مروری بر متدهای بررسی جذب گوارشی و نفوذپذیری روده ای داروها

پروین ذاکری میلانی[۱و۲]، هادی ولیزاده[۱و۳]، حسنیه تاجرزاده[۴*]

[۱]دانشکده داروسازی دانشگاه علوم پزشکی تبریز، تبریز، ایران، [۲]مرکز تحقیقات کاربردی علوم داروئی دانشگاه علوم پزشکی تبریز، تبریز، ایران، [۳]مرکز تحقیقات نانوتکنولوژی دارویی دانشگاه علوم پزشکی تبریز، تبریز، ایران، [۴]دانشکده داروسازی دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران

تاریخ دریافت: ۸۸/۲/۱۳ ، تاریخ پذیرش: ۸۷/۴/۲۰

Methods to study the gastrointestinal absorption and permeability of drugs

Zakeri-Milani P.[1,2] ,Valizadeh H.[1,3] , Tajerzadeh H.[4]*

[1]Faculty of Pharmacy, Tabriz University of Medical Sciences, Tabriz, Iran, [2]Drug Applied Research Center, Tabriz University of Medical Sciences, Tabriz, Iran.[3]Research Center for Pharmaceutical Nanotechnology, Tabriz University of Medical Sciences, Tabriz, Iran, [4] Faculty of Pharmacy, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran

Received: 3 May 2009, Accepted: 11 Jul. 2009

Objectives: There are several approaches to gain early information regarding the intestinal permeability and potential for intestinal absorption of drugs. Thus in the present work, different methods available in scientific sources are reviewed. **Methods:** several models gathered from literature, then their use, advantages and limitations were evaluated. **Results:** The review indicates that the models are categorized into five classes including human perfusion studies, animal studies (using isolated tissue and/or intestinal perfusion), cell culture techniques, immobilized artificial membrane columns and in silico models. **Conclusion:** Introduced models could be used in different phases of drug discovery and development, however in silico models are the only one that can help optimizing chemical synthesis since the absorption potential is predicted based on structural characteristics only.

Key words: *intestinal permeability, absorption, in vivo, in vitro, in silico, cell culture.*

زمینه و هدف: امروزه روشهای مختلفی برای بدست آوردن اطلاعات اولیه در خصوص نفوذپذیری روده ای یا پتانسیل جذب روده ای داروها مورد استفاده قرار می گیرد. از اینرو در مقاله مروری حاضر انواع مدلهای مختلف موجود در منابع علمی مورد مطالعه قرا گرفته است. **روشها:** انواع مدلهای مورد استفاده بدین منظور از منابع علمی متعدد گردآوری شد و سپس موار استفاده، مزایا و معایب آنها مورد بررسی قرار گرفت. **یافته ها:** نتایج مطالعه نشان می دهد که کل روشهای موجود را میتوان در پنج دسته طبقه بندی کرد که عبارتند از: روش های انسانی (پرفیوژن روده انسان)، روشهای حیوانی (بااستفاده از بافت ایزوله حیوان و یا پرفیوژن روده حیوان)، روش کشت سلولی، روش استفاده از ستونهای غشای مصنوعی و نهایتا" روشهای in silico . **نتیجه گیری:** هر کدام از مدلهای موجود برای بررسی جذب گوارشی داروها در مرحله خاصی از مراحل توسعه و کشف داروهای جدید کاربرد دارند. لیکن در طراحی دارو و بهینه سازی سنتز شیمیایی آن تنها مدلهای in silico که بر پایه خصوصیات ساختمانی مولکول داروها بنا شده اند قابل استفاده می باشد.

واژه های کلیدی: نفوذپذیری روده ای، جذب، درون تن، برون تن، in silico ، کشت سلولی.

*نویسنده مسئول: حسنیه تاجرزاده، استاد، دانشکده داروسازی دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران، تلفن: ۶۹۵۹۰۵۳-۰۲۱، نمابر: ۶۶۴۶۱۱۷۸ -۰۲۱

**Corresponding Author: Hosnieh Tajerzadeh, Professor, Faculty of Pharmacy, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran ,. Tel: +98 -21- 6959053; Fax: +98-21-66461178; E-mail: Tajerzadeh@tums.ac.ir*

Archive of SID

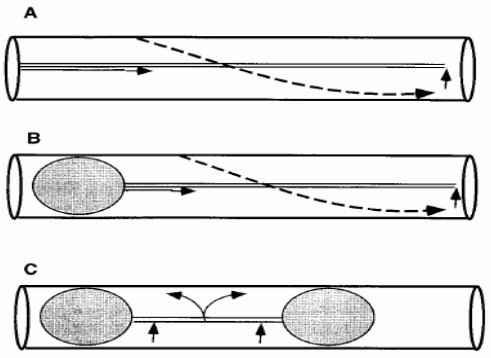
www.SID.ir

۱- مقدمه

جذب روده ای کافی داروهای خوراکی از دستگاه گوارش، یکی از لازمه های درمان موفق از راه تجویز خوراکی داروها می باشد. بنابراین برای یافتن داروهای کاندیدا با بهره دهی درمانی کافی باید روشهای مناسبی برای پیش بینی جذب گوارشی آنها در دسترس باشد. بعلاوه فاکتورهای تعیین کننده این جذب نیز باید بخوبی مشخص شده و مورد مطالعه و ارزیابی قرار گیرند (۱). پیش بینی صحیح جذب گوارشی همچنین برای دسته بندی درست داروها بر اساس سیستم طبقه بندی بیوفارماسیوتیکی لازم و ضروری است. معرفی این سیستم باعث شده است تا در مواردی برای فراورده های سریع رهش بتوان مطالعات بررسی همسنگی زیستی در شرایط درون تن را با آزمایشات تعیین نفوذپذیری و نیز تست انحلال در شرایط برون تن جایگزین نمود (۲). عوامل عمده تعیین کننده فراکسیون داروی جذب شده از دستگاه گوارش عبارتند از: نفوذپذیری روده ای داروها، محلولیت و انحلال، مدت زمان جذب و پایداری دارو (۳, ۱). نفوذپذیری در حقیقت سرعت انتقال مولکول (با انتشار غیرفعال و یا انتقال فعال) از غشای سلول می باشد که با خصوصیات مولکولی از قبیل وزن مولکولی، اندازه و شکل مولکولی، آرایش فضایی، درجه یونیزاسیون، مساحت سطح قطبی و غیرقطبی مولکول، بار الکتریکی، لیپوفیلیسیته و تعداد دهنده ها و گیرنده های پیوند هیدروژنی در مولکول در ارتباط است (۵, ۴). هدف از مقاله حاضر معرفی و ارزیابی روشهای غربالگری برای پیش بینی نفوذپذیری روده ای و فراکسیون دوز جذب شده (f_a) با استفاده از مدلهای انسانی، حیوانی و کشت سلولی می باشد.

۱-۱- تکنیک پرفیوژن روده در انسان

تخمین صحیح نفوذپذیری مؤثر روده ای داروها (P_{eff}) در انسان به روش درون تن دشوار است. لیکن متدهای پرفیوژن یک بار عبور (single-pass) مختلفی در دهه های اخیر بدین منظور مورد مطالعه و بررسی قرار گرفته اند (۶). در تمام آزمایشات پرفیوژن، جذب بر اساس سرعت حذف دارو از بخش مورد مطالعه محاسبه می شود. بررسی سرعت جذب به روشهای مختلف امکان پذیر است، ولی به نظر می رسد که نفوذپذیری روده ای، بهترین معرف برای عبور دارو از غشای روده باشد (۸-۶). محاسبه نفوذپذیری مؤثر روده ای بستگی به هیدرودینامیک بخش مورد مطالعه داردکه آنهم به نوبه خود تحت تاثیر روش پرفیوژن، سرعت پرفیوژن، و میزان حرکات روده قرار می گیرد. سه روش عمده برای بررسی جذب و نفوذپذیری روده باریک در انسان بکار می رود: الف-روش استفاده از لوله سه جزئی حاوی بخش مخلوط کننده (مدل باز) ب- روش استفاده ازلوله چندجزئی با بالن انسدادی در ابتدای بخش (مدل نیمه باز) ج- روش استفاده از لوله چندجزئی با دو بالن انسدادی در دو انتهای بخش ۱۰ سانتیمتری روده (مدل دو بالنه یا مدل بسته) (۱۰, ۹, ۶) (شکل ۱).



شکل ۱. شمای متدهای مختلف پرفیوژن روده انسان (A: مدل باز B : مدل نیمه باز C : مدل دو بالنه یا مدل بسته)

در روش اول محلول پرفیوژن وارده و مایعات گوارشی در بخش مخلوط کننده، مخلوط می گردند و در انتهای این بخش یک نمونه که معرف غلظت ورودی به بخش مورد بررسی است، گرفته می شود. در حدود ۳۰-۲۰ سانتیمتر دورتر از بخش اختلاط، که در حقیقت انتهای بخش مورد بررسی می باشد، نمونه دوم گرفته شده و جذب محاسبه می گردد. عیب عمده این روش تغییر ترکیب محلول پرفیوژن در بخش اختلاط و نیز در بخش مورد آزمایش است . این مساله باعث بروز مشکلاتی در تعیین شرایط جذب و نیز تعیین نفوذپذیری داروهای رفرانس (در شرایط معینی در روده) می گردد. بعلاوه در مدل باز محلول مورد آزمایش در تمام جهات قابلیت حرکت داشته و تخمین طول واقعی بخش نیز مشکل است. با معرفی مدل نیمه باز در سال ۱۹۶۵ و استفاده از بالن انسدادی در ابتدای بخش (۱۱)، ترکیب محتویات روده در وضعیت تعادلی باقی مانده و تعیین نفوذپذیری در شرایط کاملا" معین محیط روده امکان پذیر گردید. لیکن در هر دو این روشها میزان بازیافت نشانگر غیر قابل جذب (که اغلب پلی اتیلن گلیکول ۴۰۰۰ می باشد)، کم بوده و سرعت پرفیوژن نیز نسبتا" بالا و معمولا" بین ۵ تا ۲۰ میلی لیتر در دقیقه است. این سرعت جریان بطور چشمگیری بیشتر از سرعت جریان فیزیولوژیک (۳-۱ میلی لیتر در دقیقه) می باشد. از طرف دیگر، یکی از مزایای عمده این روشها، امکان پرفیوژن

Archive of SID

www.SID.ir

بخشهای انتهایی روده باریک است (۱۳, ۱۲). تکنیک استفاده از دو بالن انسدادی نیز برای پرفـــیوژن روده (Loc-I-Gut) و نواحی کولورکتال (Loc-I-Col) بکار می رود (۱۵, ۱۴). در مدل Loc-I-Gut یک بخش ۱۰ سانتیمتری با وضعیت مشخص بین دو بالن ایجاد می شود. یکی از مزایای مهم روشهای دو بالنه، به حداقل رسیدن امکان آلودگی بخش مورد آزمایش با مایعات گوارشی می باشد. بعلاوه امکان نشت محلول پرفیوژن به بیرون از بخش نیز کاهش می یابد. بنابراین بازیافت نشانگر غیر قابل جذب نیز تقریبا" کامل صورت می گیرد. چنین وضعیتی انجام مطالعات بررسی مکانیزم عبور و متابولیسم داروها و مواد غذایی در روده انسان تسهیل می نماید. مزیت مهم دیگر این روشها، امکان اندازه گیری میزان عبور اول روده ای و کبدی می باشد که با تعیین همزمان وسعت جذب و بهر ه دهی درمانی صورت می گیرد. همبستگی خوبی بین ضرایب نفوذپذیری مؤثر محاسبه شده داروها در روده انسان و وسعت جذب گوارشی آنها گزارش شده است (۱۸-۱۶). برای محاسبه ضریب نفوذپذیری روده ای مؤثر دارو (P_{eff}) در آزمایشات پرفیوژن روده انسان و در شرایط ثابت و یکنواخت که معمولا" بعد از ۴۰-۳۰ دقیقه حاصل میشود، از فرمول زیر استفاده میگردد:

$$Peff = \frac{Q}{2\pi rl}\left(\frac{C'in}{C'out} - 1\right)$$

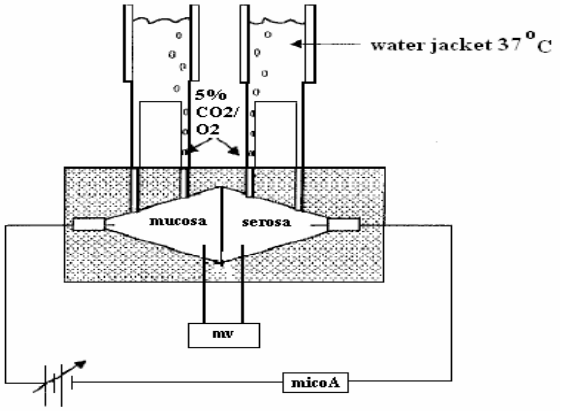
که در آن Q عبارتست از سرعت جریان محلول پرفیوژن در روده بر حسب میلی لیتر در دقیقه، r و l شعاع و طول بخش مورد مطالعه (برحسب سانتیمتر)، C'_{in} و C'_{out} به ترتیب غلظت محلول ورودی و خروجی از روده می باشد که نسبت به انتقال آب در روده تعدیل شده است. این تعدیل بر اساس غلظت ماده نشانگر غیر قابل جذب در محلول ورودی و خروجی صورت می گیرد (۱۹) .

۲-۱:روشهای حیوانی

۱-۲-۱: روش استفاده از بافتهای ایزوله

۱-۱-۲-۱: محفظه Ussing

در این روش، جذب مواد توسط عبور آنها از عرض غشای دست نخورده روده اندازه گیری می شود. در مواردیکه عبور از غشا یا بعبارتی نفوذپذیری عامل محدودکننده جذب گوارشی باشد، استفاده از این روش برای تعیین میزان تغییرات جذب مفید خواهد بود. بخشهایی از روده ایزوله شده، برش داده شده و بصورت صفحات مسطحی در می آید. این صفحات سپس به دستگاه سل-دیفوزیون سوار شده و در تماس با بافر مناسب قرار داده می شود. برای کنترل ضخامت لایه ساکن آبی در اطراف غشا از طریق همزدن محیط و نیز اکسیژن رسانی به بافت، حبابهای هوا وارد سیستم می گردند. داروی مورد بررسی به بخش دهنده وارد شده و تجمع آن در بخش گیرنده بعنوان تابعی از زمان اندازه گیری می شود. سرعت جریان دارو در چنین شرایطی بصورت سرعت تجمع نرمالیزه شده به واحد سطح تعریف می گردد.



شکل ۲. شمای محفظه ussing

بافرهای مورد استفاده در بخش سروزی و موکوسی باید حداکثر قدرت زنده نگهداشتن بافت را داشته و حاوی گلوتامین و یا گلوکز بعنوان منبع انرژی باشند. علاوه بر اندازه گیری سرعت جریان دارو، از این سیستم برای ارزیابی خصوصیات الکتروفیزیولوژیک بافتهای روده نیز استفاده می شود.

جریان یونهای غیرآلی از اپی تلیوم باعث ایجاد اختلاف پتانسیل و جریان الکتریکی در عرض غشا می شود که میزان آن توسط الکترودهای قرار داده شده در محفظه های دهنده و گیرنده قابل اندازه گیری است. مقاومت الکتریکی غشا (Transepithelial electrical resistance or TEER) نیز توسط قانون اهم تعیین می گردد. مزیت استفاده از این روش، امکان نمونه برداری از بخشهای دهنده و گیرنده بصورت مستقل و بررسی سرعت جریان دارو در هر دو جهت سروزی- مخاطی و مخاطی- سروزی می باشد. بنابراین می توان انتقال غیرفعال را از انتقال با واسطه حامل تشخیص داد. بعلاوه برای بررسی تاثیر pH و یونها روی انتقال دارو می توان ترکیب یونی فاز دهنده را تغییر داد. بهرحال حفظ شرایط سینک در این آنالیز ضروری است. بطوریکه غلظت ماده مورد مطالعه در محفظه گیرنده در طی زمان آزمایش

Archive of SID

www.SID.ir

باید همواره کمتر از ده درصد غلظت آن در محفظه دهنده باشد.

۲-۱-۲-۱: حلقه های برگردانده شده

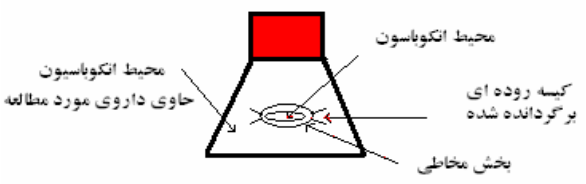
حلقه های برگردانده شده از کل بخشهای روده برای مطالعه برداشت دارو (uptake) مورد استفاده قرار می گیرند. برای تهیه این حلقه ها ابتدا بخشی از روده از بدن حیوان جدا شده و از یک انتها بسته می شود. با استفاده از یک میله شیشه ای با دقت و احتیاط، روده برگردانده شده و سپس به صورت حلقه ها یا بخشهای کوچکی بریده می شود. حلقه های حاصله به فواصل زمانی معین در بافر اکسیژنه حاوی دارو انکوبه می گردد. سیستم در طی انکوباسیون همزده می شود تا از کاهش مقاومت لایه آبی و یکنواختی دما در آن اطمینان حاصل شود. میزان برداشت دارو توسط حلقه ها بعد از شستن سریع آنها با بافر یخ اندازه گیری می گردد. هر حلقه بطور جداگانه بعد از خشک شدن نسبی در یک ویال قرار گرفته و وزن آن اندازه گیری می شود. نتایج این نوع مطالعات معمولا" بصورت آپتیک دارو (مول دارو بر وزن بافت) و یا سرعت جریان دارو (مول دارو بر زمان بر وزن بافت) بیان می شود. برای محاسبه نفوذپذیری دارو نیز از معادله زیر می توان استفاده نمود:

$$J=P\ C\ <cf>$$

که در آن J سرعت جریان دارو، P نفوذپذیری، C غلظت دارو در بافر انکوباسیون و <cf> فاکتور تبدیل کننده وزن بافت به مساحت سطح بافت می باشد (۲۰, ۲۱). نظیر سایر روشهای برون تن، زنده ماندن بافت در طول مدت این آزمایش نیز حائز اهمیت فراوانی است. برای بررسی نفوذپذیری بین سلولی در این روش از موادی مانند پلی اتیلن گلیکول ۴۰۰۰، اینولین و مانیتول استفاده می شود. بطوریکه افزایش برداشت این مواد توسط حلقه ها نشانه تخریب بافت مورد آزمایش می باشد. نگهداری بافت مورد آزمایش در دمای ۴ درجه سانتیگراد در طی مرحله آماده سازی حلقه ها و قبل از شروع آزمایش باعث کاهش سرعت زوال بافت در طول مدت انکوباسیون در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد می گردد. روش استفاده از حلقه های روده ای برگردانده شده برای مطالعه انتقال غیرفعال سایمتیدین(۲۲)، آسیکلووير (۲۳)، فنی توئین (۲۴) پردنیزولون (۲۵) و انتقال فعال متیل دوپا (۲۶)، گاباپنتین (۲۷)، بنازپریل (۲۸) و SQ29852 (۲۱) بکار رفته است. این روش همچنین برای مطالعه جذب محدود شونده با محلولیت (۲۵)، ارزیابی تبدیل پیش دارو به داروی اصلی توسط مخاط روده (۲۵) و بررسی تاثیر مواد غذایی بر عبور روده ای داروها (۲۴) مورد استفاده قرار گرفته است. شواهد نشان می دهد که نتایج مطالعات آپتیک دارو می تواند برای پیش بینی جذب در شرایط درون تن مورد استفاده قرار گیرد. بطوریکه ترتیب سرعت جذب درون تن چهار داروی تئوفیلین، سالیسیلات، آلفامتیل دوپا و سفوکسیتین در رت با ترتیب میزان آپتیک آنها در حلقه های برگردانده شده رت یکسان بوده است (۲۱). در مطالعه دیگری رابطه خطی بین جذب خوراکی ۱۱ دارو در انسان و میزان آپتیک آنها در حلقه ها مشاهده شده است (۲۹). این روش بدلیل سادگی و سرعت انجام آن روش مناسبی برای مطالعات عبور روده ای مواد محسوب می گردد. بعلاوه بدلیل اینکه می توان تعداد زیادی حلقه از یک حیوان تهیه نمود، بنابراین هر حیوان بعنوان کنترل خود عمل می نماید. در یک تحقیق تغییرات درون فردی با استفاده از این متد کمتر از ۵٪ گزارش شده است (۲۱). بهر حال بمنظور غربالگری داروها استفاده از این روش فقط برای سوبستراهای رادیواکتیو مفید است، چراکه استخراج و آماده سازی نمونه برای سایر روشهای آنالیز از جمله متد کروماتوگرافی بسیار وقت گیر و خسته کننده خواهد بود.

۳-۱-۲-۱: کیسه روده ای برگردانده شده

روش کیسه روده ای برگردانده شده اولین بار در سال ۱۹۵۴ توسط Wilson و Wiseman معرفی گردید (۳۰) . در این روش نیز برای تهیه کیسه های برگردانده شده، بخشی از روده حیوان بیهوش جدا شده و بعد از تخلیه محتویات آن با سالین طبیعی و برگرداندن آن توسط میله شیشه ای، سریعا" با محیط کشت اکسیژنه تازه پر شده و سپس به کیسه هایی به طول ۴-۲ سانتیمتر تقسیم می گردد. در مرحله بعد این کیسه ها (که بخش خارجی آنها لایه مخاطی می باشد) در درون محیط کشت حاوی داروی مورد آزمایش قرار گرفته و تجمع دارو در بخش درونی آنها اندازه گیری می شود.



شکل ۳. شمای سیستم کیسه روده ای برگردانده شده

Archive of SID

www.SID.ir

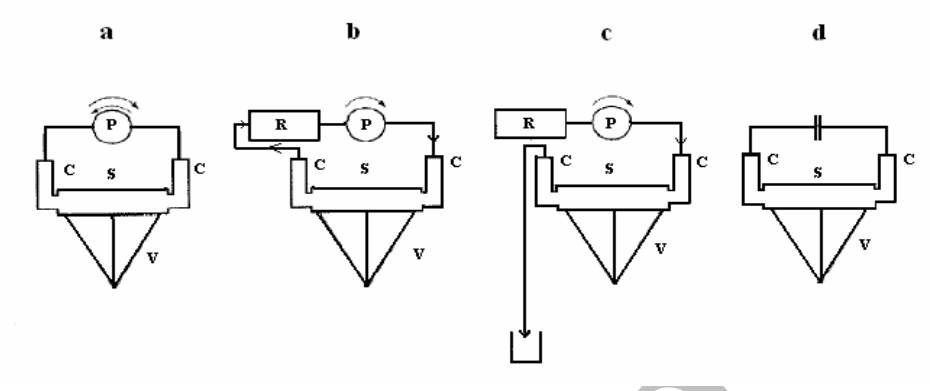
در شرایط طبیعی، بافت روده بمدت ۱۲۰ دقیقه زنده می ماند. از مزایای این روش سرعت بالای آن و ارزان بودن آن است. بعلاوه بدلیل حجم کم محیط داخل کیسه، غلظت دارو در درون کیسه سریعا" افزایش می یابد. اگر چه این افزایش سریع غلظت در اغلب موارد از نظر آنالیتیکی یک مزیت محسوب می گردد، لیکن در مورد داروهای با جذب بالا، بدلیل برهم زدن شرایط سینک در درون کیسه بعنوان یک عیب محسوب می گردد. عیب عمده این روش آن است که دارو برای ورود به محفظه داخلی باید همه لایـــــه های جدار روده (از جمله عضلات) را سپری نماید. با وجود این از این مدل جذب برای غربالگری داروهای سوبسترای p-گلیکوپروتئین و اندازه گیری میزان عبور آنها در حضور و عدم حضور مهارکننده های ناقل فوق استفاده می گردد (۳۱). بر خلاف روش حلقه های برگردانده شده، با این روش می توان عبور بین سلولی و درون سلولی را به تفکیک بررسی نمود. همچنین مطالعه متابولیسم دارو توسط مخاط روده نیز با این روش امکان پذیر است (۳۲). اگر دارویی توسط آنزیمهای سطح سلولهای روده متابولیزه گردد، محصولات متابولیکی بدنبال انکوباسیون در محیط قابل شناسایی خواهند بود. با روش کیسه روده ای برگردانده شده میتوان به مکانیسم عبور دارو از غشای دستگاه گوارش پی برد و در مورد انتخاب راهکار مناسب برای افزایش نفوذپذیری داروها از جمله تغییرات در ساختار شیمیایی دارو و یا اصلاح فرمولاسیون تصمیم گیری نمود. آگاهی کامل از جذب وابسته به محل داروها، مساله بسیار مهم در بهینه سازی دارورسانی خوراکی ، علی الخصوص فرمولاسیونهای آهسته رهش می باشد. با روش کیسه های روده ای می توان میزان جذب در بخشهای مختلف روده را به تفکیک تعیین نمود و از آنجاییکه طول هر کیسه ۴-۲ سانتیمتر است، بنابراین از روده باریک یک رت بسته به سن وسایز آن بطور طبیعی می توان ۲۰-۱۵ کیسه تهیه نمود و میزان جذب دارو را در هر چند سانتیمتر روده تعیین نمود. تحقیقات در مورد مواد افزاینده نفوذپذیری روده ای داروها از دیگر مواردی است که با استفاده از این روش انجام می گیرد. بطوریکه علاوه بر مکانیسم افزایش انتقال روده ای دارو حتی می توان سمیت مواد افزاینده نفوذ را نیز به آسانی ارزیابی نمود. یکی از ساده ترین روشها برای بررسی آسیب سلولی، اندازه گیری میزان آزادسازی آنزیم لاکتیک دهیدروژناز می باشد. این آنزیم در سیتوپلاسم سلول قرار دارد که در صورت آسیب سلول و یا مرگ سلول در مقادیر قابل اندازه گیری به محیط آزاد می شود.

۲-۲-۱: روش پرفیوژن روده

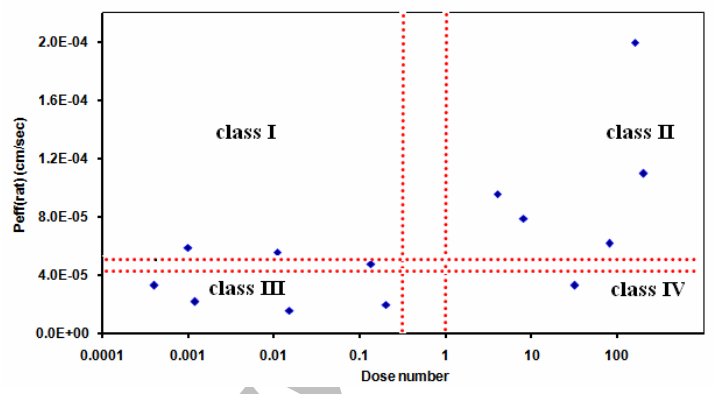
روش پرفیوژن روده در حیوانات کوچک آزمایشگاهی بخصوص رت، به بهترین حالت، جذب درون تن در حیوان راتقلید می نماید. بر خلاف روشهای برون تن، در این روش، موانع جذبی بر سر راه دارو تا رسیدن به جریان خون کبدی دقیقا" با شرایط درون تن یکسان است که این مساله بر قابلیت اعتماد آن می افزاید. اگرچه تحقیقات نشان داده است که نوع ماده بیهوشی مورد استفاده در این روش، تاثیر قابل توجهی در میزان جذب داروها داشته است (۳۳, ۳۴)، لیکن بدلیل عصب دهی و خونگیری طبیعی روده و نیز تلاش در جهت اعمال حداقل تغییرات در عمل و ساختار روده، میزان قابلیت زنده ماندن بافت روده و حفظ تمامیت غشای آن به حداکثر رسیده و احتمال تخمین و گزارش مقادیر نفوذپذیری بیشتر از مقدار واقعی برای داروها به حداقل می رسد. متدهای مختلفی برای پرفیوژن روده وجود دارد که عبارتنـــــــــد از: پرفیوژن نوسانی (Oscillating)، پرفیوژن چرخشی (Recirculating)، پرفیـــــوژن یک بار عبور (Single-pass) و روش لوپ بسته (Closed-loop) (شکل ۴). در روش لوپ بسته، محلول دارو به داخل یک بخش ۲۰-۱۰ سانتیمتری روده که از دو انتها بسته است وارد می شود. سپس بعد از گذشت زمان انکوباسیون معین، برای تعیین مقدار از دست رفته دارو از لومن روده نمونه گیری می شود. مدلهای دینامیکی پرفیوژن (چرخشی و نوسانی) به منظور تقلید بهتر حرکات طبیعی محتویات روده در شرایط درون تن بکار می روند. بهر حال مهمترین نقصان مطرح برای این روشها، این است که رسیدن به حالت ثابت و یکنواخت انتقال روده ای با آنها عملا" ممکن نخواهد بود. بنابراین عموما" از روش پرفیوژن یکبار عبور علیرغم حجم زیاد لازم از محلول دارو در این روش، استفاده می شود. در متد یکبار عبور بخشی از روده حیوان بیهوش کانوله شده و توسط محلول داروی مورد نظر مشروب می‌گردد و سپس نمونه گیری در فواصل زمانی معین از کانول خروجی صورت می گیرد.

Archive of SID

www.SID.ir



شکل ۴. شمای روشهای مختلف پرفیوژن روده: a) نوسانی b) چرخشی c) یکبار عبور d) لوپ بسته
S: بخش مورد بررسی c : کانول v : ورید روده ای R : مخزن دارو P : پمپ



شکل ۵. سیستم طبقه بندی داروها بر اساس عدد دوز و مقادیر نفوذپذیری روده ای در رت (۴۲)

سپس مقدار داروی جذب شده از روده به وسیله میزان کاهش غلظت محلول خروجی تعیین شده و نفوذپذیری مؤثر دارو (بر حسب سانتیمتر بر ثانیه) نیز از فرمول زیر محاسبه می‌گردد (۳۵-۳۷):

$$P_{eff} = \frac{-Q \ln(C_{out}/C_{in})}{2\pi rl}$$

که در آن Q سرعت جریان ورودی به روده بر حسب سانتیمتر بر ثانیه، C_{in} و C_{out} به ترتیب غلظت‌های ورودی و خروجی روده، r شعاع روده باریک بر حسب سانتیمتر و l نیز طول بخش مورد مطالعه از روده بر حسب سانتی‌متر می‌باشد. برای محاسبه میزان ورود و خروج آب از روده و تصحیح نفوذپذیری حاصله از مواد غیر قابل جذب بطور همزمان استفاده می‌گردد. پلی اتیلن گلیکول ۴۰۰۰ و فنل رد که یک مولکول رنگی درشت می‌باشد به کرات به این منظور مورد استفاده قرار گرفته اند. با استفاده از این روش امکان بررسی وقایع جذب بدون دخالت پدیده دفع صفراوی و چرخه روده ای-کبدی فراهم می گردد. بعلاوه مانند روشهای قبل میتوان جذب دارو در بخشهای مختلف روده را نیز تعیین نمود. اگرچه روش پرفیوژن روده رت بدلیل وقت گیر بودن آن، روش ایده آلی برای غربالگری داروها به حساب نمی آید، لیکن برای تایید نتایج بدست آمده از روشهای ساده تر بررسی جذب نظیر روشهای کشت سلولی، کاربرد وسیعی دارد. بعلاوه نقش p-گلیکوپروتئین در نقل و انتقال طیف وسیعی از داروها به روش فوق مورد مطالعه قرار گرفته است (۴۱-۳۸). در یک مقاله مروری توسط Lennernas، آزمایشات پرفیوژن ژژنوم موش صحرایی به عنوان تکنیک مفیدی برای طبقه بندی داروها بر اساس سیستم جدید بیوفارماسیوتیکی (BCS) معرفی شده است (۶). در طبقه بندی که توسط نویسنده و همکاران در مورد داروهای مدل کار شده به روش پرفیوژن روده باریک موش صحرایی ارائه گردید، داروها بر اساس نفوذپذیری روده ای

Archive of SID

www.SID.ir

و عدد دوزشان در چهار گروه مجزا قرار گرفتند که در شکل۵ مشاهده می‌گردد (۴۲).

در طبقه بندی دیگری توسط نویسنده و همکاران از سرعت انحلال ذاتی داروها و نفوذپذیری مؤثر روده ای آنها در رت بعنوان پارامترهای قابل اطمینان استفاده شده است (شکل ۶) (۴۳).

محل شکل ۶

جالب توجه است که استفاده از نفوذپذیری روده ای داروها در رت بعنوان یکی از پارامترهای طبقه بندی توانسته است داروها را در کلاس مربوطه شان که در سیستم طبقه بندی بیوفارماسیوتیکی که توسط Amidon و همکارانش ارائه شده بود (۷)، قرار دهد. بعلاوه مطالعات مختلف نشان داده است که مدل پرفیوژن روده رت بصورت یک بار عبور ، از قدرت بالایی برای پیش بینی فراکسیون دوز جذب شده و نفوذپذیری روده ای داروها در انسان برخوردار است (۴۵, ۴۴, ۳۴, ۱۷). بعنوان مثال Salphati و همکارانش (۴۴) همبستگی خوبی (r^2=0.88) بین مقادیر نفوذپذیری روده ای رت و انسان گزارش نمودند. نتایج تحقیقات انجام شده توسط نویسنده و همکاران نیز بیانگر همبستگی بالای بین ضرایب P_{eff} داروها در موش صحرایی با ضرایب نفوذپذیری‌های مربوطه در انسان (R^2 =۰/۹۳) و نیز با مقادیر فراکسیون دوز جذب شده در انسان (R^2=۰/۹۱) می‌باشد(۳۴).

۳-۱: روشهای سلولی

۱-۳-۱: سلولهای Caco-2

از چند دهه قبل، محققین شروع به استفاده از سلولهای کشت داده شده برای مطالعات جذب نمودند. یکی از مزایای کشت سلولی این است که در حالت تک لایه، سلولها درست مثل حالت درون تن حالت قطبی نشان می دهند. کشتهای سلولی اولیه دارای قابلیت زنده ماندن ضعیف بوده و تک لایه منسجمی که در آن سلولها درکنار هم با اتصالات محکم بین سلولی قرار بگیرند، تشکیل نمی دادند. امروزه اغب مدلهای کشت سلولی از رده های سلولی نامیرا هستند که از سلولهای طبیعی، سلولهای تومورهای القایی ویا سلولهای سرطانی کولون منشا گرفته اند (۴۶). سلولهای سرطانی کولون بدلیل قابلیت تمایز و تشکیل تک لایه های منسجم و پلاریزه در محیط کشت بیشترین استفاده را دارند. از میان آنها سلولهای Caco-2 که اولین بار در دهه ۱۹۷۰ استفاده شده اند بیشترین کاربرد را دارد. مزیت این سلولها این است که می توانند در عرض چند روز روی فیلترهای منفذدار در محیط کشت تشکیل تک لایه داده و سپس به سلولهای جذبی روده با مرفولوژی تیپیک (دارای حاشیه برسی و اتصالات محکم بین سلولی) تمایز یابند. شکل ۷ شمایی از کشت سلولها روی غشای پلی کربنات را نشان می دهد.

محل شکل۷

در طی کشت، سلولها تک لایه های منسجمی تشکیل داده و در نتیجه اتصالات بین سلولی محکمتر، مقاومت اپیتلیال بیشتر و نفوذ بین سلولی مانیتول کمتر می گردد. سلولهای Caco-2 چنین تک لایه ای را بعد از دو هفته از زمان کشت تشکیل میدهند. البته امروزه انواع با رشد سریع این سلولها نیز در دسترس می باشد (۴۷). اتصالات محکم بین سلولی سلولهای Caco-2 باعث ایجاد مقاومت الکتریکی بین سلولی (TEER) بالا حدود ۴۵۰-۱۵۰ اهم سانتیمتر مربع می شود. در حالیکه این میزان در بافت طبیعی روده باریک به ۴۰-۲۵ اهم سانتیمتر مربع می رسد. مقاومت بالای این سلولها باعث شده است که بتوان از آنها در مطالعه تاثیر عوامل مختلف بر تمامیت تک لایه استفاده نمود. زیرا بعنوان مثال نفوذپذیری یک ماده غیر قابل نفوذ تیپیک نظیر PEG4000 یا مانیتول را براحتی میتوان بررسی نمود. بطور کلی برای محاسبه نفوذپذیری ظاهری دارو (بر حسب سانتیمتر بر ثانیه) از تک لایه سلولی کشت داده شده روی فیلتر از معادله زیر استفاده می شود که در آن dQ/dt سرعت انتقال برحسب نانومول بر ثانیه، C_0 غلظت اولیه در محفظه دهنده و A مساحت سطح غشای تک لایه بر حسب سانتیمتر مربع می باشد.

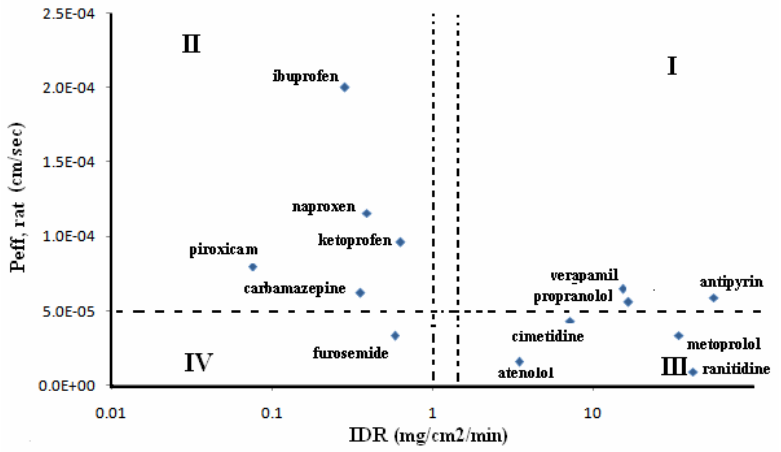
$$P_{app} = \frac{dQ}{dt}\left(\frac{1}{AC_0}\right)$$

محققین مختلفی همبستگی خوبی بین نفوذپذیری اندازه گیری شده دارو در تک لایه سلولهای Caco-2 و جذب خوراکی همان دارو در انسان گزارش نموده اند (۴۸-۵۰). لیکن این مشاهدات اکثرا" برای داروهای با حل شوندگی خوب در آب صورت گرفته است در حالیکه بسیاری از داروهای جدید آبگریز بوده و محلولیت در آب ضعیفی دارند. در یک تحقیق که توسط نویسنده و همکارش (۵۱) بر روی طیفی از داروهای با خصوصیات مختلف که در برگیرنده هر دو گروه داروها با محلولیت کم و زیاد در آب می باشد، استفاده گردید، همبستگی نسبتا" خوبی بین مقادیر $P_{app(Caco-2)}$ با مقادیر $P_{eff\ (human)}$ (R^2= ./۷۹) و $F_{a\ (human)}$ (R^2= ./۹۱) برای داروهای با جذب غیر فعال بدست آمد (شکل ۸).

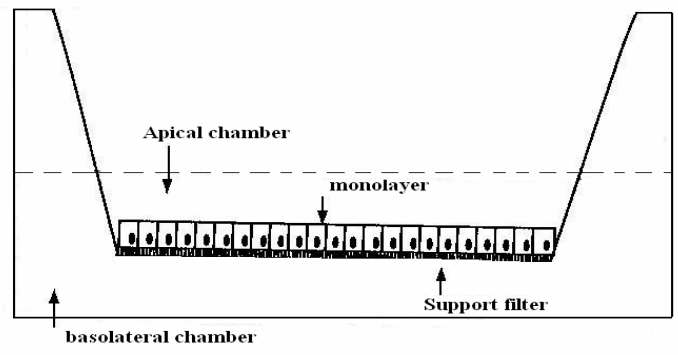
محل شکل ۸

Archive of SID

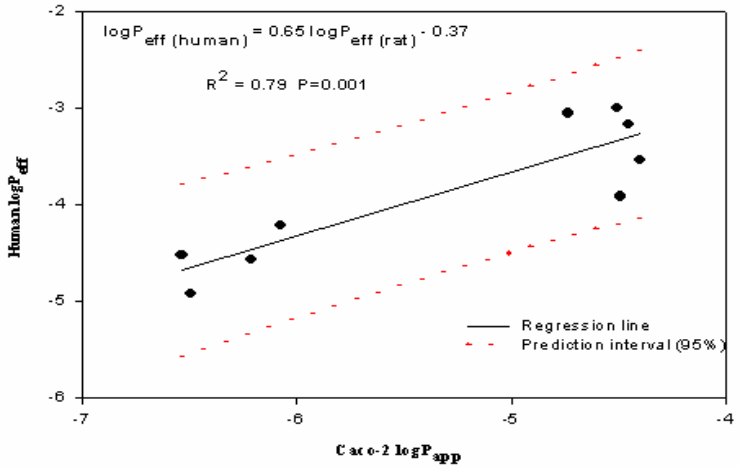
www.SID.ir



شکل ۶. سیستم طبقه بندی داروها بر اساس سرعت انحلال ذاتی و مقادیر نفوذپذیری روده ای در رت (۴۳)



شکل ۷. شمایی از تک لایه سلولی کشت داده شده روی فیلتر پلی کربنات



شکل ۸. نمودار همبستگی ضرایب نفوذپذیری داروها در سلولهای Caco-2 و روده انسان

www.SID.ir

اگرچه مقادیر مقاومت الکتریکی بین سلولی تک لایه سلولهای Caco-2 با مقادیر طبیعی آن در روده متفاوت است، لیکن این تک لایه ها آنزیمهای حاشیه برسی و آنزیمهای متابولیک فاز یک و دو را دارا می باشند (۵۲). بهمین دلیل پیشنهاد شده است که می توان از این سلولها بعنوان سیستمی برای ارزیابی متابولیسم داروها در بافت روده ای در طی روند انتقال استفاده نمود (۵۲). بعلاوه این سلولها بعد از تمایز، سیستمهای انتقال فعال از قبیل ناقل اسیدهای آمینه، پپتیدهای کوچک، اسیدهای صفراوی، گلوکز و ویتامین B_{12} و نیز سیستم انتشار به خارج P – گلیکوپروتئین را بیان می کنند. باید یادآور شد که با وجود اینکه سلولهای Caco-2 از سلولهای سرطانی روده منشا گرفته اند، ولی خصوصیات انتروسیتهای روده باریک از جمله حضور حاملهای انتقال فعال را از خود بروز می دهند (۵۳). یک نکته قابل توجه در خصوص روش کشت سلولی، احتمال وجود یک سد اضافی (مربوط به فیلتر پلی کربنات) در برابر نفوذ می باشد. Rubas و همکارانش تخمین زده اند که نفوذپذیری ترکیبات هیدروفیل از غشای پشتیبان (فیلتر پلی کربنات) به همان اندازه دیفوزیون آزاد در محلول آبی باشد (۵۴). چنین یافته ای در مورد ترکیبات لیپوفیل که امکان تداخل با غشاها را دارند، صادق نمی باشد. یکی از مهمترین مزایای روش کشت سلولی امکان استفاده از آن در استراتژی غربالگری می باشد. زیرا کشت سلولها در مقادیر زیاد نسبتا" آسان و تکرارپذیر بوده و نتایج حاصل از آزمایشات نفوذپذیری نیز تکرارپذیری بالایی دارد. اما این سلولها دارای معایب مهمی نیز می باشند. نخست اینکه این سلولها دارای اتصالات بین سلولی بسیار محکم می باشند. بطوریکه این اتصالات بیشتر به اتصالات سلولی کولون شباهت دارند تا روده باریک. این مساله می تواند باعث پیش بینی اشتباه و کمتر از واقعیت ترکیبات هیدروفیل گردد. دوم اینکه اگرچه این سلولها سیستمهای انتقال فعال به داخل و خارج سلول را دارا هستند، لیکن در مورد ناقلین مختلف ، اختلافاتی از نظر تعداد نسبت به بافت روده مشاهده می شود (۱). یک مثال در این مورد حامل گلوکز است که در سلولهای کشت داده شده کمتر از بافت طبیعی روده یافت می شود. همچنین اگرچه این ناقلها در سلولهای کولونی در حالت طبیعی وجود ندارند، لیکن در سلولهای Caco-2 مرتبا" بروز می نمایند. نکته سوم اینکه اختلافات بین آزمایشگاهی و حتی بچ به بچ در میزان بروز این خصوصیات مشاهده می شود. این امر ممکن است منجر به ضعف قدرت پیش بینی نفوذپذیری بین سلولی و انتقال توسط حامل گردد. از طرف دیگر در آینده ای نزدیک بدلیل پیشرفتهای مهندسی سلولی احتمالا" شاهد رده های سلولی تکرارپذیر با خصوصیات جذبی قابل اطمینان تر برای کلیه مکانیسمهای جذبی خواهیم بود. یکی دیگر از مزایای استفاده از کشت سلولی کاربرد آنها در متدهای نیمه اتوماتیک است. بعلاوه این سلولها اطلاعات کیفی خوبی در زمینه تداخلات دارویی در خصوص CYP3A و P-gp ارائه کرده اند (۵۵). اگرچه هنوز داده های کمی در این مورد در دسترس نیست. جهت تقلید بهتر غشای مخاطی دستگاه گوارش، کشت توام سلولهای Caco-2 و سلولهای تولید کننده موسین

HT-29-MTX مورد استفاده قرار گرفته است. در چنین سیستمی مقادیر نفوذپذیری بدست آمده برای داروهای با جذب غیر فعال همبستگی خوبی با فراکسیون دوز جذب شده در انسان نشان می دهد. لیکن در مورد داروهای با انتقال فعال، سرعت جذب کمتر از مقدار واقعی در شرایط درون تن و نیز کمتر از سیستم Caco-2 به تنهایی بدست می آید. بهر حال نفوذپذیری بین سلولی تک لایه حاصل از کشت توام سلولها ۳۰ برابر بیشتر بوده و برای پیش بینی انتقال بین سلولی ترکیبات هیدروفیل سیستم مناسبی می باشد (۳۱).

۲-۳-۱: سلولهای MDCK

مدل MDCK (Madin-Darby Canine Kidney) نیز از جمله مدلهای مورد استفاده برای تخمین نفوذپذیری و پیش بینی مقادیر فراکسیون جذب شده در انسان می باشد. بدلیل منشا این سلولها که توبولهای دیستال کلیه سگ می باشد، انتقال فعال از تک لایه های این سلولها، متفاوت از سلولهای روده انسان می باشد (۵۶). همچنین احتمال دارد که این سلولها از نظر ترکیبات غشایی نیز با سلولهای روده ای متفاوت باشند. Irvine و همکارانش (۵۷) همبستگی مقادیر نفوذپذیری بدست آمده از تک لایه های MDCK برای۴۰ دارو با جذب غیرفعال را با مقادیر فراکسیون دوز جذب شده در انسان مورد بررسی قرار دادند و دقت و صحت مشابه داده های حاصل از سلولهای Caco-2 بدست آوردند. نتایج مشابهی برای معدودی از ترکیبات توسط Salphati و همکارانش گزارش شده است (۴۴). لیکن مزیت این سلولها نسبت به سلولهای Caco-2 این است که در عرض فقط سه روز ، می توانند تک لایه ای با اتصالات محکم بین سلولی تشکیل دهند. بطور کلی مقاومت غشای تک لایه حاصل از سلولهای MDCK در مقایسه با غشای حاصل از سلولهای Caco-2 کمتر می باشد که این امرباعث می شود بعنوان یک

Archive of SID

www.SID.ir

سیستم غربالگری مناسب برای عبور بین سلولی در نظر گرفته شود(۳۱).

۳-۳-۱: سلولهای TC-7

این سلولها زیرمجموعه ای از سلولهای Caco-2 می باشند. بر اساس مقایسه ای که بین این سلولها و سلولهای مادر آنها توسط Gres و همکارانش انجام شده است (۵۸)، علیرغم مقاومت الکتریکی بالای غشای تک لایه حاصل از سلولهای TC-7، از نظر سایر خصوصیات تشابه زیادی بین این سلولها وجود دارد. نظیر آنچه که در مورد سلولهای Caco-2 گفته شد، مقادیر نفوذپذیری (انتقال غیرفعال) حاصل از این سلولها نیز همبستگی خوبی با فراکسیون دوز جذب شده در انسان نشان می دهد. تحقیقات نشان داده است که این سلولها دارای آنزیم CYP3A5 می باشند و از آنجاییکه این آنزیم از انواع مهم سیتوکروم در روده بزرگ انسان می باشد، بنابراین بنظر می رسد که سلولهای TC-7 برای مطالعه انتقال و متابولیسم مواد در روده بزرگ مفید باشند که چنین امری در مورد سلولهای مادر (Caco-2) صادق نمی باشد (۳۱).

۴-۳-۱: سلولهای ۲/۴/A1

این سلولها برای اولین بار توسط Tavelin و همکارانش در سال ۱۹۹۹ معرفی گردیدند (۵۹). مطالعات برون تن شانزده دارو با مکانیسم جذب غیرفعال با استفاده از سلولهای روده باریک رت (سلولهای ۲/۴/A1) نشان داده است که این سلولها در مقایسه با سلولهای Caco-2 قدرت بالاتری برای پیش بینی فراکسیون دوز جذب شده در انسان نشان می دهند، بخصوص در مورد داروهای با نفوذپذیری کم که انتقال حدود ۳۰۰ بار سریعتر از سلولهای Caco-2 صورت می گیرد (۵۰, ۶۰). لیکن بر خلاف سلولهای Caco-2 این سلولها فاقد حاملهای مختلف انتقال داروها هستند و بنابراین عمدتا" نفوذپذیری روده ای داروهای با جذب غیرفعال را پیش بینی می کنند. نکته مهم دیگر حساسیت این سلولها به دما است. بطوریکه تغییرات کوچک دما باعث ایجاد تغییرات در آنها می گردد. سلولهایی که در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد نگهداری می شوند بسیار کمتر از سلولهایی که در دمای ۳۹ درجه نگهداری می شوند، تمایز می یابند (۶۱). بعلاوه داده های حاصل از کار روی این سلولها محدود است و برای ارزیابی کامل پتانسیل آنها، آزمایشات بیشتری باید انجام گردد.

۴-۱: روش استفاده از ستونهای غشای مصنوعی ساکن (Immobilized artificial membrane columns)

این ستونها اساسا" از نوع ستونهای کروماتوگرافی فاز معکوس هستند که در آنها فاز هیدروکربنه پوشاننده ستون توسط لیپیدها (مخصوصا" فسفولیپیدها) جایگزین شده است. هدف از این جایگزینی،تقلید غشای لیپیدی سلول می باشد. ترکیباتی که با فاز لیپیدی تداخل می نمایند، زمان بازداری طولانی تری در ستون خواهند داشت. انتظار می رود که چنین ترکیبی، نفوذپذیری خوبی از غشای دولایه چرب سلولها داشته باشد. مزیت این روش سرعت بالای آن نسبت به روشهای کشت سلولی، برای غربالگری تعداد زیادی داروها در فرایند توسعه و ساخت داروهای جدید می باشد. لیکن معایب و محدودیتهایی نیز در این روش وجود دارد از جمله عدم امکان مطالعات در زمینه عبور بین سلولی مواد، انتقال فعال و نیز متابولیسم داروها (۶۲). بنابراین احتمالا" پیش بینی پتانسیل جذب داروها در شرایط درون تن با این روش نسبت به سایر روشها از صحت کمتری برخوردار است. بطریق مشابه از غشاهای مصنوعی نیز می توان برای پیش بینی نفوذ و جذب داروها در انسان استفاده نمود. نمونه هایی از این غشاها از جنس هگزادکان (۵۰) و فسفولیپید (۶۳) توسط محققین مورد مطالعه قرار گرفته اند. معایب ذکر شده برای ستونهای غشای مصنوعی برای این سیستم نیز مطرح است. لیکن در این روش، نیازی به آنالیز توسط دستگاه کروماتوگرافی با کارایی بالا وجود ندارد و فقط کافی است که جذب ماورای بنفش ترکیب در محلول عبور داده شده از غشا قرائت گردد. لیکن زمان طولانی انکوباسیون (در حد چندین ساعت) ممکن است برای ترکیبات ناپایدار محدودیت ایجاد نماید.

۵-۱: روشهای In silico

تلاشهای زیادی برای مطالعه و ایجاد ارتباط بین خصوصیات مختلف مولکولی و نفوذپذیری یا جذب داروها صورت گرفته است. بعنوان مثال نشان داده شده است که با افزایش وزن مولکولی دارو نفوذپذیری آن کاهش یافته و با افزایش لیپوفیلیسیته آن تا یک حد معین، میزان نفوذپذیری افزایش می یابد (۱). در مطالعه دیگر رابطه سیگموئیدی بین مساحت سطح قطبی (PSA) و فراکسیون دوز جذب شده در انسان برای بیست دارو گزارش شده است (۵). لیکن مطالعه در مورد طیف وسیعتری از داروها (بیشتر ار صد دارو) ارتباط ضعیفتری بین این دو پارامتر نشان داده است (۶۴). در مطالعه ای که توسط نویسنده و همکاران وی صورت گرفته است، ارتباط بین خصوصیات مختلف مولکولی از جمله وزن مولکولی، تعداد جایگاههای دهنده و پذیرنده باند هیدروژنی، ضریب توزیع روغن در آب، مساحت سطح قطبی و تعداد باندهای قابل چرخش با

Archive of SID

www.SID.ir

نفوذپذیری گوارشی و فراکسیون دوز جذبی داروها مورد بررسی قرار گرفته است (۶۵). بطور کلی روشهای مختلفی برای غربالگری داروها بروش in silico وجود دارد. شناخته شده ترین روشها، قانون ۵ لیپینسکی و همکارانش می باشد (۶۶). این قانون برای ترکیباتی که حداقل دو مورد از موارد زیر را شامل می شوند، جذب ضعیفی پیشنهاد می کند. این موارد عبارتند از: وزن مولکولی بالای ۵۰۰ گرم بر مول، پذیرنده باند هیدروژنی بیش از ۱۰، دهنده باند هیدروژنی بیش از ۱۰ و Log P بزرگتر از ۵. این قانون توسط Clark و Grootenhuis (۶۷) بدین صورت اصلاح گردیده است که چنانکه PSA بالاتر از ۱۴۰ آنگستروم مربع داشته باشد و حداقل دو مورد از ویژگیهای زیر را داشته باشد، از پتانسیل جذبی ضعیفی برخوردار خواهد بود. این موارد عبارتند از: وزن مولکولی بالای ۵۵۰ گرم بر مول، پذیرنده باند هیدروژنی بیش از ۱۲، دهنده باند هیدروژنی بیش از ۵ و Log P بزرگتر از ۶/۲. امروزه تلاش زیادی توسط محققین برای ارایه بسته های نرم افزاری که قادر به پیش بینی جذب درون تن داروها باشند، صورت می گیرد، لیکن نکته مهم در این مورد عدم وجود داده های قابل اعتماد برای پایه گذاری این مدلهاست. بعبارتی دیگر تا زمانیکه داده های قابل اعتماد و متنوع برای راه اندازی این مدلها در دسترس نباشد، کارایی آنها صرفا" برای ترکیباتی خواهد بود که تشابه زیادی با داروهای سری اول (training set) داشته باشد.

۲- نتیجه گیری

متدهای غیر انسانی توضیح داده شده در این مقاله می توانند بعنوان روشهای جایگزین در ارزیابی نفوذپذیری و جذب درون تن داروها مورد استفاده قرار گیرند. استفاده منطقی از این متدها باعث صرفه جویی در هزینه و وقت در غربالگری داروها بمنظور طراحی و ساخت داروهای جدید می گردد.

References:

1. Fagerholm U., Prediction of human pharmacokinetics-gastrointestinal absorption, J. Pharm. Pharmacol., 2007, 59(7): 905-16.
2. Rinaki E., Valsami G., Macheras P. Quantitative Biopharmaceutics classification system: The central role of dose/solubility ratio, Pharm. Res., 2003, 20(12): 1917-1925.
3. Fagerholm U., Lindahl A., Lennernas H. Regional intestinal permeability in rats of compounds with different physicochemical properties and transport mechanisms, J. Pharm. Pharmacol., 1997, 49(7): 687-90.
4. Lipinski C. A., Drug-like properties and the causes of poor solubility and poor permeability, J. Pharmacol. Toxicol. Methods, 2000, 44(1): 235-49.
5. Palm K., Stenberg P., Luthman K., Artursson P., Polar molecular surface properties predict the intestinal absorption of drugs in humans, Pharm. Res., 1997, 14: 568-571.
6. Lennernas H., Human intestinal permeability, J. Pharm. Sci., 1998, 87: 403-410.
7. Amidon G. L., Lennernas H., Shah V. P., Crison J. R. A theoretical basis for a biopharmaceutic drug classification: the correlation of in vitro drug product dissolution and in vivo bioavailability, Pharm. Res., 1995, 12(3): 413-20.
8. Lennernas H., Lee I. D., Fagerholm D., Amidon G. L., residence-time distribution analysis of the hydrodynamics within the intestine in man during a regional single-pass perfusion with Loc-I-Gut: in-vivo permeability estimation, J. Pharm. Pharmacol., 1997, 49: 682-686.
9. Knutson T., Fridblom P., Ahlstrom H., Magnusson A., Tannergren C., Lennernas H. Increased Understanding of Intestinal Drug Permeability Determined by the LOC-I-GUT Approach Using Multislice Computed Tomography, Mol. Pharm., 2009 Jan 14, in press.
10. Teshima C. W. and Meddings J. B. The measurement and clinical significance of intestinal permeability, Curr. Gastroenterol. Rep., 2008, 10(5): 443-9.
11. Ewe K. and Summerskill W. H. Transfer of Ammonia in the Human Jejunum, J. Lab. Clin. Med., 1965, 65: 839-47.
12. Gramatte T., Oertel R., Terhaag B., Kirch W. Direct demonstration of small intestinal Secretion and site-dependent absorption of the beta-blocker talinolol in humans, Clin. Pharmacol. Ther., 1996, 59(5): 541-9.
13. Gramatte T., El Desoky E., and Klotz U., Site-dependent small intestinal absorption of ranitidine, Eur. J. Clin. Pharmacol., 1994, 46(3): 253-9.
14. Raab Y., Sundberg C., Hallgren R., Knutson L., Gerdin B. Mucosal synthesis and release of prostaglandin E2 from activated eosinophils and macrophages in ulcerative colitis, Am. J. Gastroenterol., 1995, 90(4): 614-20.
15. Lennernas H., Fagerholm U., Raab Y., Gerdin B., Hallgren R. Regional rectal perfusion: a new in vivo approach to study rectal drug absorption in man, Pharm. Res., 1995, 12(3): 426-32.
16. Lennernas H., Nylander S., Ungell A. L. Jejunal permeability: a comparison between the ussing chamber technique and

Archive of SID

www.SID.ir

the single-pass perfusion in humans, Pharm. Res., 1997, 14(5): 667-71.
17. Fagerholm U., Johansson M., Lennernas H. Comparison between permeability coefficients in rat and human jejunum, Pharm. Res., 1996, 13(9): 1336-42.
18. Fagerholm U., Borgstrom L., Ahrenstedt O., Lennernas H. The lack of effect of induced net fluid absorption on the in vivo permeability of terbutaline in the human jejunum, J. Drug Target, 1995, 3(3): 191-200.
19. Chiu Y. Y., Higaki K., Neudeck B. L., Barnett J. L., Welage L. S., Amidon G. L. Human jejunal permeability of cyclosporin A: influence of surfactants on P-glycoprotein efflux in Caco-2 cells, Pharm. Res., 2003, 20(5): 749-56.
20. Stewart B. H., Chan O. H., Lu R. H., Reyner E. L., Schmid H. L., Hamilton H. W., Steinbaugh B. A., Taylor M. D. Comparison of intestinal permeabilities determined in multiple in vitro and in situ models: relationship to absorption in humans, Pharm. Res., 1995, 12(5): 693-9.
21. Stewart B. H., Chan O. H., Jezyk N., Fleisher D. Discrimination between drug candidates using models for evaluation of intestinal absorption, Adv. Drug Del. Rev., 1997, 23: 27-45.
22. Mummaneni V., Dressman J. B. Intestinal uptake of cimetidine and ranitidine in rats, Pharm. Res., 1994, 11(11): 1599-604.
23. Meadows K. C., Dressman J. B. Mechanism of acyclovir uptake in rat jejunum, Pharm. Res., 1990, 7(3): 299-303.
24. Fleisher D., Sheth N., Griffin H., Mcfadden M., Aspacher G. Nutrient influences on rat intestinal phenytoin uptake, Pharm. Res., 1989, 6(4): 332-7.
25. Stewart B. H., Amidon G. L., Brabec R. K. Uptake of prodrugs by rat intestinal mucosal cells: mechanism and pharmaceutical implications, J. Pharm. Sci., 1986, 75(10): 940-5.
26. Osiecka I., Cortese M., Porter P. A., Borchardt R. T., Fix J. A., Gardner C. R. Intestinal absorption of alpha-methyldopa: in vitro mechanistic studies in rat small intestinal segments, J. Pharmacol. Exp. Ther., 1987, 242(2): 443-9.
27. Stewart B. H., Kugler A. R., Thompson P. R., Bockbrader H. N. A saturable transport mechanism in the intestinal absorption of gabapentin is the underlying cause of the lack of proportionality between increasing dose and drug levels in plasma, Pharm. Res., 1993, 10(2): 276-81.
28. Kim J. S, Oberle R. L., Krummel D. A., Dressman J. B., Fleisher D. Absorption of ACE inhibitors from small intestine and colon. J Pharm Sci. 1994, 83(9): 1350-6.
29. Leppert P. S. and Fix J. A., Use of everted intestinal rings for in vitro examination of oral absorption potential, J. Pharm. Sci., 1994, 83(7): 976-81.
30. Wilson T. H., Wiseman G. The use of sacs of everted small intestine for the study of the transference of substances from the mucosal to the serosal surface, J. Physiol., 1954, 123: 116-125.
31. Bohets H., Annaert P., Mannens G., Beijsterveldt L., Anciaux K., Verboven P., Meuldermans W., Lavrijsen K. Strategies for Absorption Screening in Drug Discovery and Development, Current Topics in Medicinal Chemistry, 2001, 1: 367-383.
32. Bouer R., Barthe L., Philibert C., Tournaire C., Woodley J., Houin G. The roles of P-glycoprotein and intracellular metabolism in the intestinal absorption of methadone: in vitro studies using the rat everted intestinal sac, Fundam. Clin. Pharmacol., 1999, 13(4): 494-500.
33. Yuasa H., Matsuda K., Watanabe J. Influence of anaesthetic regimens on intestinal absorption in rats, Pharm. Res., 1993, 10(6): 884-888.
34. Zakeri-Milani P., Valizadeh H., Tajerzadeh H., Azarmi Y., Islambolchilar Z., Barzegar S., Barzegar-Jalali M. Predicting human intestinal permeability using single-pass intestinal perfusion in rat, J. Pharm. Pharm. Sci., 2007, 10(3): 368-79.
35. Zakeri-Milani P., Valizadeh H., Yadollah Azarmi Y., Barzegar Jalali M., Tajerzadeh H. Simultaneous determination of metoprolol, propranolol and phenol red in samples from rat in situ intestinal perfusion studies, DARU, 2006, 14(2): 102-108.
36. Zakeri-Milani P., Barzegar-Jalali M., Tajerzadeh H., Azarmi Y., Valizadeh H. Simultaneous determination of naproxen, ketoprofen and phenol red in samples from rat intestinal permeability studies: HPLC method development and validation, J. Pharm. Biomed. Anal., 2005, 39(3-4): 624-30.
37. Valizadeh H., Zakeri-Milani P., Islambulchilar Z., Tajerzadeh H. A simple and rapid high-performance liquid chromatography method for determining furosemide, hydrochlorothiazide, and phenol red: applicability to intestinal permeability studies,. J. AOAC Int., 2006, 89(1): 88-93.
38. Dahan A., Amidon G. L. Segmental dependent transport of low permeability compounds along the small intestine due to P-glycoprotein: the role of efflux transport in the oral absorption of BCS class III drugs, Mol. Pharm., 2009, 6(1): 19-28.
39. Zakeri-Milani P., Valizadeh H., Islambulchilar Z., Damani S., Mehtari M. Investigation of the intestinal permeability of ciclosporin using the in situ technique in rats and the relevance of P-glycoprotein, Arzneimittelforschung, 2008, 58(4): 188-92.
40. Zakeri-Milani P., Valizadeh H., Islambulchilar Z., Mehtari M., Damani S. Effect of erythromycin and clarithromycin on the intestinal transport of digoxin, Phamaceutical Sciences, Journal of faculty of pharmacy. 2009, In press.
41. Shirasaka Y., Masaoka Y., Kataoka M., Sakuma S., Yamashita S. Scaling of in vitro membrane permeability to predict P-glycoprotein-mediated drug absorption in vivo, Drug Metab. Dispos., 2008, 36(5): 916-22.

Archive of SID

www.SID.ir

42. Zakeri-Milani P., Valizadeh H., Tajerzadeh H., Islambolchilar Z. The utility of rat jejunal permeability values for biopharmaceutics classification system, Drug Dev. Ind. Pharm., submitted.
43. Zakeri-Milani P., Barzegar-Jalali M., Azimi M., Valizadeh H. Biopharmaceutical classification of drugs using intrinsic dissolution rate (IDR) and rat intestinal permeability. European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics. 2009, submitted.
44. Salphati L., Childers K., Pan L., Tsutsui K., Takahashi L. Evaluation of a single-pass intestinal-perfusion method in rat for the prediction of absorption in man, J. Pharm. Pharmacol., 2001, 53: 1007-1013.
45. Amidon G. L., Sinko P. J., Fleisher D. Estimating human oral fraction dose absorbed: A correlation using rat intestinal membrane permeability for passive and carrier-mediated compounds, Pharmaceutical Research, 1988, 5(10): 651-654.
46. Barthe L., Woodley J., Houin G. Gastrointestinal absorption of drugs: methods and studies. Fundam. Clin. Pharmacol., 1999, 13: 154-168.
47. Lakeram M., Lockley D. J., Sanders D. J., Pendlington R, Forbes B. Paraben transport and metabolism in the biomimetic artificial membrane permeability assay (BAMPA) and 3-day and 21-day Caco-2 cell systems, J. Biomol. Screen, 2007, 12(1): 84-91.
48. Artursson P., Karlsson J. Correlation between oral drug absorption in humans and apparent drug permeability coefficients in human intestinal epithelial (CACO-2) cells, Biochemical and Biophysical Research Communications, 1991, 175(3): 880-885.
49. 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.
50. Matsson P., Bergstrom C. A., Nagahara N., Tavelin S., Norinder U., Artursson P. Exploring the role of different drug transport routes in permeability screening, J. Med. Chem., 2005, 48(2): 604-13.
51. Zakeri-Milani P., Valizadeh H. The use of Caco-2 cell monolayers as a model to predict human intestinal permeability and drug absorption, Pharmaceutical Sciences (Tabriz Faculty of Pharmacy). 2006, winter: 71-77.
52. Hu M., Chen J., Tran D., Zhu Y., Leonardo G. The Caco-2 cell monolayers as an intestinal metabolism model: metabolism of dipeptide Phe-Pro, J. Drug Target, 1994, 2(1): 79-89.
53. Seithel A., Karlsson J., Hilgendorf C., Bjorquist A., Ungell A. L. Variability in mRNA expression of ABC- and SLC-transporters in human intestinal cells: comparison between human segments and Caco-2 cells, Eur. J. Pharm. Sci., 2006, 28(4): 291-9.
54. Rubas W., Cromwell M. E., Shahrokh Z., Villagran J., Nguyen T. N., Wellton M., Nguyen T. H., Mrsny R. J. Flux measurements across Caco-2 monolayers may predict transport in human large intestinal tissue, J. Pharm. Sci., 1996, 85(2): 165-9.
55. Raeissi S. D., Hidalgo I. J., Segura-Aguilar J., Artursson P. Interplay between CYP3A-mediated metabolism and polarized efflux of terfenadine and its metabolites in intestinal epithelial Caco-2 (TC7) cell monolayers, Pharm. Res., 1999, 16(5): 625-32.
56. Balimane P. V., Chong S. Cell culture-based models for intestinal permeability: a critique, Drug Discov. Today, 2005, 10(5): 335-43.
57. Irvine J. D., Takahashi L., Lockhart K., Cheong J., Tolan J. W., Selick H. E., Grove J. R. MDCK (Madin-Darby canine kidney) cells: A tool for membrane permeability screening, J. Pharm. Sci., 1999, 88(1): 28-33.
58. Gres M. C., Julian B., Bourrie M., Meunier V., Roques C., Berger M., Boulenc X., Berger Y., Fabre G. Correlation between oral drug absorption in humans, and apparent drug permeability in TC-7 cells, a human epithelial intestinal cell line: comparison with the parental Caco-2 cell line, Pharm. Res., 1998, 15(5): 726-33.
59. Tavelin S., Milovic V., Ocklind G., Olsson S., Artursson P. A conditionally immortalized epithelial cell line for studies of intestinal drug transport, J. Pharmacol. Exp. Ther., 1999, 290(3): 1212-21.
60. Tavelin S., Taipalensuu J., Soderberg L., Morrison R., Chong S., Artursson P., Prediction of the oral absorption of low-permeability drugs using small intestine-like 2/4/A1 cell monolayers, Pharm. Res., 2003, 20(3): 397-405.
61. Tavelin S., Taipalensuu J., Hallbook F., Vellonen K. S., Moore V., Artursson P. An improved cell culture model based on 2/4/A1 cell monolayers for studies of intestinal drug transport: characterization of transport routes, Pharm Res., 2003, 20(3): 373-81.
62. Shin B. S., Yoon C. H., Balthasar J. P., Choi B. Y., Hong S. H., Kim H. J., Lee J. B., Hwang S. W., Yoo S. D. Prediction of drug bioavailability in humans using immobilized artificial membrane phosphatidylcholine column chromatography and in vitro hepatic metabolic clearance, Biomed. Chromatogr., 2009 Jul;23(7):764-9.
63. Flaten G. E., Dhanikula A. B., Luthman K., Brandl M. Drug permeability across a phospholipid vesicle based barrier: a novel approach for studying passive diffusion, Eur. J. Pharm. Sci., 2006, 27(1): 80-90.
64. Willmann S., Schmitt W., Keldenich J., Lippert J., Dressman J. B. A physiological model for the estimation of the fraction dose absorbed in humans, J. Med. Chem., 2004, 47(16): 4022-31.
65. Zakeri-Milani P., Tajerzadeh H., Islambulchilar Z., Barzegar S., Valizadeh H. The relation between molecular properties of drugs and their transport

Archive of SID

www.SID.ir

across the intestinal membrane, DARU, 2006, 14(4): 164-171.
66. Lipinski C. A., Lombardo F., Dominy B. W., Feeney P. J. Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings, Adv. Drug Deliv. Rev., 2001, 46(1-3): 3-26.
67. Clark D. E., Grootenhuis P. D. Predicting passive transport in silico-history, hype, hope, Curr. Top Med. Chem., 2003, 3(11): 1193-203.

Archive of SID

www.SID.ir