anionic compounds: a mechanism contributing to poor oral absorption. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 278 (1996) 205-211
- 142.Saitoh H und Inui KI: Dipeptide transporters in apical and basolateral membranes of the human intestinal cell line Caco-2. *Am. J. Physiol.* 265 (1993) G289-G294
- 143.Saitoh H; Kawai S; Miyazaki K und Arita T: Transport characteristics of propantheline across intestinal brush border membrane. *J. Pharm. Pharmacol.* 40 (1987) 176-180
- 144.Saitoh H; Noujoh A; Chiba Y; Iseki K; Miyazaki K und Arita T: Correlation between structures of organic cations and their binding behaviours to brush border membrane isolated from rat small intestine. *J. Pharm. Pharmacol.* 42 (1990) 308-313
- 145.Saitoh H; Okuda M; Terada T; Sasaki S und Inui K: Cloning and characterization of a rat H⁺/peptide cotransporter mediating absorption of beta-lactam antibiotics in the intestine and kidney. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 275 (1995) 1631-1637
- 146.Sakai M; Imai T; Ohtake H; Azuma H und Otagiri M: Effects of absorption enhancers on the transport of model compounds in Caco-2 cell monolayers: assessment by confocal laser scanning microscopy. *J. Pharm. Sci.* 86 (1997) 779-785
- 147.Sakane K; Inamoto Y und Takaya T: A new oral cephem, cefdinir: its structure-activity relationships and biological profile. *Jpn. J. Antibiot.* 45 (1992) 909-925
- 148.Sancho-Chust V; Fabra-Campos S; Gómez-Meseguer V; Bengochea M und Martin-Villodre A: Experimental studies on the influence of surfactants on intestinal absorption of drugs. *Drug Res.* 45 (1995) 595-601
- 149.Schilling RJ und Ashim KM: Intestinal mucosal transport of insulin. *Int. J. Pharm.* 62 (1990) 53-64
- 150.Schoenfield LJ und Lachim JM: Chenodiol (chenodeoxycholic acid) for dissolution of gallstones: the national cooperative gallstone study. *Ann. Int. Med.* 95 (1981) 257-281
- 151.Semenitz E: Wirkungsmechanismus der Betalactamantibiotika und Probleme der Resistenzentwicklung bei der antibakteriellen Chemotherapie. *Wien. klin. Wschr.* 95 Suppl. 142 (1983) 7-11
- 152.Shekels LL; Lyftogt CT und Ho SB: Bile acid-induced alterations of mucin production in differentiated human colon cancer cell lines. *Int. J. Biochem. Cell. Biol.* 28 (1996) 193-201
- 153.Shiga M; Hayashi M; Horie T und Awazu S: Differences in the promotion mechanism of the colonic absorption of antipyrine, phenol red and cefmetazol. *J. Pharm. Pharmacol.* 39 (1987) 118-123
- 154.Sithigorngul P; Burton P; Nishihata T und Caldwell L: Effects of sodium salicylate on epithelial cells of the rectal mucosa of the rat: a light and electron microscopic study. *Life Sci.* 33 (1983) 1025-1032
- 155.Smith PL; Eddy EP; Lee CP und Wilson G: Exploitation of the intestinal oligopeptide transporter to enhance drug absorption. *Drug Delivery* 3 (1996) 117-123
- 156.Smith PL; Wall DA; Gochoco CH und Wilson G: Routes of delivery: Case studies. Oral absorption of peptides and proteins. *Adv. Drug Delivery Rev.* 8 (1992) 253-290

- 157.Snyder NJ; Tabas LB; Berry DM; Duckworth DC; Spry DO und Dantzig AH: Struktur-activity relationship of carbacephalosporins and cephalosporins: Antibacterial activity and interaction with the intestinal proton-dependent dipeptide transport carrier of Caco-2 cells. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 41 (1997) 1649-1657
- 158.Sprecher E: Antibiotika. *Deutsche Apotheker Zeitung*.124 (1984) 2099-2108
- 159.Steel A; Nussberger S; Romero MF; Boron WF; Boyd CA und Heidiger MA: Stoichiometry and pH dependence of the rabbit proton-dependent oligopeptide transporter PepT1. *J. Physiol*. 498 (1997) 563-569
- 160.Steinhardt HJ und Adibi SA: Interaction between transport of zinc and other solutes in human intestine. *Am. J. Physiol*. 247 (1984) G176-G182
- 161.Strehl E: Oralcephalosporine in der antibakteriellen Therapie. *Pharm. Zeit. Prisma*. 1 (1994) 14-23
- 162.Sugawara M; Iseki K; Miyazaki K; Shioto H; Kondo Y und Uchino J: Transportcharakteristics of ceftibuten, cefixime and cephalixin across human jejunal brush border membrane. *J. Pharm. Pharmacol*. 43 (1991) 882-884
- 163.Swaan PW; Koops BC; Moret EE und Tukker JJ: Mapping the binding site of the small intestinal peptide carrier (PepT1) using comparative molecular field analysis. *Receptor and Channels*. 6 (1998) 189-200
- 164.Swaan PW und Tukker JJ: Molekular determinants of recognition for the intestinal peptide carrier. *J. Pharm. Sci*. 86 (1997) 596-602
- 165.Swaan PW; Hillgren KM; Szoka FC und Oie S: Enhanced transepithelial transport of peptides by conjugation to cholic acid. *Bioconjug. Chem*. 8 (1997) 520-525
- 166.Swenson ES; Milisen WB und Curatolo W: Intestinal permeability enhancement: efficacy, acute local toxicity, and reversibility. *Pharm Res*. 11 (1994) 1132-1142
- 167.Tacnet F; Lauthier F und Ripoche P: Mechanisms of zinc transport into pig small intestine brush-border membrane vesicles. *J. Physiol*. 465 (1993) 57-72
- 168.Tamai I; Nakanishi T; Hayashi K; Terao T; Sai Y; Shiraga T; Miyamoto K; Takeda E; Higashida H und Tsuji A: The predominant contribution of oligopeptide transporter PepT1 to intestinal absorption of beta-lactam antibiotics in the rat small intestine. *J. Pharm. Pharmacol*. 49 (1997) 796-801
- 169.Terada T; Saito H und Inui K: Interaction of beta-lactam antibiotics with histidine residue of rat H⁺/peptide cotransporters, PEPT1 and PEPT2. *J. Biol. Chem*. 273 (1998) 5582-5585
- 170.Terada T; Saito H; Mukai M und Inui KI: Identifikation of the histideine residues involved in substrate recognition by a rat H⁺/peptide cotransporter, PEPT1. *FEBS Lett*. 394 (1996) 196-200
- 171.Terada T; Saito H; Mukai M und Inui KI: Recognition of β -lactam antibiotics by rat peptide transporters, PEPT1 and PEPT2, in LLC-PK₁ cells. *Am. J. Physiol*. 273 (1997) F706-F711
- 172.Terada T; Sawada K; Saito H; Hashimoto Y und Inui KI: Functional characteristics of basolateral peptide transporter in the human intestinal cell line Caco-2. *Am. J. Physiol*. 276 (1999) G1435-G1441
- 173.Thamotharan M; Bawani SZ; Zhou X und Adibi SA: Mechanism of dipeptide stimulation of its own transport in a human intestinal cell line. *Proc. Assoc. Am. Physicians*. 110 (1998) 361-368
- 174.Thwaites DT; Brown CDA; Hirst BH und Simmons NL: H⁺-coupled dipeptide (glycylsarkosine) transport across apical and basal borders of human intestinal Caco-2- cell monolayers display distinctive characteristics. *Biochim Biophys. Acta* 1151 (1993) 237-245

- 175.Thwaites DT; Brown CDA; Hirst BH und Simmons NL: Transepithelial glycylysarcosine transport in intestinal Caco-2 cells mediated by expression of H⁺- coupled carriers at both apical and basal membranes. *J. Biol. Chem.* 268 (1993) 7640-7642
- 176.Thwaites DT; Hirst BH und Simmons NL: Direct assesment of dipeptid/H⁺ symport in intact human intestinal (Caco-2) epithelium: a novel method utilising continuous intracellular pH measurement. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 194 (1993) 432-438
- 177.Thwaites DT; Hirst BH und Simmons NL: Substrat specificity of the di/tripeptide transporter in human intestinal epithelia (Caco-2): identification of substrates that undergo H(+)-coupled absorption. *Br. J. Pharmacol.* 113 (1994)1050-1056
- 178.Tomida H; Kohashi K; Tsuruta Y; Kiryu S und Schwartz MA: Kinetics and mechanism of zinc ion-mediated degradation of cephalosporins in tromethamine solution. *Pharm. Res.* 4 (1987) 214-219
- 179.Tomita M; Hayashi M und Awazu S: Absorption-enhancing mechanism of EDTA, caprate, and decanoylcarnitine in Caco-2 cells. *J. Pharm. Sci.* 85 (1996) 608-611
- 180.Tsuji A und Tamai I: Carrier- mediated intestinal transport of drugs. *Pharm. Res.* 13 (1996) 963-977
- 181.Tsuji A: Intestinal absorption of β - lactam antibiotics. In: Peptide-based drug design. Hrsg.: Taylor MD und Amidon GL. Washington: American Chemical Society. (1995) 101-134
- 182.Tsuji A; Miyamoto E; Hashimoto N und Yamana T: GI absorption of β -lactam antibiotics. II Deviation from pH-partition hypothesis in penicillin absorption through in situ and in vitro lipoidal barriers. *J. Pharm. Sci.* 67 (1978) 1705-1711
- 183.Tsuji A; Miyamoto E; Matsuda M; Nishimura K und Yamana T: Effects of surfactants on the aqueous stability and solubility of beta-lactam antibiotics. *J. Pharm. Sci.* 71 (1982) 1313-1318
- 184.Tsuji A; Miyamoto E; Terasaki T und Yamana T: Carbenicillin prodrugs: Kinetics of intestinal absorption competing degradation of the α -esters of carbenicillin and prediction of prodrug absorbability from quantitative structure-absorption rate ralationship. *J. Pharm. Sci.* 71 (1982) 403-406
- 185.Tsuji A; Nakashima E; Kagami I und Yamana T: Intestinal absorption mechanism of amphoteric beta-lactam antibiotics I: Comparative absorption and evidence for saturable transport of amino-beta-lactam antibiotics by in situ rat small intestine. *J. Pharm. Sci.* 70 (1981) 768-772
- 186.Tsuji A; Tamai I; Nakanishi M; Terasaki T und Hamano S: Intestinal brush-border transport of the oral cephalosporin antibiotic, cefdinir, mediated by dipeptide and monocarboxylic acid transport systems in rabbits. *J. Pharm. Pharmacol.* 45 (1993) 996-998
- 187.Tsuji A; Terasaki T; Tamai I und Hirooka H: H⁺- gradient- dependant and carrier- mediated transport of cefixime, a new cephalosporin antibiotic, across brush border membrane vesicles from rat small intestine. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 241 (1987) 594-601
- 188.Ueno K; Tanaka K; Tsujimura K; Morishima Y; Iwashige H; Yamazaki K und Nakata I: Impairment of cefdinir absorption by iron ion. *Clin. Pharmacol. Ther.* 54 (1993) 473-475
- 189.Ussing HH und Zerahn K: Active transport of sodium as the source of electric current in the short-circuited isolated frog skin. *Acta Physiol. Scand.* 23 (1951) 110-127
- 190.Van Hoogdalem EJ, De Boer AG und Breimer DD: Intestinal drug absorption enhancement: an overview. *Pharmac. Ther.* 44 (1989) 407-443

191. Van Hoogdalem EJ; Hardens MA; de Boer AG und Breimer DD: Absorption enhancement of rectally infused cefoxitin sodium by medium chain fatty acids in conscious rats: concentration-effect relation. *Pharmaceut. Res.* 5 (1988) 453-456
192. Van Krimpen PC; Van Bennekom WP; and Bult A: Penicillins and Cephalosporins. Physicochemical properties and analysis in pharmaceutical and biological matrices. *Pharm. Weekbl. [Sci]* 9 (1987)1-23.
193. Van Meer G: How epithelia grease their microvilli. *Trends. Biochem. Sci.* 13 (1988) 242-243
194. Voet D and Voet JG: *Biochemie.* VCH Verlagsgesellschaft mbH. Weinheim. (1992) 329-347
195. Wagner C: Das Transportverhalten topisch applizierter Antiseptika in künstlichen und biologischen Membransystemen. Dissertation. Halle. (1995)
196. Walde P; Sunamoto J und O'Conner CJ: The mechanism of liposomal damage by taurocholate. *Biochim. Biophys. Acta* 905 (1987) 30-38
197. Walter E; Kissel T und Amidon GL: The intestinal peptide carrier: A potential transport system for small peptide derived drugs. *Adv. Drug Delivery Rev.* 20 (1996) 33-58
198. Walter H und Meyer FP: *Klinische Pharmakologie antibakterieller Arzneimittel.* Berlin: Volk und Gesundheit. (1986) 139-145
199. Wenzel U; Gebert I; Weintraut H; Weber WM; Clauß W und Daniel H: Transport characteristics of differently charged cephalosporin antibiotics in oocytes expressing the cloned intestinal peptide transporter PepT1 and in human intestinal Caco-2-cells. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 277 (1996) 831-839
200. Wess G; Enhsen A und Kramer W: Gallensäuren: Wiederentdeckt. *Nachr. Chem. Tech. Lab.* 43 (1995) 1047-1052
201. Wheeler PG; Menzies IS und Creamer B: Effect of hyperosmolar stimuli and coeliac disease on the permeability of human gastrointestinal tract. *Clin. Sci. Mol. Med.* 54 (1978) 495
202. Whitmore DA; Brookes LG und Wheeler KP: Relative effects of different surfactants on intestinal absorption and the release of proteins and phospholipids from tissue. *J. Pharm. Pharmacol.* 31 (1979) 277-283
203. Wilson TH und 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 (1954) 116-125
204. Wootton R und Hazelwood R: Relative affinity of a series of charged dipeptides for the carrier or rabbit intestinal brush-border membranes. *Biochem. Soc. Trans.* 17 (1989) 691-692
205. Yamashita S; Saitoh H; Abe K; Nakanishi K; Masada M; Nadai T und Kimura T: Effect of sodium or glucose exclusion from the incubation medium on drug transfer across rat jejunal membrane in vitro: an electrophysiological study. *Chem. Pharm. Bull.* 35 (1987) 3382-3389
206. Yata N; Higashi Y; Murakami T; Yamayo R; Wu MW; Taku K; Sasaki Y und Hideshima Y: A possible mechanism of absorption promoters. *J. Pharmacobio.-Dyn.* 6 (1983) s-78

Danksagung

Herrn Prof. Dr. habil. R. Neubert, Dekan der Mathematisch-Naturwissenschaftlich-Technischen Fakultät der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg und Leiter der Arbeitsgruppe Biopharmazie am Institut für Pharmazeutische Technologie und Biopharmazie danke ich für die Überlassung des interessanten Themas, seine zahlreichen Hinweise und sein stetes Interesse am Fortgang der Arbeit.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Dr. M. Brandsch, Abteilungsleiter Zellkultur/Tierhaltung des Biozentrums der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg, für seine Unterstützung bei der Etablierung der humanen Colocarzinomzelllinie Caco-2, für seine ständige Hilfsbereitschaft und Ansprechbarkeit bei technischen und fachlichen Problemen und für die großzügige Überlassung von Literatur.

Ebenso danke ich Herrn Dr. Y. Mrestani, Mitarbeiter der Arbeitsgruppe Biopharmazie, für seine ständige Diskussionsbereitschaft und seine Hilfe bei technischen Fragen zur HPLC.

Weiterhin möchte ich mich bei allen Mitarbeitern der Arbeitsgruppe Biopharmazie des Institutes für Pharmazeutische Technologie und Biopharmazie für die angenehme Arbeitsatmosphäre bedanken, sowie den Mitarbeitern der Abteilung Naturstoffbiochemie des Fachbereiches Biochemie/Biotechnologie unter der Leitung von Prof. Dr. habil. K. Neubert, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben. Mein besonderer Dank gilt dabei Frau I. Knütter und Frau K. Möbus für die Hilfe bei der technischen Durchführung einiger Experimente.

Herrn Prof. Dr. habil. G. Isenberg, Leiter des Julius-Bernstein-Institutes für Physiologie der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg, danke ich für die Bereitstellung der isolierten Meerschweinchendünndärme.

Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich, daß ich die vorliegende Arbeit selbständig und ohne fremde Hilfe verfaßt habe, andere als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel nicht benutzt und den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommene Stellen als solche kenntlich gemacht habe.

Beate Bretschneider

Tabellarischer Lebenslauf

Name: Bretschneider, geb. Wustmann
Vorname: Beate Inge
Geburtsdatum: 06. 01. 1970

Ehemann: Dr. Frank Bretschneider, geb. am: 19.01.1967
Kind: Konstantin Frank Bretschneider, geb. am: 13.09.1997

Wohnort: 06110 Halle, Wörlitzer Str. 108

Schulbildung: 1976 bis 1986: Besuch der Polytechnischen Oberschule in Halle
1986 bis 1988: Besuch der Erweiterten Oberschule in Halle, Abitur 1988

Vorpraktikum: 1988 bis 1989: Zentralapotheke des Klinikums der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

Hochschule: 1989 bis 1994: Studium der Pharmazie an der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg
1. Pharmazeutische Prüfung 1991
2. Pharmazeutische Prüfung 1993
3. Pharmazeutische Prüfung 1994

Diplom: 1993 bis 1994 zum Thema: "Transportbeeinflussung an Cephalosporinen." bei Prof. R. Neubert, Institut für Pharmazeutische Technologie und Biopharmazie der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

Promotion: 1995 bis 1998 zum Thema: „Charakterisierung und Beeinflussung des intestinalen Cephalosporintransportes.“ als Kollegiat im Graduiertenkolleg „Transport von Wirkstoffen in biologischen Systemen“ bei Prof. R. Neubert, Institut für Pharmazeutische Technologie und Biopharmazie der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

Berufliche Tätigkeit: 1994: Praktikantin bzw. Apothekerin in der Waisenhaus-Apotheke in Halle
seit 1999 als Apothekerin in der Waisenhaus-Apotheke in Halle