

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO

ANA NAGODE

**VPLIVI EKSPERIMENTALNIH PARAMETROV NA *IN VITRO*
DOLOČANJE PERMEABILNOSTI MODELNIH SPOJIN SKOZI
UMETNI *PAMPA* MODEL KRVNO-MOŽGANSKE BARIERE**

**EFFECTS OF EXPERIMENTAL PARAMETERS ON *IN VITRO*
PERMEABILITY DETERMINATION OF MODEL COMPOUNDS
THROUGH AN ARTIFICIAL *PAMPA* MODEL OF THE BLOOD-BRAIN
BARRIER**

ENOVITI MAGISTRSKI ŠTUDIJ FARMACIJA

Ljubljana, 2018

Magistrsko nalogo sem opravljala na Katedri za biofarmacijo in farmakokinetiko Fakultete za farmacijo pod mentorstvom izr. prof. dr. Simona Žaklja in doc. dr. Marka Jukiča. Meritve UV-VIS spektroskopije so bile izvedene na Katedri za farmacevtsko kemijo Fakultete za farmacijo.

Zahvalila bi se svojim mentorjema za njuno pomoč pri izdelavi tega magistrskega dela. Za vso pomoč pri delu sem hvaležna tudi strokovni sodelavki Nevenki Lilik ter ostalim članom Katedre za biofarmacijo in farmakokinetiko.

Zahvala pa gre tudi izr. prof. dr. Igorju Locatelliju za pomoč pri statistični analizi.

Izjava:

Izjavljam, da sem magistrsko delo samostojno izdelala pod vodstvom mentorja izr. prof. dr. Simona Žaklja in somentorja doc. dr. Marka Jukiča.

Ana Nagode

Ljubljana, 2018

Predsednik magistrske komisije: prof. dr. Stanislav Gobec

Mentor: izr. prof. dr. Simon Žakelj

Somentor: doc. dr. Marko Jukič

Članica komisije: doc. dr. Tanja Gmeiner

VSEBINA

VSEBINA.....	ii
POVZETEK	iv
ABSTRACT	v
SEZNAM OKRAJŠAV	vi
1. UVOD.....	1
1.1. KRVNO-MOŽGANSKA BARIERA.....	1
1.2. PERMEABILNOST IN METODE DOLOČANJA PERMEABILNOSTNIH LASTNOSTI SPOJIN	3
1.3. TEST PERMEABILNOSTI S SISTEMOM VZPOREDNIH UMETNIH MEMBRAN – <i>PAMPA</i>	4
2. NAMEN DELA	8
3. MATERIALI IN METODE DELA.....	9
3.1. MATERIALI	9
3.1.1. Spojine.....	9
3.1.2. Paket spojin in pufrov pION.....	9
3.1.3. Ostale kemikalije	10
3.1.4. Pribor in aparature	10
3.2. METODE DELA	12
3.2.1. Raztopine.....	12
3.2.2. Priprava raztopin spojin.....	12
3.2.3. Priprava lipidov	14
3.2.4. Priprava akceptorskih pufrov	15
3.2.5. Izvedba poskusov <i>PAMPA</i>	16
3.2.6. Analiza vzorcev	21
UV-VIS spektroskopija	21

Tekočinska kromatografija visoke ločljivosti (HPLC).....	22
3.2.7. Obdelava rezultatov	26
4. REZULTATI IN RAZPRAVA	29
4.1. Prvi poskus.....	29
4.2. Drugi poskus	30
4.3. Tretji poskus	37
4.4. Četrty poskus	41
4.5. Primerjava analiznih metod	45
5. SKLEP	47
6. LITERATURA	48
7. PRILOGA.....	50

POVZETEK

V zgodnjih fazah razvoja novih učinkovin je pomembno določiti permeabilnostne lastnosti kandidatnih spojin, saj je nezadosten prehod skozi krvno-možgansko bariero glavni razlog za njihov neuspeh v predkliničnih in kliničnih testiranjih. V zgodnji fazi odkrivanja učinkovin je potrebno testirati veliko število spojin, za kar pa metode *in vivo* niso primerne, zato so se razvile številne metode z večjo zmogljivostjo. Ena izmed takšnih metod je *PAMPA*, metoda *in vitro* visoke zmogljivosti, ki temelji na nebiološki membrani, ki posnema biološko bariero. Namen naše magistrske naloge je bil preučiti vpliv nekaterih ključnih eksperimentalnih parametrov *PAMPA* modela. Najprej smo na širšem naboru modelnih spojin preverili ustreznost na novo uvedenih metod, nato pa smo uvedli in ovrednotili naše različice sistema. Rezultati naših eksperimentov so pokazali, da naš model pravilno klasificira modelne spojine kot dobro ali slabo permeabilne, pokazale pa so se tudi razlike med dvema komercialnima sistemoma (pION in Corning-Gentest), ki so najverjetneje posledica razlik v eksperimentalnih pogojih. Največji del magistrske naloge je posvečen vplivu različnih sestav lipidnih membran in akceptorskih raztopin na klasifikacijo permeabilnosti spojin. Izkazalo se je, da razlike med lipidi so, vendar so le-te majhne in nimajo bistvenega vpliva na določanje permeabilnostnih lastnosti spojin iz vidika klasifikacije na dobro in slabo permeabilne. Podobno smo ugotovili le majhen in nesignifikanten vpliv testiranih sprememb akceptorske raztopine. Pri testiranju novih akceptorskih raztopin je bilo v primerjavi z rezultati, pridobljenimi pri uporabi komercialno dostopnega akceptorskega pufra, opazno le zmerno zmanjšanje razlik med permeabilnostnimi koeficienti dobro in slabo permeabilnih spojin. To zmanjšanje razlik samo ne ovira pravilne klasifikacije, v kombinaciji z morebitnimi drugimi dejavniki pa bi bila potrebna previdnost. Pri medsebojni primerjavi rezultatov, pridobljenih z UV-VIS spektroskopijo in tekočinsko kromatografijo visoke ločljivosti smo ugotovili, da z metodama pridobimo uporabne ter primerljive rezultate pri analizi vzorcev po končani inkubaciji sistema *PAMPA*. Ker pa je analiza z UV-VIS spektroskopijo hitrejša in enostavnejša, je ta primernejša za rutinsko uporabo.

Ključne besede

permeabilnost, krvno-možganska bariera, *PAMPA*, lipidi, akceptorske raztopine

ABSTRACT

In the early stages of drug development, it is important to determine the permeability of compounds, because the main reason for attrition of drug candidates in preclinical and clinical stages is permeability across blood-brain barrier. Early drug discovery necessitates screening of large compound libraries for which *in vivo* methods are unsuitable. Therefore, other high-throughput methods have been developed. One such method is *PAMPA* – parallel artificial membrane permeability assay, an *in vitro* high-throughput method based on a non-biological membrane system imitating biological barriers. The focus of this work was to examine the influence of key parameters in *PAMPA* experimental model. First, we tested the suitability of newly implemented methods on a range of model compounds and then we introduced and evaluated an “in-house” variation of the system. Based on results from our experiments, we were always able to correctly identify the model compounds as permeable or non-permeable. Results have also shown some differences between two different commercial systems (pION and Corning-Gentest), which are most likely due to differences in experimental conditions. The main part of our work was aimed at investigating the influence of various lipid membrane compositions and acceptor solutions on permeability classification. Differences between lipids are present but are negligible. Similarly, there are also small but not significant differences between acceptor solutions we tested. However, the use of tested novel acceptor solutions resulted in reduced differences between permeability coefficients of compounds with high and low permeability compared with those obtained with a commercial acceptor buffer used as a reference. This reduction does not affect classification of compounds, but further changes to the model should be implemented with caution. When comparing the results obtained with UV-VIS spectroscopy and HPLC, we found that comparable results are obtained with the two methods. However, the analysis with UV-VIS spectroscopy is faster and simpler and therefore more suitable for routine use.

Key words

permeability, blood-brain barrier, *PAMPA*, lipids, acceptor solutions

SEZNAM OKRAJŠAV

- ABC – ATP-vezavna kasetna (*ang.* ATP-binding cassette)
- AR – akceptorska raztopina
- ATP – adenzin trifosfat
- BBB – krvno-možganska pregrada (*ang.* blood-brain barrier)
- C_A – koncentracija spojine v akceptorski raztopini
- C_D – koncentracija spojine v donorski raztopini
- CŽS – centralni živčni sistem
- CŽS⁻ – spojina, ki slabo prehaja v CŽS
- CŽS⁺ – spojina, ki dobro prehaja v CŽS
- DES – desipramin*
- DMSO – dimetilsulfoksid
- DR – donorska raztopina
- DZP – diazepam*
- EC – endotelijska celica
- FUR – furosemid*
- GIT – gastrointestinalni trakt
- HAL – haloperidol*
- HEB – krvno-možganska (hematoencefalna) bariera
- HPLC – tekočinska kromatografija visoke ločljivosti
- IAM – imobilizirana umetna membrana (*ang.* immobilised artificial membrane)
- IND – indometacin*
- KBZ – karbamazepin*
- KND – kinidin*
- LC-MS/MS – tekočinska kromatografija, sklopljena z masnim spektrometrom
- LDK – lidokain*
- LOP – loperamid*
- MDCK – Madin-Darby pasje celice ledvic (*ang.* Madin-Darby canine kidney)
- MDR1 – P-glikoprotein (*ang.* multidrug resistance protein 1)
- MF – mobilna faza
- OR – osnovna raztopina

PAMPA – test permeabilnosti s sistemom vzporednih umetnih membran (*ang.* parallel artificial membrane permeability assay)

PAS – površinsko aktivna snov

PBL – prašičji možganski lipidi (*ang.* porcine brain lipid)

PBS – fosfatni pufer s soljo (NaCl) (*ang.* phosphate-buffered saline)

P_e – efektivni permeabilnostni koeficient ($-\log P_e$ – negativni logaritem efektivnega permeabilnostnega koeficienta)

PKS – piroksikam*

PRO – propranolol*

QSAR – kvantitativno razmerje med strukturo in delovanjem (*ang.* quantitative structure–activity relationship)

RSD – koeficient variacije

RSP – risperidon*

SLZ – sulfasalazin*

SLS – natrijev lavril sulfat

SRT – sertralin*

SUM – suatriptan*

TEO – teofilin*

TRF – terfenadin*

UV-VIS – ultravijolično vidno (*ang.* ultraviolet–visible)

VRP – verapamil*

* okrajšave uporabljene le v preglednicah in grafih

1. UVOD

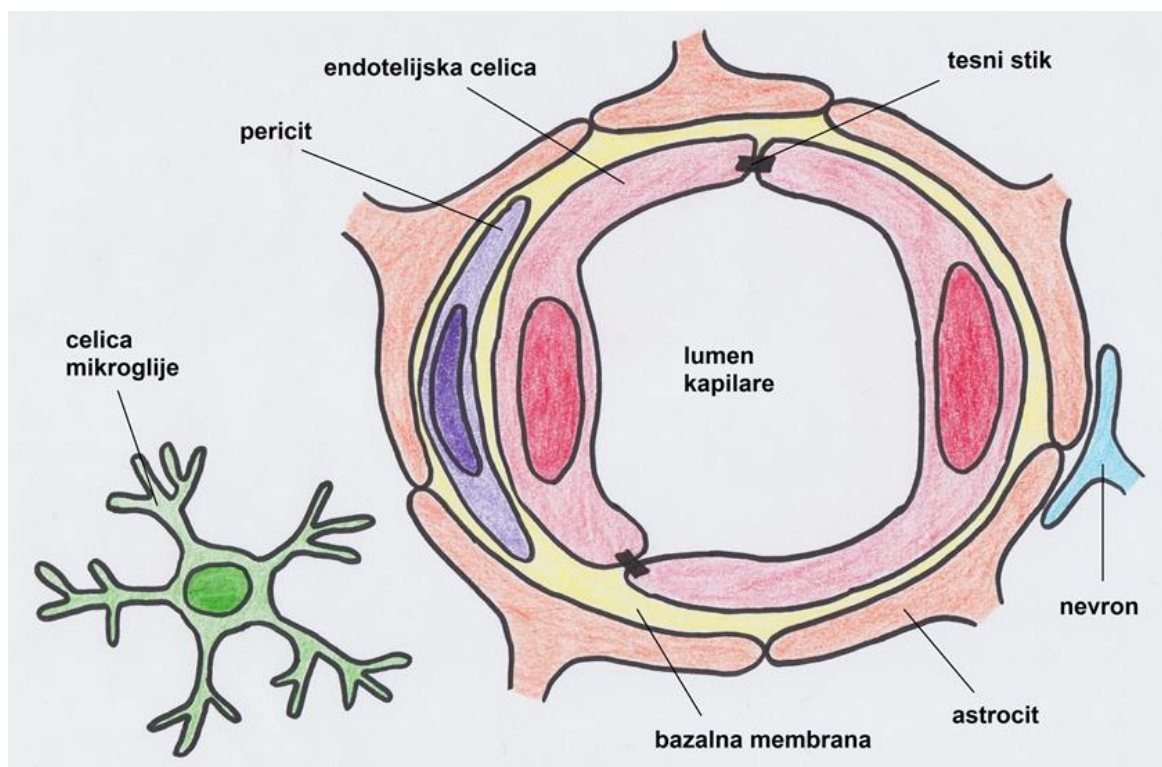
Z razvojem kombinatorne kemije se je število učinkovin kandidatk v začetni fazi razvoja močno povečalo. Kljub temu pa razvoj novih zdravilnih učinkovin z delovanjem v centralnem živčnem sistemu še vedno predstavlja izziv v farmaciji. Nevrološke motnje so kompleksne in patološki mehanizmi še niso popolnoma raziskani. Poleg tega je velik delež učinkovin kandidatk v fazi razvoja neuspešnih (1). Glavni razlog za neuspeh pa je oviran prehod spojin skozi krvno-možgansko pregrado (*ang.* blood-brain barrier) (2,3). Zato se je pojavila potreba po razvoju visoko zmogljivih metod, ki omogočajo enostavno in hitro preverjanje permeabilnosti krvno-možganske pregrade za nove učinkovine (2). Tako je možno že v zgodnjih fazah razvoja izločiti neprimerne učinkovine kandidatke. Permeabilnost krvno-možganske pregrade pa ni pomembna le za zdravilne učinkovine, ki delujejo v CŽS, temveč tudi za zdravilne učinkovine, ki imajo svoje tarče na periferiji, saj lahko njihovo prehajanje v CŽS povzroči neželene učinke terapije (4,5,6).

1.1. KRVNO-MOŽGANSKA BARIERA

Krvno-možganska ali hematoencefalna bariera (HEB) skrbi za ohranjanje homeostaze v CŽS, ki je zelo pomembna za njegovo pravilno delovanje (7). S svojo kompleksno zgradbo skrbi za nadzorovano izmenjavo snovi med krvnim obtokom in možgani ter tako preprečuje vstop mnogim spojinam, tudi zdravilnim učinkovinam (3,8).

Osnova HEB so **endotelijske celice** (EC) možganskih kapilar (2,6). Te tvorijo tanek monosloj, ki je na luminalni strani prekrit s slojem glikoproteinov, proteoglikanov in glikozaminoglikanov, imenovanim glikokaliks, na abluminalni strani pa z bazalno membrano (1). V bazalni membrani se nahajajo **periciti**, celice, ki so del strukturne podpore mikrokapilar in sodelujejo pri regulaciji angiogeneze in mikrocirkulacije (1,3,7). Znano je, da izguba pericitov vodi v abnormalno žilno morfogenezo, hiperplazijo endotelija in povečano permeabilnost HEB (3). Možganske žile obdajajo **astrociti**, celice nevroglije, ki igrajo pomembno vlogo pri razvoju tesnih stikov ter vzdrževanju homeostaze zunajceličnih koncentracij transmiterjev, metabolitov, ionov in vode (1,3,7). V okolici žil se nahajajo celice **mikroglije**, makrofagi, ki nadzirajo prirojen in pridobljen imunski odziv v možganih (3). Aktivirana mikroglija lahko izloča vnetne citokine in lahko vpliva na permeabilnost HEB. V stiku s kapilarami pa so tudi živčni končiči možganskih **nevronov**

(1). Skupaj z **zunajceličnim matriksom** zgoraj omenjene celice tvorijo **neurovaskularno enoto** (slika 1) (1,3,7).



Slika 1: Shema krvno-možganske bariere – neurovaskularna enota.

Možganski endotelij se v zgradbi razlikuje od endotelija običajnih kapilar, kar se odraža v slabši prepustnosti za spojine. Na periferiji je endotelij fenestriran – ima pore, ki omogočajo izmenjavo snovi med krvjo in tkivi, možganski endotelij teh por nima (3). Med EC možganskih žil so tesni stiki, ki jih tvorijo transmembranski proteini (3,7). Ti omejujejo paracelularno prehajanje molekul, zato prevladuje transcelularni način prehoda molekul (2,5,6). Možen je prehod s pasivno difuzijo (npr. kisik, ogljikov dioksid in drugi plini ter lipofilne spojine), s transcitozo (npr. proteini) ali s prenašalci (npr. glukoza, aminokisljine) (3,6,9). Možganski endotelij je bogat s prenašalci, ki lahko delujejo v smeri absorpcije ali pa v smeri eliminacije spojin iz CŽS (4). Na apikalni oz. luminalni membrani so izraženi eliminatorni prenašalci, ki črpajo toksine, lipofilne spojine in druge ksenobiotike iz celic (1,3). Med njimi prevladujejo prenašalci iz družine ABC (*ang.* ATP-binding cassette). Gre za aktivne membranske črpalke, ki za svoje delovanje porabljajo energijo, pridobljeno s hidrolizo ATP (1,3,7). Najbolj raziskan je P-glikoprotein (*ang.* multidrug resistance protein 1 – MDR1), ki ima širok spekter substratov, med drugim številne strukturno raznolike učinkovine iz različnih farmakoloških skupin. Izraženi pa so

tudi drugi prenašalci. V možganskih EC je veliko tudi število mitohondrijev in posledično visoka presnovna aktivnost. Bolj kot v ne-možganskih kapilarah je izražen specifičen nabor encimov, kot so alkalna fosfataza, γ -glutamil transpeptidaza, aromatska dekarboksilaza in številni citokromi P450, ki presnavljajo številne ksenobiotike. Možganske EC se razlikujejo od drugih celic tudi po bolj negativno nabiti membrani, zato je naboj molekule pomemben faktor permeabilnosti spojin (3). Vse te razlike pa omejujejo prepustnost HEB za ksenobiotike.

1.2. PERMEABILNOST IN METODE DOLOČANJA PERMEABILNOSTNIH LASTNOSTI SPOJIN

Za doseg terapijskega učinka mora učinkovina priti na mesto svoje farmakološke tarče v dovolj visoki koncentraciji in se tam tudi dovolj dolgo zadržati. Pri tem pa mora učinkovina preiti številne biološke membrane.

Permeabilnost je lastnost membrane, ki ločuje dve raztopini, da omogoča prehod topljenca iz ene v drugo raztopino, vendar se lahko izraz permeabilnost nanaša tudi na permeabilnostni koeficient spojine za določeno membrano. Permeabilnostni koeficient (P_e) lahko definiramo kot množino topljenca (mol), ki difundira skozi površino membrane (cm^2) v določenem času (s) pod vplivom gradienta koncentracij (mol/cm^3) in ima enoto cm/s (1). Spojine z visokimi permeabilnostnimi koeficienti prehajajo skozi membrane boljše kot spojine z nizkimi permeabilnostnimi koeficienti.

Obstajajo različne metode za določanje permeabilnosti spojin skozi biološke membrane. Tako je bilo razvitih tudi več metod za opredelitev ali presajanje spojin glede na njihovo prehajanje skozi HEB. Metode *in vivo* in *in situ* se izvajajo na glodalcih (pogosto na podganah) in dajejo najbolj zanesljive podatke za vrednotenje prehajanja spojin v možgane, ki se uporabljajo tudi za validacijo drugih metod. Ključna prednost metod *in vivo* je, da omogočajo tudi vrednotenje vpliva aktivnega transporta na prehod HEB, vendar so pri nekaterih metodah prisotni tudi drugi dejavniki, ki vplivajo na porazdelitev spojine, npr. presnova in vezava na plazemske beljakovine (3, 9). Pridobljeni rezultati tako niso nujno samo odraz permeabilnosti (9). Poleg tega so časovno potratne, delovno intenzivne in drage, zato niso neprimerne za reševanje visoke zmogljivosti v zgodnjih fazah odkrivanja in se tako uporabljajo v kasnejših fazah razvoja (3,9).

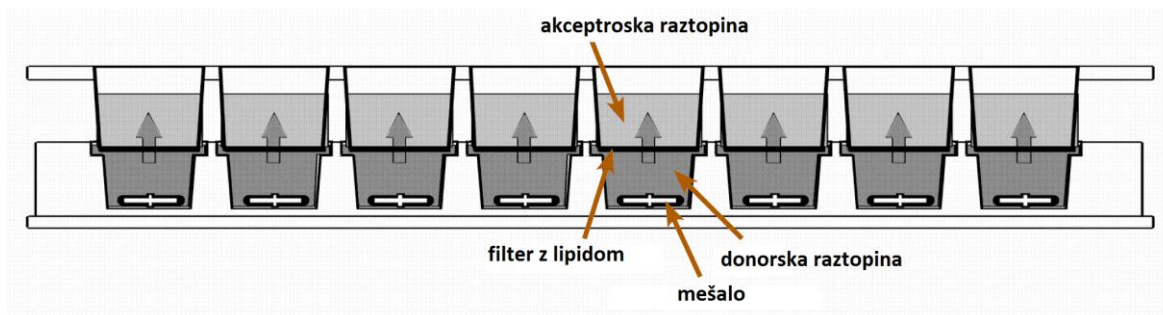
Metode *in vitro* lahko delimo na celične in ne-celične. Celične metode se izvajajo na mikrotitrskih ploščah, kjer sta donorska in akceptorska stran ločeni s filtrom, na katerem se nahaja celična kultura v obliki plasti med seboj povezanih celic (3). V uporabi so različne celične kulture, možganskega izvora (npr. iz možganskih kapilar) in ne-možganskega izvora (npr. MDCK – *ang.* Madin-Darby canine kidney), ki so lahko primarne celične linije ali pa nesmrtnne celične linije (2,3). Tudi celične metode nam podajo poleg podatkov o pasivnem transportu tudi podatke o aktivnem transportu, izraženost prenašalcev pa se v celičnih kulturah lahko razlikuje od izraženosti prenašalcev *in vivo* (3,6,8). Ker celice niso izpostavljene fiziološkim pogojem, se lahko spremeni tudi izraženost določenih ligandov in encimov (3). V primerjavi z metodami *in vivo* so celične metode *in vitro* cenejše in bolj zmogljive, a ker je gojenje celičnih kultur zahtevno, so še vedno časovno potratne, zahtevne za izvedbo in (pre)nizko zmogljive ter se prav tako uporabljajo v kasnejših fazah odkrivanja (2,3). Primer ne-celične metode *in vitro* so kolone HPLC, ki posnemajo lastnosti bioloških membran (IAM – *ang.* immobilised artificial membrane), ki prav tako niso primerne za reševanje visoke zmogljivosti in tako se njihova uporaba ni uveljavila (8,9).

Z izgradnjo knjižnic spojin, ki so aktivne v CZS, so se razvile tudi metode *in silico*, ki na podlagi kvantitativnega odnosa med strukturo spojine in njenim delovanjem (QSAR – *ang.* quantitative structure–activity relationship) napovejo permeabilnostne lastnosti spojine. Problem metod *in silico* je predvsem pomanjkanje eksperimentalnih podatkov *in vivo* ter napovedna moč iz domene postavljenega modela *in silico* (9).

1.3. TEST PERMEABILNOSTI S SISTEMOM VZPOREDNIH UMETNIH MEMBRAN – PAMPA

Test permeabilnosti s sistemom vzporednih umetnih membran (*ang.* **parallel artificial membrane permeability assay – PAMPA**) je metoda *in vitro* visoke zmogljivosti za določanje absorpcije spojin s transcelularno pasivno difuzijo (3). Test je sestavljen iz dveh mikrotitrskih plošč, zgornje in spodnje plošče. Zgornja plošča se od spodnje razlikuje v tem, da ima na dnu vdolbinic filter. Na ta filter se nanese lipid, ki posnema nekatere lastnosti biološke bariere. Na eno ploščo se nanese donorske raztopine spojin na drugo pa akceptorske raztopine glede na prehod preiskovanega topljenca. Po nanosu raztopin se

plošči združi v t.i. 'sendvič', ki omogoči stik donorske raztopine z akceptorsko preko samega filtra (slika 2).



Slika 2: Shema sendviča PAMPA (11).

Med inkubacijo spojina difundira skozi lipidno membrano iz donorske celice v akceptorsko. Po končani inkubaciji se spojino kvantificira in določi efektivni permeabilnostni koeficient (P_e) (3). Možna je tudi izvedba z mešanjem, v tem primeru se v vdolbinice dodajo mešala. Na ta način se zmanjša vpliv nepremičnega sloja vode, ki predstavlja dodatno oviro pri difuziji spojin skozi membrane (10).

PAMPA je bila prvotno razvita kot metoda za napovedovanje absorpcije iz gastrointestinalnega trakta (GIT) (3,12). Kasneje pa so se razvili tudi modeli za napovedovanje permeabilnosti skozi HEB in kože (8). Prvi *PAMPA-HEB* model je razvil Di s sodelavci, uporabili pa so prašičje možganske lipide (PBL – *ang.* porcine brain lipid) raztopljene v dodekanu, ki so posnemali HEB (6). V primerjavi z modelom, ki je vseboval fosfatidilholin v dodekanu, je *PAMPA-HEB* model bolje klasificiral spojine med CŽS+ in CŽS– (manj lažno negativnih določitev). Pri primerjavi eksperimentalnih rezultatov s podatki iz literature so odkrili primere lažno pozitivnih in lažno negativnih določitev permeabilnosti, ki so posledica aktivnih procesov, teh pa *PAMPA* ne vključuje. Do lažno negativnih določitev je prišlo v primerih spojin, ki so substrati za absorptivne prenašalce. Lažno pozitivni rezultati pa so se pojavili pri spojinah, ki so substrati eliminatornih prenašalcev ali pa so presnovno nestabilne (6).

Med razvojem metode so raziskovalci testirali številne eksperimentalne pogoje. Raziskovali so vpliv sestave lipida, predvsem uporabo različnih organskih topil in razmerja med lipidom in topilom. Ker je za povečanje zmogljivosti metode pomemben čas izvedbe testa, so preverili tudi vpliv časa inkubacije ter v povezavi z njim tudi vpliv mešanja (3).

Večina študij je bilo izvedenih z donorskimi in akceptorskimi pufri s fiziološko vrednostjo pH (7,4), ki so se razlikovali po sestavi (npr. dodano sotopilo ali PAS) (3). Sotopilo poveča topnost učinkovine in preprečuje obarjanje spojine, z dodatkom PAS v akceptorskem pufri pa se ustvari koncentracijski gradient in izniči vpliv koncentracije spojine v akceptorski celici na difuzijo skozi lipidno membrano. Vendar pa so sotopila v glavnem hlapne spojine, kar otežuje ohranjanje stalne koncentracije spojine v raztopini. Poleg tega lahko sotopilo tudi poškoduje plastične plošče in posledično spremeni rezultate ali pa vpliva na analizo vzorcev (npr. DMSO, ki omejuje UV detekcijo). Pri uporabi sotopil in PAS pa je ključna in zelo potrebna pazljivost, ker lahko PAS poškodujejo lipidno membrano, npr. DMSO lahko poveča permeabilnost lipidnih membran in tako spremeni rezultate (8).

Tako kvantitativna in kvalitativna sestava lipidne zmesi kot tudi volumen membrane vplivajo na permeabilnost testnih spojin. Z uporabo za HEB specifičnih fosfolipidov model bolje posnema interakcije spojine s HEB. Pomemben vpliv pa ima sestava topila, v katerem je lipid raztopljen. Pri uporabi samega dodekana ima tak model zmerno napovedno moč, pri samem heksanu pa barierna funkcija membrane izgine (8). Veliko boljše rezultate dajejo modeli, v katerih je uporabljena zmes heksana in dodekana. Ker je heksan hlapen, po nanosu lipidne zmesi izhlapi, nastala membrana pa je tanjša in ima spremenjene permeabilnostne lastnosti (8). Rezultati študije, ki je raziskovala vpliv topila in fosfolipidov na permeabilnost pri metodi *PAMPA*, nakazujejo, da je pri uporabi PBL, raztopljenem v samem dodekanu (20mg PBL/mL), permeabilnost odvisna predvsem od dodekana in ne fosfolipidov, vsaj pri spojinah z nizko ali visoko permeabilnostjo (4). Pri mejnih spojinah (spojine z zmerno permeabilnostjo – amprenavir in nalbufin) pa ima razmerje med količino dodekana in lipida v lipidni zmesi večji vpliv in lahko spremeni določitev permeabilnosti – npr. pri uporabi zmesi topila 1:1 dodekan:heksan so bile nekatere testirane spojine pravilno razvrščene kot CŽS+, pri uporabi samega dodekana v topilu pa so bile razvrščene med CŽS– spojine (4). Dodatek holesterola v lipidno zmes s samim dodekanom poveča napovedno vrednost modela medtem, ko pri modelih z zmesjo heksana in dodekana holesterol ni imel večjega vpliva (4).

Inkubacijski časi se gibljejo v razponu 1-24 ur (3). Za skrajšanje časa inkubacije se običajno uporablja mešanje, inkubacijski čas tako traja 1-2 uri (2,3). Z mešanjem se stanjša nepremični sloj vode ob lipidni membrani, ki še dodatno ovira difuzijo spojine skozi membrano. Vendar pa je lahko tudi brez mešanja čas inkubacije krajši, pri preučevanju

vpliva inkubacijskega časa se je izkazalo, da po 5 urah inkubacije ni razlik v vrednostih permeabilnosti (3).

Na tržišču je na voljo tudi nekaj kompletov za izvedbo poskusov *PAMPA* različnih proizvajalcev (npr. pION in Corning-Gentest). Ti modeli so dobro raziskani, njihova uporaba pa se je med raziskovalci uveljavila. Problem komercialno dostopnih kompletov je njihova visoka cena, proizvajalci pa ne razkrivajo sestave posameznih komponent (npr. pufrov in lipidov), kar lahko otežuje interpretacijo rezultatov. Med proizvajalci se tudi delijo mnenja glede vpliva lipida na določanje permeabilnostnih lastnosti spojin. Nekateri so mnenja, da se z uporabo PBL doseže boljšo napovedno moč, medtem ko so drugi mnenja, da izbira lipida ni pomembna.

2. NAMEN DELA

Pri načrtovanju poskusov za določanje permeabilnosti spojin je pomembno dobro poznavanje modela, ki ga pri tem uporabljamo. Spremembe eksperimentalnih parametrov vplivajo na rezultate določanja permeabilnosti spojin, kar lahko zmanjša napovedno vrednost modela. Namen te magistrske naloge je raziskati vpliv variacij nekaterih parametrov na permeabilnost modelnih spojin. Na podlagi rezultatov našega dela bomo preverili primernost posameznih lipidnih zmesi in akceptorskih pufrov za uporabo v poskusih *PAMPA*. Tako bomo lahko v prihodnje v laboratorijsko delo vpeljali lasten *PAMPA* model, ki bo cenejši od uveljavljenih komercialnih modelov, hkrati pa bomo tudi poznali njegove lastnosti in sestavo.

V prvem delu želimo s poskusom na različno oblikovanih sistemih *PAMPA* iz plošč dveh različnih proizvajalcev – pION in Millipore, preveriti ustreznost naših metod dela. Naše rezultate bomo primerjali z referenčnimi vrednostmi proizvajalca, poleg tega pa bomo preverili tudi, če lahko na podlagi naših rezultatov modelne spojine pravilno klasificiramo glede na njihovo permeabilnost v primerjavi z literaturno klasifikacijo. Uporabili bomo nabor modelnih spojin, ki jim bomo sočasno določili permeabilnostne koeficiente v obeh sistemih pri enakih eksperimentalnih pogojih – t.j. enaka sestava lipidov in raztopin. Na podlagi ugotovitev se bomo odločili za morebitne spremembe v izvedbi poskusa, ki jih bomo testirali v novem poskusu. Glede na rezultate uvodnih meritev bomo iz prvotnega nabora spojin izbrali tudi 6 reprezentativnih spojin, ki jih bomo nato uporabili v naslednjih poskusih. Prvotni nabor spojin bomo testirali tudi na referenčnem predpripravljenem sistemu *PAMPA*.

V drugem delu bomo nato sami pripravili različne lipidne zmesi in jih uporabili pri določitvi permeabilnosti modelnih spojin iz ožjega nabora. Izvedli bomo tudi poskus z različnimi akceptorskimi pufri, ki jih bomo pripravili sami. Na koncu bomo tako primerjali vplive različnih lipidnih zmesi in akceptorskih pufrov na določitve permeabilnosti.

Za meritve bomo uporabili UV-VIS spektroskopijo in HPLC. Naredili bomo primerjavo med rezultati, pridobljenimi z dvema različnima analiznima metodama in tako preverili ustreznost metod ter njihovo uporabnost pri analizi večjega števila spojin.

3. MATERIALI IN METODE DELA

3.1. MATERIALI

3.1.1. Spojine

Izbor spojin smo naredili na podlagi podatkov iz literature (spojine, uporabljene v podobnih poskusih) in pa razpoložljivosti spojin na katedri. Med spojinami so tako učinkovine z delovanjem v CŽS kot tudi učinkovine z delovanjem na periferiji.

- desipraminijev klorid, Sigma, Indija, $\geq 98\%$, $M_r = 302,84$ g/mol
- diazepam, Sigma-Aldrich, ZDA, $M_r = 284,74$ g/mol
- furosemid, Sigma, Kitajska, $M_r = 330,74$ g/mol
- haloperidol, Sigma, Kitajska, $M_r = 375,87$ g/mol
- indometacin, Sigma, Kitajska, $\geq 99,9\%$, $M_r = 357,79$ g/mol
- karbamazepin, Sigma, Kitajska, $M_r = 236,27$ g/mol
- kinidin, Fluka, Nemčija, $\geq 98,0\%$, $M_r = 324,42$ g/mol
- lidokainijev klorid, AppliChem, Nemčija, $M_r = 270,80$ g/mol
- loperamidijev klorid, Sigma, Italija, $M_r = 513,503$ g/mol
- piroksikam, Sigma-Aldrich, ZDA, $M_r = 331,35$ g/mol
- propranololijev klorid, Fluka, ZDA, $\geq 98\%$, $M_r = 295,81$ g/mol
- risperidon, Sequia Research Products Ltd, Velika Britanija, $M_r = 410,48$ g/mol
- sertraliniijev klorid, Sigma-Aldrich, ZDA, $M_r = 342,69$ g/mol
- sulfasalazin, Fluka Analytical, Kitajska, $\geq 98\%$, $M_r = 398,39$ g/mol
- sumatriptanijev sukcinat, Sequia Research Products Ltd, Velika Britanija, $M_r = 413,489$ g/mol
- teofilin (anhidrid), Sigma, Kanada, min. 99%, $M_r = 180,167$ g/mol
- terfenadin, Sigma, Kitajska, $M_r = 471,7$ g/mol
- verapamilijev klorid, Sigma, Italija, min. 99,0%, $M_r = 491,05$ g/mol

3.1.2. Paket spojin in pufrov pION

- kinidiniijev klorid $M_r = 378,9$ g/mol
- lidokain $M_r = 234,34$ g/mol

- propranololijev klorid $M_r = 295,807 \text{ g/mol}$
- teofilin $M_r = 180,17 \text{ g/mol}$
- verapamilijev klorid $M_r = 491,05 \text{ g/mol}$
- akceptorski pufer Brain Sink Buffer P/N 110674
- donorski pufer Prisma HT P/N 110151
- lipid pION BBB lipid solution, P/N 110672

3.1.3. Ostale kemikalije

- acetonitril, Honeywell, Izrael, $\geq 99,9\%$, *gradient grade, for HPLC*
- amonijak, Sigma-Aldrich, Nemčija, $\sim 25\%$
- dimetil sulfoksid, Sigma, Francija, $\geq 99,5\%$, *plant cell culture tested*
- dodekan, Sigma-Aldrich, Kitajska, $\geq 99\%$
- heksan, Honeywell, Nemčija, $\geq 99\%$, *puriss p.a.*
- holesterol, Lex, Slovenija, Ph.Eur. 7th Ed.
- kalijev dihidrogenfosfat KH_2PO_4 , Merck, Nemčija, *for analysis*
- klorovodikova kislina, standardna raztopina za pripravo 1 M HCl, Titrisol[®], Merck, Nemčija
- lipid PBL: Brain Polar Lipid Extract (Porcine) 25 mg/mL, Avanti Num. 141101C (kloroform), Lot. Num. BEXTP-73, Avanti Polar Lipids, inc.
- metanol, Honeywell, Nemčija, $\geq 99,9\%$, *for HPLC*
- natrijev hidrogenfosfat dodekahidrat $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 12\text{H}_2\text{O}$, Merck, *for analysis*
- natrijev hidroksid, standardna raztopina za pripravo 1 M NaOH, Titrisol[®], Merck, Nemčija
- natrijev klorid NaCl, Merck, Danska, *for analysis*
- natrijev lavril sulfat (SLS), Sigma-Aldrich, Kitajska
- ortofosforna kislina, Merck, 85%, *for analysis*
- poloksamer 188 – Pluronic[®] F-68, Sigma-Aldrich, Nemčija
- Tween[®] 80, Fluka BioChemika, Nemčija

3.1.4. Pribor in aparature

Kromatografske kolone:

- Chromolith Performance RP-8e, 100 – 4,6 mm
- Kinetex XB C18, 50x4,6 mm

- Onyx monolithic C18, 50x2,0 mm

PAMPA plošče:

- Multiscreen Filter Plate (96 well tray with lid, 0,4 µm PCTE membrane), Cat.No. MPC4NTR10, Millipore
- Multiscreen Transport Receiver plate (96 well, Polystyrene), Cat.No. MATRNPS50, Millipore
- Pre-coated PAMPA Plate System, Ref. 353015, Corning, Gentest™
- Stirwell™ PAMPA Sandwich, P/N: 110 243, pION

- analitski tehtnici – Mettler Toledo XP105 DeltaRange®, Mettler Toledo AG245
- epice – Eppendorf Safe-Lock tubes; 1,5 mL, 2 mL
- grelo – Cole-Parmer chilling/heating block
- HPLC – Agilent 1100 series (razplinjevalec, binarna črpalka, termostatirani avtomatski vzorčevalnik, termostat za kolono, UV-VIS detektor z nizom diod)
- HPLC-plošče – Agilent, Deep Well, PP, 96 well, 1 mL
- mešalne kroglice iz nerjavečega jekla – Next Advance, 3,2 mL
- naprava za prečiščevanje vode – Millipore MilliQ, Merck KGaA
- orbitalni stresalnik – Vibromix 403 EVT, Tehnica
- pH-metri – pH330i s pripradajočo elektrodo SenTix 41, WTW; FiveEasyPlus s pripradajočo pripadajočo elektrodo InLab® ExpertPro, Mettler Toledo
- pipete – Eppendorf Research, volumni: 1-10 µL, 20-200 µL, 100-1000 µL, 30-300 µL (8-kanalna), s pripadajočimi nastavki
- plošče za redčitev – pION plošče z 96 vdolbinami, 2,5 mL
- tehtnica – EXACTA 300 EB, Tehnica
- UV-VIS-čitalec – Biotek Synergy HT
- UV-plošče – UV-STAR® Microplate, 96 well, half area, µCLEAR®, clear, Ref. 675801, Greiner Bio-One
- vakumirana centrifuga za odparevanje topil – Centrivac Heraeus instrumentals, VR-1/120/240
- viala – Short thread autosampler vial, clear glass; 11,6x32 mm - 1,5 mL
- vorteks – Vibromix 10, Tehnica

3.2. METODE DELA

3.2.1. Raztopine

- **PBS (*ang. phosphate-buffered saline*) (pH=7,4)**

Za pripravo pufra smo v merilno bučko (250 mL) natehtali in kvantitativno prenesli

- 0,595 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 12\text{H}_2\text{O}$
- 0,0475 g KH_2PO_4
- 2,0 g NaCl.

V bučko smo skoraj do oznake dolili deionizirano vodo in s predhodno umerjenim pH-metrom (pH=7) izmerili pH vrednost raztopine. Če je izmerjena pH vrednost odstopala več kot $\pm 0,05$ enote, smo jo z dodatkom 1 M NaOH/HCl ustrezno uravnali. Bučko smo nato napolnili z deionizirano vodo do oznake.

- **Donorski puffer Prisma HT (pH=7,4)**

V 100 mL merilno bučko smo s pipeto odmerili 2,5 mL koncentrata Prisma HT ter skoraj do oznake dolili deionizirano vodo. S predhodno umerjenim pH-metrom (pH=7) smo izmerili pH vrednost raztopine in nato z dodatkom 0,5 M NaOH pH uravnali na ustrezno vrednost pH. Z deionizirano vodo smo nato dopolnili bučko do oznake.

- **Mobilna faza za HPLC (pH=2,5 in 3)**

V 1 L steklenico za mobilne faze smo z aparatom Millipore odmerili 1,0 L vode MilliQ. V steklenico smo s pipeto odmerili 1,0 mL ortofosforne kisline. Z raztopino amonijaka smo nato z umerjenim pH-metrom izmerili in uravnali pH vrednost raztopine na želeno vrednost.

3.2.2. Priprava raztopin spojin

- **Osnovne raztopine (OR) spojin (10 mM)**

V 1,5 mL epice smo pribl. natančno natehtali spojino in izračunali volumen DMSO potreben za pripravo 10 mM raztopine. S pipeto smo odmerili izračunano količino DMSO in ga dodali v epico ter raztopili spojino. Epico smo nato vorteksirali.

- **Donorske raztopine (DR) spojini (50 μ M)**

V 1,5 mL epico smo s pipeto odmerili 100 μ L OR in jo redčili z 900 μ L donorskega pufra (Prisma HT). Po 45 μ L pripravljene raztopine smo prenesli v 4 vdolbinice HPLC-plošče (položaj vdolbinic pri redčitvah je bil enak položaju na spodnjih ploščah sendviča za izvedbo poskusa – preglednica IV) ter dodali 855 μ L donorskega pufra, da smo dobili 50 μ M raztopino spojine.

- **Donorske raztopine spojini (200 μ M)**

Za pripravo 2 mL raztopine smo odpipetirali 40 μ L OR v 2 mL epico in dodali 1960 μ L donorskega pufra (Prisma HT ali PBS). Epico smo nato vorteksirali.

Za pripravo 10 mL raztopine smo v 10 mL merilno bučko odpipetirali 200 μ L OR in dopolnili do oznake z donorskim pufrom.

- **Priprava raztopin spojini za umeritveno premico**

Raztopine smo pripravili z redčenjem izhodne 50 μ M DR s PBS. Redčitve smo izvedli na ploščah za redčitev po shemi prikazani v preglednici I.

Preglednica I: Shema redčitev donorske raztopine za pripravo umeritvene krivulje – redčitev na ploščah (vsako okence tabele predstavlja eno vdolbinico na plošči).

200 μ L 50 μ M DR + 800 μ L PBS (10 μ M)	200 μ L 50 μ M DR + 800 μ L PBS \Rightarrow razt. A
500 μ L razt. A + 500 μ L PBS (5 μ M)	/
200 μ L razt. A + 800 μ L PBS (2 μ M)	/
100 μ L razt. A + 900 μ L PBS (1 μ M)	100 μ L razt. A + 900 μ L PBS \Rightarrow razt. B
500 μ L razt. B + 500 μ L PBS (0,5 μ M)	/
200 μ L razt. B + 800 μ L PBS (0,2 μ M)	/
100 μ L razt. A + 900 μ L PBS (0,1 μ M)	/

- **Priprava referenčnih raztopin spojini za določanje koncentracije**

Za pripravo referenčnih raztopin smo uporabili 200 μ M DR. V vialo smo prenesli 1000 μ L DR. Iz vialo smo nato prenesli 100 μ L DR v drugo vialo in dodali 900 μ L donorskega pufra.

Vialo z 200 μM raztopino smo uporabili kot referenco za določanje koncentracij v donorski plošči, viala z 20 μM raztopino pa je bila referenca za določanje koncentracij v akceptorski plošči.

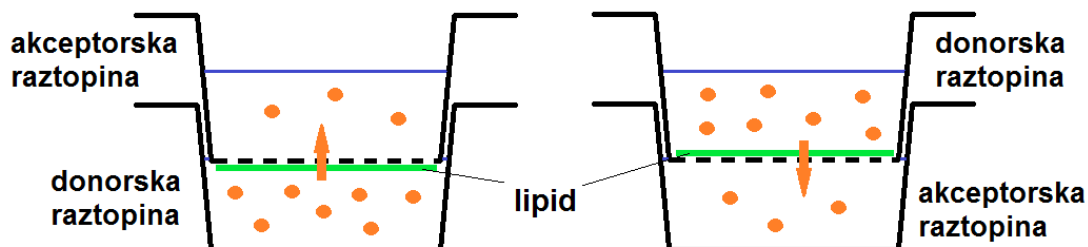
- **Priprava raztopin za razvoj kromatograskih metod**

Za razvoj metod smo pripravili 20 μM raztopine testnih spojin. Najprej smo v epice (1,5 mL) približno natančno natehtali spojine ter jih razredčili do koncentracije 10 mM z ustrežno količino DMSO. Izhodne raztopine smo nato redčili še naprej s pufrom (PBS, pH=7,4) do končne koncentracije 20 μM (50-kratna in 10-kratna redčitev).

3.2.3. Priprava lipidov

- **Lipid pION BBB lipid solution**

Lipid pION *BBB lipid solution* je raztopina, ki je že pripravljena za uporabo. Pred nanašanjem smo zamrznjen lipid odtalili in prenesli iz ampule v sekundarno embalažo (npr. epico), ki je omogočala lažje pipetiranje. S pipeto smo nato nanесли lipid na filter ploščo, na stran donorske raztopine (slika 3).



Slika 3: Prikaz dveh različnih načinov izvedbe poskusa PAMPA glede na položaj donorske raztopine.

- **Lastne zmesi lipidov**

Pripravili smo lastne zmesi lipidov z raztapljanjem lipida *Brain Polar Lipid Extract* v različnih topilih. V štiri epice smo odpipetirali 800 μL lipida in v vakimirani centrifugi odparili topilo (kloroform). Med odparevanjem smo v praznih epicah pripravili topila. V prvo in drugo epico smo približno natančno natehtali holesterol. V prvo epico smo holesterolu dodali ustrežno količino dodekana, da smo dobili 1% raztopino holesterola. V

drugo epico smo dodali ustrezno količino zmesi dodekana in heksana (dodekan:heksan = 3:1), da smo dobili 1% raztopino holesterola. V tretji epici smo zmešali dodekan in heksan v razmerju dodekan:heksan = 1:3. Po končanem odparevanju topila smo v vsako epico z lipidom dodali 1 mL pripravljene topila in z mešanjem na vorteksu raztopili lipid.

Preglednica II: Sestave pripravljenih lastnih zmesi lipidov v epicah.

Prva epica	Druga epica	Tretja epica	Četrta epica
PBL 20 mg/mL dodekana + 1 % (m/V) holesterola	PBL 20 mg/mL 1:3 heksan/dodekan + 1 % (m/V) holesterola	PBL 20 mg/mL 3:1 heksan/dodekan	PBL 20 mg/mL dodekana

3.2.4. Priprava akceptorskih pufrov

- **Akceptorski pufer *Brain Sink Buffer***

Akceptorski pufer *Brain Sink Buffer* je že pripravljen za uporabo. Shranjuje se ga v hladilniku (2-8°C), zato smo ga pred uporabo nekaj časa pustili na sobni temperaturi. Pred nanašanjem na ploščo smo pufer prelili v kadičko, iz katere smo ga nato pipetirali, saj bi s pipetiranjem iz originalnega vsebnika kontaminirali preostali neporabljen pufer. Pri tem smo bili previdni, da zaradi prisotnosti PAS v pufri ne bi prišlo do penjenja.

- **10% metanol v PBS + 1 mg/mL Tween 80**

V 50 mL bučko smo natehtali 50,0 mg Tween 80, s pipeto dodali 5 mL metanola, do oznake dopolnili s PBS in premešali.

- **10% metanol v PBS + 3 mg/mL Poloxamer 188**

V 50 mL bučko smo natehtali 150,0 mg Poloxamer 188, s pipeto dodali 5 mL metanola, do oznake dopolnili s PBS in premešali.

- **10% metanol v PBS + 3% natrijev lavril sulfat (SLS)**

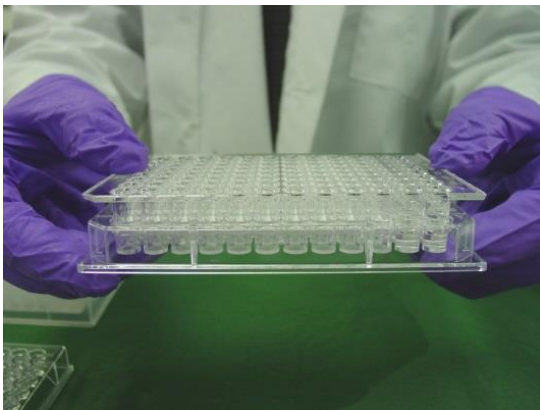
Na tehtalni čolniček smo natehtali 1,50 mg SLS in ga kvantitativno prenesli v 50 mL bučko. S pipeto smo dodali 5 mL metanola, do oznake dopolnili s PBS in premešali.

- **10% DMSO v PBS + 3% natrijev lavril sulfat (SLS)**

Na tehtalni čolniček smo natehtali 1,50 mg SLS in ga kvantitativno prenesli v 50 mL bučko. S pipeto smo dodali 5 mL DMSO, do oznake dopolnili s PBS in premešali.

3.2.5. Izvedba poskusov *PAMPA*

Najprej smo na filter ploščo nanесли lipid. Nanesen lipid se je posušil zelo hitro in tako dodatno sušenje ni bilo potrebno. Nanesli smo raztopine na spodnjo ploščo ter nato še na zgornjo filter ploščo. Po nanosu raztopin smo obe plošči združili v sendvič tako, da smo zgornjo ploščo položili na spodnjo ploščo. Sestavljen sendvič smo pokrili s pokrovom, ter ga prestavili na stresalnik (prvi poskus) oz. na grelo (vsi nadaljnji poskusi). Pri premikanju plošč smo bili ves čas previdni, da plošč nismo nagibali, saj bi lahko prišlo do prelivanja raztopin med vdolbinicami. Sledila je inkubacija. Po inkubaciji smo odstranili pokrov in ločili zgornjo ploščo od spodnje.



Slika 4: Sestavljen sendvič *PAMPA* (11).

- Prvi poskus

Preglednica III: Uporabljen material in pogoji izvedbe 1. poskusa.

plošče	Stirwell™ PAMPA Sandwich	
lipid	pION BBB lipid solution	5 µL
donorska stran	50 µM, Prisma HT	185 µL (spodnja plošča)
akceptorska stran	Brain Sink Buffer	200 µL
pogoji inkubacije	4 h, 25°C, mešanje: 125 rpm	
plošče	Multiscreen Transport Receiver plate in Filter Plate	
lipid	pION BBB lipid solution	5 µL
donorska stran	50 µM, Prisma HT	150 µL
akceptorska stran	Brain Sink Buffer	285 µL (spodnja plošča)
pogoji inkubacije	4 h, 25°C, mešanje: 125 rpm	

V vsako vdolbinico smo pred nanosom raztopin s pinceto dodali še mešalno kroglico. Plošče različnih proizvajalcev se razlikujejo po obliki, kar vpliva tudi na možnosti mešanja. Pri uporabi plošč Millipore je možna samo uporaba mešalnih kroglic, pri uporabi plošč pION pa je možna uporaba tudi mešalnih diskov, ki so del paketa pION za izvedbo poskusov *PAMPA*. Prednost uporabe diskov je, da so dvignjeni nad dnom in se tako ne dotikajo filtra z lipidno membrano. Pri uporabi mešalnih kroglic pa le-te krožijo po dnu vdolbinic in lahko pri tem poškodujejo lipidno membrano.

Preglednica IV: Shema nanosa donorskih raztopin spojin na plošči.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	IND	LOP	SRT	VRP	DES	KBZ	FUR	RSP	LDK	/	/	/
B	IND	LOP	SRT	VRP	DES	KBZ	FUR	RSP	LDK	/	/	/
C	IND	LOP	SRT	VRP	DES	KBZ	FUR	RSP	LDK	/	/	/
D	IND	LOP	SRT	VRP	DES	KBZ	FUR	RSP	LDK	/	/	/
E	TRF	DZP	SUM	SLZ	HAL	PKS	PRO	KND	TEO	/	/	/
F	TRF	DZP	SUM	SLZ	HAL	PKS	PRO	KND	TEO	/	/	/
G	TRF	DZP	SUM	SLZ	HAL	PKS	PRO	KND	TEO	/	/	/
H	TRF	DZP	SUM	SLZ	HAL	PKS	PRO	KND	TEO	/	/	/

Pomen okrajšav spojin je pojasnjen v poglavju Seznam okrajšav.

- **Drugi poskus**

Preglednica V: Uporabljen material in pogoji izvedbe 2. poskusa – sistem pION.

plošče	Stirwell™ PAMPA Sandwich	
lipid	pION BBB lipid solution	4 µL
donorska stran	200 µM, Prisma HT	200 µL (spodnja plošča)
akceptorska stran	Brain Sink Buffer	200 µL
pogoji inkubacije	16 h, 25°C, brez mešanja	

Preglednica VI: Shema nanosa donorskih raztopin spojin na ploščo pION.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	IND	DZP	VRP	DES	KBZ	FUR	RSP	LDK	/	/	/	/
B	IND	DZP	VRP	DES	KBZ	FUR	RSP	LDK	/	/	/	/
C	IND	DZP	VRP	DES	KBZ	FUR	RSP	LDK	/	/	/	/
D	IND	DZP	VRP	DES	KBZ	FUR	RSP	LDK	/	/	/	slepa razt.
E	TRF	SUM	SLZ	HAL	PKS	PRO	KND	TEO	/	/	/	slepa razt.
F	TRF	SUM	SLZ	HAL	PKS	PRO	KND	TEO	/	/	/	slepa razt.
G	TRF	SUM	SLZ	HAL	PKS	PRO	KND	TEO	/	/	/	slepa razt.
H	TRF	SUM	SLZ	HAL	PKS	PRO	KND	TEO	/	/	/	slepa razt.

Preglednica VII: Uporabljen material in pogoji izvedbe 2. poskusa – Pre-coated sistem.

plošče	Pre-coated PAMPA Plate System	
lipid	/	4 µL
donorska stran	200 µM, PBS	300 µL (spodnja plošča)
akceptorska stran	PBS	200 µL
pogoji inkubacije	4 h, 25°C, brez mešanja	

Preglednica VIII: Shema nanosa donorskih raztopin spojin na Pre-coated ploščo.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	IND	VRP	DES	PKS	PRO	KND	TEO	/	/	/	/	slepa razt.
B	IND	VRP	DES	PKS	PRO	KND	TEO	/	/	/	/	slepa razt.
C	IND	VRP	DES	PKS	PRO	KND	TEO	/	/	/	/	slepa razt.
D	IND	VRP	DES	PKS	PRO	KND	TEO	/	/	/	/	slepa razt.
E	SUM	SLZ	KBZ	FUR	RSP	LDK	/	/	/	/	/	slepa razt.
F	SUM	SLZ	KBZ	FUR	RSP	LDK	/	/	/	/	/	slepa razt.
G	SUM	SLZ	KBZ	FUR	RSP	LDK	/	/	/	/	/	slepa razt.
H	SUM	SLZ	KBZ	FUR	RSP	LDK	/	/	/	/	/	slepa razt.

Pre-coated PAMPA Plate System je komplet pripravljenih plošč, kjer je lipid že nanosen na filter ploščo. Pred uporabo smo ga vzeli iz zamrzovalnika in ga za najmanj 30 minut pustili na sobni temperaturi, da se je odtalil.

- **Tretji poskus**

Preglednica IX: Shema nanosa DR spojin na donorsko ploščo pri poskusih 3 in 4.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	TEO	SLZ	HAL	PRO	LDK	RSP	TEO	SLZ	HAL	PRO	LDK	RSP
B	TEO	SLZ	HAL	PRO	LDK	RSP	TEO	SLZ	HAL	PRO	LDK	RSP
C	TEO	SLZ	HAL	PRO	LDK	RSP	TEO	SLZ	HAL	PRO	LDK	RSP
D	TEO	SLZ	HAL	PRO	LDK	RSP	TEO	SLZ	HAL	PRO	LDK	RSP
E	TEO	SLZ	HAL	PRO	LDK	RSP	TEO	SLZ	HAL	PRO	LDK	RSP
F	TEO	SLZ	HAL	PRO	LDK	RSP	TEO	SLZ	HAL	PRO	LDK	RSP
G	TEO	SLZ	HAL	PRO	LDK	RSP	TEO	SLZ	HAL	PRO	LDK	RSP
H	TEO	SLZ	HAL	PRO	LDK	RSP	TEO	SLZ	HAL	PRO	LDK	RSP

Preglednica X: Uporabljen material in pogoji izvedbe 3. poskusa.

plošče	Multiscreen Transport Receiver plate in Filter Plate	
lipid	preglednica XI	4 μ L
donorska stran	200 μ M, Prisma HT	200 μ L (spodnja plošča)
akceptorska stran	Brain Sink Buffer	200 μ L
pogoji inkubacije	16 h, 25°C, brez mešanja	

Preglednica XI: Shema nanosa lipidov na filter ploščo pri 3. poskusu.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	lipid pION						PBL 20 mg/mL dodekana					
B												
C												
D												
E	PBL 20 mg/mL dodekana + 1 % (m/V) holesterola						PBL 20 mg/mL 3:1 heksan/dodekan					
F												
G												
H												

- Četrty poskus

Preglednica XII: Uporabljen material in pogoji izvedbe 4. poskusa.

plošče	Multiscreen Transport Receiver plate in Filter Plate	
lipid	PBL 20 mg/mL 1:3 heksan/dodekan+ 1 % (m/V) holesterola	4 μ L
donorska stran	200 μ M, Prisma HT	300 μ L (spodnja plošča)
akceptorska stran	preglednica XIII	200 μ L
pogoji inkubacije	16 h, 25°C, brez mešanja	

Preglednica XIII: Shema nanosa akceptorskih pufrov na akceptorsko ploščo pri 4. poskusu.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	10% MeOH v PBS 1 mg/mL Tween 80						10% MeOH v PBS 3% SLS					
B												
C												
D												
E	10% MeOH v PBS 3 mg/mL Poloxamer 188						10% DMSO v PBS 3% SLS					
F												
G												
H												

3.2.6. Analiza vzorcev

Vzorci smo analizirali z UV-VIS spektroskopijo in HPLC. Posameznih analiznih metod nismo validirali, ker validacija zaradi velikega števila uporabljenih metod ni bila racionalna.

UV-VIS spektroskopija

Za analizo z UV-VIS spektroskopijo smo najprej pripravili UV-plošče s slepimi raztopinami, na plošče smo nanesti 150 μ L raztopine v vsako vdolbinico. Za meritve na donorski plošči smo uporabili donorski pufer, ki smo ga uporabili pri posameznem poskusu, za akceptorsko ploščo pa akceptorski pufer, ki smo ga uporabili pri posameznem poskusu. Pripravljene plošče smo nato analizirali z UV-VIS-čitalcem v območju valovnih dolžin od 230 nm do 500 nm (korak 4 nm).

Po končani inkubaciji smo previdno ločili akceptorsko in donorsko ploščo. Ker so mikrotitrne plošče narejene iz materiala, ki ni primeren za analizo z UV-VIS-čitalcem, smo za analizo uporabili UV-plošče. Nanje smo najprej prenesli po 150 μ L raztopine iz vsake vdolbinice. Plošče smo nato analizirali.

Pri rokovanju z UV-ploščami smo uporabili zaščitne rokavice in bili previdni, da smo ohranili zgornjo in spodnjo stran plošče ohranili čisto. Morebitni madeži na zgornji in spodnji strani plošče bi lahko vplivali na rezultate naših meritev.

Tekočinska kromatografija visoke ločljivosti (HPLC)

- **Razvoj metod**

Za mobilno fazo smo uporabili amonijev fosfatni pufer (kanal A) in acetonitril (kanal B). Razvoj metod smo začeli z metodo gradientne elucije. Testne spojine smo najprej analizirali z gradientno elucijo in iz pridobljenih retencijskih časov izračunali okvirne pogoje (sestavo MF), pri katerih se je vsaka posamezna spojina eluirala s kolone. S spreminjanjem deležev komponente A in B smo nato optimizirali retencijo testnih spojin na koloni.

Razvoj metod smo začeli z amonijevim fosfatnim pufrom pH=3,0 in kolonama Onyx monolithic C18 in Chromolith Performance RP-8e. Kasneje smo zaradi optimizacije izvedbe analize razvoj metod izvedli še z amonijevim fosfatnim pufrom pH=2,5 in kolono Kinetex XB C18.

- **Metode**

Kolona Onyx monolithic C18

- temperatura kolone: 40,0 °C
- pretok MF: 1,7 ml/min
- najvišji pritisk na koloni: 250 bar
- čas analize: 1 min
- volumen injiciranja: 3 µL DR, 80 µL AR

Preglednica XIV: Parametri metod na koloni Onyx monolithic C18.

spojina	sestava mobilne faze (delež acetonitrila) [%]	valovna dolžina detekcije [nm]	retencijski čas [min] (±0,1 min)
desipramin	28	252 (ref. 360); 214 (ref. 360)	0,5
diazepam	38	230 (ref. 360)	0,5
furosemid	24	274 (ref. 360)	0,5
haloperidol	24	246 (ref. 360)	0,5
karbamazepin	25	286 (ref. 360)	0,5
kinidin*	10	249 (ref. 360)	0,4/0,6
loperamid	35	220 (ref. 360)	0,5
piroksikam	25	248, 364	0,5
propranolol	20	214 (ref. 360); 290 (ref. 360)	0,5
risperidon	16	238 (ref. 360); 276 (ref. 360)	0,6
sertralin	33	220 (ref. 360)	0,4
sulfasalazin	26	244 (ref. 360)	0,4
sumatriptan	5	226 (ref. 360)	0,5
terfenadin	40	220 (ref. 360)	0,4
verapamil	29	230 (ref. 360); 279 (ref. 360)	0,5

* V kromatogramu kinidina vidimo dva vrhova, ker nismo uporabili optično čiste spojine temveč zmes kinidina in njegovega stereoizomera kinina.

Kolona Chromolith Performance RP-8e

- temperatura kolone: 40,0 °C
- pretok MF: 3,5 ml/min
- najvišji pritisk na koloni: 250 bar
- čas analize: 3 min
- volumen injiciranja: 3 µL DR, 80 µL AR

Preglednica XV: Parametri metod na koloni Chromolith Performance RP-8e.

spojina	sestava mobilne faze (delež acetonitrila) [%]	valovna dolžina detekcije [nm]	retencijski čas [min] (±0,1 min)
indometacin	38	260	19
lidokain	8	220 (ref. 360)	1,8
teofilin	3	272 (ref. 360)	2,4

Kolona Kinetex XB C18

- temperatura kolone: 50,0 °C
- najvišji pritisk na koloni: 400 bar
- volumen injiciranja: 5 µL DR, 50 µL AR

Preglednica XVI: Parametri metod na koloni Kinetex XB C18.

spojina	čas analize [min]	sestava MF (delež acetonitrila) [%]	pretok MF [mL]	valovna dolžina detekcije [nm]	retencijski čas [min] (±0,1 min)
desipramin	1	33	2,5	252 (ref. 360); 214 (ref. 360)	0,7
diazepam	1	44	2,5	230 (ref. 360)	0,9
furosemid	1	30	2,5	274 (ref. 360)	0,8
haloperidol	1,5	29	2,0	246 (ref. 360)	0,9
indometacin	1	61	2,0	260	0,6
karbamazepin	1,3	30	2,5	286 (ref. 360)	0,9
kinidin*	1,1	15	2,0	249 (ref. 360)	0,6/0,7
lidokain	1,4	15	2,0		0,8
piroksikam	1,2	33	2,5	248, 364	0,9
propranolol	1,1	28	2,0	214 (ref. 360); 290 (ref. 360)	0,7
risperidon	1,2	20	2,5	238 (ref. 360); 276 (ref. 360)	0,8
sulfasalazin	1	33	2,5	244 (ref. 360)	0,7
sumatriptan	1,2	7	2,5	226 (ref. 360)	0,9
teofilin	1,2	7	2,0	272 (ref. 360)	0,9
terfenadin	1,2	45	2,0	220 (ref. 360)	1,1
verapamil	1,2	36	2,0	230 (ref. 360); 279 (ref. 360)	0,9

* V kromatogramu kinidina vidimo dva vrhova, ker nismo uporabili optično čiste spojine, temveč zmes kinidina in njegovega stereoizomera kinina.

- **Izvedba analize**

Po končani analizi UV-VIS smo plošče z donorskimi (DR) in akceptorskimi (AR) raztopinami analizirali še z metodo HPLC. Analizirali smo tudi referenčne raztopine za vsako spojino. V prvem poskusu smo za vsako spojino pripravili nabor raztopin za izdelavo umeritvene premice. V kasnejših poskusih smo kot referenčno raztopino za DR uporabili izhodno DR (200 μM) za AR pa 20 μM raztopine.

3.2.7. Obdelava rezultatov

- **Izračun koncentracij raztopin po končani inkubaciji**

V programu Excel smo zbrali in uredili rezultate analiz HPLC – retencijski časi spojin in površine vrhov. Pri spojinah, kjer sta v analitski metodi uporabljeni dve valovni dolžini, smo uporabili tisto, pri kateri je absorbanca večja in imajo kromatografski vrhovi večjo površino. S pomočjo referenčnih raztopin (metoda eksternega standarda) smo iz površin vrhov izračunali koncentracije spojin v raztopinah po končani inkubaciji. Za izračun smo uporabili enačbo 1:

Enačba 1: Enačba za izračun koncentracije raztopine.

$$C_{vz} = \frac{C_{ref} \times A_{vz}}{A_{ref}}$$

kjer je:

C_{vz} koncentracija v vzorcu (DR ali AR po končani inkubaciji) [μM]

C_{ref} koncentracija v referenčni raztopini [μM]

A_{vz} površina kromatografskega vrha vzorca

A_{ref} površina kromatografskega vrha referenčne raztopine

- **Izračun permeabilnostnih koeficientov**

Za izračun permeabilnostnih koeficientov P_e smo uporabili program, zapisan v programskem jeziku Python, kamor smo iz programa Excel vnesli naše rezultate meritev.

V primeru meritev UV-VIS smo vnesli surove podatke. Algoritem je za vsako meritev samostojno določil valovno dolžino absorpcijskega maksimuma in vrednosti absorbance pri tej valovni dolžini odštel absorbanco slepe raztopine.

Za meritve HPLC smo v program vnesli izračunane koncentracije raztopin po končani inkubaciji.

Program je nato izračunal permeabilnostne koeficiente na podlagi enačbe 2 (za *ne-sink* pogoje).

Enačba 2: Izračun permeabilnostnega koeficienta (1,2,5).

$$P_e = -\frac{2,303V_d}{A \times D_A(t - \tau_{ss})} \times \left(\frac{1}{1 + r_v}\right) \times \log \left[1 - \left(\frac{1 + r_v^{-1}}{1 - R_M}\right) \times \frac{C_A(t)}{C_D(0)} \right]$$

kjer je:

P_e efektivna permeabilnost [cm/s]

V_d volumen DR [cm³]

V_a volumen AR [cm³]

A površina membrane [cm²] – plošče pION: 0,304 cm²; plošče Millipore: 0,3 cm²

D_A poroznost membrane A – plošče pION: 0,76; plošče Millipore: 0,76

t inkubacijski čas (s)

τ_{ss} čas saturacije membrane (s) – tu zanemarjen

$r_v = V_d/V_a$ razmerje volumnov med DR in AR

R_M retencija spojine na membrani

C_R koncentracija referenčne spojine v času 0 = C_D koncentracija DR v času $t = 0$ ($C_D(0)$)

C_D koncentracija DR v času $t = t$ ($C_D(t)$)

C_A koncentracija AR v času t ($C_A(t)$)

V primeru *sink* pogojev predpostavimo, da $C_A = 0$ in tako dobimo enačbo 3.

Enačba 3: Izračun permeabilnostnega koeficienta pri *sink* pogojih (2,5).

$$P_e = -\frac{2,303V_d}{A \times D_A(t - \tau_{ss})} \times \log \left[\left(\frac{1}{1 - R_M}\right) \times \frac{C_D(t)}{C_D(0)} \right]$$

Retencijo spojine na membrani se izračuna po enačbi 4.

Enačba 4: Izračun retencije spojine na membrani (1).

$$R_M = 1 - \frac{C_D(t)}{C_D(0)} - \left(\frac{V_a}{V_d}\right) \times \frac{C_A(t)}{C_D(0)}$$

Končne rezultate smo podali v obliki permeabilnostnih koeficientov (P_e) in njihovih negativnih logaritmov ($-\log P_e$).

- **Statistična obdelava rezultatov**

Prvi del obdelave rezultatov smo izvedli s pomočjo programa Excel. Povprečne vrednosti (\bar{x}) paralelnih meritev smo izračunali z uporabo funkcije *AVERAGE*, njihov standardni odklon (σ) smo izračunali s funkcijo *STDEV.P*. Na koncu smo po enačbi 5 izračunali še koeficient variacije (RSD), vrednost je podana v odstotkih.

Enačba 5: Izračun koeficienta variacije.

$$RSD = \frac{\sigma}{\bar{x}} \times 100$$

Drugi del obdelave podatkov smo izvedli v programu SPSS, kjer smo za rezultate 3. in 4. poskusa izvedli test ANOVA (*General Linear Model*) z Dunnettovim ali Bonferronijevim *post-hoc* testom. Zaradi velikih razlik med variancami in velikostnimi razredi posameznih skupin meritev smo vrednosti P_e dvakrat logaritmirali in namesto vrednosti P_e za analizo uporabili vrednosti $\log(-\log P_e)$. Za mejo signifikantnosti pri teh testih smo privzeli vrednost $p < 0,05$.

4. REZULTATI IN RAZPRAVA

4.1. Prvi poskus

S prvim poskusom smo preverili ustreznost metod dela vpeljanih na osnovi literature in navodil proizvajalcev potrošnega materiala ter se na podlagi rezultatov odločili za optimizacijo izvedbe poskusa in analize vzorcev.

Za analizo vzorcev s HPLC smo prvotno uporabili tri različne kromatografske kolone, da smo lahko analizirali vzorce vseh uporabljenih spojin. To se je izkazalo za zelo nepraktično in časovno potratno, pri analizi smo imeli tudi težave s kromatografskim sistemom in tako nismo uspeli uspešno analizirati vseh vzorcev. Zato smo se odločili, da zamenjamo kromatografske kolone in razvijemo metode za analizo spojin na eni sami kromatografski koloni.

Pri pregledu rezultatov analize vzorcev smo ugotovili, da pri nekaterih spojinah, ki sicer prehajajo membrano, ni vidnega vrha/signala. Predvidevali smo, da bi to lahko bila posledica nizke začetne koncentracije v donorski raztopini (DR). Zato smo se odločili, da za nadaljnje poskuse uporabimo DR z višjo koncentracijo (200 μM namesto 50 μM).

V predhodnem delu, kjer so opisane izvedbe poskusov z metodo *PAMPA*, so raziskovalci pri uporabi sistema *pION* nanесли DR v spodnjo ploščo (prevladujoč način pri delu z umetnimi membranami), medtem ko so v sendviču Millipore DR nanесли v zgornjo ploščo (način pri delu s celičnim kulturami) (2,5; 4,8). V prvem poskusu smo sledili tem trendom, za kasnejše poskuse pa smo se odločili, da poenotimo oba sistema in smo tako v prihodnjih poskusih DR nanесли na spodnje plošče. Tak nanos omogoča tudi optimizacijo mešanja. Mešanje smo v naslednjih poskusih sicer opustili, ker je predstavljalo dodatno spremenljivko v našem sistemu. Za preučitev te spremenljivke pa je potrebno dodatno eksperimentalno delo in je izven obsega pričujoče naloge. Posledično smo se odločili tudi za podaljšanje inkubacijskega časa s 4 ur na 16 ur, saj je večina referenčnih literaturnih vrednosti brez mešanja pridobljenih v podobno dolgih 18-urnih poskusih. Spremenili smo še volumen lipidnega nanosa s 5 μL na 4 μL , saj se je izkazalo, da tudi manjši volumen nanesenega lipida zadostuje za prekritje celotnega filtra.

4.2. Drugi poskus

V drugem poskusu smo preverili ustreznost naših metod dela z uvedenimi optimizacijami izvedbe poskusov, t.j. ali naš *PAMPA* model pravilno loči med CŽS+ in CŽS– spojinami in ali so vrednosti P_e , ki smo jih določili v našem poskusu, primerljive z vrednostmi P_e , ki so podane v navodilih proizvajalca pION *PAMPA* sistemov. Želeli smo tudi primerjati rezultate sistema z ročno nanesenim lipidom in pripravljenimi ploščami, ki imajo predhodno strojno nanesen lipid.

V preglednicah XVII in XVIII so prikazane povprečne koncentracije spojin v raztopinah po končani inkubaciji.

Preglednica XVII: Povprečne koncentracije spojin v raztopinah po inkubaciji sistema pION v 2. poskusu, določene s HPLC.

spojina	C_D [μ M] (RSD %)	C_A [μ M] (RSD)
indometacin	192,7 (3,3)	39,6 (4,9)
terfenadin	4,6 (21,8)	/
diazepam	30,1 (2,1)	139,3 (3,8)
sumatriptan	219,4 (7,7)	/
verapamil	18,3 (4,6)	135,4 (3,8)
sulfasalazin	214,7 (6,1)	0,2 (9,5)
desipramin	8,1 (9,8)	101,8 (4,8)
haloperidol	24,2 (6,7)	120,9 (11,6)
karbamazepin	66,7 (1,8)	132,9 (4,1)
piroksikam	204,9 (10,7)	18,9 (4,0)
furosemid	211,1 (6,8)	/
propranolol	19,2 (11,9)	103,5 (3,7)
risperidon	46,2 (1,4)	136,3 (2,8)
kinidin	27,6 (9,1)/ 25,3 (6,7)	/
lidokain	71,2 (3,5)	109,7 (5,9)
teofilin	129,1 (8,1)	/

V referenčni raztopini za AR je prišlo do precipitacije terfenadina, zato nismo imeli podatkov, potrebnih za izračun koncentracije v akceptorski raztopini. V kromatogramih analiz AR sumatriptana, furosemida, kinidina in teofilina ni bilo vidnih vrhov oz. so bili premajhni za integracijo.

V Pre-coated sistemu nismo testirali terfenadina, diazepama in haloperidola, saj smo za pripravo raztopin uporabili PBS, v katerem bi se te spojine oborile in bi tako dobili neustrezne rezultate.

Preglednica XVIII: Povprečne koncentracije spojin v raztopinah po inkubaciji Pre-coated sistema v 2. poskusu, določene s HPLC.

spojina	C _D [μM] (RSD%)	C _A [μM] (RSD%)
indometacin	167,6 (4,6)	12,2 (27,2)
sumatriptan	180,0 (1,9)	0,2 (19,4)
verapamil	137,3 (1,1)	41,0 (15,4)
sulfasalazin	164,9 (5,2)	/
desipramin	139,1 (2,2)	42,8 (19,5)
karbamazepin	148,0 (3,3)	33,0 (16,3)
piroksikam	165,0 (1,8)	21,2 (10,2)
furosemid	177,8 (5,1)	/
propranolol	149,3 (2,7)	35,9 (10,6)
risperidon	158,9 (2,8)	36,8 (15,0)
kinidin	158,1 (5,0) / 158,7 (5,5)	26,2 (16,3) / 26,8 (27,8)
lidokain	143,6 (3,0)	58,2 (15,9)
teofilin	103,3 (1,6)	11,0 (11,4)

V kromatogramih analiz AR sulfasalazina in furosemida ni bilo vidnih vrhov oz. so bili premajhni za integracijo.

V preglednici XIX so prikazani rezultati 2. poskusa za sistem pION in klasifikacija spojin glede na permeabilnost iz literature (2,4,6,12). Zaradi manjkajočega podatka o koncentraciji v AR terfenadina izračun permeabilnostnega koeficienta na podlagi meritev HPLC ni bil mogoč.

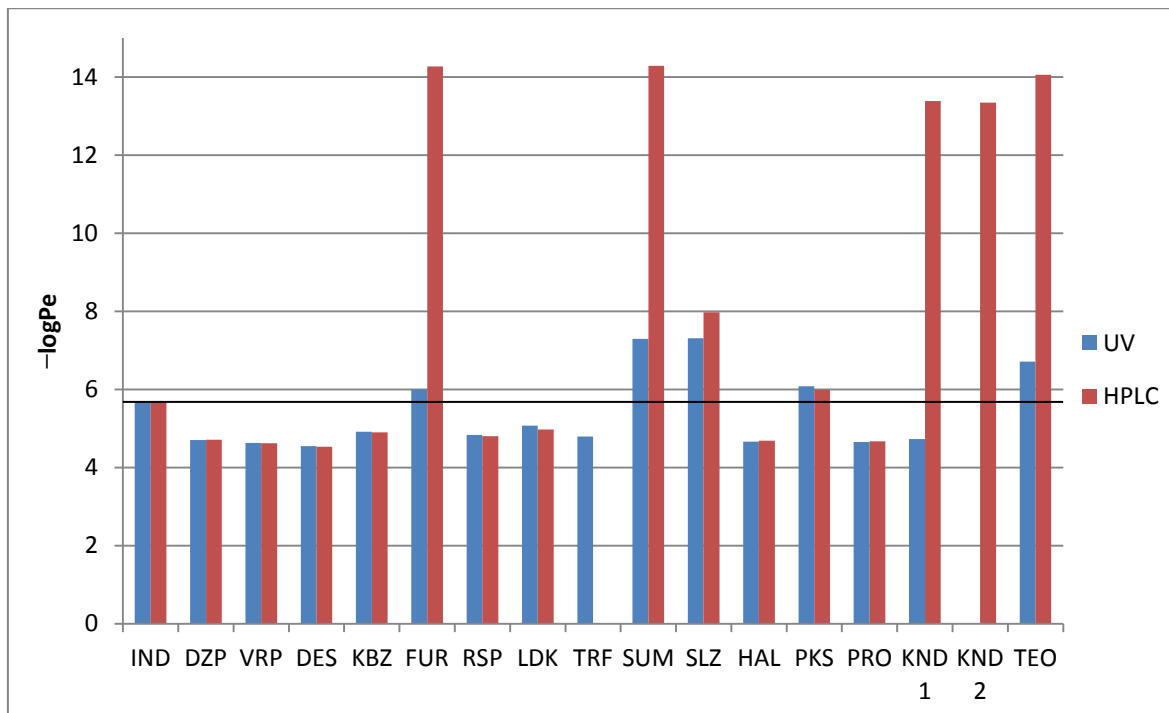
Preglednica XIX: Permeabilnostni koeficienti spojin (rezultati 2. poskusa PAMPA) in literaturna klasifikacija spojin – pION sistem.

spojina	HPLC	UV-VIS	HPLC	UV-VIS	CŽS+ / CŽS–
	P _e (10 ⁻⁶ cm/s) (RSD%)		-logP _e		
indometacin	2,14 (6,6)	2,03 (5,6)	5,67	5,69	CŽS–
terfenadin	/	16,1 (3,8)	/	4,79	CŽS–
diazepam	19,7 (0,8)	19,9 (1,5)	4,71	4,70	CŽS+
sumatriptan	5,23·10 ⁻⁹ (7,1)	0,00539 (29,3)	14,28	7,29	+/-*
verapamil	24,3 (1,0)	23,5 (1,2)	4,62	4,63	CŽS+/CŽS–
sulfasalazin	0,0107 (6,0)	0,0519 (31,4)	7,97	7,31	CŽS–
desipramin	29,8 (3,0)	28,4 (2,2)	4,53	4,55	CŽS+
haloperidol	20,5 (7,6)	22,0 (7,3)	4,69	4,66	CŽS+
karbamazepin	12,5 (1,7)	12,1 (2,7)	4,92	4,92	CŽS+
piroksikam	1,02 (12,5)	0,837 (8,2)	5,99	6,08	CŽS–
furosemid	5,43·10 ⁻⁹ (6,5)	1,00 (0,0)	14,27	6,00	CŽS–
propranolol	21,3 (3,6)	22,2 (2,2)	4,67	4,66	CŽS+
risperidon	15,7 (1,3)	14,6 (3,3)	4,81	4,84	+*
kinidin	4,53·10 ⁻⁸ (6,4) / 4,17·10 ⁻⁸ (8,3)	18,8 (2,0)	13,38 / 13,34	4,73	CŽS–
lidokain	10,6 (1,7)	8,57 (16,6)	4,97	5,07	CŽS+
teofilin	8,91·10 ⁻⁹ (7,7)	0,194 (2,8)	14,05	6,71	CŽS–

* aktivnost v CŽS (13)

V navodilih proizvajalca je navedena meja za razvrstitev spojin med CŽS+ ali CŽS– določena pri P_e 2,0·10⁻⁶ (-logP_e 5,70). Ker smo uporabili proizvajalčev PAMPA model, smo se odločili, da tudi mi uporabimo to vrednost kot kriterij za klasifikacijo spojin. Določitev interne meje bi bila namreč preveč zamudna in v tej točki vpeljevanja metode nesmiselna. Spojine z vrednostjo -logP_e višjo od mejne vrednosti slabo prehajajo membrane, spojine z nižjo vrednostjo -logP_e pa dobro. Naše modelne spojine smo tako

razvrstili med CŽS+ ali CŽS– in našo razvrstitev primerjali s klasifikacijo spojin iz literature.



IND indometacin, DZP diazepam, VRP verapamil, DES desipramin, KBZ karbamazepin, FUR furosemid, RSP risperidon, LDK lidokain, TRF terfenadin, SUM sumatriptan, SLZ sulfasalazin, HAL haloperidol, PKS piroksikam, PRO propranolol, KND kinidin, TEO teofilin

Graf 1: Vrednosti $-\log P_e$ spojin, določene z 2. poskusom PAMPA – sistem pION.

Graf 1 ponazarja $-\log P_e$ vrednosti in mejno vrednost za razvrstitev. Glede na literaturno klasifikacijo spojin je naš PAMPA model kot CŽS– pravilno identificiral furosemid, piroksikam, teofilin in sulfasalazin. Indometacin, ki se po podatkih iz literature tudi uvršča med spojine, ki slabo prehajajo v CŽS, je ravno na meji med dobro in slabo permeabilnimi spojinami. Naš PAMPA model tudi pravilno identificira večino CŽS+ modelnih spojin, vendar pa sta lažno pozitivno identificirana terfenadin in kinidin (glede na podatke pridobljene na podlagi meritev UV-VIS). Obe spojini s pasivno difuzijo sicer lahko prehajata HEB, vendar sta substrata za P-glikoprotein, ki ju črpa iz endotelijskih celic možganskih kapilar nazaj v kri in *in vivo* ne prehajata v CŽS, terfenadin pa je tudi metabolno nestabilen (4,6,12). Za verapamil smo v literaturi našli nasprotno si podatke, klasificiran je kot CŽS+ in tudi kot CŽS–, spojina je substrat za P-glikoprotein (2,4). Za sumatriptan in risperidon v literaturi nismo našli podatkov za klasifikacijo na podlagi penetracije v CŽS, temveč smo podali klasifikacijo glede na aktivnost v CŽS. Risperidon je antipsihotik, njegovo mesto delovanja je CŽS in se uvršča med dobro permeabilne

spojine, je pa tudi substrat za P-glikoprotein. Naš model ga tako pravilno razvršča med CNS+ spojine. Sumatriptan se v terapiji uporablja za blažitev migrenskih napadov, v literaturi pa ima navedene nizke vrednosti permeabilnostnih koeficientov, kar se je pokazalo tudi v našem poskusu (14,15). Predvideva se, da se med migrenskimi napadi HEB poruši in/ali da so tarčni serotoninški receptorji prisotni tudi v manjših krvnih žilah CŽS in drugih mestih na periferiji ter zato za doseg terapevtskega učinka ni potrebno, da spojina prehaja nepoškodovano HEB (14).

Izračunane $-\log P_e$ smo primerjali tudi z $-\log P_e$ iz proizvajalčevih navodil, ki so prikazani v preglednici XX (16). Preverili smo relativne razlike med našimi in proizvajalčevimi vrednostmi, ki so manjše od 1. Vrednosti $-\log P_e$ se tako ne razlikujejo za več kot eno logaritmsko enoto, kar pomeni, da z našim modelom dobimo vrednosti, ki so primerljive s proizvajalčevimi.

Preglednica XX: Primerjava negativnih logaritmov permeabilnostnih koeficientov spojin iz proizvajalčevih (pION) navodil z našimi določitvami.

	pION	HPLC	UV-VIS
spojina	$-\log P_e$		
verapamil	3,8	4,62	4,63
propranolol	4,1	4,67	4,66
kinidin	4,3	13,38 / 13,34	4,73
lidokain	4,3	4,97	5,07
teofilin	>6 (~10)	14,05	6,71

Z našim *PAMPA* modelom smo uspeli pravilno razvrstiti spojine med dobro in slabo permeabilne spojine, dobili pa smo tudi primerljive vrednosti $-\log P_e$ v primerjavi s proizvajalčevimi vrednostmi. Na podlagi tega smo zaključili, da so naše metode dela po uvedbi optimizacij ustrezne.

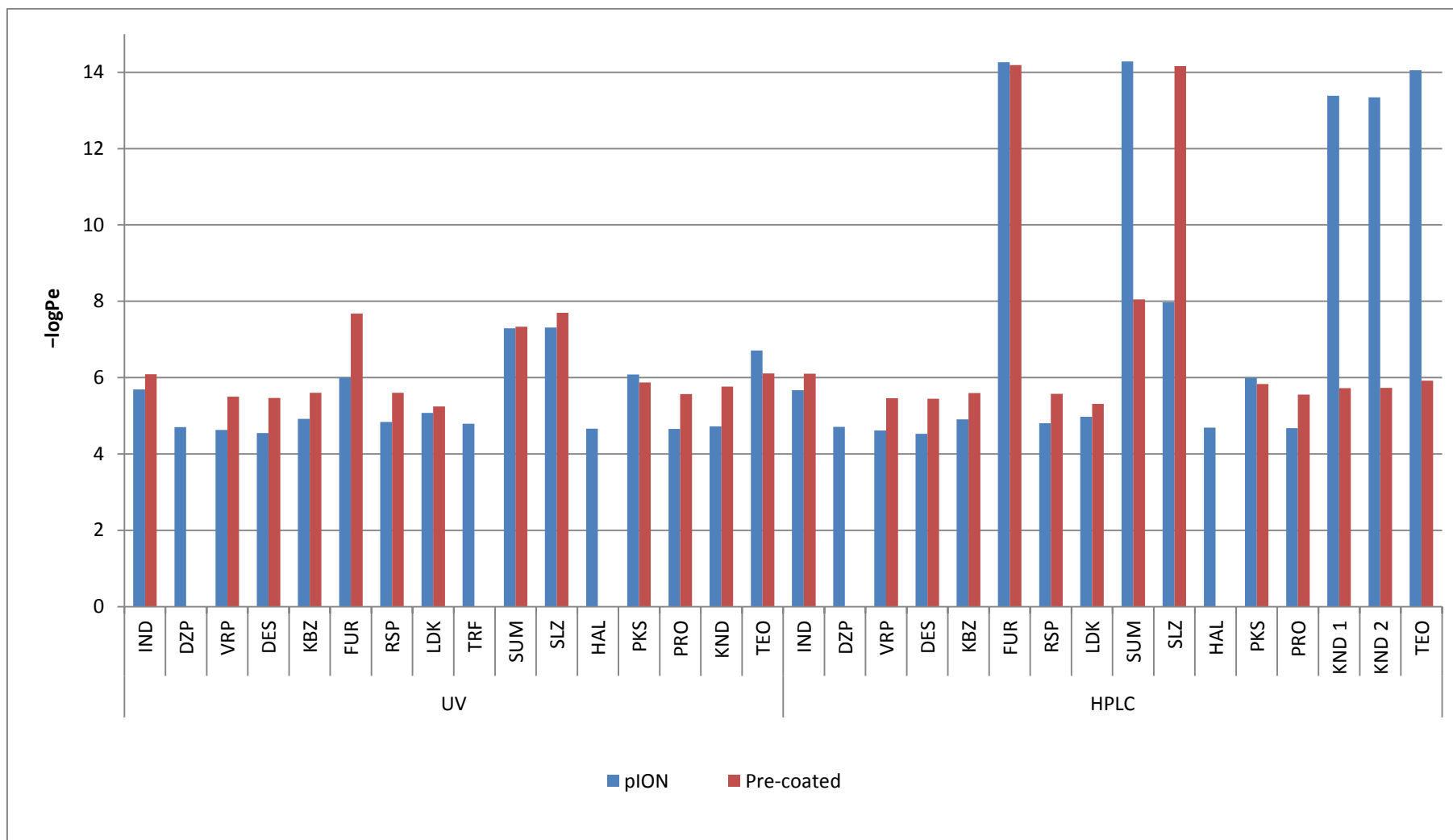
Za nadaljnje poskuse smo izbrali propranolol, lidokain, haloperidol in risperidon kot modelne spojine z dobro permeabilnostjo ter teofilin in sulfasalazin kot modelni spojini s slabo permeabilnostjo. Pri teh spojinah nismo imeli težav s topnostjo in precipitacijo v raztopinah, spojine so tudi dobro zastopane v literaturi. Propranolol, lidokain in teofilin so tudi del paketa pION za izvedbo poskusov *PAMPA* in smo tako imeli na voljo tudi proizvajalčeve referenčne vrednosti P_e .

V preglednici XXI so prikazani rezultati 2. poskusa za Pre-coated sistem.

Preglednica XXI: Permeabilnostni koeficienti spojin (rezultati 2. poskusa PAMPA) – Pre-coated sistem.

spojina	HPLC	UV-VIS	HPLC	UV-VIS
	P_e ($\cdot 10^{-6}$ cm/s) (RSD%)		$-\log P_e$	
indometacin	0,843 (29,6)	0,860 (29,4)	6,10	6,09
sumatriptan	0,00948 (32,0)	0,0489 (34,4)	8,05	7,34
verapamil	3,53 (17,4)	3,22 (17,9)	5,46	5,50
sulfasalazin	$6,94 \cdot 10^{-9}$ (5,2)	0,0206 (17,8)	14,16	7,70
desipramin	3,63 (19,2)	3,50 (20,2)	5,45	5,47
karbamazepin	2,58 (14,2)	2,53 (14,5)	5,60	5,60
piroksikam	1,48 (10,3)	1,35 (9,7)	5,84	5,87
furosemid	$6,44 \cdot 10^{-9}$ (5,0)	0,0219 (27,8)	14,19	7,68
propranolol	2,80 (8,3)	2,73 (9,1)	5,56	5,57
risperidon	2,69 (13,0)	2,52 (13,4)	5,57	5,60
kinidin	1,91 (16,0) / 1,93 (23,0)	1,78 (23,3)	5,73 / 5,73	5,76
lidokain	4,96 (20,5)	5,78 (16,7)	5,31	5,25
teofilin	1,22 (12,0)	0,789 (10,3)	5,92	6,11

Ker nismo uporabili optično čistega kinidina, sta v kromatogramu vidna dva vrhova, podali smo rezultate izračunane za oba vrhova posamično. Z UV-VIS spektroskopijo ločitev med izomeroma ni možna, zato je podana vrednost obeh izomerov skupaj.



Graf 2: Primerjava vrednosti $-\log P_e$ spojin, določenih s sistemom pION in Pre-coated sistemom (2. poskus PAMPA).

V grafu 2 so prikazani rezultati obeh sistemom *PAMPA*. Razlike med rezultati so bile pričakovane, saj sta imela sistema različen čas inkubacije (pION – 16 ur, Pre-coated – 4 ure) ter različni sestavi lipidne membrane (Pre-coated sistem je namenjen napovedovanju permeabilnosti skozi GIT, v sistemu pION smo uporabili lipid, ki je modificiran za boljše napovedovanje permeabilnosti skozi HEB) (17). Zaradi različnega načina nanosa lipida na filtre se lipidne membrane razlikujejo tudi v debelini. Lipid je na Pre-coated plošče nanešen strojno, membrane so tako tanjše, na plošče pION pa smo lipid nanesli ročno, zato so bile membrane debelejšje.

Pričakovali smo, da bomo s Pre-coated sistemom zaradi tanjših lipidnih membran in krajšega inkubacijskega časa dobili višje P_e oz. nižje $-\log P_e$ vrednosti kot s sistemom pION. Skozi tanjše membrane spojine lažje difundirajo, čas inkubacije, ki je daljši od časa potrebnega za doseg ravnotežja v sistemu, pa navidezno zniža vrednosti P_e . Vendar pri večini spojin opazimo, da so P_e določeni s sistemom pION večji od tistih določenih s Pre-coated sistemom, izjeme so le sumatriptan, piroksikam in teofilin. Možen razlog za nepričakovane rezultate so lahko različni akceptorski puffri, ki smo jih uporabili. V sistemu pION smo uporabili komercialno dostopen pufer, ki vsebuje PAS in tako vzpostavi *sink* pogoje (natančna kvalitativna in kvantitativna sestava uporabniku ni podana), v Pre-coated sistemu pa smo zaradi tanjših membran, ki so bolj občutljive na PAS, uporabili pufer PBS in tako ni bilo *sink* pogojev. *Sink* pogoji so tako lahko razlog za boljšo permeabilnost spojin v sistemu pION.

Pri primerjavi rezultatov obeh sistemov pa opazimo tudi očitno razliko vrednosti RSD enega in drugega sistema. Pri Pre-coated sistemu opazimo večjo variabilnost med posameznimi meritvami. Predvidevali bi, da se s strojnim nanosom lipida doseže bolj enakomerne debeline membran in s tem manjše razlike med posameznimi meritvami. Ker pa strojno naneseni lipidi ustvarijo tanjšo membrano, je ta bolj občutljiva in se hitreje poškoduje, kar bi lahko razložilo razliko v variabilnosti.

4.3. Tretji poskus

V tretjem poskusu smo želeli preveriti vpliv lipidne zmesi na določanje permeabilnosti modelnih spojin. V ta namen smo poleg že pripravljene lipidne zmesi uporabili še tri lipidne zmesi, ki smo jih pripravili sami. Vsako izmed zmesi smo testirali na šestih modelnih spojinah.

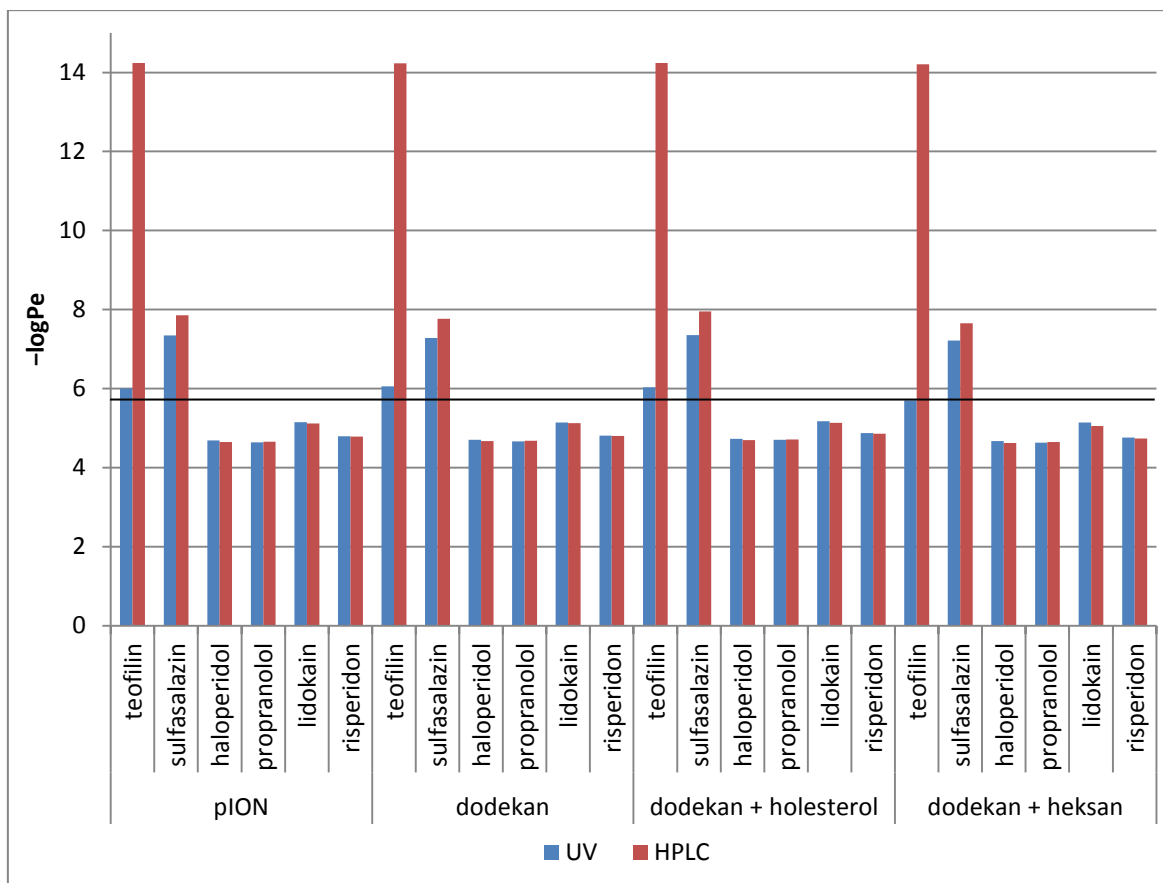
V preglednici XXII so prikazane povprečne koncentracije spojih v DR in AR po končani inkubaciji.

Preglednica XXII: Povprečne koncentracije spojin v raztopinah po inkubaciji sistema PAMPA v 3. poskusu (primerjava različnih lipidnih zmesi), določene s HPLC.

spojina (lipid)	C _D [μM] (RSD%)	C _A [μM] (RSD%)
teofilin (pION)	196,5 (0,4)	/
teofilin (dodekan)	196,2 (0,6)	/
teofilin (dodekan + holesterol)	198,2 (0,5)	/
teofilin (dodekan + heksan)	182,6 (0,6)	/
sulfasalazin (pION)	202,2 (0,3)	0,22 (17,9)
sulfasalazin (dodekan)	201,7 (0,6)	0,29 (8,9)
sulfasalazin (dodekan + holesterol)	202,7 (0,5)	0,20 (17,1)
sulfasalazin (dodekan + heksan)	202,9 (0,6)	0,43 (2,8)
haloperidol (pION)	43,7 (2,4)	176,6 (2,3)
haloperidol (dodekan)	55,8 (3,1)	207,2 (3,2)
haloperidol (dodekan + holesterol)	60,9 (1,7)	204,7 (0,4)
haloperidol (dodekan + heksan)	48,9 (1,8)	218,6 (1,0)
propranolol (pION)	43,5 (2,3)	172,4 (3,4)
propranolol (dodekan)	54,1 (0,6)	194,3 (1,4)
propranolol (dodekan + holesterol)	59,0 (1,8)	187,0 (1,3)
propranolol (dodekan + heksan)	48,2 (1,9)	199,4 (0,6)
lidokain (pION)	118,1 (1,0)	100,9 (5,4)
lidokain (dodekan)	121,2 (0,5)	98,7 (2,1)
lidokain (dodekan + holesterol)	122,5 (0,5)	98,1 (1,7)
lidokain (dodekan + heksan)	120,2 (0,6)	122,7 (0,5)
risperidon (pION)	72,7 (1,8)	176,1 (1,6)
risperidon (dodekan)	81,6 (2,0)	187,0 (2,5)
risperidon (dodekan + holesterol)	89,9 (1,9)	168,1 (3,0)
risperidon (dodekan + heksan)	69,7 (0,9)	202,1 (0,8)

V kromatogramih AR teofilina zaradi prenizkih koncentracij spojine ni bilo vidnih vrhov.

V grafu 3 so grafično prikazani rezultati 3. poskusa. Preglednici XXVII in XXVIII, v katerih so zbrani številčni rezultati poskusa, se nahajata v Prilogi.



Graf 3: Vrednosti $-\log P_e$ spojin, določene z 3. poskusom PAMPA (primerjava različnih lipidnih zmesi).

V graf 3 smo dodali črto pri vrednosti $-\log P_e$ 5,70, ki predstavlja kriterij za razvrstitev spojin med dobro in slabo permeabilne. Razvidno je, da smo z našim poskusom še vedno pravilno identificirali spojine kot dobro in slabo permeabilne spojine. V primeru teofilina pa smo tokrat v primerjavi z 2. poskusom določili nekoliko boljše permeabilnost teofilina. V primeru lipidne zmesi dodekana s heksanom tako vrednost $-\log P_e$ teofilina znaša 5,70 (UV-VIS spektroskopija), kar je ravno na meji.

V programu SPSS smo izvedli statistično analizo – test ANOVA. Za primerjavo vpliva lipidov smo uporabili dvostranski Dunnettov test, kjer so nam kot referenca služile vrednosti lipida pION HEB. V preglednici XXIII smo prikazali rezultate Dunnettovega testa za podatke, pridobljene z UV-VIS spektroskopijo. Povprečna razlika nam pove, za koliko se v povprečju razlikujejo vrednosti $\log(-\log P_e)$ izbranega lipida v primerjavi z vrednostmi referenčnega lipida. Razmerje med vrednostima $-\log P_e$ izbranega lipida in referenčnega lipida pa dobimo, če povprečno razliko antilogaritmiramo (10^X).

Preglednica XXIII: Rezultati dvostranskega Dunnettovega testa (analiza rezultatov 3. poskusa) pri katerem je referenca lipid pION HEB – UV-VIS spektroskopija.

lipid	p-vrednost	povprečna razlika $\log(-\log P_e)$	razmerje $-\log P_e$
dodekan	0,387	0,0007	1,002
dodekan + holesterol	0,000	0,0036	1,008
dodekan + heksan	0,000	-0,0060	0,986

Glede na izračunane p-vrednosti bi lahko rekli, da imata lipidni zmesi dodekana s holesterolom ali s heksanom statistično značilen vpliv na vrednosti $\log(-\log P_e)$ v primerjavi z referenčnim modelom, medtem ko lipidna zmes s samim dodekanom nima statistično značilnega vpliva. Statistično značilen vpliv je posledica predvsem majhne variabilnosti med štirimi paralelnimi meritvami, opravljenimi za vsako kombinacijo lipida in spojine. Ker pa smo test ANOVA izvajali z dvakratno logaritmiranimi vrednostmi, pridobljene p-vrednosti niso tako pomembne kot interpretacija rezultatov na osnovi razmerja $-\log P_e$ vrednosti.

Iz razmerja $-\log P_e$ je razvidno, da so razlike med $-\log P_e$ posameznih lipidnih zmesi zelo majhne. V primerjavi z lipidom pION so vrednosti ($-\log P_e$) lipidne zmesi dodekana v povprečju za 0,2% večje, vrednosti ($-\log P_e$) lipidne zmesi dodekana s holesterolom za 0,8% večje in vrednosti ($-\log P_e$) lipidne zmesi dodekana s heksanom za 1,4% manjše. V povprečju so najvišje vrednosti P_e pridobljene z lipidno zmesjo dodekana s heksanom, najmanjše vrednosti P_e pa z lipidno zmesjo dodekana s holesterolom. Vsa ta odstopanja pa pravzaprav predvsem potrjujejo, da so razlike med različnimi sestavami lipidov, resda statistično dokazljive, vendar nepomembne pri sami klasifikaciji spojin na CŽS+/-.

Rezultati Dunnettovega testa s podatki, pridobljenimi z metodo HPLC, so podobni. Tudi v tem primeru so razlike med rezultati zelo majhne, v povprečju so $-\log P_e$ posameznih lipidnih zmesi večje od vrednosti lipida pION za manj kot 1%. Z našimi lipidnimi zmesmi torej določimo nekoliko nižje vrednosti P_e . Absolutne razlike vrednosti $-\log P_e$ med lipidi pa so tako pri določitvah z UV-VIS spektroskopijo kot z metodo HPLC majhne in tudi pri pretvorbi v P_e nimajo bistvenega vpliva na napovedno vrednost PAMPA modela.

4.4. Četrty poskus

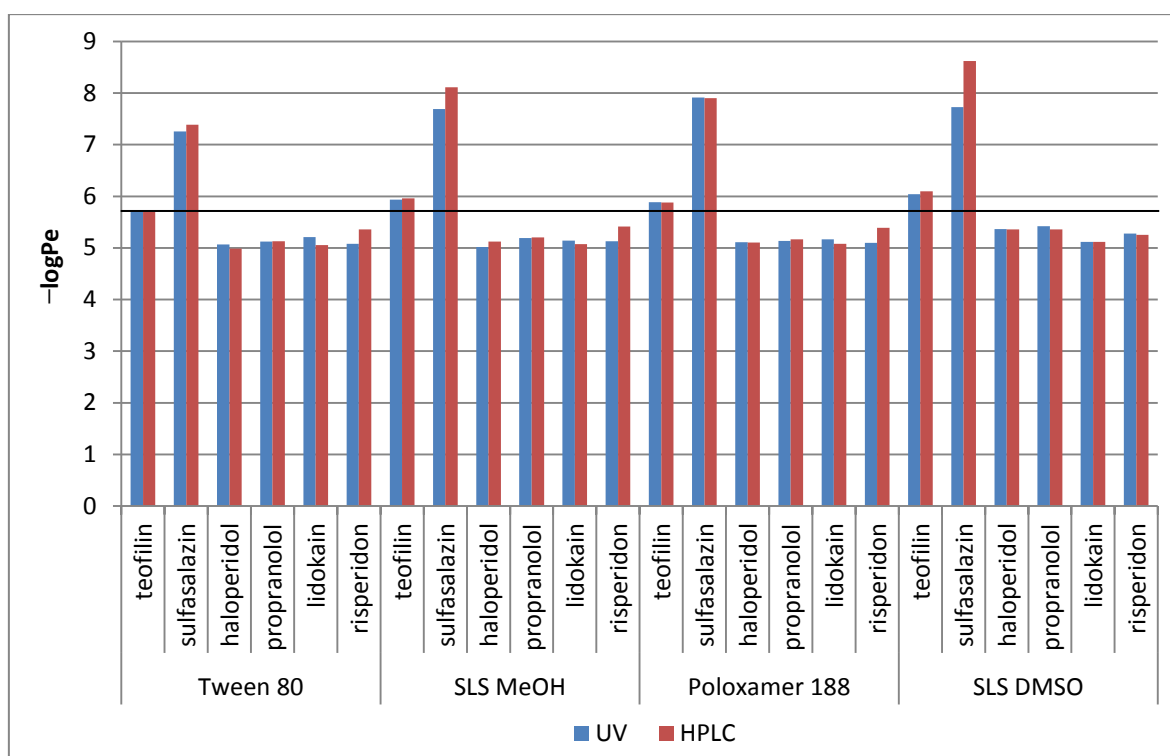
V našem zadnjem poskusu smo preverili vpliv štirih različnih pufrov na določanje permeabilnosti naših modelnih spojin. Pripravili smo štiri akceptorske pufre, ki so vsebovali različne PAS ali sotopila. Vsak pufer smo testirali na šestih modelnih spojinah.

Preglednica XXIV prikazuje povprečne koncentracije spojin v DR in AR po inkubaciji.

Preglednica XXIV: Povprečne koncentracije spojin v raztopinah po inkubaciji sistema PAMPA v 4. poskusu (primerjava različnih akceptorskih pufrov), določene s HPLC.

spojina (pufer)	C _D [μM] (RSD%)	C _A [μM] (RSD%)
teofilin (Tween 80)	201,2 (2,5)	37,5 (4,4)
teofilin (SLS MeOH)	212,2 (0,5)	21,1 (2,6)
teofilin (Poloxamer 188)	207,5 (0,2)	25,0 (8,5)
teofilin (SLS DMSO)	192,1 (1,6)	13,9 (3,6)
sulfasalazin (Tween 80)	217,8 (0,6)	0,79 (6,0)
sulfasalazin (SLS MeOH)	215,7 (0,7)	0,15 (13,4)
sulfasalazin (Poloxamer 188)	217,9 (1,1)	0,25 (26,5)
sulfasalazin (SLS DMSO)	203,9 (1,8)	0,04 (12,4)
haloperidol (Tween 80)	78,4 (6,8)	96,5 (3,5)
haloperidol (SLS MeOH)	72,4 (3,0)	55,9 (3,2)
haloperidol (Poloxamer 188)	90,8 (14,3)	79,8 (15,4)
haloperidol (SLS DMSO)	111,9 (9,5)	49,8 (20,1)
propranolol (Tween 80)	125,2 (1,0)	101,7 (1,2)
propranolol (SLS MeOH)	118,0 (1,7)	78,1 (2,1)
propranolol (Poloxamer 188)	133,0 (0,5)	98,1 (0,6)
propranolol (SLS DMSO)	134,2 (7,8)	59,0 (3,3)
lidokain (Tween 80)	121,8 (1,8)	122,9 (4,2)
lidokain (SLS MeOH)	121,9 (1,1)	115,8 (1,5)
lidokain (Poloxamer 188)	122,7 (2,1)	116,1 (1,8)
lidokain (SLS DMSO)	126,8 (4,7)	106,8 (4,2)
risperidon (Tween 80)	273,8 (0,8)	118,6 (0,8)
risperidon (SLS MeOH)	277,3 (1,6)	104,0 (0,2)
risperidon (Poloxamer 188)	284,8 (2,1)	115,8 (2,4)
risperidon (SLS DMSO)	153,5 (4,8)	88,4 (6,4)

Pri sulfasalazinu je prišlo v AR do zanimivega pojava, in sicer v kromatogramu sta bila vidna dva vrhova, ki sta imela bodisi nekoliko krajši bodisi nekoliko daljši retencijski čas v primerjavi z vrhom v referenčni raztopini. Absorpcijski spekter obeh vrhov je enak spektru vrha spojine iz referenčne raztopine. Iz tega sklepamo, da v obeh vrhovih nahaja sulfasalazin. Za izračun koncentracij smo zato uporabili seštevek površin obeh vrhov (kjer sta bila oba vrhova dovolj velika za integracijo površine). Predvidevamo, da bi do ločitve spojine na dva vrhova lahko prišlo zaradi interakcij spojine s PAS – npr. nastanka micelov.



Graf 4: Vrednosti $-\log P_e$ spojin, določene z 4. poskusom PAMPA (primerjava različnih akceptorskih pufrov).

V grafu 4 so grafično prikazani rezultati 4. poskusa. Preglednici XXIX in XXX, v katerih so predstavljeni številčni rezultati poskusa, se nahajata v Prilogi.

V programu SPSS smo izvedli statistično analizo – test ANOVA. Za primerjavo vpliva pufrov smo uporabili Bonferronijev test. V preglednici XXV smo prikazali rezultate Bonferronijevega testa za podatke pridobljene z UV-VIS spektroskopijo. Povprečna razlika nam pove, za koliko se v povprečju razlikujejo vrednosti $\log(-\log P_e)$ pufr A v primerjavi z vrednostmi pufr B. Razmerje $-\log P_e$ pa dobimo po antilogaritmiranju povprečne razlike in nam poda razmerje med vrednostmi $-\log P_e$ izbranih pufrov.

Preglednica XXV: Rezultati Bonferronijevega testa (analiza rezultatov 4. poskusa) – UV-VIS spektroskopija.

puffer A	puffer B	p-vrednost	povprečna razlika $\log(-\log P_e)$	razmerje $-\log P_e$
Tween 80	SLS DMSO	0,000	-0,0184	0,959
Tween 80	SLS MeOH	0,000	-0,0107	0,976
Poloxamer 188	SLS DMSO	0,000	-0,0094	0,979
Tween 80	Poloxamer 188	0,000	-0,0090	0,979
SLS MeOH	SLS DMSO	0,000	-0,0077	0,982
Poloxamer 188	SLS MeOH	1,000	-0,0017	0,996

Pri pregledu razmerij vrednosti $-\log P_e$ vidimo, da so razlike med vrednostmi zelo majhne. Največje razlike so med vrednostmi pufera s Tween 80 in pufera s SLS DMSO, ki se v povprečju razlikujejo za 4,1%, najmanjše pa med vrednostmi pufera s Poloxamer 188 in pufera s SLS MeOH, ki se v povprečju razlikujejo za 0,4%.

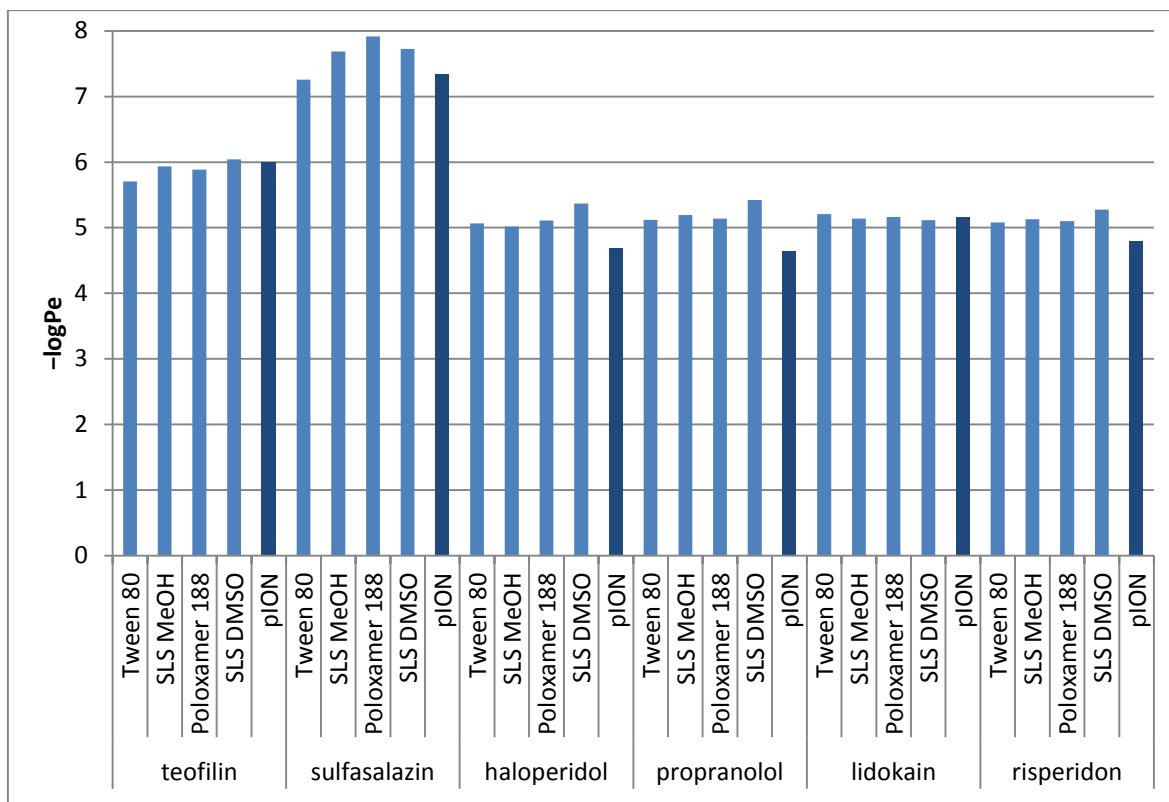
Analiza podatkov pridobljenih z metodo HPLC nam poda podobne rezultate. Največje razlike so med vrednostmi $-\log P_e$ pufera s Tween 80 in pufera s SLS DMSO in znašajo 5,3%, najmanjše pa med vrednostmi $-\log P_e$ pufera s Poloxamer 188 in pufera s SLS MeOH in znašajo 1,5%. V povprečju so najvišje vrednosti P_e pridobljene s pufrom, ki vsebuje Tween 80, najmanjše vrednosti P_e pa s pufrom, ki vsebuje SLS in DMSO. Absolutne razlike v vrednosti $-\log P_e$ med posameznimi akceptorskimi pufri so tako majhne in nimajo bistvenega vpliva na napovedovanje permeabilnosti spojin.

Iz grafa 4, kamor smo dodali še mejno vrednost $-\log P_e$, je razvidno, da je še vedno možno pravilno razvrstiti testirane spojine med CŽS+ in CŽS-. Vendar pa smo tudi v 4. poskusu teofilinu določili nekoliko nižje $-\log P_e$, ki so blizu mejne vrednosti 5,70. Poleg tega pa smo opazili, da imajo dobro permeabilne spojine haloperidol, propranolol in risperidon v 4. poskusu določene nekoliko višje vrednosti $-\log P_e$ kot pri prejšnjih poskusih. V programu SPSS smo zato v okviru testa ANOVA z dvostranskim Dunnettovim testom preverili razlike med rezultati 4. poskusa in 3. poskusa z lipidom pION (referenca). Analizirali smo samo rezultate pridobljene z UV-VIS spektroskopijo, rezultati pa so prikazani v preglednici XXVI.

Preglednica XXVI: Rezultati analize z Dunnettovim testom – primerjava rezultatov 4. poskusa z rezultati 3. poskusa (lipid pION – referenčna vrednost).

pufer	p-vrednost	povprečna razlika $\log(-\log P_e)$	razmerje $-\log P_e$
Tween 80	0,000	0,0132	1,031
SLS MeOH	0,000	0,0238	1,056
Poloxamer 188	0,000	0,0221	1,052
SLS DMSO	0,000	0,0316	1,075

Rezultati Dunnettovega testa so pokazali statistično signifikantne razlike med vrednostmi $\log(-\log P_e)$ vseh štirih akceptorskih pufrov v primerjavi z vrednostmi lipida pION iz 3. poskusa. V vseh štirih primerih so bile določene višje vrednosti $-\log P_e$ v primerjavi z lipidom pION, razlike pa znašajo med 3,1 in 7,5%. Z vidika določanja P_e so te razlike sicer majhne, vendar je problematično zmanjšanje razlik med P_e dobro in slabo permeabilnih spojin, ki je prikazano na grafu 5. Tu je vidno, da se vrednosti $-\log P_e$ dobro permeabilnih spojin bližajo mejni vrednosti 5,70. Zmanjšanje razlik med P_e lahko namreč onemogoči identifikacijo CŽS+ in CŽS- spojin s PAMPA modelom. Sprememba katerega parametra je povzročila zmanjšanje razlik P_e je težko oceniti, ker smo v 4. poskusu poleg različnih akceptorskih pufrov uporabili tudi drugo lipidno zmes v primerjavi s 3. poskusom. Sestave lastnih lipidnih zmesi, uporabljenih v 3. in 4. poskusu pa so bile vseeno podobne. Ker pri nobeni v 3. poskusu uporabljeni lipidni zmesi ni vidnega tako očitnega zmanjšanja, tako lahko sklepamo, da so za to odgovorni akceptorski pufri uporabljeni v 4. poskusu.



Graf 5: Primerjava vrednosti $-\log P_e$ spojin, določenih s 4. poskusov, z vrednostmi $-\log P_e$ spojin, določenih s 3. poskusom (lipid pION).

4.5. Primerjava analiznih metod

Skozi naše delo smo ugotovili, da obstajajo razlike v rezultatih, ki smo jih pridobili z UV-VIS spektroskopijo in z metodo HPLC. Največje razlike smo opazili pri furosemidu, sumatriptanu, sulfasalazinu, kinidinu ter teofilinu. Pri teh spojinah v kromatogramih ni bilo vidnih vrhov, ker so bile koncentracije v AR po inkubaciji prenizke. Za izračun P_e smo privzeli vrednost koncentracij $0 \mu\text{M}$ in zato smo dobili vrednosti P_e , ki so zelo nizke v primerjavi z vrednostmi, ki smo jih dobili z UV-VIS spektroskopijo. V primeru kinidina (sistem pION) je možno, da vrhovi spojine niso bili vidni tudi zaradi neustrezne retencije spojine na koloni. Z obema metodama pa smo lahko pravilno razvrstili spojine med CŽS+ oz. CŽS-.

Kot del testa ANOVA smo izvedli tudi medsebojno primerjavo rezultatov, pridobljenih z metodama UV-VIS spektroskopije in HPLC (*Contrasts – Simple*). Analiza rezultatov 3. poskusa je pokazala, da razlika med vrednostmi $\log(-\log P_e)$ UV-VIS spektroskopije in vrednostmi $\log(-\log P_e)$ HPLC znaša $-0,0667$, razmerje med vrednostmi $-\log P_e$ ene in druge metode pa je $0,858$. To pomeni, da so v povprečju vrednosti $-\log P_e$ določene z UV-

VIS spektroskopije za 14,2% manjše od vrednosti $-\log P_e$ določene z metodo HPLC. V primeru rezultatov 4. poskusa znaša povprečna razlika $-0,005$, razmerje med vrednostmi $-\log P_e$ pa 0,989. Vrednosti $-\log P_e$ pridobljene z UV-VIS spektroskopijo so tako v povprečju za 1,1% manjše od vrednosti pridobljenih z metodo HPLC. V obeh poskusih pa smo z UV-VIS spektroskopijo določili nekoliko višje P_e spojin kot z metodo HPLC.

PAMPA je presejalna metoda visoke zmogljivosti, katere namen je identifikacija dobro (pasivno) permeabilnih spojin. Za ta namen je pomembno, da z izbrano analizo metodo pridobimo P_e na podlagi katerih spojine pravilno razvrstimo med dobro in slabo permeabilne spojine. Kromatografska metoda je bolj občutljiva in specifična od UV-VIS spektroskopije. Dodatna prednost je, da se na kromatografski koloni morebitne nečistote, ki so morebiti še prisotne v spojini po končani sintezi, ločijo od spojine in ne vplivajo na analizo. Njena slabost je časovna potratnost analize raztopin, poleg tega je potrebno za vsako spojino posebej razviti metodo za analizo. Z vidika visoke zmogljivosti je torej UV-VIS spektroskopija primernejša, saj je analiza krajša in ne zahteva razvoja metode za posamezne spojine. Edini pogoj za uporabo UV-VIS spektroskopije (tudi kot sklopljene metode s HPLC) je, da testirane spojine absorbirajo svetlobo v UV-VIS območju spektra, problem pa lahko predstavljajo prisotne nečistote, ki absorbirajo svetlobo pri enakih valovnih dolžinah kot testirane spojine (te se pri kromatografiji ločijo od spojine). V literaturi je opisana tudi uporaba UPLC-MS/MS z generično metodo (2,5). V tem primeru razvoj metod za posamezne spojine ni potreben, masni spektrometer pa omogoča občutljivejšo detekcijo kot UV-VIS spektrofotometer in večjo selektivnostjo kot HPLC-UV. Analiza vzorcev je daljša kot pri uporabi UV-VIS-čitalca, dodatna slabost metode pa je visoka cena.

Na podlagi rezultatov 2. poskusa smo ugotovili, da smo lahko z obema ustrezno klasificirali spojine, rezultati 3. in 4. poskusa pa so pokazali, da so razlike med vrednostmi, pridobljenimi z eno in drugo metodo zelo majhne in ne vplivajo na končno klasifikacijo permeabilnostnih lastnosti testiranih spojin (razlike v vrednostih so pri rezultatih 3. poskusa večje zaradi velikih razlik v P_e teofilina). Obe metodi sta torej primerni za analizo raztopin po končani inkubaciji sendviča *PAMPA*, za rutinsko uporabo pa je zaradi krajšega časa potrebnega za izvedbo analize primernejša UV-VIS spektroskopija.

5. SKLEP

V naši magistrski nalogi smo preverili vpliv sprememb nekaterih izmed parametrov *PAMPA* modela na določitev permeabilnosti modelnih spojin in pokazali ustreznost uporabe pripravljenih lipidnih zmesi v poskusih *PAMPA*.

V prvem delu smo ugotovili, da se naše vrednosti $-\log P_e$ ne razlikujejo bistveno od referenčnih vrednosti proizvajalca. Na podlagi naših rezultatov smo v primerjavi s podatki iz literature tudi pravilno razvrstili modelne spojine med CŽS+ in CŽS- spojine.

V drugem delu smo primerjali tri lipidne zmesi, ki smo jih pripravili sami, z lipidom proizvajalca pION. Vrednosti $-\log P_e$, določene s posameznimi lipidi, se sicer razlikujejo, vendar so razlike le nekaj odstotne in nimajo vpliva na končno klasifikacijo spojin. Zaradi majhnih razlik med lipidi bi tako pri nadaljnjem delu lahko namesto lipida pION uporabili naše lipidne zmesi, ki so cenovno ugodnejše. Primerjali smo tudi štiri različne akceptorske pufre. Tudi v tem primeru so razlike med pufri majhne in nimajo vpliva na določitev permeabilnosti. Ob primerjavi rezultatov različnih akceptorskih raztopin smo opazili zmanjšanje razlik med permeabilnostnimi koeficienti CŽS+ in CŽS- spojin, ki bi lahko ob uvedbi dodatnih sprememb parametrov poskusa onemogočilo ločitev spojin na tiste z dobro in tiste s slabo permeabilnostjo. V prihodnje bo zato potrebno še dodatno raziskati vzroke za to zmanjšanje razlik in preizkusiti še druge kombinacije PAS in sotopil v akceptorskih pufrih.

Medsebojna primerjava UV-VIS spektroskopije in HPLC, ki je pokazala, da so razlike med rezultati pridobljenimi z različnima metodama majhne in da je z obema metodama možno pravilno določiti permeabilnost spojin. Tako lahko zaključimo, da je UV-VIS spektroskopija ustrezna za uporabo pri analizi vzorcev poskusov *PAMPA*. V primerjavi s HPLC je enostavnejša za uporabo in hitrejša, zato je kljub manjši občutljivosti in specifičnosti primernejša za rutinsko uporabo.

Lipidna membrana in akceptorski pufer pa sta le dva izmed številnih dejavnikov, ki lahko vplivajo na določitev permeabilnosti spojin. V prihodnjih poskusih bi se tako lahko posvetili vrednotenju vpliva inkubacijskega časa, mešanja in sestavi donorskih pufrov.

6. LITERATURA

- (1) Avdeef A: *Absorption and drug development: solubility, permeability, and charge state*. 2. izdaja. John Wiley & Sons, Inc, Hoboken, New Jersey. 2012: 320, 472, 575-580, 633-634.
- (2) Mensch J, Melis A, Mackie C, Verreck G, Brewster ME, Augustijns P: *Evaluation of various PAMPA models to identify the most discriminating method for the prediction of BBB permeability*. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 74, 2010: 495-502.
- (3) Bicker J, Alves G, Fortuna A, Falcão A: *Blood-brain barrier models and their relevance for a successful development of CNS drug delivery systems: A review*. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 87, 2014: 409-432.
- (4) Carrara S, Reali V, Misiano P, Dondio G, Bigogno C: *Evaluation of in vitro brain penetration: Optimized PAMPA and MDCKII-MDR1 assay comparison*. *International Journal of Pharmaceutics*, 345, 2007: 125-133.
- (5) Mensch J, Jaroskova LL, Sanderson W, Melis A, Mackie C, Verreck G, Brewster ME, Augustijns P: *Application of PAMPA-models to predict BBB permeability including efflux ratio, plasma protein binding and physicochemical parameters*. *International Journal of Pharmaceutics*, 395, 2010: 182-197.
- (6) Di L, Kerns EH, Fan K, McConnell OJ, Carter GT: *High throughput artificial membrane permeability assay for blood-brain barrier*. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 38, 2003: 223-232.
- (7) Serlin A, Shelef I, Knyazer B, Friedman A: *Anatomy and physiology of the blood-brain barrier*. *Seminars in Cell & Developmental Biology*, 38, 2015: 2-6.
- (8) Müller J, Esső K, Dargó G, Könczöl Á, Balogh GT: *Tuning the predictive capacity of the PAMPA-BBB model*. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 79, 2015: 53-60.
- (9) Abbott NJ: *Prediction of blood-brain barrier permeation in drug discovery from in vivo, in vitro and in silico models*. *Drug Discovery Today*, 1, 2004: 407-416.

- (10) Aulton ME, Taylor KMG: *Aulton's Pharmaceutics: The Design and Manufacture of Medicines*. 4. izdaja. Elsevier Ltd., 2013: 306.
- (11) <https://www.pion-inc.com/Instrumentation/Permeability/en>, dostopano: 25.5.2018.
- (12) Bicker J, Alves G, Fortuna A, Soares-da-Silva P, Falcão A: *A new PAMPA model using an in-house brain lipid extract for screening the blood-brain barrier permeability of drug candidates*. *International Journal of Pharmaceutics*, 501, 2016: 102-111.
- (13) Tsinman O, Tsinman K, Sun N, Avdeef A: *Physicochemical Selectivity of the BBB Microenvironment Governing Passive Diffusion – Matching with a Porcine Brain Lipid Extract Artificial Membrane Permeability Model*. *Pharmaceutical Research*, 28 (2), 2011: 337-363.
- (14) Mahar Doan KM, Humphreys, JE, Webster LO, Wring SA, Shampine LJ, Serabjit-Singh CJ, Adkison KK, Polli JW: *Passive Permeability and P-Glycoprotein Mediated Efflux Differentiate Central Nervous System (CNS) and Non-CNS Marketed Drugs*. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 303, 2002: 1092-1037.
- (15) Di L, Kerns E H, Bezar I F, Petusky S L, Huang Y: *Comparison of Blood–Brain Barrier Permeability Assays: In Situ Brain Perfusion, MDRI-MDCKII and PAMPA-BBB*. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 98, 2009: 1980-1991.
- (16) Navodila proizvajalca: Pion Inc.: *Instruction Manual for PAMPA Explorer Permeability Analyzer*. 4.16. 2013.
- (17)
https://www.corning.com/media/worldwide/cls/documents/CLS_DL_GT_023_REV1.pdf, dostopano: 13.8.2018.

7. PRILOGA

Preglednica XXVII: Rezultati 3. poskusa *PAMPA* (primerjava lipidnih zmesi): permeabilnostni koeficienti P_e spojin.

	HPLC				UV-VIS			
	pION	dodekan	dodekan + holesterol	dodekan + heksan	pION	dodekan	dodekan + holesterol	dodekan + heksan
spojina	P_e ($\cdot 10^{-6}$ cm/s) (RSD%)							
teofilin	$5,82 \cdot 10^{-9}$ (0,4)	$5,82 \cdot 10^{-9}$ (0,5)	$5,76 \cdot 10^{-9}$ (0,5)	$6,26 \cdot 10^{-9}$ (0,6)	0,998 (7,6)	0,882 (7,9)	0,930 (6,6)	1,99 (5,4)
sulfasalazin	0,0141 (20,0)	0,0170 (0,6)	0,0113 (0,5)	0,0225 (0,7)	0,0454 (3,3)	0,0531 (7,6)	0,0438 (6,3)	0,0612 (3,9)
haloperidol	22,4 (0,7)	21,4 (0,9)	20,1 (1,1)	23,7 (0,7)	20,6 (0,6)	19,7 (1,1)	18,7 (1,4)	21,2 (1,3)
propranolol	22,1 (1,0)	20,9 (1,1)	19,5 (1,6)	22,7 (1,3)	22,7 (0,6)	21,8 (5,0)	19,9 (1,9)	23,2 (0,4)
lidokain	7,72 (3,7)	7,43 (1,5)	7,33 (1,4)	8,89 (0,5)	7,06 (4,3)	7,25 (5,5)	6,71 (7,4)	7,14 (3,2)
risperidon	16,5 (0,9)	15,9 (3,0)	13,9 (3,4)	18,4 (1,0)	15,9 (1,0)	15,3 (3,3)	13,2 (3,9)	17,3 (1,0)

Preglednica XXVIII: Rezultati 3. poskusa PAMPA (primerjava lipidnih zmesi): vrednosti $-\log P_e$ spojin.

	HPLC				UV-VIS			
	pION	dodekan	dodekan + holesterol	dodekan + heksan	pION	dodekan	dodekan + holesterol	dodekan + heksan
spojina	$-\log P_e$							
teofilin	14,24	14,24	14,24	14,21	6,00	6,06	6,03	5,70
sulfasalazin	7,86	7,77	7,95	7,65	7,34	7,28	7,36	7,21
haloperidol	4,65	4,67	4,70	4,63	4,69	4,71	4,73	4,68
propranolol	4,65	4,68	4,71	4,65	4,64	4,66	4,70	4,64
lidokain	5,12	5,13	5,14	5,05	5,15	5,14	5,18	5,15
risperidon	4,79	4,80	4,86	4,74	4,80	4,81	4,88	4,76

Preglednica XXIX: Rezultati 4. poskusa PAMPA (primerjava akceptorskih pufrov): permeabilnostni koeficienti P_e spojin.

	HPLC				UV-VIS			
	Tween 80	SLS (MeOH)	Poloxamer 188	SLS (DMSO)	Tween 80	SLS (MeOH)	Poloxamer 188	SLS (DMSO)
spojina	$P_e \cdot 10^{-6} \text{ cm/s}$ (RSD%)							
teofilin	2,00 (1,8)	1,10 (2,7)	1,32 (8,0)	0,806 (4,3)	1,97 (4,8)	1,17 (2,3)	1,31 (10,1)	0,910 (5,5)
sulfasalazin	0,0414 (6,2)	0,0130 (25,3)	0,00781 (13,2)	0,00244 (14,2)	0,0549 (5,8)	0,0214 (26,1)	0,0147 (69,4)	0,0190 (13,4)
haloperidol	10,3 (2,5)	7,11 (0,7)	7,89 (1,6)	4,45 (16,5)	8,63 (2,8)	6,98 (6,7)	7,78 (1,8)	4,33 (16,8)
propranolol	7,42 (0,3)	6,26 (0,4)	6,85 (0,3)	4,43 (6,8)	7,57 (0,4)	6,43 (1,6)	7,32 (0,7)	3,81 (7,2)
lidokain	8,81 (1,8)	8,40 (0,8)	8,38 (1,4)	7,66 (6,5)	6,20 (1,3)	7,28 (4,3)	6,85 (5,2)	7,66 (7,1)
risperidon	4,35 (0,1)	3,82 (1,4)	4,11 (0,3)	5,57 (5,3)	8,31 (0,2)	7,47 (0,8)	7,97 (1,3)	5,33 (4,5)

Preglednica XXX: Rezultati 4. poskusa PAMPA (primerjava akceptorskih pufrov): vrednosti $-\log P_e$ spojin.

	HPLC				UV-VIS			
	Tween 80	SLS (MeOH)	Poloxamer 188	SLS (DMSO)	Tween 80	SLS (MeOH)	Poloxamer 188	SLS (DMSO)
spojina	$-\log P_e$							
teofilin	5,70	5,96	5,88	6,10	5,71	5,94	5,89	6,04
sulfasalazin	7,39	8,11	7,90	8,62	7,26	7,69	7,92	7,73
haloperidol	4,99	5,13	5,11	5,36	5,07	5,02	5,11	5,37
propranolol	5,13	5,20	5,17	5,36	5,12	5,19	5,14	5,42
lidokain	5,06	5,08	5,08	5,12	5,21	5,14	5,17	5,12
risperidon	5,36	5,42	5,39	5,26	5,08	5,13	5,10	5,28