

HELSINGIN YLIOPISTO - HELSINGFORS UNIVERSITET

Tiedekunta/Osasto - Fakultet/Sektion Matemaattis-luonnontieteellinen tiedekunta		Laitos - Institution Farmasian laitos	
Tekijä - Författare Vuoristo <u>Auli</u> Maarit Hannele			
Työn nimi - Arbetets titel Furosemidin kulkeutuminen Caco-2 soluviljelmän läpi: Kitosaanit imeytymisen edisteinä			
Oppiaine - Läroämne Biofarmasia			
Työn laji - Arbetets art Kokeellinen Pro gradu		Aika - Datum Elokuu 2000	
		Sivumäärä - Sidoantal 68 + 12 liitettä	
Tiivistelmä - Referat Tämän erikoistyön kokeellisen osion tavoitteena oli tutkia Caco-2 eläinsolumallin soveltuvuutta furosemidin imeytymisen mallintamiseen sekä mahdollisuutta edistää furosemidin kulkeutumista soluviljelmien läpi erilaisten kitosaanilaatujen avulla. Caco-2 soluviljelmät ovat ihmisen paksusuolen syövästä eristetty solulinja, jota käytetään yleisesti mallintamaan suolen epiteelisolukkoa. Furosemidin on todettu imeytyvän pääasiallisesti ruoansulatuskanavan alkuosista ja sen imeytyminen suoliston distaalisemmista osista on hyvin vähäistä. Kitosaaneilla on havaittu olevan sekä mukoadhesiivisia, että imeytymistä edistäviä ominaisuuksia. Näitä ominaisuuksia hyödyntäen saattaisi olla mahdollista valmistaa sellainen lääkevalmiste, joka vapauttaisi lääkeainetta säädellysti ruoansulatuskanavan alkuosista ja soveltuisi siten ruoansulatuskanavan loppuosista imeytymättömien lääkeaineiden valmistemuodoksi. Caco-2 soluilla havaittiin huomattava furosemidin kulkeutumisen nopeutuminen kitosaanien toimiessa imeytymisen edisteinä. Myös soluviljelmien integriteetin seuraamiseen käytetyn radioaktiivisen merkkiaineen [¹⁴ C]-mannitolin kulkeutuminen lisääntyi kitosaanien vaikutuksesta. Hydrofiilisen mannitolin kulkeutumisen lisääntymisen katsotaan olevan merkinä kasvaneesta tiiviiden liitosten läpäisevyydestä, sillä mannitoli kulkeutuu epiteelikerroksen läpi pääasiassa parasellulaarisesti. Furosemidin kulkeutumisen nopeutuminen tulkittiin siten myös lisääntyneeksi parasellulaariseksi kulkeutumiseksi tiiviiden liitosten aukeamisen seurauksena. Tutkimuksessa käytettiin neljää erilaista kitosaanilaatua verraten niiden vaikutuksia furosemidin kulkeutumiseen kitosaanien tärkeimpien ominaisuuksien; asetylaatioasteen, molekyylipainon sekä kiteisyysasteen kannalta. Matala asetylaatioaste oli 1-15% ja korkea 15-35%. Molekyylipainot luokiteltiin korkeisiin 120- kDa ja mataliin <120 kDa. Kiteisyysasteeltaan suuria olivat mikrokiteiset kitosaanit (MCCh) ja pieni muokkaamaton kitosaani (Ch). Kaikkien kitosaanilaatujen havaittiin edistävän furosemidin kulkeutumista Caco-2 soluviljelmässä. Kitosaanit kasvattivat furosemidin näennäisten permeabiliteettivakioiden (P _{app}) arvot keskimäärin 2,5 kertaisiksi. Voimakkain vaikutus havaittiin matalan asetylaatioasteen omaavalla mikrokiteisellä kitosaanilaadulla 10/120. Tämän MCCh havaittiin kuitenkin aiheuttavan pitkittyneen aleneman soluviljelmien sähköisessä vastuksessa (TEER -arvot) ja arveltiin olleen vaikutuksiltaan toksinen. Soveltuvimmaksi furosemidin-imeytymisen edisteeksi todettiin MCCh 26/150, jonka molekyylipaino sekä asetylaatioaste olivat korkeat. Tämä MCCh oli melko voimakas imeytymisen ediste, joka on todettu vaikutuksiltaan palautuvaksi sekä ei-toksiseksi. Matalamolekyylipainoisen MCCh havaittiin edistävän furosemidin kulkeutumista vain suurimmalla pitoisuudella, mutta aiheuttavan voimakkuudeltaan muiden MCCh kaltaisen vaikutuksen. Matalan molekyylipainon omaavan MCCh:n vaikutukset olivat palautuvia soluviljelmien sähköisen vastuksen kehittymistä mittaavassa reversiibeliyskokeessa ja solut olivat elinkykyisiä kokeiden jälkeen suoritettussa Trypan blue -värjäyksessä. Kitosaanien kiteisyysasteella todettiin, aikaisempaa tutkimusta tukien, olevan vaikutusta kitosaanin liukoisuuteen, sillä Ch liukeni huomattavasti MCCh huonommin pH:ssa 5,5. Muokkaamattoman kitosaanin furosemidin kulkeutumista edistävä vaikutus oli verraten voimakas ja sen käyttöä rajoittavaksi tekijäksi nimettiin huono liukoisuus. Furosemidin imeytymisen aktiiviselle tai passiiviselle mekanismille ei saatu vahvistusta + 4°C:ssa suoritetuissa kylmäkokeissa, sillä sekä hydrofiilisen merkkiaineen; mannitolin, että furosemidin kulkeutuminen vähentyi, eikä MCCh:n imeytymistä edistävää vaikutusta havaittu lainkaan. Kulkeutumisen vähentymisen arveltiin johtuneen yleisestä molekyylien hidastuneesta liikkeestä sekä tiiviiden liitosten toimintaan liittyvästä mahdollisesta aktiivisesta mekanismista, jonka toiminta vähentyy alhaisen lämpötilan aiheuttaman lämpöenergian vähenemisen seurauksena.			
Avainsanat - Nyckelord Furosemidi, kitosaani, Caco-2 solut, näennäinen permeabiliteettivakio, imeytymisen ediste			
Säilytyspaikka - Förvaringställe Farmasian laitos, biofarmasian ja farmakokinetiikan osasto			