استفاده از تك لايه هاي سلولهاي Caco-2 بعنوان مدلي براي پيش بيني نفوذپذيري و جذب داروها در انسان

پروين ذاكري ميلاني*، هادي وليزاده
دانشكده داروسازي و مركز تحقيقات كاربردي داروئي، دانشگاه علوم پزشكي تبريز
تاريخ دريافت: ٨۴/٩/٨ ، تاريخ پذيرش: ٨۵/٢/١٧

The use of Caco-2 cell monolayers as a model to predict human intestinal permeabilility and drug absorption

Zakeri-Milani P.*, Valizadeh H.
Faculty of Pharmacy, Drug Applied Research Center, Tabriz University of Medical Sciences
Received: 2005/11/29 , Accepted: 2006/5/7

OBJECTIVES: The purpose of the study was to predict the human intestinal permeability and the fraction of oral dose absorbed using Caco-2 system. **METHODS:** Permeability coefficients were determined for nine passively absorbed compounds in Caco-2 system. Caco-2 monolayers were grown on porous filters in multi-well plates as monolayers. Drug solution in HBSS was added to top inserts (apical sides) and then the inserts with plate were incubated at 37^{o} C for 60 min with shaking (~70 rpm). Samples were collected at 60 min from basolateral sides. Lucifer yellow was applied as marker for monolayer integrity in Caco-2 monolayers. Drug concentrations in samples were determined using HPLC equipment and permeability coefficients were calculated. Finally the obtained values were compared with published data for human intestinal permeability and fraction of dose absorbed in human. **RESULTS:** The relationship between permeabilities was found to be $\log P_{eff\ (human)} = 0.65 \log P_{app\ (Caco-2)} - 0.37$ (R^2= 0.79, P= 0.001). The fraction of dose absorbed in vivo in human (F_a) after oral dosing can also be estimated from $F_{a\ (human)} = 100\ (1\text{-}e^{-1917852\ Papp\ (Caco\text{-}2)})$ (R^2= 0.91, P= 0.0002). **CONCLUSION:** Therefore we conclude that the Caco-2 system has the potential for the prediction of human intestinal permeability and fraction of oral dose absorbed in human (F_a) as well.
Keywords: *Caco-2, P_{eff}, P_{app}, Permeability- Passively absorbed, Fraction dose absorbed.*

زمينه و هدف: هدف از تحقيق حاضر پيش بيني قابليت نفوذ داروها به مخاط روده باريك انسان با استفاده از تكنيك كشت سلولي مي باشد. **روشها:** ضرايب نفوذپذيري براي نه دارو (با جذب غير فعال) با استفاده از تك لايه هاي سلولهاي Caco-2 تعيين گرديد. بدين ترتيب كه تك لايه هاي سلولهاي Caco-2 روي غشاهاي نفوذپذير در پليتهاي چاهكدار كشت داده شدند. سپس محلول داروي مورد آزمايش در بافرHBSS به بخش آپيكال تك لايه افزوده و نمونه گيري از بخش بازولترال در دقيقه شصت انجام شد. در تمام طول مدت آزمايش پليت محتوي تك لايه سلولها در شيكر-انكوباتور ٣٧ ^{o}C (٧٠ دور در دقيقه) قرار گرفت. نمونه هاي گرفته شده با استفاده از دستگاه HPLC آناليز و ضرايب نفوذپذيري داروها با استفاده از فرمول مربوطه محاسبه گرديد. **يافته ها:** مقادير بدست آمده براي نفوذپذيري با مقادير معلوم نفوذپذيري روده انسان $P_{eff(human)}$ و فراكسيون دوز جذب شده در انسان مقايسه گرديد و روابط زير براي پيش بيني بدست آمد:

$\log P_{eff\ (human)} = 0.65 \log P_{app\ (Caco-2)} - 0.37$ (R^2= 0.79, P= 0.001)

$F_{a\ (human)} = 1\text{-}e^{-1917852\ Papp\ (Caco-2)}$ (R^2= 0.91, P= 0.0002)

نتيجه گيري: بنابراين بر اساس نتايج بدست آمده همبستگي بالاي بين مقادير $P_{app(Caco-2)}$ با مقادير $P_{eff\ (human)}$ و $F_{a\ (human)}$ براي داروهاي با جذب غير فعال نشان ميدهد كه مدل سلولهاي Caco-2 قابليت خوبي براي پيش بيني نفوذپذيري روده اي و نيز فراكسيون دوز جذب شده در انسان دارد.
واژه هاي كليدي: *نفوذپذيري، P_{eff}، P_{app}، جذب غير فعال، فراكسيون دوز جذب شده، Caco-2.*

*نويسنده مسئول: دكتر پروين ذاكري ميلاني، استاديار، دانشكده داروسازي دانشگاه علوم پزشكي تبريز، تلفن: ٣٣٩٢٥٩٣ ، نمابر: ٣٣٤٤٧٩٨

**Corresponding Author: Dr Parvin Zakeri-Milani, Assistant Professor, Faculty of Pharmacy, Tabriz University of Medical Sciences, Tel:* 3392593*; E-mail: Pzakeri@tbzmed.ac.ir*

۱- مقدمه

جذب گوارشي داروهاي خوراكي كه مهمترين عامل تعيين كننده بهره دهي درماني آنهاست، اساسا" توسط نفوذپذيري غشايي داروها و نيز محلوليت آنها در مجاري گوارشي تعيين ميگردد. در طي پروسه ساخت داروهاي جديد (Drug development)، معمولا روشهاي مختلفي براي تخمين نفوذپذيري روده اي داروها در شرايط درون تن استفاده ميگردد. اخيرا" از تك لايه سلولهاي سرطاني روده انسان كه بنام سلول هاي Caco-2 ناميده ميشوند، بدين منظور استفاده مي گردد. اين سلول ها تا حدود زيادي خصوصيات سلول هاي روده باريك انسان را در خود حفظ مي نمايند (۱, ۲)، بطوريكه به عنوان روشي قابل قبول در غربالگري سريع جذب روده اي داروها پيشنهاد مي شود. محققين مختلفي همبستگي خوبي بين نفوذپذيري اندازه گيري شده دارو در تك لايه سلولهاي Caco-2 و جذب خوراكي همان دارو در انسان گزارش نموده اند (۳-۵). ليكن اين مشاهدات اكثرا" براي داروهاي با محلوليت خوب در آب صورت گرفته است در حاليكه بسياري از داروهاي جديد آبگريز بوده و محلوليت در آب ضعيفي دارند (۶) بنابراين يكي ازمهمترين عوامل محدودكننده استفاده از سيستم Caco-2 در طيف وسيع، محلوليت اندك بسياري از تركيبات در آب مي باشد. ازطرفي ديگر، عبور داروها از غشاهاي جذبي به دو صورت درون سلولي و بين سلولي انجام مي گيرد (۷) بطوريكه اگر داروي مورد نظر از ليپوفيليسيته كافي برخوردار باشد، سريعا" از مجراي روده به غشاي سلول وارد ميگردد در حاليكه داروهاي هيدروفيل قادر به چنين نفوذي نمي باشند. در مورد اينگونه داروها، عبور از راه بين سلولي و از طريق كانال هاي آبي موجود در اتصالات محكم (tight junctions) صورت ميگيرد. اين كانالها به علت قطر متوسط كوچكشان (در حد چند آنگستروم)، فقط به مولكولهاي بسيار كوچك اجازه عبور ميدهند. بنابراين عبور بين سلولي در ميزان نفوذپذيري داروهاي هيدوفيل به ميزان زيادي مؤثر است ولي اهميتي در نفوذ داروهاي ليپوفيل كه سريعا" از راه درون سلولي انتقال مي يابند، ندارد (۷). در تحقيق حاضر سعي شده است تا از طيفي از داروهاي با خصوصيات مختلف كه در برگيرنده هر دو گروه با محلوليت كم و زياد در آب مي باشد، استفاده گردد تا ضمن تعيين نفوذپذيري آنها از تك لايه سلولهاي Caco-2 ، ارتباط و همبستگي مقادير حاصله با مقادير معلوم نفوذپذيري در انسان و نيز فراكسيون داروي جذب شده در انسان بررسي گردد.

۲- مواد و روشها

۲-۱: آماده سازي و كشت متوالي سلولهاي Caco-2

سلولهاي دريافت شده از ATCC كه به صورت منجمد در داخل ويالهايي با دانسيته $۱۰^{۶}$ سلول در ميلي ليتر قرار دارند، بلافاصله به تانك نيتروژن منتقل مي شوند. بعد از آماده سازي محيط كشت لازم براي سلولها، يك ويال از سلولهاي منجمد برداشته شده و پس از انجام مراحل ذوب با دقت در ۳۷^{o}C، در فلاسك T-75 حاوي محيط كشت اضافه ميگردد. براي حفظ و نگهداري سلولها، تعويض محيط كشت يكروز در ميان انجام شده و در مواردي كه لازم باشد، عمل واكشت (subculturing) انجام ميگيرد. اين عمل براي تامين مواد مغذي و نيز فضاي كافي رشد براي سلولها متناوبا" تكرار مي گردد. بدين منظور شمارش سلولي در فلاسك صورت ميگيرد تا بتوان دانسيته مورد نظر در فلاسك جديد را ايجاد نمود. جهت شمارش سلولي از رنگ تريپان آبي در PBS با غلظت ۰/۴ % براي رنگ آميزي استفاده شده است كه پس از رنگ آميزي با استفاده از لام هماسيتومتر و ميكروسكوپ نوري شمارش سلولي صورت ميگيرد. لازم به ذكر است كه فقط سلولهاي زنده كه بصورت شفاف مشاهده ميگردند شمارش ميشوند. سلولهاي مرده به علت ورود رنگ به داخل آنها رنگ آبي به خود مي گيرند (۸). مراحل فوق مرتبا" در مورد سلولهاي كشت داده شده در فلاسكها صورت مي گيرد تا زمانيكه سلولها در پليت هاي چاهك دار ۲۴ تايي كشت داده شوند.

۲-۲: كشت سلولها در ترانسول اينسرتهاي ۲۴ تايي

قبل از كشت سلولها در ترانسول اينسرت هاي حاوي غشا، مقاومت الكتريكي (TEER) غشاهاي بلانك اندازه گيري ميشود. بدين منظور ۲۰۰ ميكروليتر محيط كشت درداخل هر اينسرت و ۲۸ ميلي ليتر دربخش زيرين (feeding tray) قرار داده و انكوباسيون در ۳۷^{o}C به مدت ۲ ساعت صورت مي گيرد. سپس TEER هاي (Trans Epithelial Electrical Resistance) مربوطه با استفاده از ولت متر EVOM® اندازه گيري مي شود.

بعد از تخليه اينسرتها، در مرحله بعدي در هر چاهك۵۰۰ ميكروليتر سوسپانسيون سلولي با دانسيته ۲×۱۰^{۴} سلول بر ميلي ليتر اضافه شده و ۲۸ ميلي ليترمحيط كشت نيز دربخش زيرين (feeding tray) افزوده مي گردد. سپس پليت به انكوباتور منتقل شده و يكروز در ميان تعويض محيط كشت صورت مي گيرد. ۲۱ روز بعد از كشت سلولها در روي فيلترها، تك لايه هاي Caco-2 حاصله آماده انجام آزمايشات نفوذپذيري مي باشند (۹). در روز آزمايش نيز مجددا" TEER غشاهاي حاوي تك لايه هاي سلولي اندازه گيري شده و مقاومت الكتريكي تصحيح شده به صورت زير محاسبه مي گردد (۹):

$$\text{Corrected TEER } (\Omega.cm^2) = (\text{TEER } (\Omega) - \text{Blank TEER } (\Omega)) * 0.33(cm^2)$$

مقادير TEER بلانك براي غشاهاي روكش داده شده با كلاژن و غشاهاي فاقد روكش به ترتيب در محدوده ۱۱۰-۹۰ اهم و ۱۰۵- ۹۰ اهم قرار دارد.

۳-۲: آزمايشات نفوذپذيري

ترانسول اينسرت (Transwell insert) بيست و چهارتايي حاوي تك لايه هاي سلولي از انكوباتور به بيرون منتقل شده و محيط كشت داخل آن تخليه ميگردد. سپس ۴۰۰ ميكروليتر بافر ترانسپورت (HBSS + 10 mM HEPES, pH 7.4) ۳۷ ^{o}C به بخش روئي غشا در داخل اينسرت و ۲۸ ميلي ليتر به بخش زيرين (feeding tray) آن افزوده مي شود. بعد از ۳۰ دقيقه انكوباسيون مجددا" تخليه صورت مي گيرد. در قدم بعدي بخش زيرين با پليت چاهكدار جايگزين شده ودر هر چاهك در زير هر اينسرت يك ميلي ليتر از بافر ترانسپورت افزوده و به هر اينسرت نيز ۴۰۰ ميكروليتر محلول داروي مورد آزمايش با غلظت ۱۰۰ ميكرومولار اضافه مي شود. براي هر دارو، سه پليت مجزا با سه اينسرت در هر كدام (جمعا" ۹ اينسرت) آزمايش ميگردد. در تمام آزمايشات از ماده لوسيفر زرد با غلظت ۱۰۰ ميكرومولار براي ارزيابي تماميت تك لايه سلولي استفاده مي گردد (۱). بلافاصله بعد از افزودن محلول مورد آزمايش، به ميزان ۱۰۰ ميكروليتر از آن نمونه برداري مي شود. مجموعه ترانسول اينسرت و چاهكهاي زيرين حاوي بافر ترانسپورت در شيكر _ انكوباتور با دور ۷۰ rpm قرار گرفته و نمونه هاي ۱ميلي ليتري و ۱۰۰ ميكروليتري توسط نوكهاي استاندارد ۱۰۰۰ و ۱۰۰ ميكروليتري پيپت اتوماتيك به ترتيب از بخش گيرنده (زيرين يا بازولترال) و بخش دهنده (روئي يا آپيكال) در زمان ۶۰ دقيقه گرفته ميشود. بعد از تعيين مقدار نمونه هاي گرفته شده توسط دستگاه HPLC ضريب نفوذپذيري ظاهري با استفاده از فرمول زير محاسبه مي گردد (۹) :

$$P_{app} = (V/(AC_i))\ (C_f/T)$$

P_{app} = نفوذپذيري ظاهري (cm/s)

V = حجم بخش گيرنده (cm^3)

A= مساحت غشاء (0.33 cm^2)

C_i = غلظت اوليه دارو در بخش آپيكال در زمان صفر دقيقه

C_f = غلظت نهايي دارو در بخش بازولترال در زمان شصت دقيقه

T = زمان بر حسب ثانيه

۳-۲: مواد و دستگاهها

محيط كشت DMEM (Dolbecco's modified eagle's medium) حاوي سرم جنين گاوي غيرفعال شده توسط حرارت به غلظت ۱۰% (FBS)، HEPES ده ميلي مولار، اسيدآمينه هاي غيراساسي با غلظت ۱%، ال- گلوتامين دو ميلي مولار. بافر فسفات سالينه حاوي ۰/۵ ميلي مولار EDTA فاقد املاح كلسيم و منيزيم، تريپسين حاوي ۲۵% EDTA، دي متيل سولفوكساييد، محلول نمكي متعادل هنكس (HBSS)، لوسيفر زرد، پودر فورزمايد، آنتولول، رانيتيدين، سايمتيدين، كتوپروفن، ناپروكسن، متوپرولول، پيروكسيكام و پروپرانولول. تمام مواد مذكور از شركت Sigma-Aldrich (Canada) تهيه گرديدند. رنگ تريپان آبي (۰/۴ % در بافر فسفات سالينه) (Gibco)، سلول هاي Caco-2 (ATCC, Rockville, MD, USA).

فلاسك هاي T-75 ، پليت هاي چاهكدار ۲۴ تايي (HTS Transwell®، 0.4 µm pore size, 6.5 mm diameter polycarbonate membrane) از كارخانه كورنينگ كوستار انگلستان (Corning Costar). ولت متر EVOM®، لام هماسيتومتر (Neubauer)، ميكروسكوپ با بزرگنمايي 10X، سانتريفوژ، انكوباتور (CO2 ۵%)، فريزر ۲۰- و ۷۰- درجه سانتي گراد، نيتروژن مايع، دستگاه كروماتوگرافي مايع با كارايي بالا (HPLC) با دتكتور فلورسانس و طيف سنجي جرمي (HP1100 (agilent 1100), CA, Palo Alto).

۳- نتايج

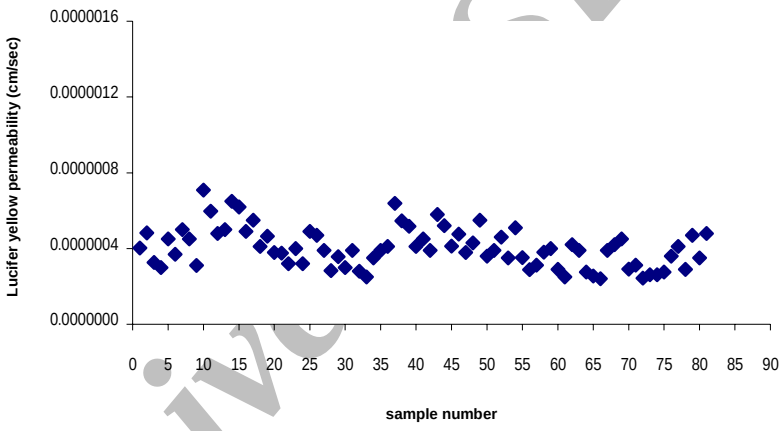
جدول ۱ ميانگين ضرايب نفوذپذيري ظاهري بدست آمده براي داروهاي مورد آزمايش، از تك لايه سلولهاي Caco-2 را نشان ميدهد. در همين جدول ميانگين ضرايب نفوذپذيري ظاهري براي لوسيفر زرد نيز نشان داده شده است. همانگونه كه اشاره شد اين ماده بعنوان ماركري براي بررسي تماميت غشاي متشكل از تك لايه سلولي استفاده شده است.

بدين معني كه فقط نتايج تك لايه هايي درمحاسبات نفوذپذيري داروها بكار رفته اند كه نشت و عبور لوسيفر زرد از آنها كمتر از ۰/۵ % بر ساعت بوده است (۱۰). بعلاوه اندازه گيري TEER قبل و بعد از انجام آزمايش نفوذپذيري نيز بعنوان تاييدي بر يكنواختي و تماميت تك لايه در طي دوره آزمايش مي باشد. بطوريكه تك لايه هاي با TEER كمتر از ۳۵۰Ohm.cm^2 در محاسبات استفاده نشده اند (۱۰). شكل ۱ مقادير نفوذپذيري بدست آمده براي لوسيفر زرد در آزمايشات مختلف را نشان ميدهد.

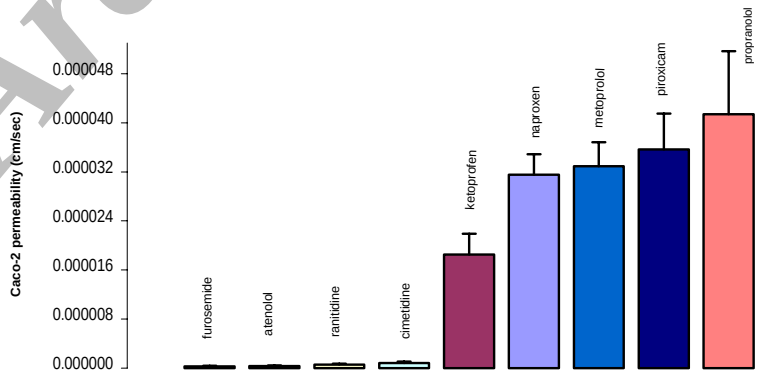
جدول ۱: ميانگين ضرايب نفوذپذيري حاصله براي لوسيفر زرد و داروهاي مورد آزمايش (در Caco-2 و انسان) و فراكسيون داروي جذب شده در انسان

Compound	Mean P_{app} drug (cm/s)	Mean P_{app} LY(cm/s)	Human $P_{eff}(10^{-4})$ (cm/sec)	Human F_a (%)
Naproxen	$3.15(\pm0.33)\times10^{-5}$	$3.98(\pm0.75)\times10^{-7}$	10.0 [a]	100[c]
Ketoprofen	$1.85(\pm0.34)\times10^{-5}$	$5.56(\pm0.95)\times10^{-7}$	8.70[b]	100[d]
Ranitidine	$6.10(\pm1.32)\times10^{-7}$	$4.01(\pm0.62)\times10^{7}$	0.27[b]	50[e]
Cimetidine	$8.40(\pm2.30)\times10^{-7}$	$3.34(\pm0.58)\times10^{7}$	0.60[b]	79[f]
Atenolol	$3.32(\pm1.06)\times10^{-7}$	$4.95(\pm0.85)\times10^{7}$	0.12[a]	50[e]
Propranolol	$4.14(\pm1.02)\times10^{-5}$	$4.33(\pm0.70)\times10^{7}$	2.90[b]	90[e]
Metoprolol	$3.29(\pm0.39)\times10^{-5}$	$3.42(\pm0.59)\times10^{7}$	1.20[a]	95[e]
Furosemide	$2.94(\pm1.14)\times10^{-7}$	$3.18(\pm0.80)\times10^{7}$	0.30[b]	61[e]
Piroxicam	$3.56(\pm0.58)\times10^{-5}$	$3.50(\pm0.86)\times10^{-7}$	6.65[b]	99[c]

[a] برگرفته از رفرانس (۱۳) [b] برگرفته از رفرانس (۱۴) [c] برگرفته از رفرانس (۱۵) [d] برگرفته از رفرانس (۱۶) [e] برگرفته از رفرانس (۱۷) [f] برگرفته از رفرانس (۱۸)



شكل ۱: مقادير ضرايب نفوذپذيري لوسيفر زرد در آزمايشات مختلف و تكرار پذيري سيستم Caco-2.

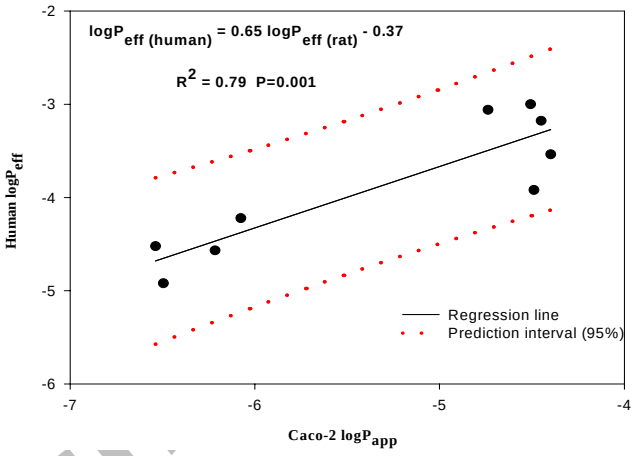


شكل ۲: مقايسه مقادير ضرايب نفوذپذيري داروهاي مورد آزمايش در سيستم Caco-2.

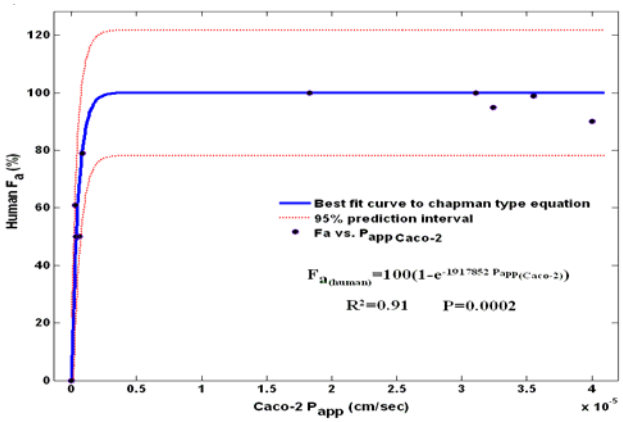
مشاهده ميشود كه سيستم Caco-2 ازقابليت تكرار پذيري بالايي برخوردار بوده و ميانگين كل ضرايب نفوذپذيري لوسيفر زرد برابر $(\pm ۰/۸) \times ۱۰^{-۷}$ ۴ سانتي متر بر ثانيه بوده است. لازم به ذكر است كه كليه ضرايب نفوذپذيري حاصله از آزمايشات جذبي در مسير آپيكال به بازولترال (AP→ BL) تك لايه بدست آمده اند. براي مقايسه آسانتر و بهتر مقادير نفوذپذيري بصورت نمودار ستوني در شكل ۲ براي داروها ترسيم شده است. مشاهده ميشود كه كمترين نفوذپذيري براي فورزمايد $(۲/۹ \times ۱۰^{-۷}$ cm/sec) و بيشترين آن براي پرويرانولول $(۴/۱۴ \times ۱۰^{-۵}$ cm/sec) بدست آمده است. از آنجاييكه در اين مطالعه، سلولهاي Caco-2 روي غشاي پلي كربناتي فاقد روكش كشت داده شده اند، بنابراين اطمينان از پيوسته و كامل بودن تك لايه حائز اهميت زيادي است. نتايج حاصل از آزمايشات بيانگر اين است كه مقاومت الكتريكي غشا در سطوح بالايي ثبات خود را حفظ نموده و نيز غشاي مربوطه نفوذپذيري بسيار اندكي به لوسيفر زرد (كه فقط از طريق بين سلولي انتقال مي يابد) نشان ميدهد. در نتيجه تك لايه سلولهاي Caco-2 ميتواند در مطالعات انتقال غير فعال داروها مورد استفاده قرار گيرد (۱۱).

۴- بحث

بررسي مقايسه اي نفوذپذيري داروها در سيستم Caco-2 با مقادير مشابه در انسان و نيز با مقادير فراكسيون داروي جذب شده در انسان (جدول ۱) نشان داد كه همبستگي خوبي بين اين داده ها دو بدو وجود دارد. همانگونه كه در شكلهاي ۴-۳ مشاهده ميشود همبستگي خوبي با $R^2 = 0.79$ $(P = 0.001, MPE=7.45)$ بين $logP_{app(Caco-2)}$ و $logP_{eff\ (human)}$ برقرار است.



شكل ۳- نمودار $logP_{app(Caco-2)}$ در برابر $logP_{eff\ (human)}$



شكل ۴- نمودار Papp(Caco-2) در برابر Fa (human)

ارتباط مشابهي نيز با ($R^2 = 0.91$ MPE=10.5, P = 0.0002) بين مقادير $P_{app(Caco-2)}$ و فراكسيون دوز جذب شده در انسان (F_a) مشاهده ميشود. در حقيقت بر اساس يافته هاي اين مطالعه، تركيبات با جذب كامل در انسان ($F_a \approx 1$)، داراي نفوذپذيري ظاهري بزرگتر از $۰/۲۵ \times ۱۰^{-۵}$ سانتي متر بر ثانيه در سيستم Caco-2 مي باشند. در حاليكه تركيبات با نفوذپذيري ظاهري كوچكتر از $۸/۴ \times ۱۰^{-۷}$ سانتي متر بر ثانيه در تك لايه هاي Caco-2 داراي جذب ناكاملي ($Fa<۰/۸$) در انسان مي باشند. اين يافته ها در تطابق با محدوده پيشنهاد شده توسط Artursson و همكارانش ميباشد (۳). اين محققين در طيفي از تركيبات مورد مطالعه خود، اعداد ۱×۱۰^{-۶} و ۱×۱۰^{-۷} سانتي متر بر ثانيه را بعنوان مرزي براي تركيبات با جذب كامل و ناچيز در انسان پيشنهاد نموده اند. در مقايسه دو مدل انسان وCaco-2 احتمالا" لايه ساكن آبي نقش مهمي ايفا نمي كند چرا كه در تمام طول مدت آزمايش پليت حاوي تك لايه ها در ۷۰ RPM تكان داده ميشوند. بنابراين انتظار ميرود كه نسبت نفوذپذيري داروهاي با قابليت نفوذ بالا در دو مدل انسان و Caco-2، كمتر از همان نسبت براي داروهاي با نفوذپذيري اندك باشد. بر اساس يافته هاي حاصل از اين تحقيق نسبت حاصله براي داروهاي با نفوذپذيري زياد ۲۱ و در مورد داروهاي با قابلت نفوذ اندك (فورزمايد و آنتولول) ۶۴ مي باشد. در حقيقت در مورد تركيبات اخير، نفوذپذيري اندك سيستم Caco-2 و بالا بودن نسبت مذكور احتمالا" ناشي از مساحت سطح وسيع قابل دسترس و يا احتمال بالاي انتقال بين سلولي در حالت درون تن در انسان مي باشد. به عبارت ديگر بسياري از تركيباتي كه جذب ناكامل دارند، نه از راه درون سلولي، بلكه از طريق اتصالات محكم بين سلولي انتقال مي يابند. از طرفي راه بين سلولي در اپيتليوم كولون (كه سلولهاي Caco-2 برگرفته از آن است)، سفت تر و تنگتر از مسير مشابه در روده باريك است (۱۲). بگونه اي كه متوسط شعاع كانالهاي آبي در ژژنوم انسان ۰/۸ نانومتر، ولي در كولون ۰/۳ نانومتر مي باشد. بعلاوه نفوذپذيري يوني (كه بعنوان معياري از نفوذپذيري بين سلولي محسوب مي گردد)، در روده كوچك بيشتر از تك لايه سلولهاي Caco-2 مي باشد (۱۲). بنابراين تركيبات با جذب ناكامل از بين سلول هاي روده باريك بيشتر از مسير بين سلولي كولون عبور مينمايند و اين بيانگر اين است كه نفوذپذيري تركيبات هيدروفيل در سلولهاي Caco-2 شباهت بيشتري به نفوذپذيري كولون انسان دارد اگر چه خصوصيات مرفولوژيكي و بيوشيميايي اين سلولها به سلولهاي پرزهاي روده كوچك بيشتر شبيه است. نكته آخر اينكه تك لايه سلولهاي Caco-2 شامل يك لايه سلولي و يك غشاي پلي كرباتي (با اندازه منافذ ۰/۴ ميكرون) در زير آن ميباشد. از آنجاييكه غشاي پلي كرباتي هيچگونه ممانعتي در عبور تركيبات با وزن مولكولي پايين ايجاد نميكند، بنابراين دارويي كه از لايه سلولي عبور نمايد، سريعا" در بخش بازولترال قابل شناسايي مي باشد. بنابراين روند نفوذ داروها در سيستم Caco-2 عمدتا" شبيه آن چيزي است كه در حالت درون تن در غشاي روده رخ ميدهد و به علت همين تشابه زياد است كه تك لايه سلولهاي فوق قابليت پيش بيني بالايي (حتي نسبت به روده ايزوله شده در حالت برون تن) براي جذب دارو در انسان نشان ميدهد (۵).

۵- نتيجه گيري

مقايسه نفوذ و انتقال داروها از تك لايه هاي سلولهاي Caco-2 با حالت درون تن در انسان نشان ميدهد كه سيستم Caco-2 ميتواند براي پيش بيني نفوذ داروهاي با انتقال غيرفعال (كه معمولترين روش جذب داروهاست) از جدار روده انسان و نيز فراكسيون دوز جذب شده در انسان بكار رود. بنابراين با استفاده از اين سيستم ميتوان داروهايي را كه در روند جذب با مشكل مواجهند شناسايي نموده و نيز داروهاي با خصوصيات جذب غيرفعال ايده آل را از بين تركيبات فعال از نظر فارماكولوژيكي در پروسه ساخت داروهاي جديد (Drug development) انتخاب نمود.

References

1. Takahashi Y., Kondo H., Yasuda T., Watanabe T., Kobayashi S.I., Yokohama S., Common solubilizers to estimate the Caco-2 transport of poorly water-soluble drugs. Int. J. Pharm., 2002, 246: 85-94.
2. Hidalgo I.J. Borchardt R.T. Transport of a large neutral amino acid (phenylalanine) in a human intestinal epithelial cell line: Caco-2. Biochem. Biophys. Acta., 1990, 1028: 25-30.
3. Artursson P. Karsson J. Correlation between oral drug absorption in human apparent drug permeability coefficients in human intestinal epithelial (Caco-2) cells. Biochem. Biophys. Acta., 1991, 175: 880-885.
4. Yee S., In vitro permeability across Caco-2 cells (colonic) can predict in vivo (small intestinal) absorption in man -fact or myth. Pharm. Res., 1997, 14: 763-766.
5. Yamashita S., Tanaka T., Endoh Y., Taki Y., Sakane T., Nadai T., Sezaki H. Analysis of drug permeation across Caco-2 monolayer: implication for predicting in vivo drug absorption. Pharm. Res., 1997, 14: 486-491.

6. Lipinsky C.A., Lombardo F., Dominy R.W., P.J., F., Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings. Adv. Drug Deliv. Rev., 1997, 23: 3-25.
7. Artursson P. Magnusson C., Epithelial transport of drugs in cell culture. II: Effect of extracellular calcium concentration on the paracellular transport of drugs of different lipophilicities across monolayers of intestinal epithelial (Caco-2) cells. J. Pharm. Sci., 1989, 79 (7): 595-600.
8. Butler M. Dawson M.E., Cell culture Labfax. 1992: 34-35, 135-145.
9. F. Faassen J. Kelder, J. Lenders R. Onderwater, Vromans H. Physicochemical properties and transport of steroids across Caco-2 cells. Pharm. Res., 2003, 2 (20): 177-186.
10. Artursson P. Epithelial transport of drugs in cell culture. I: A model for studying the passive diffusion of drugs over intestinal absorptive (Caco2). J. Pharm. Sci., 1990, 79: 476-482.
11. Gamenisch G., Waterbeemd H., Alsenz J., Folkers G., Estimation of permeability by passive diffusion through Caco-2 monolayers using the drugs lipophilicity and molecular weight. Eur. J. Pharm. Sci., 1998, 6: 313-319.
12. Artursson P., Cell cultures as models for drug absorption across the intestinal mucosa. Critic. Rev. Therap. Drug Carr. Sys., 1991, 8 (4): 305-330.
13. Lennernas H., Human intestinal permeability. J. Pharm. Sci., 1998, 87: 403-410.
14. Kasim N.A., Whitehouse M., Ramachran C., Bermejo M., Lennernas H., Hussain A.S., Junginger H.E., Stavchansky S.A., Midha K.K., Shah V.P., Amidon G.L., Molecular properties of WHO essential drugs and provisional biopharmaceutical classification. Molecular Pharmaceutics, 2003, 1 (1): 85-96.
15. Walker E., Janich S., Roessler B.J., Hilfinger J.M., Amidon G.L., HT29-MTX/Caco-2 cocultures as an in vitro model for the intestinal epithelium: In vitro- in vivo correlation with permeability data from rats and humans. J. Pharm. Sci., 1996, 85 (10): 1070-1076.
16. Fagerholm U., Johansson M., Lennernas H., Comparison between permeability coefficients in rat and human jejunum. Pharm. Res., 1996, 13: 1336-1342.
17. Irvine J.D., Takahashi L., Lockhart K., Cheong J., Tolan J.W., Selick H.E., Grove J.R., MDCK cells: A tool for membrane permeability screening. J. Pharm. Sci., 1998, 88 (1): 28-33.
18. Stenberg P., Norinder U., Luthman K., Artursson P., Experimental and computational screening models for the prediction of intestinal drug absorption. J. Med. Chem., 2001, 44: 1927-1037.