

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO

ANDREJA LENART (MRAVLJAK)

**UPORABA GLUTATHIONIJSKIH KONJUGATOV KOT
MRP2 OZNAČEVALCEV NA IZOLIRANEM
ODSEKU TANKEGA ČREVESA
PODGANE**

**THE USE OF GLUTATHIONE CONJUGATES AS
MRP2 MARKERS ON ISOLATED SEGMENT OF
RAT SMALL INTESTINE**

DIPLOMSKA NALOGA

Ljubljana, 2008

Diplomsko nalogo sem opravljala na Fakulteti za farmacijo (Katedra za biofarmacijo in farmakokinetiko) pod mentorstvom prof. dr. Albina Kristla, mag. farm. ter somentorstvom asist. dr. Simona Žaklja, mag. farm.

Za strokovno pomoč in nasvete pri nastajanju diplomske naloge se zahvaljujem mentorju in somentorju. Posebna zahvala gre Daretu, ki je ves čas s svojimi izkušnjami in predlogi potrpežljivo spremljal moje delo. Hvala tudi ostalim sodelavcem katedre.

Posebej hvaležna sem svoji družini. Ata in mama, hvala, da sta mi v vseh teh letih šolanja stala ob strani. Ket, hvala za razumevanje in vse spodbude.

In možu. Slavkej, dovolj je, da si z mano.

IZJAVA

Izjavljam, da sem diplomsko nalogo izdelala samostojno pod mentorstvom prof. dr. Albina Kristla, mag. farm. ter somentorstvom asist. dr. Simona Žaklja, mag. farm.

Ljubljana, 2008

Predsednik diplomske komisije: prof. dr. Slavko Pečar, mag. farm.

Članica diplomske komisije: izr. prof. dr. Mirjana Gašperlin, mag. farm.

VSEBINA

VSEBINA	II
1 POVZETEK	1
2 SEZNAM OKRAJŠAV	2
3 UVOD	4
3.1 TANKO ČREVO	4
3.1.1 ENTEROCIT	5
3.1.2 NAČINI PREHODA	6
3.2 VREDNOTENJE HITROSTI ABSORPCIJE	10
3.3 MRP	10
3.3.1 EFLUKSNI SISTEMI	11
3.3.2 MRP2	13
3.3.3 SUBSTRATI MRP2	13
3.4 PRESNOVNA SPOSOBNOST SLUZNICE	14
3.4.1 GLUTATION - STRUKTURA IN DELOVANJE	14
3.4.2 GLUTATION-S-TRANSFERAZA	16
3.4.3 ESTERAZE	17
3.5 KONJUGATI GLUTATIONA	17
3.5.1 ZAHTEVE ZA OZNAČEVALCE	17
3.5.2 PREISKOVANE SPOJINE	20
4 NAMEN DELA	23
5 MATERIALI IN METODE	24
5.1 REAGENTI IN TOPILA	24
5.1.1 ZA SINTEZO IN ANALIZO KONJUGATOV	24
5.1.2 ZA PRIPRAVO IN SHRANJEVANJE ELEKTROD	24
5.1.3 ZA PERMEABILNOSTNE POSKUSE	24
5.2 RAZTOPINE	25
5.2.1 RAZTOPINE ZA SINTEZO IN ANALIZO KONJUGATOV	25
5.2.2 OSNOVNE RAZTOPINE	25
5.2.3 AKCEPTORSKE RAZTOPINE	25
5.2.4 DONORSKE RAZTOPINE	26
5.3 APARATURE	26
5.3.1 PRI SINTEZAH	26
5.3.2 PRI PERMEABILNOSTNIH POSKUSIH	26
5.3.3 ZA ANALIZO	26
5.4 METODE	27
5.4.1 UPORABA RAČUNALNIŠKIH PROGRAMOV	27
5.4.2 IZRAČUN PORAZDELITVENEGA KOEFICIENTA	27
5.4.3 PRIPRAVA IN VZDRŽEVANJE ELEKTROD	27
5.4.4 PRIPRAVA EASY MOUNT DIFUZIJSKIH CELIC IN VCC MC8	28
5.4.5 PRIPRAVA TKIVA	29

5.4.6	PROTOKOL POSKUSA	29
5.4.7	OCENJEVANJE VITALNOSTI TKIVA	30
5.4.8	ANALIZA PREISKOVANIH SPOJIN	31
5.4.9	IZRAČUN PERMEABILNOSTNEGA KOEFICIENTA IN PRETOKA (FLUKSA)	32
5.4.10	STATISTIČNE METODE	33
6	REZULTATI IN RAZPRAVA	35
6.1	IN SILICO PREDVIDEVANJA FIZIKALNO-KEMIJSKIH LASTNOSTI MOŽNIH OZNAČEVALCEV	36
6.1.1	VREDNOTENJE LOGD	37
6.1.2	VREDNOTENJE NEKATERIH DRUGIH FIZIKALNO-KEMIJSKIH LASTNOSTI, KI VPLIVAJO NA PREHOD	39
6.1.3	PRIMERJAVA LOGD GLEDE NA OBE IN SILICO METODE	41
6.2	IN VITRO POSKUSI V DVOPROSTORNIH DIFUZIJSKIH CELICAH S CDNB IN ET-DNP-SG	43
6.2.1	POSKUS CDNB MANITOL/GLUKOZA	45
6.2.2	POSKUS CDNB GLUKOZA/GLUKOZA	46
6.2.3	POSKUS ET-DNP-SG MANITOL/GLUKOZA	49
6.3	IN VITRO POSKUSI V DVOPROSTORNIH DIFUZIJSKIH CELICAH Z NEM-SG IN ET-NEM-SG	51
6.3.1	POSKUS NEM-SG MANITOL/GLUKOZA	53
6.3.2	POSKUS NEM-SG GLUKOZA/GLUKOZA	54
6.3.3	POSKUS ET-NEM-SG MANITOL/GLUKOZA	55
6.3.4	POSKUS ET-NEM-SG GLUKOZA/GLUKOZA	56
6.4	PRIMERJAVA SUBSTRATOV	58
7	SKLEP	64
8	LITERATURA	65

1 POVZETEK

V diplomski nalogi smo raziskovali vpliv lastnosti glutationskih konjugatov, ki naj bi bili dobri substrati za apikalni prenašalec MRP2. Želeli smo ugotoviti, kateri substrati so primerni označevalci za MRP2 prenašalce. Pri tem smo uporabili različne metode dela, od *in silico* primerjav fizikalno-kemijskih lastnosti z uporabo računalniških programov do *in vitro* permeabilnostnih poskusov na podganjem jejunumu ter vse do opisa primerjav preiskovanih spojin glede na postavljene zahteve.

Izbrali smo nekaj substratov, ki bi lahko bili ustrezni označevalci za MRP2. Po začetnih »presejalnih testih« smo lahko na podlagi ugotovljenih neustreznih fizikalno-kemijskih lastnosti ter neugodnih kriterijev, zahtevanih za označevalce, izključili kar nekaj spojin. Iz prvotnega nabora (prekursorji, estri in konjugati glutationa) smo za permeabilnostne poskuse, ki smo jih izvajali v difuzijskih celicah na podganjem jejunumu, na koncu uporabili za nas najbolj primerne štiri.

Ugotovili smo, da mora označevalec ustrezati mnogim kriterijem. Pomembno je, da ima ugodno lipofilnost za prehod skozi membrano enterocita. Nadalje je potrebno, da zadosti kriterijem pravila petic (pravilo Lipinskega) ter dodatnim dejavnikom, ki so povezani s strukturnimi lastnostmi spojine (polarna površina molekule, število rotacijskih vezi, volumen molekule). Zagotoviti je treba tudi, da je spojina, ki prehaja v celico, dobro topna, stabilna in da ni toksična. Navsezadnje ni nepomembno, da je priprava in analiza izbranih spojin čim bolj preprosta in ekonomična.

Po vseh opravljenih raziskavah lahko zaključimo, da je med izbranimi spojinami (prekursorji, konjugati in estri glutationa) najbolj uporaben prekursor 1-kloro-2,4-dinitrobenzen. Le-ta je v ustreznih mejah večine postavljenih kriterijev, prav tako pa sam prehod skozi enterocit kaže, da naj bi bil povezan z MRP2 prenašalcem, saj v veliki meri prehaja s serozne na mukozno stran.

2 SEZNAM OKRAJŠAV

ABC	ATP vezoča skupina (angl. ATP binding cassette)
ATP	adenozin trifosfat
CDNB	kloro-2,4-dinitrobenzen
CFPN	cefcapen (peroralni antibiotik, cefalosporin)
cMOAT	kanalikularni multispecifični organski anionski prenašalec (angl. canalicular multispecific organic anion transporter)
cMRP	kanalikularni protein, povezan z rezistenco proti več učinkovinam (angl. canalicular MRP)
D	distribucijski oziroma navidezni porazdelitveni koeficient
DNP-SG	2,4-dinitrofenil-S-glutation
EA	etakrinska kislina
EA-SG	konjugat etakrinske kisline z glutationom
et-DNP-SG	...	etilni ester 2,4-dinitrofenil-S-glutationa
et-GSH	etilni ester glutationa
et-NEM-SG	...	etilni ester N-etil maleimid glutationa
EV	uporabimo t-test z enakima variancama
GGT	γ -glutamil transferaza
GIT	gastro-intestinalni trakt
GLU	glukoza
GSH	glutation (tiolna molekula, prisotna v telesnih tkivih => G-SH)
GSSG	oksidiran glutation
GST	glutation-S-transferaza
HPLC	tekočinska kromatografija visoke ločljivosti (angl. high performance liquid chromatography)
Isc	kratkostični tok
J	pretok (angl. flux)
MAN	manitol
MDR	protein rezistence na več učinkovin (angl. multidrug resistance protein)
MRP	protein, povezan z rezistenco na več učinkovin (angl. multidrug resistance associated protein)

M-S	prehod v smeri z mukozne na serozno stran
NEM	N-etil maleimid
NEM-SG	...	N-etil maleimid glutation
NS	statistično neznačilna sprememba (ni signifikantno)
NPM	N-(1-pirenil) maleimid
NPM-SG	...	N-(1-pirenil) maleimid glutation
P	pravi porazdelitveni koeficient
Papp	navidezni permeabilnostni koeficient
Pd	električni potencial
PEG	polietilenglikol
P-gp	P-glikoprotein
PSA	skupna polarna površina molekule (angl. polar surface area)
RSD	relativna standardna deviacija
RV	uporabimo t-test z različnima variancama
S	statistično značilna sprememba (signifikantno)
S-M	prehod s serozne na mukozno stran
TER	transtktivna električna upornost (angl. transtissue electrical resistance)
VCC MC8	...	osemkanalni napetostni vir (angl. voltage clamp)

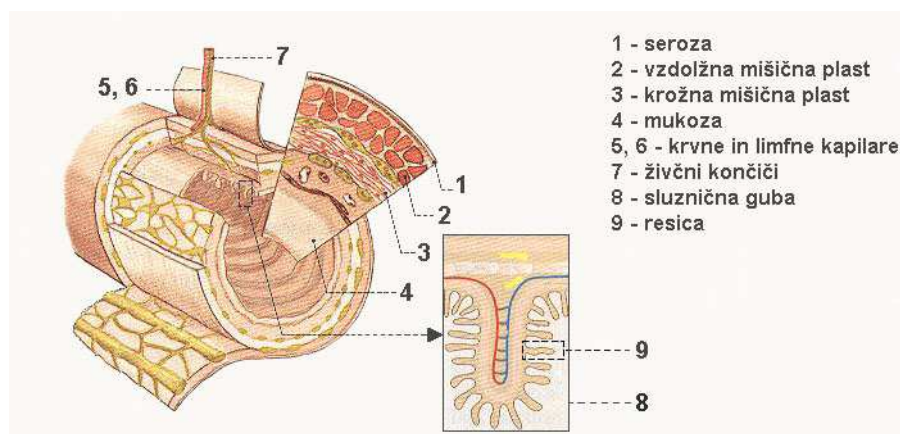
3 UVOD

Permeabilnost je zelo pomemben parameter v fazi preučevanja učinkovin, saj je to tisti parameter, ki je skupaj s topnostjo bistvenega pomena za absorpcijo. Absorpcija učinkovin iz prebavnega trakta pa je poleg presnove najpomembnejši dejavnik, ki določa biološko uporabnost učinkovin po peroralni aplikaciji (1).

Pri napovedovanju absorpcije iz lumna črevesa v krvni obtok v človeškem organizmu se zaradi etičnih razlogov pogosto poslužujemo različnih modelov, na primer celičnih kultur, tkivnih kultur ali živalskih modelov. V različnih študijah absorpcije na živalih raziskovalci uporabljajo miši, podgane, pse ali druge eksperimentalne živali oziroma njihove organe. V diplomskem delu smo raziskovali absorpcijo na izoliranem segmentu tankega črevesa podgane.

3.1 TANKO ČREVO

Tanko črevo človeka je sestavljeno iz treh odsekov: duodenuma, jejunuma in ileuma. V kratek dvanajstnik vstopajo izvodila iz jeter in trebušne slinavke. Jejunum in ileum sta daljša odseka; jejunum je širši in nekoliko krajši kot ileum ter ima debelejšo steno. V tankem črevesu sokovi trebušne slinavke, žolča in črevesni sokovi razgrajujejo hrano na osnovne gradnike (monosaharide, aminokisliline, dipeptide, monogliceride in proste maščobne kisline), ki poleg vode in vitaminov prehajajo v krvni obtok in od tam v tkiva. Učinkovitejšo absorpcijo omogoči velika površina sluznice, ki jo ustvarijo sluznične gube, resice in mikrosesice (slika 1). Površina tankega črevesa tako pri odraslem človeku doseže okoli 200 m² (2).



Slika 1: Sestava stene tankega črevesa (4)

Glavni funkciji tankega črevesa sta razgradnja zaužitih snovi v lumnu ter absorpcija elektrolitov, vode in hranilnih snovi skozi sluznico. Sekundarna, vendar prav tako pomembna vloga, je izločanje škodljivih snovi in njihovih metabolitov iz telesa. V veliki meri se izločajo ksenobiotiki, ki se običajno predhodno metabolizirajo (3). Tanko črevo je tudi najpomembnejše mesto za absorpcijo učinkovin v gastro-intestinalnem traktu (GIT). Pri proučevanju absorpcije pogosto opravljamo poskuse na podganah ali drugih poskusnih živalih. Rezultate nato ekstrapoliramo na človeka. Za pravilno napoved parametrov moramo zato pazljivo obravnavati vsako vrsto posebej. GIT človeka in podgane sta si na mikroskopskem področju morfološko zelo podobna, vendar so prisotne razlike. Relativna absorpcijska površina pri človeku je večja ter zmožna hitrejše absorpcije in v večjem obsegu kot pri podgani. Razlika je tudi v najdaljšem odseku, kjer se vrši absorpcija. Pri človeku je to ileum, medtem ko pri podgani najdaljši del predstavlja jejunum (2).

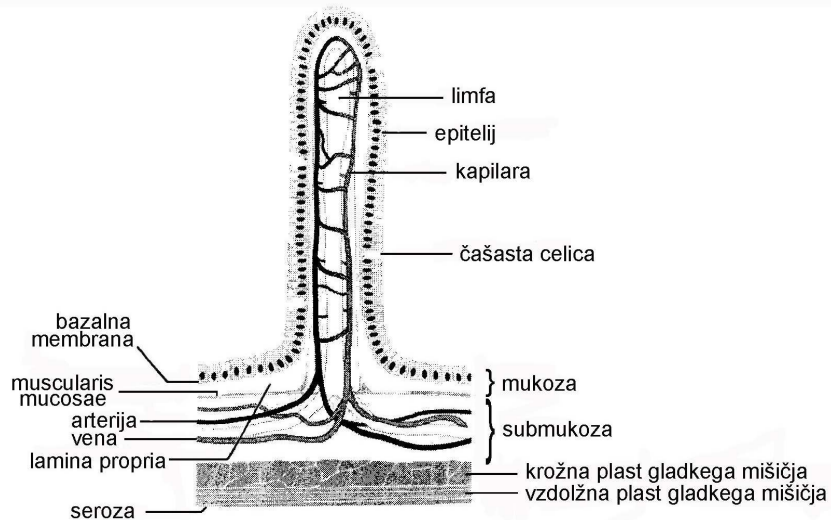
3.1.1 ENTEROCIT

Epitelij tankega črevesa je sestavljen iz ene plasti celic, ki jo večinoma tvorijo črevesne celice oziroma enterociti. To so specializirane celice, ki so namenjene absorpciji hranilnih snovi in prav tako učinkovin iz tankega črevesa. Vsaka celica vsebuje približno 3000 do 7000 gubic, imenovanih mikroresice, ki dajejo enterocitu izgled krtače. Ta del celice zato imenujemo ščetkasti obrobek. Med enterociti najdemo razsejane čašaste celice. Slednje izločajo mukus (sluz), ki ima vlogo varovalnega plašča ter deluje kot lubrikant (4).

Črevesna celica je usmerjena. Obdajata jo apikalna (na luminalni strani) ter bazolateralna (na serozni strani) membrana, ki se med seboj precej razlikujeta. Apikalna membrana je nagubana, saj jo sestavljajo mikroresice, ki v višino merijo približno 1 μm , kar poveča površino za okoli 20-krat. Na tej membrani se nahajajo prebavni encimi kot so disaharidaze in peptidaze. Apikalna membrana prav tako izraža transportne sisteme za absorpcijo monosaharidov, di/tripeptidov, aminokislin, maščobnih kislin ter ionov. Na drugi strani je bazolateralna membrana brez gub, ne vsebuje prebavnih encimov, izraža pa transportne sisteme, ki vključujejo Na-K ATPazo, glikoziltransferaze in adenilat ciklazo (5).

Enterocit leži na bazalni membrani, pod njo je lamina propria, ki ima vlogo strukturne opore epiteliju ter je zelo bogata s krvnimi in limfnimi kapilarami, živčnimi končiči, gladko-mišičnimi celicami ter ostalimi celicami, kot so limfociti in makrofagi (slika 2). Molekule, ki prehajajo epiteljski monosloj, preidejo v kri in limfne žile, ki se nahajajo v

lamini proprii. Pod lamino proprio je tanek sloj gladkega mišičja, imenovan muscularis mucosae. Ta plast sodeluje pri ritmičnem gibanju črevesnih resic. S krčenjem in z mešanjem lahko muscularis mucosae spremeni debelino nemešajočega vodnega sloja črevesnih izločkov in vsebine iz lumna črevesa na površini sluznice, ki bi drugače lahko ustvaril difuzijsko bariero pri absorpciji snovi (6,7). Tako vpliva na absorpcijo lipofilnih molekul in s tem pomaga izprazniti vsebino luminalne vsebine iz kripta.



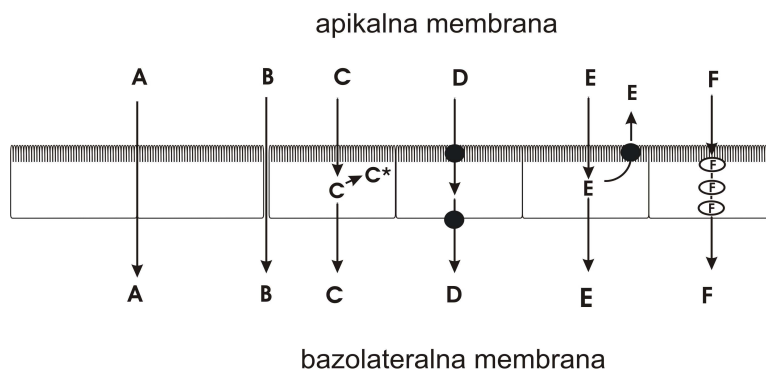
Slika 2: Struktura črevesne resice (2)

Muscularis mukosae zaključuje sluznico (mukozo), ki se nadaljuje v podsluznico (submukozo), kjer se nahajajo večje krvne in limfne žile. Sledita ji še dve plasti gladkega mišičja, kjer je notranja plast glede na lumen črevesa krožna, zunanja pa vzdolžna. Koordinirane ritmične kontrakcije teh dveh mišičnih plasti omogočajo temeljito mešanje hrane in gibanje tankega črevesa v smeri proti debelemu črevesu, čemur pravimo tudi peristaltika (6, 7).

3.1.2 NAČINI PREHODA

Ko je določena snov na voljo za črevesno absorpcijo, sledi prehod le-te skozi črevesni epitelij. Učinkovine prehajajo skozi monosloj celic črevesne sluznice (enterocite) na različne načine. Osnova je pasiven prehod bodisi preko epitelijske celice (transcelularen prehod) bodisi med njimi (paracelularen prehod). Za transcelularno pot je na voljo okoli 99,9% celotne površine (enterociti z mikrosesicami), zato večina snovi prehaja po tej poti (8).

Različne poti prehoda so opisane in prikazane spodaj (slika 3):



Slika 3: Načini prehoda snovi skozi enterocit (8); A-paracelularna difuzija, B-paracelularna difuzija skozi tesne stike, C-transcelularna pasivna difuzija, C*-intracelularni metabolizem, D-transcelularni prenos s prenašalci, E-transcelularna difuzija z efleksnimi prenašalci, F-transcelularna transcitoza

A. in B. PARACELULARNA DIFUZIJA SKOZI TESNE STIKE

Gastrointestinalni trakt ima dve poglavitni funkciji. Na eni strani je to učinkovita površina za absorpcijo, na drugi pa deluje kot selektivna bariera med zunanjim in notranjim okoljem za zaščito pred potencialno škodljivimi snovmi. Ena od značilnosti epitelijev so tesni stiki med celicami, ki omejujejo absorpcijo skozi paracelularni prostor (9).

Tesni stiki tvorijo hidrofilne povezave med enterociti. Transport preko te poti je možen, ampak je omejen s počasnostjo in majhno relativno površino. Tesni stiki predstavljajo le 0,1% celotne površine, ki je na voljo za prehod (slika 3 - pot A in B). Epitelijski stiki postajajo v smeri od dvanajstnika proti kolonu postopoma manj prepustni, kar zmanjšuje permeabilnost polarnih substanc vzdolž tankega črevesa. Prehod skozi tesne stike je omogočen manjšim hidrofilnim molekulam (ionom), za večje molekule (>400Da) tesni stiki pomenijo transportno oviro, za makromolekule pa so popolnoma neprepustni (10).

C. TRANSCELULARNA PASIVNA DIFUZIJA

Transport snovi, ki se absorbirajo s pasivno difuzijo, poteka v smeri od višje proti nižji koncentraciji in izkazuje od odmerka neodvisno kinetiko absorpcije. Transport poteka po korakih, ki vključujejo difuzijo skozi nemešajoči vodni sloj, raztapljanje v membrani in na koncu prehod na drugo stran membrane. Molekule, ki prečkajo apikalno in bazolateralno membrano s pasivno difuzijo (slika 3 - pot C), imajo značilne fizikalno-kemijske lastnosti. Lastnosti lahko razdelimo na strukturne (polarna površina molekule (PSA, angl. polar surface area), število rotacijskih vezi, število proton donorjev/akceptorjev, molekulska

masa), računsko predvidene (lipofilnost) ali izmerjene (pretok, permeabilnost). V študiji so dokazali, da ena sama lastnost (npr. lipofilnost – opisana v naslednjem poglavju) približno korelira s pasivnim transportom vzdolž celične membrane. Za absorpcijo so zelo ugodne neionizirane lipofilne snovi, medtem ko imajo zelo hidrofilne ali zelo lipofilne substance manjšo permeabilnost. Neionizirane lipofilne snovi (navidezni porazdelitveni koeficient v dvofaznem sistemu oktanol/pufer s pH 7,4 ima vrednost $\log D_{\text{okt},7,4} > 0$) se hitro absorbirajo v lipidni dvosloj, saj se zaradi svoje strukture v njem topijo (11,12). Zelo hidrofilne molekule ($\log D_{\text{okt},7,4} < -1$) niso topne v lipidni dvoplasti in tako ne morejo preko celične membrane. Zelo lipofilne substance ($\log D_{\text{okt},7,4} > 4$) pa so lahko slabše topne v nemešajočem vodnem sloju in se zato zadržijo v membrani, kar zmanjša samo permeabilnost (11). Permeabilnost teh substanc se močno poveča ob vključitvi žolčnih soli (13). V splošnem so transcelularno prehodnost predvideli, če so sledili »pravilu petic«, ki ga je podrobneje opisal Lipinski. Pravilo petic pravi, da je biološka razpoložljivost peroralno aktivnih učinkovin ugodna, ko ima molekula naslednje lastnosti: največ 5 donorjev vodikove vezi (OH in NH skupine), največ 10 akceptorjev vodika pri tvorbi vodikove vezi (zlasti dušik ali kisik v molekuli), molekulska masa pod 500 in logP pod 5. Izjeme pri tem pravilu so naravni produkti in substrati za absorptivne prenašalce (14).

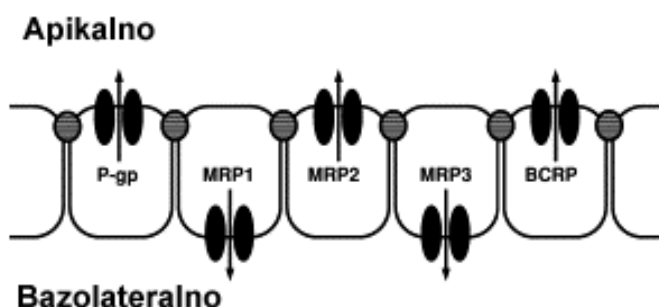
D. TRANSCELULARNI TRANSPORT S PRENAŠALNIMI PROTEINI

Hidrofilne snovi ($\log D_{\text{okt},7,4} < 0$) ne prehajajo dobro preko lipidnega dvosloja, toda njihovo transcelularno absorpcijo omogočajo substratno specifični prenašalci ali aktiven transport s proteini (slika 3 - pot D). Ta pot je pomembna za hranilne snovi, kot so monosaharidi, aminokisliline, di/tripeptidi. Pomembna je še za absorpcijo elektrolitov in žolčnih soli ter za nekatere specifične razrede učinkovin. Na primer, L-dopa in D-cikloserin se absorbirata s sistemom za transport aminokislin, medtem ko so peroralni cefalosporini in antagonisti renina substrati za intestinalni oligopeptidni prenašalec (15). Tako absorpcija s prenašalci kot z aktivnim transportom, sta nasitljivi in ju opisuje nelinearna kinetika absorpcije (Michaelis-Mentenova kinetika). Absorpcija s prenašalci lahko poteka v smeri proti nižji koncentraciji (facilitirana difuzija) oziroma aktivno od nižje proti višji koncentraciji. Aktivni transport uporablja energijo, ki jo pridobi s hidrolizo iz ATP (primarni izvor) ali s sklopljenim transportom, običajno Na^+ ali H^+ (sekundarni izvor energije). Glukoza tako recimo prehaja skozi apikalno membrano enterocitov s sekundarnim aktivnim transportom s pomočjo ko-prenašalca za Na^+ in D-glukozo, imenovanega SGLT1, ter s facilitirano difuzijo s pomočjo prenašalca GLUT2 (16).

E. TRANSCELULARNA DIFUZIJA PREKO EFLUKSNIH PRENAŠALCEV

Snovi, ki se prenašajo s pasivno transcelularno absorpcijo, so lahko substrati za intracelularni metabolizem v enterocitu (slika 3 - pot C*) in za apikalni efluksni mehanizem (slika 3 - pot E). Na tej poti igra črevesni epitelij poleg metabolizma in sekrecije pomembno vlogo tudi pri zaščiti telesa pred zaužitimi ksenobiotiki (8).

Za razliko od absorpcijskih prenašalcev, ki povečujejo permeabilnost skozi intestinalni epitelij, imajo apikalni efluksni prenašalci sposobnost aktivnega črpanja snovi iz celic v intestinalni lumen, kar zmanjša permeabilnost skozi apikalno membrano enterocitov (17). Med najpomembnejše apikalne efluksne prenašalce (slika 4), ki se nahajajo v tankem črevesu, uvrščamo: P-glikoprotein (MDR1), MRP2 in MRP4 ter BCRP (angl. breast cancer resistance protein) (18). Poleg apikalnih prenašalcev se v tankem črevesu nahajajo tudi bazolateralni efluksni prenašalci MRP1, MRP3 in MRP5, vendar njihova vloga pri absorpciji učinkovin še ni natančno razjasnjena (19).



Slika 4: Nahajališča efluksnih prenašalcev na membranah (18)

F. TRANSCELULARNA TRANSCITOZA

Makromolekule, kot so peptidi in proteini, se transportirajo s specifično receptorsko ali nespecifično endocitozo (slika 3 - pot F), saj nimajo lastnih prenašalcev in so hkrati prevelike za transcelularni prehod. Specializirane, t.i. M-celice v Peyerjevih ploščah, imajo manj mikroresic in izkazujejo večjo endocitotsko aktivnost kot enterociti, pri katerih poteka endocitoza v manjšem obsegu. Po končani endocitozi se vezikel v celici zlije z lizosomom, ki je pomemben pri prebavi zajete vsebine (10).

3.2 VREDNOTENJE HITROSTI ABSORPCIJE

Za napovedovanje absorpcije učinkovine v telesu so izredno pomembne fizikalno-kemijske lastnosti le-te. Na vrsto farmakokinetičnih parametrov vpliva predvsem topnost učinkovine ter njeno porazdeljevanje v hidrofilnih in lipofilnih področjih.

Porazdelitveni koeficient (P) je ravnotežno razmerje neke učinkovine v dvofaznem sistemu organsko topilo-voda. Praviloma kot organsko fazo največkrat uporabljamo oktanol. Razmerje je opisano z enačbo 1, kjer je C_o koncentracija topljenca v organski fazi in C_v koncentracija topljenca v vodni fazi.

$$P = C_o/C_v \text{ (enačba 1)}$$

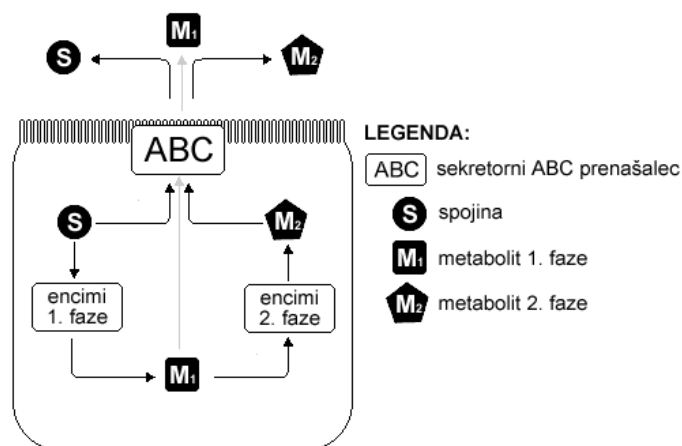
Za merilo lipofilnosti uporabljamo izračunan logaritem P (logP). logP je aditivna termodinamska količina, ki je ugodna za napovedovanje korelacij med biološko uporabnostjo ter lipofilnostjo učinkovin. Vrednost logP v izbranih topilih (običajno oktanol/voda) v glavnem določamo eksperimentalno s porazdelitveno metodo. Porazdelitveni koeficient ionizirajočih snovi pa je odvisen še od pH vodne faze in zato lipofilnost teh učinkovin večkrat podajamo v obliki logaritemske vrednosti navideznega porazdelitvenega koeficienta logD. Ta ponazarja porazdelitev učinkovine med oktanolom in pufrom z določeno pH vrednostjo, največkrat kar pri 7,4 (20, 21).

3.3 MRP

Proteini, ki so povezani z rezistenco na več učinkovin ali MRP (angl. multidrug resistance associated proteins), so efluksni oz. sekretorni prenašalci, ki spadajo v naddružino ATP vezočih skupin prenašalcev (angl. ATP binding cassette transporters ali na kratko ABC prenašalcev), saj izrabljajo energijo z razgradnjo ATP. Prenašajo lahko substrate preko bioloških membran tudi proti velikemu koncentracijskemu gradientu (22).

Povezujejo jih tudi z metabolizmom. Ena najpomembnejših nalog metabolizma je seveda odstranjevanje škodljivih snovi iz telesa. Delimo ga v dve fazi. Prva se običajno nanaša na oksidacijo spojine, ki poteka s citokromi P450. Pri drugi fazi pa se spojina konjugira z različnimi encimi ali encimskimi sistemi (glutation-S-transferazo (GST) ali UDP-glukuronoziltransferazo, ki na spojino pripneta glutation (GSH) ali glukuronsko kislino). ABC prenašalci pripomorejo k zaščiti organizma z odstranjevanjem toksinov, zato jih vedno več raziskovalcev omenja v procesu metabolizma. Na ta način dobimo dodatno, »tretjo fazo metabolizma«, kjer prenašalci odstranjujejo konjugate, ter »ničto fazo«, kjer

odstranjujejo še nespremenjene toksine (slika 5) (18). Včasih se zgodi, da je že oksidiran metabolit prve faze substrat ABC prenašalcev. Povezavo metabolizma z njimi potrjuje še tkivna koekspresija encimov druge faze metabolizma (UDP-glukuronoziltransferaze in GST) z MRP2 v tankem črevesu (13).



Slika 5: Metabolizem toksinov in pomen sekretornih ABC prenašalcev

Glavna vloga teh prenašalcev naj bi bila zaščita celice pred reaktivnimi substancami oziroma preprečevanje absorpcije potencialnih ksenobiotikov iz prebavnega trakta, npr. toksinov, ki jih proizvajajo bakterije v prebavnem traktu ali toksinov iz hrane, ki reagirajo z glutationom (23). ABC prenašalci imajo veliko vlogo pri izločanju omenjenih snovi v lumen črevesja, ledvične tubule in enterohepatični obtok. Posledično vplivajo na izločanje učinkovin in njihovih metabolitov iz organizma ter preprečujejo prehod le-teh iz krvi v možgane, testise in placento. Prav tako so pomembni pri zdravljenju rakavih obolenj, saj izločajo večino učinkovin, ki jih uporabljamo pri zdravljenju rakavih obolenj (24).

Skupina efluksnih prenašalcev je zelo raznolika in vsebuje poleg prenašalcev, ki lahko izločajo klinično pomembne spojine, tudi prenašalce in proteine, ki še nimajo natančno opredeljene funkcije. Med slednje spadajo intestinalni efluksni prenašalci, ki so odgovorni za rezistenco proti različnim učinkovinam, mednje med drugim vključujemo tudi MRP2 prenašalce (23).

3.3.1 EFLUKSNI SISTEMI

Noben efluksni sistem sam zase ne pojasnjuje dovolj raznolikosti snovi, izločenih skozi sluznico črevesa, toda največja pozornost je namenjena vlogi P-glikoproteina (P-gp) (8). Vloga P-gp kot transportnega proteina, ki je produkt MDR1 gena, je bila sprva raziskana v kancerogenih celicah. P-gp je membranski glikoprotein, eden od ABC-prenašalcev, ki

eliminira različne hidrofobne protirakave učinkovine iz tumorskih celic. Pri človeku so odkrili dva *mdr* gena, toda le MDR1 gen ustreza P-gp efluksnemu prenašalcu. Drugi MDR gen v človeku, MDR3, je substratno specifičen za izločanje ter je odgovoren za transport holesterola in fosfatidilholina v žolč (25). V normalnih razmerah se MDR1 P-gp izraža v mnogih različnih organih, vključno z jetri, ledvicami in epitelijem intestinalnega trakta. V slednjem je P-gp lokaliziran na ščetkastem obrobnju (angl. brush border) zrelih enterocitov (26). Lokalizacija P-gp v črevesu je v skladu z opaženim izločanjem njegovih substratov in dokazano je, da P-gp omejuje biološko uporabnost različnih učinkovin (8). Večji vpogled v funkcijo P-gp v črevesu ter posredno v farmakokinetiko je pridobljen iz poskusov na miših. Glodalci imajo tri *mdr* gene, med katerimi *mdr1a* in *mdr1b* izkazujeta lastnosti, podobne človeškemu MDR1. Odsotnost *mdr1* v miših ima velik vpliv na tkivno distribucijo ter na jetrni in intestinalni očistek hidrofobnih kationskih učinkovin (25). Pri miših so dokazali, da je P-gp v krvno-možganski barieri pomemben pri preprečevanju akumulacije različnih učinkovin v možganih. Nadalje so ugotovili, da ima P-gp vidno vlogo pri prenašanju posameznih učinkovin iz krvi v lumen črevesa in pri preprečevanju ponovnega vstopa (angl. re-entering) učinkovin v lumen iz krvnega obtoka (27).

Temeljni član skupine efluksnih MRP je MRP1, ki so ga identificirali kot odgovorni prenašalec za razvoj rezistence na raznolik spekter kemoterapevtskih učinkovin proti raku in na ksenobiotike v tumorskih celicah, ki niso izražali P-glikoproteina. MRP1 spremeni transport organskih anionov endo- in eksogenega izvora, ki se konjugirajo z GSH, glukuronsko kislino in sulfatom, vključno z levkotrienom C₄, 2,4-dinitrofenil-S-glutationom (DNP-SG) in estradiol-17β-glukuronidom (E₂17G). Omenjene konjugate so identificirali kot substrate za ATP-vezoči transport v jetrnih kanalikularnih membranah (apikalna membrana hepatocita, ki meji na žolčni kanal), vendar je bila ekspresija MRP1 prenizka, da bi lahko bila razlog za višjo transportno aktivnost jetrnih celic (22).

MRP 3 so klonirali kot homolog MRP1 in MRP2 ter odkrili, da ima pod holestatičnimi in hiperbilirubinemičnimi pogoji zelo povečano aktivnost na bazolateralni membrani podganjih in človeških jeter. V analizi so ugotovili, da je MRP3 strukturno zelo podoben MRP1. Za razliko od ostalih MRP, MRP3 prenaša tudi žolčno kislino tauroholat. Nadalje so videli, da MRP3 uspešno prenaša samo konjugate glukuronida in sulfata, v nasprotju z MRP2, ki prenaša tudi GSH konjugate (22).

Ostali MRP prenašalci, ki se nahajajo v tankem črevesu, so manj raziskani tako glede natančne lokacije kot tudi njihove funkcije (18).

3.3.2 MRP2

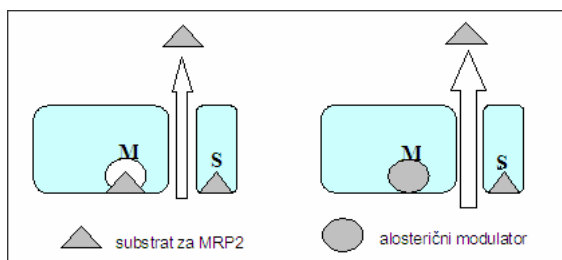
MRP2 ima v splošnem izločevalno in zaščitno vlogo. Izražen je na apikalni membrani hepatocitov, enterocitov jejunuma ter proksimalnih ledvičnih tubularnih celic kot tudi v možganih in placenti. Aktivnost MRP2 uravnavajo različni procesi, kot je popravljanje membrane ter gensko prepisovanje in prevajanje. Prenaša lahko konjugate, ki zajemajo kemoterapevtike, urikosurike, antibiotike, levkotriene, GSH, toksine in težke kovine. MRP2 prenašalci vplivajo na farmakokinetiko mnogih učinkovin, njihova ekspresija in aktivnost pa se pod vplivom določenih učinkovin ali patoloških stanj spreminjata (22). V literaturi najdemo opis dveh vrst miši z mutacijo na MRP2 genu. To mutacijo običajno povezujemo z Dubin-Johnsonovim sindromom (zlatenica, ki nastane zaradi velike količine nekonjugiranega bilirubina v krvi) (28). MRP2 je izražen v tankem črevesu normalnih podgan in ga ni pri mutiranih. Najverjetneje pa je ta prenašalec odgovoren za intestinalno sekrecijo organskih anionov in konjugacijo bilirubina (29). MRP2, imenovan tudi kanalikularni MRP (cMRP) ali kanalikularni multispecifični anionski transporter (cMOAT), prenaša konjugate z GSH, glukuronsko kislino in sulfatom (15). Uvrščamo ga med glavne efluksne prenašalce ksenobiotikov, ki jih vnašamo *per os*, saj je v jejunumu koncentracija MRP2 najvišja med vsemi ABC prenašalci (16,17). V črevesu se MRP2 v veliki meri nahaja na vrhu črevesnih resic (apikalna membrana) in ga je največ v jejunumu, manj pa v ileumu tankega črevesa. Ta razporeditev je podobna razporeditvi konjugacijskih encimov (UDP – glukuronil transferaze in GST), kar je skladno z vlogo presnove in sekrecije pri preprečevanju absorpcije toksičnih snovi in zdravilnih učinkovin. MRP2 substrati so v glavnem organski anioni, ki so nekonjugirani (npr. ampicilin) ali pa nastanejo pri konjugaciji učinkovin z glukuronsko kislino oziroma GSH. MRP2 lahko prenaša tudi nekatere nevtralne ali šibko bazične spojine v nespremenjeni obliki, ampak v tem primeru gre za ko-transport z GSH (22).

3.3.3 SUBSTRATI MRP2

Pri transportu substanc z MRP prenašalci ima GSH pomembno vlogo. Fiziološko pomembni substrati tega prenašalca vključujejo glutation-S-konjugate, kot je levkotrien C₄, kakor tudi glukuronid bilirubina, 17β-glukuronizil estradiol in oksidirani GSH (30).

Pri transportu kationskih in hidrofobnih učinkovin je GSH nujno potreben. V teh primerih lahko deluje kot aktivator ali kosubstrat. Na MRP prenašalcih so dokazali raznolike substratne interakcije, kar nekateri razlagajo z obstojem dveh transportnih mest (31).

Za MRP2 prenašalec predpostavljamo, da ima transportno mesto z visoko afiniteto do GSH, ki se imenuje S, ter modularno mesto z nizko afiniteto do GSH, ki ga imenujemo M. Kadar substanca zasede obe mesti (S in M), se lahko transportira sama (slika 6 – levo). Nekateri substance za vezavo na mesto S potrebujejo prisotnost GSH kot kosubstrata. V primeru, da dodamo neko drugo substanco, ki se na mesto S ne veže, na M mesto pa se veže bolje od prve substance, bo to pospešilo transport prve (slika 6 – desno) (32).



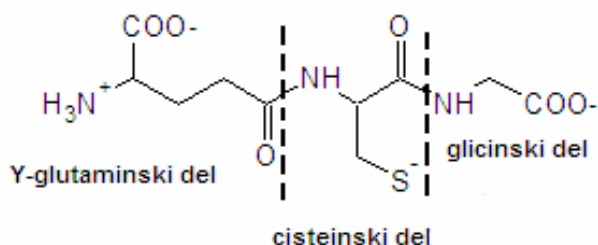
Slika 6: Shema alosterične regulacije

3.4 PRESNOVNA SPOSOBNOST SLUZNICE

V sluznici črevesa so prisotni različni encimi, ki pomagajo pri presnavljanju. Prav tako imajo vpliv na njeno delovanje in transport preko membran. V določeni meri je v črevesu prisoten tudi GSH, ki v okviru metabolizma omogoča konjugacijo različnih zaužitih snovi.

3.4.1 GLUTATION - STRUKTURA IN DELOVANJE

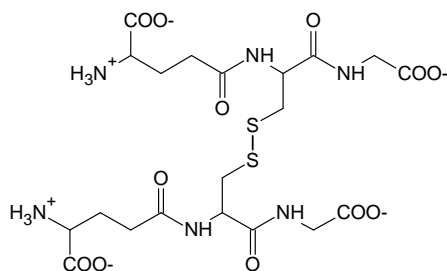
GSH (**1**) oziroma γ -glutamil-cisteinil-glicin je naravni tripeptid, ki je prisoten v vseh telesnih celicah. Sestavljajo ga tri aminokisljine: glicin, glutaminska kislina in cistein. Slednji je glavni dejavnik večine pozitivnih učinkov samega GSH, ki v veliki meri odstranjuje toksične snovi (33).



Spojina **1**: Glutation (GSH), ki ga sestavljajo trije aminokislinski deli

GSH je vpleten v mnoge pomembne biološke procese in sodeluje pri regulaciji celičnih funkcij (kot so npr. genska ekspresija, proteinska sinteza, celična proliferacija ...). Pomemben je kot antioksidant, v metabolizmu ksenobiotikov pa sodeluje tako, da z njimi tvori konjugate. Pomanjkanje GSH vodi v oksidativni stres (33, 35).

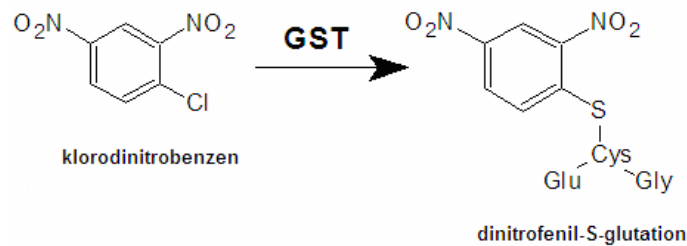
V celicah je GSH prevladujoč nizko molekularni tiol. Vsebujejo ga od 0,5-10 mmol/L. Večina (85-90%) se ga nahaja v citosolu. Žolč ga lahko vsebuje več od 10 mmol/L, ostale ekstracelularne koncentracije pa so nižje (2-20 $\mu\text{mol/L}$ v plazmi). V tanko črevo pride GSH iz žolča, ki nastaja v jetrih. Dostava GSH v žolč poteka s specifičnim transportnim sistemom preko kanalikularne membrane. GSH lahko dobimo tudi iz hrane, recimo sveže sadje in zelenjava nas oskrbuje s povprečno višjimi koncentracijami GSH. Direktne meritve GSH v jejunumu podgane so pokazale, da je koncentracijsko območje od 60 do 200 μM pri stradanih podganah ter od 120 do 300 μM pri hranjenih (34, 35). GSH, ki varuje lumen tankega črevesa, se lahko tja transportira preko Na^+ -odvisnega ali neodvisnega mehanizma. Hitrost transporta je približno enaka hitrosti sinteze, kadar je vrednost luminalnega GSH 200 μM , če pa je koncentracija višja, transport presega hitrost sinteze (34). Sinteza GSH je katalizirana z dvema encimoma (γ -glutamilcistein sintetazo in GSH sintetazo). Po tej poti nastaja v vseh celicah, kot vodilni organ nastanka GSH pa prevladujejo jetra. Povečan vnos cisteina ali njegovih prekurzorjev (cistin, N-acetilcistein) poveča sintezo GSH in preprečuje pomanjkanje le-tega. V zdravem odraslem človeku je uporabna vrednost GSH 25 $\mu\text{mol/kg}\cdot\text{h}$, kar naj bi zajemalo 65% celotnega pretoka cisteina v celicah. To nakazuje, da je GSH prevladujoča transportna oblika cisteina v telesu (35). GSH obstaja v dveh oblikah, v reducirani ali oksidirani (**2**). Zaradi cisteinskega preostanka se GSH z elektrofilnimi substancami lahko neencimsko oksidira do glutation disulfida (GSSG). GSH/GSSG je prevladujoč redoks par, ki določa antioksidativno kapaciteto celic in ima vlogo pri regulaciji poti, ki so pomembne za homeostazo organizma (35).



Spojina **2**: Oksidirani glutation oziroma glutation disulfid (GSSG)

3.4.2 GLUTATION-S-TRANSFERAZA

Glutation-S-transferaza (GST) sodi v družino encimov, ki so udeleženi pri detoksifikaciji genotoksičnih elektrofilnih snovi. GST katalizira konjugacijo GSH z različnimi ksenobiotiki ali endogenimi elektrofilnimi spojinami (slika 7). Ta encim določa tudi pomembnejše detoksifikacijske mehanizme v bioloških sistemih in je odgovoren tako za razvoj rezistence pri kemoterapiji raka kakor tudi za rezistenco insekticidov ter pesticidov v kmetijstvu (36).



Slika 7: Kataliza konjugacije GSH in klorodinitrobenzena s pomočjo encima glutation-S-transferaze

GST v tankem črevesu katalizira detoksifikacijo elektrofilnih spojin, ki jih zaužijemo s hrano, prehranskimi dopolnili ali peroralno danimi zdravilnimi učinkovinami. Človeška prehrana vsebuje različne rastlinske in živalske produkte, ki vsebujejo reaktivne skupine. Le-te se v celici lahko vežejo na vitalne strukture in jih je treba zaradi zaščite celic detoksificirati. Tudi kinoni in njihovi fenolni prekurzorji ter 4-hidroksi-2-alkenali, produkti lipidne peroksidacije, se nahajajo v mnogih prehranskih pripravkih in jih lahko detoksificiramo s pomočjo GST. Meritve so pokazale, da mnogi prehranski izdelki vsebujejo več kot 10 μM sestavin, ki reagirajo z GSH. Mnoge zdravilne učinkovine so prav tako elektrofilne (npr. produkt biotransformacije acetaminofena: N-acetil-p-benzokinon) in kadar jih damo peroralno, se relativno velike koncentracije odplavijo v lumen tankega črevesa (34).

V enterocitih se sintetizira GSH, a se sinteza maksimalne GST aktivnosti ter privzema luminalnega GSH le težka primerja. GST aktivnost v tankem črevesu je okoli 1,65 $\mu\text{mol}/10^6$ celic na uro, kar je več kot 100-krat več od sinteze GSH (1,32 $\text{nmol}/10^6$ enterocitov na uro) ali privzema GSH (8,4 $\text{nmol}/10^6$ enterocitov na uro). Intestinalne epiteljske celice vsebujejo GST, ki katalizira reakcijo GSH z elektrofilnimi komponentami. Kadar je aktivnost GST večja kot sinteza GSH, na primer takrat ko celica odstranjuje elektrofil, lahko izpraznitev zalog GSH vodi celo v celično smrt (34).

3.4.3 ESTERAZE

Večina učinkovin v GIT se absorbira s pasivnim transportom. Obseg absorpcije je večji, če je snov neionizirana in v bolj lipofilni obliki. Predzdravila v obliki estra so pogosto uporabljene oblike za pospeševanje permeabilnosti učinkovin, ki imajo kislinsko strukturo. V študiji so opazovali absorpcijo predzdravil v obliki estrov na Caco-2 celicah in podganjem črevesu. Za merjenje esterazne aktivnosti v obeh modelih so kot substrat uporabili p-nitrofenil acetat. Po dodatku le-tega je bil nivo izmerjene esterazne aktivnosti v primeru Caco-2 celic manjši kot v jejunumu podgane. Permeabilnost so raziskovali v *in vitro* sistemu, ki ponazarja fiziološke pogoje v GIT. Kot modelni spojini za preskušanje so izbrali pivampicilin in CFPN-PI (angl. cefcapene pivoxil hydrochlorid), estra peroralnih antibiotikov. Po dodatku estra na apikalno stran se je v obeh primerih vsa hidroliza estra končala, preden je spojina prešla bazolateralno membrano monosloja. Na bazolateralni strani so tako v veliki meri zaznali le navzočnost hidroliziranih estrov. Količini ampicilina in cefcapena (CFPN) sta zaradi hidrolize predzdravil narasli že v celici, saj so produkti predzdravila ostali nakopičeni v njej. Na drugi strani so po dajanju samega ampicilina ali CFPN le majhne količine teh učinkovin prešle bazolateralno membrano, hkrati pa ni bilo zaznati intracelularne akumulacije. Glede na izsledke lahko te preiskave prenašamo na vrednotenje predzdravil v obliki estrov, ki se metabolizirajo tekom permeacije preko intestinalnega epitelija (37).

Opazovanja so še pokazala, da imajo človeški, podganji in mišji epitelij prisotno aktivnost nespecifičnih esteraz, vendar jih zagotovo vsebuje samo človeška lamina propria (38).

3.5 KONJUGATI GLUTATIONA

V organizmu poteka presnova različnih snovi, ki jih vnašamo. Kadar jih organizem ne more prebaviti samih po sebi, pride do konjugacije z določenimi snovmi, ki se nahajajo v telesu. Ena izmed teh je GSH. Pri vezavi neke snovi z GSH nastanejo konjugati, ki so primerni tudi kot substrati za MRP2 prenašalec.

3.5.1 ZAHTEVE ZA OZNAČEVALCE

Substrat MRP2 prenašalcev je lahko označevalec le-teh, če izpolnjuje nekatere pogoje, ki so navedeni v nadaljevanju:

a) Specifičnost in selektivnost za MRP2

MRP2 substrati so v glavnem organski anioni, ki so bodisi nekonjugirani (npr. metotreksat, pravastatin, ampicilin), bodisi nastanejo s konjugacijo učinkovin z glukuronsko kislino ali GSH (22). Raziskave kažejo, da ima MRP2 vlogo pri intestinalni sekreciji GSH konjugatov in da so le-ti tipični substrati za ta prenašalec (29).

b) Ustrezna dostava do apikalnega efluksnega prenašalca - transcelularna pot

Prehod skozi membrano naj bi bil hiter in učinkovit. Pasivno prehajanje v celico je zaželeno, ker je neodvisno od vplivov ostalih prenašalcev. Vendar bi v primeru paracelularnega pasivnega prehoda substrat obšel celico, zato želimo transcelularen prehod.

c) Ustrezna dostava do prenašalca – hidroliza ali konjugacija

Konjugacija ali hidroliza estra, ki se običajno vršita v celici, sta ovira za dostavo do prenašalca, saj predstavljata dodaten proces. Pozorni moramo biti tudi na lipofilnost molekule, kajti molekula z ugodnimi lipofilnimi lastnostmi lažje prehaja membrano, ki je po svoji naravi lipiden dvosloj.

d) Odsotnost celične toksičnosti

Spojine, ki so potencialno citotoksične je potrebno aplicirati v nizkih koncentracijah. Pri permeabilnostnih poskusih se aplicirane spojine namreč zadržujejo v enterocitih (lahko se tam tudi kopičijo) in tako povzročajo škodo. V primeru predzdravila (npr. estra) dodamo substituent, ki po hidrolizi ne ogroža organizma (boljša je npr. etilna kot metilna veriga, pri kateri lahko nastane metanol, ki je citotoksičen).

Pomembno je tudi, da snov ne kelira Ca^{2+} ali Mg^{2+} ionov. Le-ti lahko odprejo tesne stike ali spremenijo permeabilnost preko lipidne dvoplasti v črevesu. Hkrati so ti ioni toksični za celico.

e) Topnost (pred izvedbo poskusa *in situ* v Ringerju)

Topnost je izrednega pomena za izvedbo poskusa, zato si želimo, da bi bila v uporabljenem Ringerjevem pufru dovolj visoka. Pomembno je, da se izbrana spojina topi že med samo pripravo ter nam tako omogoči nadaljnje delo. Največkrat pri pripravi poskusnih raztopin kot glavno topilo uporabljamo Ringerjev pufer. Le-ta dobro ponazarja pogoje v organizmu (osmolarnost, pH, prisotnost ionov ...). Preiskovane substance morajo zato biti dobro topne v Ringerjevi raztopini. Možna je kombinacija z nekaterimi organskimi topili (npr. etanol, metanol, acetonitril, DMSO), vendar so le-ta lahko prisotna le v izredno nizkih količinah (največ 5 vol.%), sicer toksično vplivajo na celico.

f) Stabilnost

Pri običajnih pogojih priprave in uporabe (atmosferski kisik, karbogen, pH 7,4 in temperatura 37°C) so GSH substrati načeloma stabilni. Omeniti je potrebno predvsem možno nestabilnost zaradi oksidacije, ki pogosto razgrajuje učinkovine. Do oksidacije v tekočih farmacevtskih oblikah (kamor uvrščamo tudi raztopine) lahko pride zaradi atmosferskega kisika, izpostavljanja svetlobi ali zaradi prisotnosti kovinskih ionov (39).

Za stabilizacijo substrata znotraj celice oziroma njegovo ohranitev v obliki GSH konjugata (in ne njegovih produktov) dodajamo acivicin, umetni analog glutamina. Acivicin je ireverzibilni in specifični inhibitor γ -glutamil transferaze (GGT), encima, ki je potreben za katalizo reakcije z GSH. Ta encim je dejaven le na apikalni/luminalni strani enterocitov (40, 41).

g) Enostavnost analize

Analitika nam omogoča določanje preiskovanih snovi ter potrdi ali zavrže naše ugotovitve. Zaradi tega je poglavitno, da nam da informacije, ki so zanesljive in natančne, hkrati pa nam ne vzamejo preveč časa. Glede na dostopnost za analizo v našem laboratoriju so nam ponujene možnosti UV spektrofotometrije, HPLC z UV ali fluorescentnim detektorjem ter fluorescentna detekcija na mikrotitrski ploščici.

h) Enostavna priprava

Naši substrati se glede priprave razlikujejo po dostopnosti reagentov in po reakciji pripravljanja. Nekatere od njih lahko celo kupimo v uporabni obliki (CDNB*, EA*) in jih le damo v enterocit, kjer poteče konjugacija. Drugi izbrani substrati za pripravo ne potrebujejo veliko časa in dela, saj nastanejo z enostavno predhodno *in situ* sintezo (npr. NEM-SG*, et-NEM-SG* ter NPM-SG*). Pridemo lahko tudi do nekoliko bolj zapletenih kemijskih sintez, ko je potrebno estrenje, čiščenje in ustrezni pogoji za nastanek zelenega konjugata (DNP-SG* in et-DNP-SG*). Možna je encimska priprava z GST *in situ* (EA-SG*), ki pa zahteva specifične pogoje (inkubacija, ustrezna topila ...), drugačne metode dela, to pa celotno sintezo kar nekajkrat podraži.

*kratice so zaradi preglednosti podrobneje opisane v naslednjem poglavju

i) Ekonomičnost

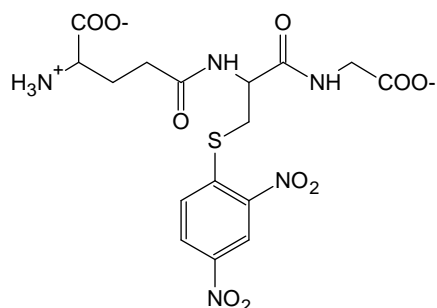
Raziskave so vselej povezane z določenimi stroški. Zato je potrebno tudi preudarno izbrati snovi, s katerimi bomo delali, ter jih med študijo čim bolj koristno (u)porabiti.

3.5.2 PREISKOVANE SPOJINE

1-kloro-2,4-dinitrobenzen (CDNB) in 2,4-dinitrofenil-S-glutation (DNP-SG)

CDNB pogosto uporabljamo za raziskave v zvezi z GSH. CDNB je prekurzor, ki se v telesu spoji z GSH, tako da nastane konjugat. Nukleofilno aromatsko substitucijo med GSH in CDNB lahko katalizira tudi GST, s tem da –SH skupino GSH prevede v bolj nukleofilni glutationski anion GS^- . Le-ta potem napade ogljik, ki je nosilec klora v CDNB in tako nastane Meisenheimerjev kompleks. Reakcija se konča, ko kloridni ion zapusti spojino.

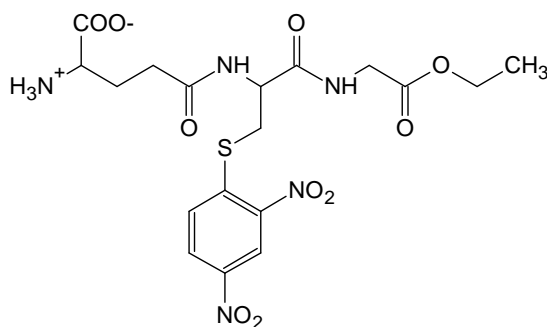
Po reakciji dobimo DNP-SG (**3**). Ta je bolj vodotopen kot sam prekurzor in je na ta način pripravljen za izločanje iz celic preko membranskega ATP-odvisnega črpalnega sistema za GSH konjugate (36).



Spojina **3**: N5-(2-[(karboksimetil)amino]-1-[[2,4-dinitrofenil]tio]metil)-2-oksoetil)glutamin (DNP-SG)

Etil 2,4-dinitrofenil-S-(γ -glutamil-cisteinil) glicinat (et-DNP-SG) (**4**)

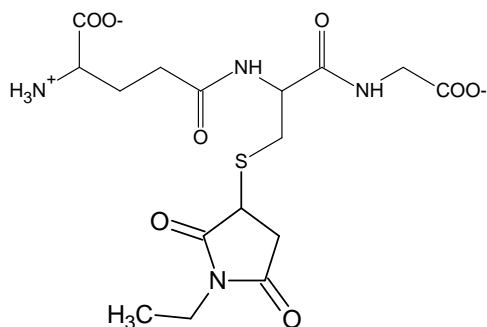
Ester nastane iz konjugata DNP-SG z reakcijo esterifikacije, ki je kislinsko katalizirana. Za estrenje je najbolje uporabiti žveplovo (VI) kislino v etanolu. Po reakciji je produkt potrebno očistiti, pri čemer najboljše rezultate daje preparativna reverznofazna kromatografija (42).



Spojina **4**: N5-(1-[[2,4-dinitrofenil]tio]metil)-2-[[2-(etiloksi)-2-oksoetil]amino]-2-oksoetil)glutamin (et-DNP-SG)

N-etil maleimid glutation (NEM-SG) (5)

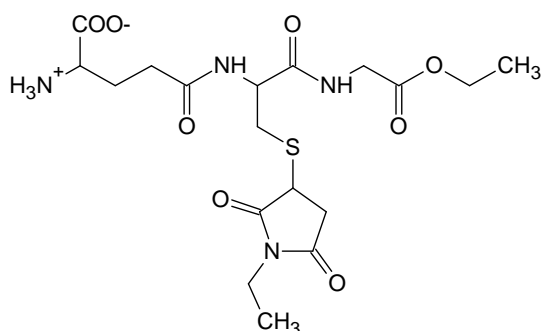
Reakcija med GSH in NEM poteka z adicijo na dvojno vez na NEM (43). Tiolna skupina cisteina iz GSH napade dvojno vez v imidnem obroču in na NEM se pripne GSH struktura. S tem dobimo željeno spojino.



Spojina **5**: N5-(2-[(karboksimetil)amino]-1-[[1-(etil-2,5-dioekso-3-pirolidinil)tio]metil]-2-oksoetil)glutamin (NEM-SG)

Etilni ester N-etil maleimid glutationa (et-NEM-SG) (6)

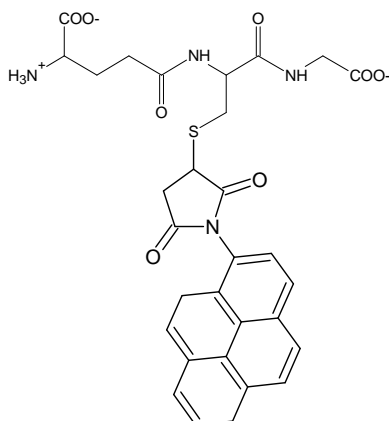
Reakcija poteka podobno kot v primeru NEM-SG, s tem da tukaj uporabimo monoetilni ester GSH [γ -L-glutamil-L-cisteinil (etil glicinat)]. Tega pridobivajo s kislinsko katalizirano esterifikacijo. Poglavitno je, da je GSH monoester očiščen do visoke stopnje čistoče, tako da ne vsebuje soli in rezidualnega GSH ter je ustrezen za biološko vrednotenje. Nekatera poročila celo navajajo, da so GSH estri toksični, kar naj bi omejevalo terapevtsko uporabo. Toda toksičnost je v veliki meri povezana s kontaminacijo z dietil estrom (42).



Spojina **6**: N5-(1-[[1-(etil-2,5-dioekso-3-pirolidinil)tio]metil]-2-[[2-(etiloksi)-2-oksoetil]amino]-2-oksoetil)glutamin (et-NEM-SG)

N-(1-pirenil) maleimid glutation (NPM-SG) (7)

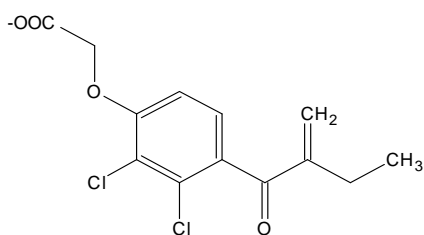
NPM relativno hitro reagira z organskimi spojinami, ki vsebujejo sulfhidrilno skupino. Spojine zaznamo s porastom fluorescence, saj vsebujejo pirenski kromofor. Kljub temu da pirenski kromofori dobro fluorescirajo, NPM ne zaznamo v vodnih spojinah (44). Te molekule so zelo slabo topne v vodi (npr. topnost pirena je 0,135 mg/L). Slabost teh spojin je tudi hitra oksidacija, do katere pride na pirenskem obroču (45).



Spojina **7**: N5-(1-([1-(4,8-dihidro-1-pirenil)-2,5-diokso-3-pirolidinil]tio)metil)-2-{[2-(etiloksi)-2-oksoetil]amino}-2-oksoetil)glutamin (NPM-SG)

Etakrinska kislina (EA) (8)

Etakrinska kislina je podobno kot CDNB prekurzor. V organizmu pride do konjugacije z GSH, ki je običajno encimska (z GST) (46).



Spojina **8**: 2-{[2,3-dikloro-4-(2-etilakriloil)fenil]oksi}ocetna kislina (EA)

4 NAMEN DELA

MRP2 prenašalci vplivajo na farmakokinetiko mnogih učinkovin, njihova ekspresija in aktivnost pa se pod vplivom določenih učinkovin ali patoloških stanj spreminjata (22). Ti prenašalci imajo pomembno vlogo pri absorpciji različnih učinkovin, ki so substrati za MRP2. Sekretorni prenašalci, kot so MRP2, lahko tudi črpajo učinkovine v smeri iz krvi v lumen jejunuma ter tako zmanjšujejo njihovo koncentracijo v telesu.

Zanimalo nas bo, kateri od znanih substratov bi bili najprimernejši označevalci. Pri transportu substanc z MRP2 prenašalci ima glutation pomembno vlogo (31). Med MRP2 substrate tako prištevamo glutationske konjugate, ki jih bomo v različnih oblikah uporabili v diplomskem delu. Proučili bomo nekaj spojin, ki so bodisi glutationski konjugati (DNP-SG, NEM-SG, NPM-SG), estri le-teh (et-DNP-SG, et-NEM-SG) ali njihovi prekurzorji (CDNB, EA).

Nekatere spojine bomo uporabili že pripravljene (CDNB, et-DNP-SG), druge (NEM-SG, et-NEM-SG) bomo najprej pripravili s preprostimi sintezami in nato z njimi opravili poskuse permeabilnosti. Prav tako bomo spremljali pretok konjugatov (DNP-SG, NEM-SG) v S-M in M-S smeri, ki bodo po aplikaciji prekurzorja (CDNB) ali estra (et-DNP-SG, et-NEM-SG) na mukozno ali serozno stran nastajali v enterocitih med poskusi permeabilnosti. Pri teh poskusih bomo uporabljali jejunum podgane. Ta namreč od vseh ABC prenašalcev v največji količini vsebuje MRP2. Poskuse bomo izvedli s pomočjo difuzijskih celic, v katere bomo vstavili segmente podganjega jejunuma. Opazovali bomo prehod preučevanih substanc skozi črevesno steno podgane. Na mukozno stran črevesa bomo dodali acivicin. Le-ta je inhibitor encima γ -glutamyl transferaze, ki je aktiven le na apikalni strani enterocitov in brez inhibicije povzroča hidrolizo γ -glutaminske kisline na GSH. Poskuse bomo izvajali tudi z zamenjavo manitola z glukozo na mukozni strani tkiva. Glukoza naj bi namreč spremenila razmerje permeabilnosti označevalca v S-M in M-S smeri. Med vzorčenjem bomo merili elektrofiziološke parametre za vrednotenje živosti tkiva, odvzete vzorce pa bomo analizirali s tekočinsko kromatografijo visoke ločljivosti. Na ta način in s pomočjo predhodne obravnave ostalih dejavnikov, odločilnih za uporabnost konjugatov, bomo poskušali oceniti, kakšne lastnosti imajo izbrani substrati in kako uspešni so kot označevalci za MRP2 prenašalce.

5 MATERIALI IN METODE

5.1 REAGENTI IN TOPILA

5.1.1 Za sintezo in analizo konjugatov

- L-glutation $\geq 99\%$, Sigma
- etilni ester L-glutationa $\geq 93\%$, Sigma
- 2,4-dinitrofenil-S-glutation (DNP-SG), sintetiziran na katedri za BF
- etil 2,4-dinitrofenil-S-(γ -glutamil-cisteinil) glicinat (et-DNP-SG), sintetiziran na katedri za BF
- N-etil maleimid, Aldrich
- 1-kloro-2,4-dinitrobenzen, Aldrich
- acetonitril (za kromatografijo), Merck
- N-(1-pirenil) maleimid $\geq 99\%$, Fluka

5.1.2 Za pripravo in shranjevanje elektrod

- agar-agar v prahu, Reidel de Haën ag seelze
- kalijev klorid, p.a.

5.1.3 Za permeabilnostne poskuse

- natrijev klorid, p.a.
- kalijev klorid, p.a.
- magnezijev klorid $\times 6 \text{ H}_2\text{O}$, p.a.
- kalcijev klorid $\times 2 \text{ H}_2\text{O}$, p.a.
- natrijev dihidrogenfosfat $\times \text{H}_2\text{O}$, p.a.
- dinatrijev hidrogenfosfat $\times 2 \text{ H}_2\text{O}$, p.a.
- natrijev hidrogenkarbonat, p.a.
- glukoza 96%, Kemika
- manitol, Fluka
- acivicin, Sigma

5.2 RAZTOPINE

5.2.1 Raztopine za sintezo in analizo konjugatov

- fosfatni pufer za HPLC analizo: zatehtamo 13,61 g KH_2PO_4 v 2l prečiščene vode ter nakisamo s H_3PO_4 do pH 3,5 ali pH 2,0 (v primeru NEM)

5.2.2 Osnovne raztopine

- za elektrode (3M raztopina KCl): 55,9 g KCl raztopimo v 250 ml bučki in dopolnimo do oznake
- Ringerjev pufer (305 mOsm, pH = 7,4): V 2l bučo nalijemo cca. 1,5l prečiščene vode. Dodamo mešalo. Nato v zaporedju raztopimo 4.200 g NaHCO_3 , 0.110 g $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \times \text{H}_2\text{O}$, 13.080 g NaCl, 0.746 g KCl, 0.352 g $\text{CaCl}_2 \times 2\text{H}_2\text{O}$, 0.488 g $\text{MgCl}_2 \times 6\text{H}_2\text{O}$ in 0.570 g $\text{NaHPO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$ in dopolnimo z destilirano vodo do oznake. Med poskusom, ko se pufer preprihava z karbogenom (5% CO_2 , 95% O_2), ima pufer pH vrednost 7,4.
- 625 mM raztopina glukoze: 2,815 g glukoze raztopimo v 25 ml bučki in z Ringerjevim pufrom dopolnimo do oznake
- 625 mM raztopina manitola: 2,850 g manitola raztopimo v 25 ml bučki ter z Ringerjevim pufrom dopolnimo do oznake
- 10 mM raztopina glukoze za transport tkiva: 0,937 g glukoze raztopimo v 500 ml bučki in z Ringerjevim pufrom dopolnimo do oznake

5.2.3 Akceptorske raztopine

Pripravili smo jih iz osnovnih raztopin. Na serozno stran smo v primeru poskusa MAN/GLU vedno dodajali 10 mM glukozo (800 μl 625 mM glukozne raztopine dopolnimo s 50 ml Ringerjevega pufra), na mukozno pa 10 mM raztopino manitola (800 μl 625 mM raztopine manitola dopolnimo s 50 ml Ringerjevega pufra), ki smo ji dodali približno natančno 5,00 mg acivicina. V vseh raztopinah smo kot osnovo za raztapljanje vzeli Ringerjev pufer. V primeru, da smo opravljali poskus GLU/GLU, smo dodali raztopino glukoze na obeh straneh, s tem da smo na mukozno stran dodali še acivicin.

5.2.4 Donorske raztopine

- poskusa s CDNB (MAN/GLU in GLU/GLU):

Natančno smo zatehtali približno 20,26 mg CDNB ter ga raztopili v 10 ml etanola (10 mM raztopina). Uporabili smo 1% raztopino, tako da smo 200 μ l pripravljene raztopine dopolnili do 20 ml z akceptorsko raztopino.

- poskus z et-DNP-SG (MAN/GLU):

Natančno smo zatehtali približno 4,41 mg et-DNP-SG in dopolnili z 11 ml akceptorske raztopine (1mM raztopina).

- poskusa z NEM-SG (MAN/GLU in GLU/GLU):

Natančno smo zatehtali približno 6,35 mg NEM in 15,94 mg GSH ter ju skupaj raztopili v 50 ml akceptorske raztopine (1mM raztopina).

- poskusa z et-NEM-SG (MAN/GLU in GLU/GLU):

Natančno smo zatehtali približno 5,0 mg NEM in 13,4 mg et-GSH ter ju raztopili v 50 ml akceptorske raztopine (1mM raztopina).

5.3 APARATURE

5.3.1 Pri sintezah

- tehtnici: Mettler Toledo AB54-S in Mettler H54AR
- pH meter: MA 5750 Iskra

5.3.2 Pri permeabilnostnih poskusih

- termostatirana vodna kopel: M3 LAUDA
- digitalni termometer: DT02 Dalmacija
- difuzijske celice Easy Mount z elektrodami in osem kanalnim napetostno tokovnim virom (VCC MC8), Physiologic Instruments Inc., ZDA

5.3.3 Za analizo

- HPLC: Hewlett Packard Series 1100 Chem Station z UV in fluorescentnim diode array detektorjem

5.4 METODE

5.4.1 Uporaba računalniških programov

Pri raziskovanju substratov smo si pomagali s programoma Pallas in Molinspiration. Oba nam na podlagi strukture preiskovanih substanc nudita podatke o fizikalno-kemijskih lastnostih teh spojin.

5.4.2 Izračun porazdelitvenega koeficienta

Pravi porazdelitveni koeficient (P) je razmerje med koncentracijama neioniziranih spojin v dvofaznem sistemu, kjer je ena od raztopin hidrofobna (običajno n-oktanol) in druga vodna (običajno voda):

$$P_{okt/vod} = \frac{[topljenec]_{okt}}{[topljenec]_{neion.vod}} \quad \text{enačba 2}$$

Logaritem tega razmerja označimo z logP in ga izračunamo:

$$\log P_{okt/vod} = \log \frac{[topljenec]_{okt}}{[topljenec]_{neion.vod}} \quad \text{enačba 3}$$

Navidezni porazdelitveni koeficient (D) je razmerje vsot koncentracij ionizirane in neionizirane oblike spojine v dvofaznem sistemu, ki je običajno sestavljen iz oktanela in pufru z določenim pH:

$$D_{okt/vod} = \frac{[topljenec]_{okt}}{[topljenec]_{ion.vod} + [topljenec]_{neion.vod}} \quad \text{enačba 4}$$

Logaritem navedenega razmerja dobimo z izračunom:

$$\log D_{okt/vod} = \log \frac{[topljenec]_{okt}}{[topljenec]_{ion.vod} + [topljenec]_{neion.vod}} \quad \text{enačba 5}$$

Oba parametra lahko s pomočjo porazdelitvene metode določimo eksperimentalno.

5.4.3 Priprava in vzdrževanje elektrod

Elektrode pripravimo tako, da primerno oblikovan nastavek za pipeto (spodaj odrezan pod določenim kotom) napolnimo z raztopino agarja (3-4%) v 3M KCl. Stik med nastavkom in elektrodo dobro zatesnimo s parafilmom.

Pripravljene elektrode priključimo na osemkanalni napetostni vir (VCC MC8) in preverimo njihovo delovanje. Napetostne elektrode morajo izkazovati nizko asimetrijo (pod 10 mV) in imeti določeno stabilnost v roku približno treh ur, kolikor časa traja

poskus. Vrednost toka, ki ga preverjamo tokovnim elektrodam, mora biti nad 60 in do 68 μA .

Elektrode vedno potopimo v 3M KCl in s parafilmom pokrite hranimo v hladilniku, da ohranijo zahtevane lastnosti. En dan pred poskusom jih moramo vzeti iz hladilnika ter pustiti, da se segrejejo na sobni temperaturi.

5.4.4 Priprava Easy Mount difuzijskih celic in VCC MC8

- Dan pred poskusom prižgemo aparaturo. Na aparaturi vse potenciometre nastavimo na 0,0 in celice s praznimi Easy Mount nastavki vpnemo v stojalo. Ugasnemo.
- Naslednji dan vklopimo VCC MC8 in termostatirano vodno kopel in počakamo, da se sistem segreje.
- Elektrode vstavimo v celice, potem ko jih speremo s prečiščeno vodo. Črne elektrode so napetostne in jih damo v odprtino bližje, bele so tokovne in jih vstavimo dlje od nastavka za tkivo. Pozorni smo, da so elektrode s konicami vzporedne nastavku za tkivo. Izhoda za V1 in I1 morata biti na eni, izhoda V2 in I2 pa na drugi strani nastavka.
- Celice napolnimo z Ringerjevim pufrom.
- Namestimo dotok karbogena.
- Na VCC MC8 nastavimo »function« na OPEN in »meter« na VOLTAGE. Izmerjeno napetost moramo nastaviti na nič, saj je posledica asimetrije elektrod. V primeru, da je negativna, nastavimo »offset« na +, če je pozitivna, pa na -. Z »offset« potenciometrom nastavljam napetost na 0,0 z vrtenjem gumba. Nato nastavimo »meter« na CURRENT in pritisnemo gumb PUSH TO ADJUST. Prikazani tok mora imeti vrednost med 60 in 68 μA , sicer elektrodi zamenjamo.
- Nastavimo »meter« na VOLTAGE in pritisnemo gumb PUSH TO ADJUST. Tako odčitamo upornost pufra, ki jo izničimo s tem, da med držanjem gumba PUSH TO ADJUST vrtimo potenciometer FLUID RES COMPENSATION do vrednosti 0,0.
- Na koncu nastavimo »function« na ZERO.

5.4.5 Priprava tkiva

Pripravimo 10 mM glukozo za transport tkiva, ki jo prepriamo s karbogenom ter ohladimo na ledu do 0°C.

Žrtvujemo podgano in ji odvzamemo črevo od želodca do cekuma. Tkivo shranimo v pripravljeno raztopino glukoze.

Odstranimo tkivo približno 20 cm od cekuma proti želodcu.

Speremo z Ringerjevim pufrom, da odstranimo ostanke.

Proti želodcu režemo segmente dolžine 2-3 cm, pri čemer se izogibamo Payerjevimi ploščam, ki so vidne kot bele lise.

Odrezan del tkiva prerežemo po mezenterialni črti.

5.4.6 Protokol poskusa

- Pripravimo tkivo po zgoraj opisanem postopku.
- Ves čas poskusa kontroliramo temperaturo, ki mora biti okoli 37°C.
- Iz celic s pomočjo injekcijske igle posrkamo pufer.
- Izvlečemo nastavek za tkivo.
- Tkivo speremo s pufrom in ga nataknemo na nastavek tako, da je mukozna stran obrnjena navzdol proti iglicam.
- Nastavek s tkivom pomažemo z mastjo ter ga vstavimo v celico.
- Dodamo 2500 µL ustrezne raztopine (raztopina manitola ali glukoze na mukozno, glukoze pa na serozno stran), ki jo predhodno segrejemo na 37°C.
- Počakamo približno 20 minut, da se sistem stabilizira.
- Izpraznimo donorske strani in dodamo 2500 µL donorske raztopine, ki smo jo segreli na 37°C.
- Nastavimo »function« na OPEN in »meter« na VOLTAGE. Skozi celoten poskus (razen pri merjenju napetosti in toka) moramo imeti VCC MC8 na teh nastavitvah. Vrednosti morajo biti 0,0, da izničimo vpliv razlike napetosti na serozni in mukozni strani.
- Začnemo meriti čas poskusa.
- Nastavimo »function« na OPEN in »meter« na VOLTAGE. Izpiše se nam vrednost napetosti, ki jo odčitamo.

- Nastavimo »function« na CLAMP in »meter« na CURRENT. Izpiše se nam vrednost kratkostičnega toka.
- Nastavimo »function« nazaj na OPEN in »meter« na VOLTAGE ter nadaljujemo s poskusom.
- Pri et-DNP-SG: Vsakih 25 minut jemljemo vzorce po 250 μL z akceptorske strani in vračamo enake količine akceptorskih raztopin. Na donorski strani jemljemo vsakič po 50 μL vzorca in raztopine ne vračamo. Odčitavamo električne parametre, kakor je opisano zgoraj.
Pri CDNB in et-NEM-SG: Vsakih 25 minut jemljemo vzorce po 250 μL z akceptorske in donorske strani ter vračamo enake količine ustreznih raztopin.
Pri NEM-SG: Vsakih 25 minut jemljemo vzorce po 250 μL z akceptorske strani ter vračamo enake količine akceptorskih raztopin.
- V primeru poskusov z manitolom po zadnjem odčitavanju dodamo na mukozno stran glukozo ter ponovno odčitamo napetost.
- Po koncu poskusa izpraznimo celice. Nastavimo »function« na ZERO in odstranimo elektrode.
- Elektrode potopimo v Ringerjev pufer in izmerimo asimetrijo napetostnih elektrod.
- Nastavimo »function« na OPEN in »meter« na VOLTAGE. Izpiše se nam vrednost napetosti, ki je posledica asimetrije elektrod, saj med elektrodama ni tkiva oziroma takega drugega vira napetosti.
- Elektrode speremo in pregledamo. Shranimo jih potopljene v 3M KCl na hladnem.
- Iz nastavkov odstranimo tkivo.
- Celice in nastavke očistimo v ultrazvočni kadički, speremo s prečiščeno vodo in posušimo.

5.4.7 Ocenjevanje vitalnosti tkiva

Vitalnost tkiva ovrednotimo z elektrofiziološkimi parametri. V primeru poškodbe, odmrlosti ali slabe vitalnosti tkiva, dobimo nižjo absolutno vrednost električnega potenciala ter nižjo transtktivno električno upornost (TER naj bi bila nad 20 Ω) in kratkostični tok v primerjavi z istimi parametri tkiv v ostalih celicah, kjer je tkivo vitalno. Dodaten kriterij živosti je odziv potenciala tkiva na dodatek glukoze na mukozno stran. ΔPd po dodatku glukoze naj bi bil višji od 1,0 mV.

Tkivo, ki je odmrlo že v začetku poskusa, smo zamenjali z novim. Kadar smo odmiranje tkiva opazili med poskusom, smo za izračun permeabilnostnega koeficienta ali pretoka uporabili vrednosti pred časom odmiranja tkiva oziroma smo vrednost izpustili.

5.4.8 Analiza preiskovanih spojin

CDNB

Med pripravljanjem raztopin za poskus smo istočasno pripravili standardne raztopine za umeritveno krivuljo. Te so bile v območju med 0,05% in 5% donorske raztopine.

Analiza je potekala na HPLC aparaturi pri temperaturi 40°C. Volumen injiciranja je bil 100 µl. Uporabili smo reverznofazno kolono Phenomenex Onyx Monolithic C18 (100x3,0mm) z ustrezno predkolono. Za mobilno fazo smo uporabili mešanico acetonitrila (5%-45% v času od 0 do 3 minut) in pufru s pH 3,5. Pretok mobilne faze je bil 4 ml/min. Detekcija CDNB je potekala pri valovni dolžini 280 nm. Retencijski čas je bil 2,63 min. Detekcija DNP-SG je potekala pri 335 nm, retencijski čas je bil 1,45 min.

et-DNP-SG

Med pripravljanjem raztopin za poskus smo istočasno pripravili standardne raztopine za umeritveno krivuljo. Te so bile v območju med 0,05% in 5% donorske raztopine.

Analiza je potekala na HPLC aparaturi pri temperaturi 35°C. Volumen injiciranja je bil 100 µl. Uporabili smo reverznofazno kolono Phenomenex Onyx Monolithic C18 (100x3,0mm) z ustrezno predkolono. Za mobilno fazo smo uporabili mešanico acetonitrila in pufru s pH 3,5 (preglednica I).

Preglednica I: uporabljena mobilna faza na HPLC pri poskusu z et-DNP-SG

čas (min)	% acetonitrila	% pufru s pH 3,5
0	10	90
0:30	10	90
2:00	30	70
2:30	30	70
2:31 →	10	90

Pretok mobilne faze je bil 3 ml/min. Detekcija je potekala pri valovni dolžini 335 nm. Retencijski čas je bil 1,15 min za et-DNP-SG ter 2,24 min za DNP-SG.

NEM-SG

Med pripravljanjem raztopin za poskus smo istočasno pripravili standardne raztopine za umeritveno krivuljo. Te so bile v območju med 0,05% in 5% donorske raztopine.

Analiza je potekala na HPLC aparaturi pri temperaturi 35°C. Volumen injiciranja je bil 100 µl. Uporabili smo reverznofazno kolono Gemini 3µm C18 (50x4,60mm) z ustrezno predkolono. Za mobilno fazo smo uporabili mešanico 5% acetonitrila in 95% pufru s pH 2,0. Pretok mobilne faze je bil 3 ml/min. Detekcija je potekala pri valovni dolžini 200 nm. Retencijski čas vrhov je bil 0,82 min ter 0,94 min.

et-NEM-SG

Med pripravljanjem raztopin za poskus smo istočasno pripravili standardne raztopine za umeritveno krivuljo. Te so bile v območju med 0,05% in 5% donorske raztopine.

Analiza je potekala na HPLC aparaturi pri temperaturi pri temperaturi 35°C. Volumen injiciranja je bil 100 µl. Uporabili smo reverznofazno kolono Gemini 3µm C18 (50x4,60mm) z ustrezno predkolono. Za mobilno fazo smo uporabili mešanico 5% acetonitrila in 95% pufru s pH 2,0. Pretok mobilne faze je bil 3 ml/min. Detekcija je potekala pri valovni dolžini 200 nm. Retencijski čas obeh vrhov je bil 4,12 min ter 5,05 min.

5.4.9 Izračun permeabilnostnega koeficienta in pretoka (fluksa)

Izračun permeabilnostnega koeficienta oziroma izračun za pretok uporabimo ob zaključku vrednotenja *in vitro* poskusa.

Množino snovi, ki preide preko membrane v določenem času, izračunamo na sledeči način:

$$Q_t = \sum_{i=1}^{N-1} (C_i \cdot V_v) + C_t \cdot V_C \quad \text{enačba 6}$$

Q_t ... množina snovi, ki je prešla membrano v času t [mol]

C_i ... koncentracija snovi v prejšnjih vzorcih [mol/L]

V_v ... volumen vzorca [L]

C_t ... koncentracija snovi v vzorcu v času t [mol/L]

V_C ... volumen celice [L]

Hitrost difuzije $\frac{dQ}{dt}$ [mol/h] lahko izrazimo kot:

$$\frac{dQ}{dt} = k(C_D - C_A) \quad \text{enačba 7}$$

kjer je:

k ... konstanta difuzije [L/h]

C_D ... donorska koncentracija [mol/L]

C_A ... akceptorska koncentracija [mol/L]

Pri poskusu velja $C_D \gg C_A$, zato upoštevamo poenostavitev:

$$\frac{dQ}{dt} = k \cdot C_D = k_D \quad \text{enačba 8}$$

k_D ... nova konstanta difuzije [mol/h]

Integracija enačbe 9,

$$\int_0^{Q_t} dQ = k_D \int_0^t dt \quad \text{enačba 9}$$

da rezultat:

$$Q_t = k_D \cdot t + n \quad \text{enačba 10}$$

Pretok J [mol/hcm²] izračunamo:

$$J = \frac{k_D}{A} = \frac{Q_t}{t \cdot A} \quad \text{enačba 11}$$

A ... površina, skozi katero snov difundira [cm²]

Permeabilnostni koeficient P_{app} [cm/s] pa dobimo z enačbo 12:

$$P_{app} = \frac{J}{C_D} \quad \text{enačba 12}$$

5.4.10 Statistične metode

Za statistično analizo rezultatov smo uporabili program Microsoft Excel, kjer smo izbirali med metodami, ki jih ta program omogoča. Elektrofiziološke parametre in pretok oziroma permeabilnost konjugatov smo ovrednotili z uporabo dvostranskega Studentovega t-testa.

Postavili smo ničelno (H_0) in alternativno (H_A) hipotezo.

H_0 : Parametri se ne razlikujejo.

H_A : Parametri se razlikujejo.

Poskušali smo zavreči ničelno hipotezo, da se parametri pod različnimi pogoji ne razlikujejo in s tem dokazati, da so parametri v različnih pogojih drugačni.

Izbrali smo dovoljeno napako (α) z vrednostjo 0,05 (5%). Izračunali smo vrednost F-testa, da smo ugotovili, ali imata parametra enake ($P \geq 0,05$) ali različne variance ($P < 0,05$) in potem uporabili primeren dvovzorčni t-test. Izračunana »p« vrednost je napaka, ki jo lahko naredimo, če zavržemo ničelno hipotezo. Signifikantnost (S) pri stopnji napake α smo zaznali, če je bila vrednost p manjša od α . Takrat smo ničelno hipotezo zavrgli in sprejeli alternativno hipotezo. Če je bila vrednost p večja od α , ničelne hipoteze nismo mogli zavreči.

6 REZULTATI IN RAZPRAVA

Ugotovitve in rezultate našega dela smo predstavili v obliki preglednic in slik. Najprej smo opisali fizikalno-kemijske lastnosti izbranih spojin s pomočjo uporabe računalniških programov Pallas in Molinspiration. Nato smo nanizali rezultate permeabilnostnih poskusov ter z dodanimi shemami ponazorili dogajanje pri prehodu skozi podganje črevo. Pri permeabilnostnih poskusih smo opazovali transport preko sekretornih prenašalnih proteinov (MRP2). Le-ti so nameščeni na apikalni membrani, kjer prepoznavajo in prenašajo substrate, med katere spadajo tudi naše izbrane spojine. Transport s tem prenašalcem poveča permeabilnost v S-M smeri.

Na koncu smo dodali še preglednico z zahtevami za preiskovane spojine ter opisom (ne)ustreznih dejavnikov. Zahteve smo ovrednotili glede na opisana teoretična dognanja in glede na izvedeno eksperimentalne delo.

6.1 IN SILICO PREDVIDEVANJA FIZIKALNO-KEMIJSKIH LASTNOSTI MOŽNIH OZNAČEVALCEV

Biološka uporabnost je pogosto najpomembnejša ocena pri razvoju biološko aktivnih molekul, ki so kasneje uporabne kot zdravilne učinkovine. Obdelava učinkovin in spojin v razvoju, kot jo opisuje Lipinski, je bila prvi vodnik za korelacijo s fizikalno-kemijskimi lastnostmi za napovedovanje ugodne absorpcije (14, 47). Lipinski je na podlagi porazdelitve izračunanih lastnosti za veliko populacijo zdravilnih učinkovin postavil določene kriterije. Mejne vrednosti teh kriterijev se gibljejo okoli števila pet oziroma večkratnika tega števila, zato so ga poimenovali tudi »pravilo petic« in se nanaša na logP, proton donorje/akceptorje ter molekulska maso (14).

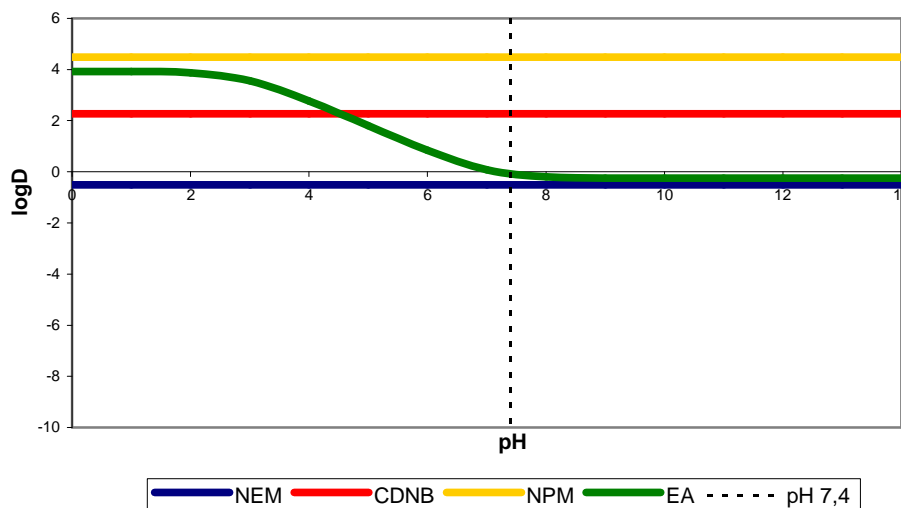
Nekateri drugi avtorji zagovarjajo tezo, da lipofilnost (izračunana s pomočjo logP) ter molekulska masa sama po sebi nista zadostna faktorja za opis strukturno-specifičnih lastnosti, ki vplivajo na biološko uporabnost. Nobeden od teh enostavnih dejavnikov namreč ne razlaga posledic ciklizacije in intramolekularnih reakcij, čeprav le-te lahko omejujejo molekularno fleksibilnost, ki vpliva na samo absorpcijo. Poskušali so odkriti pravila za optimizacijo biološke uporabnosti z lastnostmi, neodvisnimi od molekulske mase, ki se lahko tekom strukturne modifikacije spremeni. Veber in sodelavci so v poskusu na podganah kriterijem dodali število rotacijskih vezi in ugotovili, da je precej uporabno (47). Nadalje so opazovali skupno polarno površino molekule (PSA), ki je prav tako dala učinkovite predpostavke o biološki uporabnosti. Rotacijsko vez so definirali kot katerokoli enojno vez, ki ni v obroču ali neprotonsko močno vez, ki ni končna. Zaradi visoke rotacijske energijske bariere so izključili amidno C-N vez. PSA so izračunali po atomsko-osnovani metodi. Izračunana površina je bila v tesni povezavi z vsoto proton donorjev in akceptorjev. Iz opazovanj so ugotovili, da v primeru, če je število rotacijskih vezi manjše od 10 ter PSA enaka ali nižja od 140 \AA^2 (ali vsota proton donorjev in akceptorjev 12 ali manj), obstaja velika verjetnost za dobro biološko uporabnost spojine pri podganah (47). Prav tako naj bi bili biološka uporabnost in permeabilnost višji, če imamo manj H-vezi in višji logP ali logD. Prednost teh novo definiranih pravil je v tem, da lahko z njimi opazujemo tudi substance z višjo molekulska maso (več od 500, kot predlaga Lipinski), kar je bilo do sedaj manj raziskano (47, 48, 49).

6.1.1 Vrednotenje logD

Program Pallas na podlagi strukture *in silico* predvideva fizikalno-kemijske lastnosti spojin, kot so pKa, logP in logD. Program temelji na treh različnih sistemih napovedovanja. Ti sistemi spojino razgradijo na fragmente in podajo vrednost logP kot vsoto ustreznih fragmentnih konstant.

Z njim smo vrednotili porazdelitveni koeficient pri različnih pH vrednostih. Navidezni porazdelitveni koeficient logD govori o lipofilnosti pri različnih pH, hkrati pa z njim napovedujemo sposobnost transcelularne permeabilnosti. Primerjali smo logD uporabljenih konjugatov, ki nam jih je podal program. V nasprotju z logP, kjer je vključena le ena (običajno nevtralna) komponenta, program pri izračunu logD upošteva vse komponente te spojine. Na podlagi računov smo narisali grafe primerjav med izbranimi spojinami. V dvofaznem sistemu oktanol in pufer s pH 7,4 logD naj ne bi presegal vrednosti 4,15 (47), sicer je spojina preveč lipofilna ter se zato začne kopičiti v membrani.

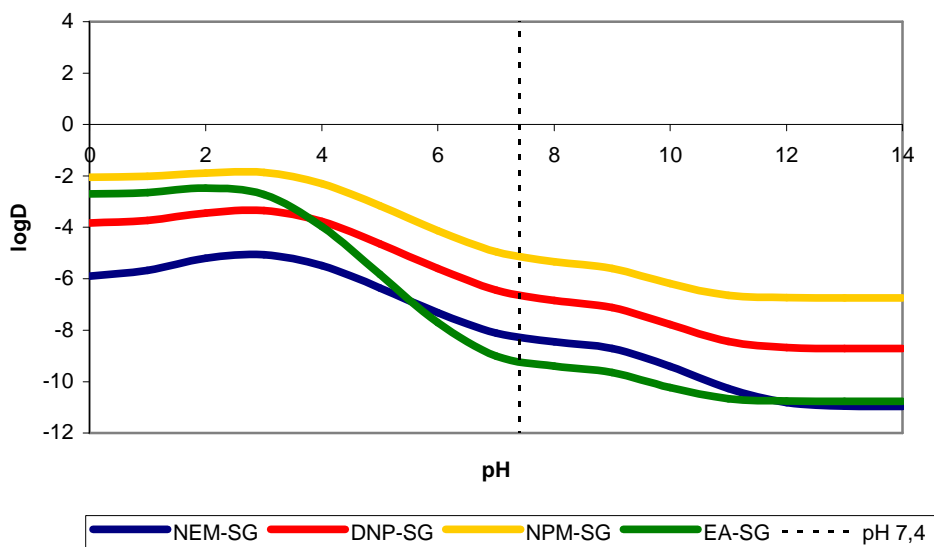
Spodnja slika (slika 8) nam kaže vrednosti logD pri štirih izbranih reagentih. V območju okoli pH 7,4, so vrednosti reagentov v okviru predpisa v vseh primerih (CDNB, NEM, EA), razen pri NPM, ki to vrednost presega ($\log D \sim 4,5$).



Slika 8: LogD, izračunan s programom Pallas, pri štirih preiskovanih reagentih

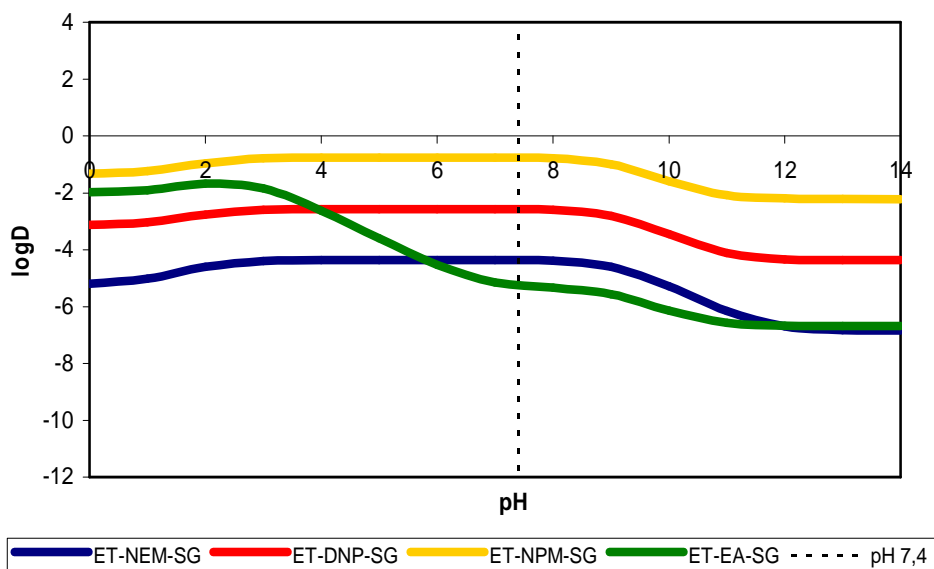
Na sliki 9 vidimo prikazan graf za konjugate z GSH. Razberemo lahko, da je pri pH 7,4 tokrat na vrhu zopet NPM-SG ($\log D \sim 5$). Po vrednosti mu sledita DNP-SG ter NEM-SG.

Svojevrstno krivuljo zaradi dodatne kislinske oblike predstavlja EA-SG, ki pa je po vrednosti logD na repu opisanih. Navkljub vsemu moramo zaključiti, da glede na programske izračune nobeden od konjugatov ni dovolj primeren za prehod preko membrane, saj so predpisane vrednosti za logD pri omenjenem pH nekje med -1,5 in 4,15.



Slika 9: LogD, izračunan s programom Pallas, za štiri izbrane konjugate

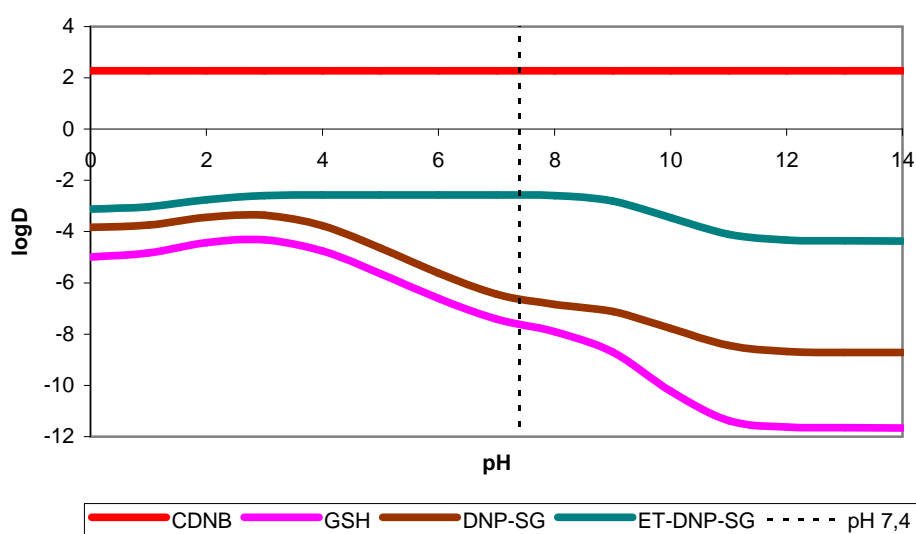
Naslednja slika (slika 10) nam podaja vrednosti logD za estre konjugatov, ki so pri pH 7,4 prav tako bolj ali manj neustrezne. Izjema je v tem primeru et-NPM-SG, katerega vrednost se nahaja v območju okoli -1. Po vrsti mu sledijo et-DNP-SG (logD~-3), et-NEM-SG ter svojevrsten primer krivulje et-EA-SG (logD~-6).



Slika 10: LogD, izračunan s programom Pallas, za izbrane estre

Primerjali smo še logD za najbolj obetavno spojino CDNB, konjugat DNP-SG ter ester et-DNP-SG. Iz slike 11 vidimo, da sam prekursor ustreza predpisani vrednosti (do 4,15), medtem ko konjugata, tako estrski (logD~-3) kot glutationski (logD~-9), zahtevi ne zadostita.

Vsi skupaj v celico prehajajo pasivno. Vemo pa, da je DNP-SG v primerjavi s prekursorjem precej hidrofilen ter zaradi tega težje prehaja (tako v celico kot tudi iz nje). Prednost prekursorja je, da zlahka preide v celico, kjer se konjugira do DNP-SG. V taki obliki pasivno sicer spet težje prehaja na drugo stran, vendar pa prehaja aktivno s pomočjo prenašalca, kar je v našem primeru zaželeno.



Slika 11: LogD, izračunan s programom Pallas, za CDNB in njegove konjugate

6.1.2 Vrednotenje nekaterih drugih fizikalno-kemijskih lastnosti, ki vplivajo na prehod

Primerjali smo posamezne dejavnike, ki imajo vpliv na prehod obravnavanih substratov skozi membrano enterocitov in zbrali rezultate (preglednica II). Molinspiration je računalniški program, ki nam je na podlagi narisane strukture izračunal predvidene fizikalno-kemijske lastnosti molekul (logP, PSA, ostali kriteriji pravila petic ...). Izračuni temeljijo na metodi, ki zajema vsoto fragmentov molekule in korekcijske faktorje.

Preglednica II: Primerjava nekaterih fizikalno-kemijskih lastnosti izbranih molekul, določenih s pomočjo programa Molinspiration

<i>molekula</i>	<i>logP</i>	<i>PSA</i>	<i>št. atom</i>	<i>Mw</i>	<i>nON</i>	<i>nOHNH</i>	<i>nROTb</i>	<i>volumen</i>
GSH	-5,0	158,817	20	307	9	6	9	259,2
GSH*	-4,8	166,094	20	305	9	5	9	270,5
et-GSH	-3,7	147,823	22	335	9	5	11	293,6
et-GSH*	-4,3	152,271	22	334	9	5	11	307,6
CDNB	2,5	91,648	13	203	6	0	2	144,2
DNP-SG	-4,1	250,465	32	473	15	6	13	377,8
DNP-SG*	-3,6	257,742	32	472	15	5	13	392,6
et-DNP-SG	-2,2	239,471	34	501	15	5	15	412,1
et-DNP-SG*	-2,8	243,919	34	501	15	5	15	429,7
NEM-SG	-5,2	196,197	28	418	12	6	11	349,8
NEM-SG*	-5,0	203,474	29	431	12	5	12	381,4
et-NEM-SG	-4,3	185,203	30	446	12	5	13	384,1
et-NEM-SG*	-4,7	189,651	30	446	12	5	13	401,7
NPM-SG	-2,5	196,197	43	605	12	6	12	509,2
NPM-SG*	-2,0	203,474	43	604	12	5	12	524,0
et-NPM-SG	-0,6	185,203	45	633	12	5	14	543,5
et-NPM-SG*	-1,2	189,651	45	633	12	5	14	561,1
EA	3,4	63,604	19	303	4	1	6	243,9
EA*	0,6	66,433	19	302	4	0	6	241,2
EA-SG	-2,5	205,350	36	568	12	7	17	461,1
EA-SG*	-1,9	215,456	36	566	12	5	17	473,2
et-EA-SG	-0,6	194,356	38	596	12	6	19	495,5
et-EA-SG*	-1,0	201,633	38	595	12	5	19	510,3

*.....oznaka ob molekuli pomeni, da je le-ta v ioniziranem stanju (pH =7,4)
PSA.....polarna površina molekule (angl. total polar surface area) v Å²
Mw.....molekulska masa v g/mol
nON.....število proton akceptorjev
nOHNH.....število proton donorjev
nROTb.....število rotacijskih vezi

Za dobro biološko uporabnost smo pri teh dejavnikih morali upoštevati, da je logP med -1 in pet, PSA pod 140 Å², ugodna molekulska masa je manjša od 500 g/mol, število proton akceptorjev manjše od 10 in proton donorjev manj kot 5, število rotacijskih vezi mora biti prav tako nižje od 10. Kriterija za omejitev števila atomov in sam volumen molekul nismo zasledili, vendar smo predvidevali, da mora tako eno kot drugo biti čim nižje, saj je oboje povezano z molekulsko maso.

Iz preglednice razberemo, da med izbranimi spojinami izstopa CDNB. Glede na vse zgoraj našete kriterije smatramo, da je najbolj uporaben. Ustrezen je v vseh pogledih, tako z

vidika logP kot tudi PSA, molekulske mase ter števila proton donorjev, akceptorjev in rotacijskih vezi. Tudi po številu atomov in volumnu je bil daleč pred ostalimi. EA je glede na navedene lastnosti precej ustrezna, vendar je zaradi drugih pomanjkljivosti (slabša permeabilnost, nestandardna sinteza) v eksperimentalni del nismo vključili. Ostali konjugati se ujemajo zgolj v nekaterih lastnostih (logP ali Mr). Odločili smo se, da vsaj en pozitiven dejavnik že zadošča za praktično izvedbo poskusa. V eksperimentalni del smo tako vključili še DNP-SG, NEM-SG in za primerjavo estrsko različico obeh, medtem ko NPM-SG zaradi neustreznosti dejavnikov v *in vitro* poskusih nismo uporabili.

6.1.3 Primerjava logD glede na obe *in silico* metodi

Z uporabljenima programoma Pallas in Molinspiration smo primerjali izračunan navidezni porazdelitveni koeficient preiskovanih spojin. Ugotovili smo, da so pri vseh rezultatih odstopanja, ki pa so v nekaterih primerih res velika (preglednica III). Nekateri avtorji navajajo, da so določene vrednosti logP za isto spojino sprejemljive, če se razlikujejo za manj kot od 0,3 logaritemske enote, kar v nelogaritemski skali pomeni dvakratno vrednost ($\log 2 = 0,3$) (50). V tem primeru bi bilo večino navedenih spojin potrebno drugače ovrednotiti, saj lahko iz razpredelnice razberemo, da temu kriteriju ustrezata le dve spojin (CDNB in et-DNP-SG).

Preglednica III: Primerjava navideznega porazdelitvenega koeficienta izbranih spojin med računalniškima programoma

preiskovana spojina	logD (Molinspiration)	logD (Pallas)	razlika
CDNB	2,5	2,3	0,2
DNP-SG	- 3,6	-6,4	2,8
et-DNP-SG	- 2,8	-2,6	0,2
NEM-SG	- 5,0	- 8,1	3,1
et-NEM-SG	- 4,7	- 4,4	0,3
NPM-SG	- 2,0	- 5,0	3,0
et-NPM-SG	- 1,2	- 0,8	0,4
EA	0,6	0,1	0,5
EA-SG	- 1,9	-9,0	7,1
et-EA-SG	- 1,0	- 5,1	4,1

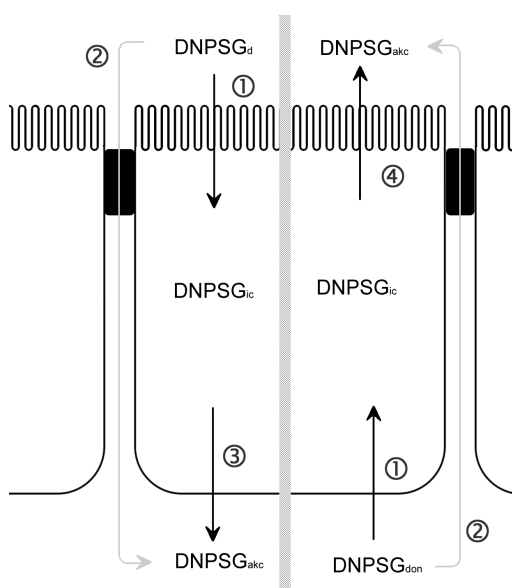
Zgoraj navedeni rezultati so najverjetneje izredno slab približek realnih vrednosti. Po opisani študiji (50) lahko predvidevamo, da so vsi *in silico* modeli v primerjavi z eksperimentalno pridobljenimi podatki slabši za napovedovanje logD. Računski modeli

namreč temeljijo na vsoti prispevkov posamezne molekule, le-tem pa dodajajo razne konstante za boljši približek. Dobljena vrednost se pogosto ne ujema z vrednostjo, pridobljeno na podlagi porazdelitvene metode (50). *In silico* modeli nam sicer delo olajšajo, saj omogočajo predvidevanja določenih dejavnikov, vendar so ti rezultati v splošnem manj zanesljivi.

6.2 IN VITRO POSKUSI V DVOPROSTORNIH DIFUZIJSKIH CELICAH S CDNB IN ET-DNP-SG

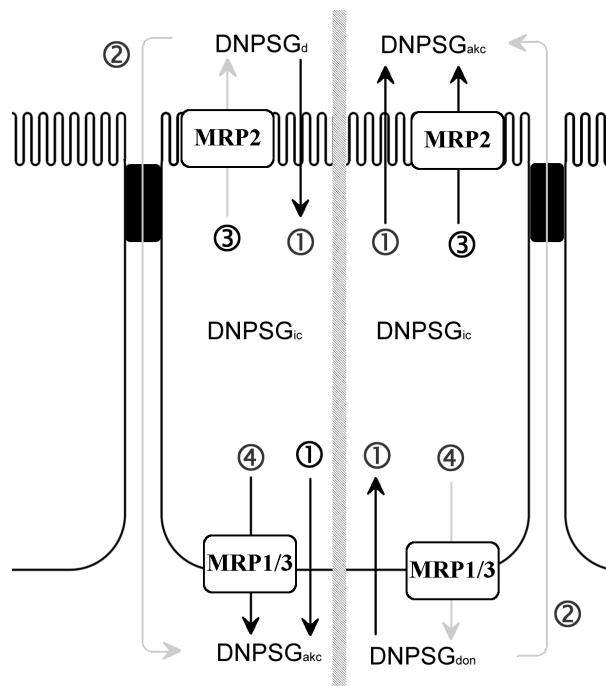
Konjugat DNP-SG smo obravnavali kot nekakšen idealen primer označevalca za MRP2. Na sliki 12 vidimo prehod konjugata v enterocit in iz njega. V enterocitu se nahaja encim GGT, ki je dejaven samo na apikalni strani. Na GSH konjugatu bi prišlo do hidrolize γ -glutaminske kisline. Vendar zaradi prisotnosti acivicina, ireverzibilnega GGT inhibitorja, ki smo ga dodali v raztopino na mukozno stran, do tega ne pride in skozi celice prehaja celoten konjugat. Če konjugat dodamo na mukozni strani (donorska stran), gre le-ta v večini skozi membrano v celico (slika 12 – točka 1 zgoraj), kjer ostaja konjugiran. Na drugi strani celice prehaja skozi bazolateralno membrano na serozno (akceptorsko) stran (slika 12 – točka 3). Možno je, da konjugat v manjši meri prehaja na serozno stran tudi po paracelularni poti (skozi tesne stike), ki jo sicer obravnavamo kot stransko pot (slika 12 – točka 2 levo).

Ko je donorska stran serozna, konjugat prehaja v celico preko bazolateralne membrane (slika 12 – točka 1 spodaj) in na drugi strani izstopa skozi apikalno membrano v lumen črevesa (slika 12 – točka 4). Tudi v tem primeru je možna kolateralna pot preko tesnih stikov (slika 12 – točka 2 desno), ki se izogne sami celici in konjugat preide na mukozno stran. Ta vrsta poti je v primerjavi s transcelularno bolj ali manj zanemarljiva. Hitrost paracelularnega prehoda je namreč enaka v obeh smereh, kar rešimo z uporabo S-M/M-S razmerja, medtem ko je transcelularna pot drugače zasnovana.



Slika 12: Prehod DNP-SG skozi enterocit

Spodnja slika je podobna prej opisani, vendar je dopolnjena z umestitvijo prenašalcev na apikalni in bazolateralni membrani. Na apikalni membrani se nahaja MRP2 prenašalec, na bazolateralni pa MRP1 in/ali MRP3. Prenášalci imajo vpliv na hitrost transcelularnega prehoda. Procese torej delimo na pasivne, ko konjugat samostojno prehaja membrano (slika 13 – točka 1) ali pa na aktivne, ko prehod poteka s prenašalci (slika 13 – točka 3 in 4). Prehod skozi tesne stike je, kot že omenjeno, obrobne pomena (slika 13 – točka 2). Kadar imamo preiskovano spojino na mukozni strani (slika 13 – levo), velik koncentracijski gradient povzroči, da je transport z MRP2 obrobne pomena in tako izstopa pasivni transport. Na drugi strani, kjer je bazolateralna membrana, sta verjetna dva procesa: konjugat gre skozi membrano brez pomoči (slika 13 – točka 1 levo spodaj) ali pa se konjugat na drugo stran prenese aktivno s pomočjo MRP1 ali MRP3 (slika 13 – točka 4 levo). Na drugi strani imamo drugačen potek pri serozni donorski strani. Tam je prehod konjugata preko bazolateralne membrane zopet pasiven, medtem ko je na apikalni strani lahko tako pasiven (slika 13 – točka 1 desno zgoraj) kot tudi aktiven, omogočen z MRP2 prenašalcem (slika 13 – točka 3 desno). Izstopanje konjugata nazaj na donorsko stran s pomočjo prenašalcev je v obeh primerih manj verjetno (slika 13 – točka 4 desno spodaj in točka 3 levo zgoraj).



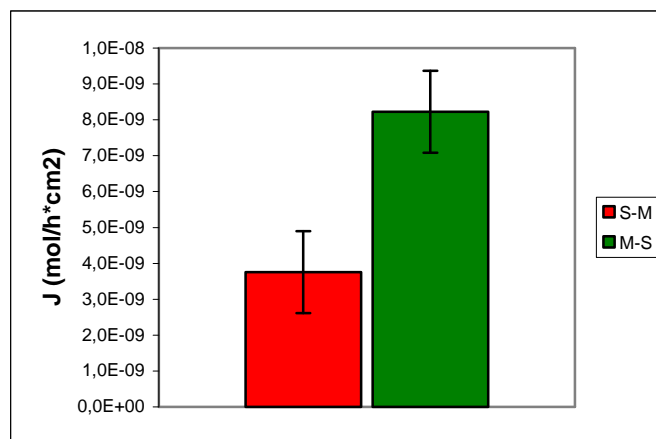
Slika 13: prehod DNP-SG skozi enterocit s prenašalci

6.2.1 Poskus CDNB manitol/glukoza

Preglednica IV: Statistična obdelava izračunanih pretokov DNP-SG skozi enterocit pri poskusu CDNB MAN/GLU

	J[mol/(h*cm ²)]							
celica	1	2	3	4	5	6	7	8
S-M	3,7E-09	4,6E-09	3,1E-09	5,3E-09	4,6E-09	4,0E-09	3,1E-09	1,7E-09
M-S	5,7E-09	4,4E-09	1,2E-08	1,0E-08	1,1E-08	1,0E-08	6,2E-09	6,8E-09
	povprečje	RSD [%]	F-test	T-test	razmerje			
S-M	3,76E-09	30,4	0,03	0,002	0,46			
M-S	8,22E-09	33,5	EV	S				

Izračunali smo pretoke DNP-SG skozi segment podganjega črevesa, ki nastanejo po dodatku 100 μM CDNB v difuzijske celice. Po primerjavi pretokov v S-M in M-S smeri smo opazili značilne razlike. Po izračunu F-testa, smo uporabili t-test z enakima variancama in dobili vrednost $p = 0,002$, kar je nižje od postavljene dovoljene napake $\alpha = 0,05$. S tem smo lahko ovrgli ničelno hipotezo in sprejeli alternativno, ki govori o različnosti parametrov. Prehod z mukozne na serozno stran je bil namreč približno dvakrat višji, kar razberemo tudi s spodnjega grafa. Sklepali smo, da se v ta proces vključujejo prenašalci na bazolateralni membrani (MRP1/3).



Slika 14: Primerjava pretokov pri poskusu s CDNB MAN/GLU v različnih smereh

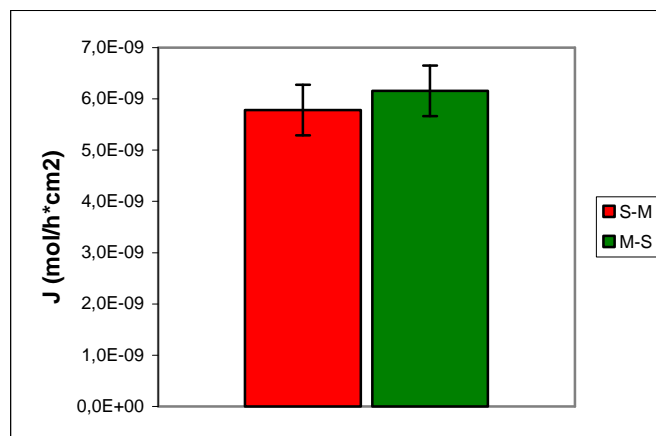
Električni parametri so bili ves čas poskusa v dovoljenih mejah. Po končanem poskusu smo dodali 625 mM raztopino glukoze na mukozno stran in Pd se je v povprečju spremenil iz 1,8 na 2,9 mV, kar ustreza predpisani zahtevi za ΔPd , ki naj bi bila vsaj 1,0 mV.

6.2.2 Poskus CDN B glukoza/glukoza

Preglednica V: Statistična obdelava izračunanih pretokov DNP-SG skozi enterocit pri poskusu CDN B GLU/GLU

celica	J[mol/(h*cm ²)]							
	1	2	3	4	5	6	7	8
S-M	6,4E-09	6,3E-09	5,6E-09	6,2E-09	5,5E-09	5,9E-09	5,3E-09	5,1E-09
M-S	6,3E-09	7,6E-09	5,2E-09	7,2E-09	6,5E-09	5,8E-09	5,7E-09	4,9E-09
	povprečje	RSD [%]	F-test	T-test	razmerje			
S-M	5,78E-09	8,5	0,10	0,34	0,93			
M-S	6,16E-09	15,6	RV	NS				

Pri *in vitro* poskusu z glukozo na obeh straneh, kjer smo 100 μ M CDN B dodali tako na serozno kot mukozno stran, nismo opazili statistično značilnih razlik pri opazovanju prehoda konjugata DNP-SG v smeri S-M in M-S. Izračunan t-test je dal vrednost p, ki je bila višja od postavljene napake α in zato ne moremo govoriti o neenakosti parametrov. Tudi samo razmerje pretoka v S-M in M-S smeri je bilo okoli ena, kar dokazuje, da gre pri tem poskusu za enak transport v obeh smereh.



Slika 15: Primerjava pretokov pri poskusu s CDN B GLU/GLU v različnih smereh

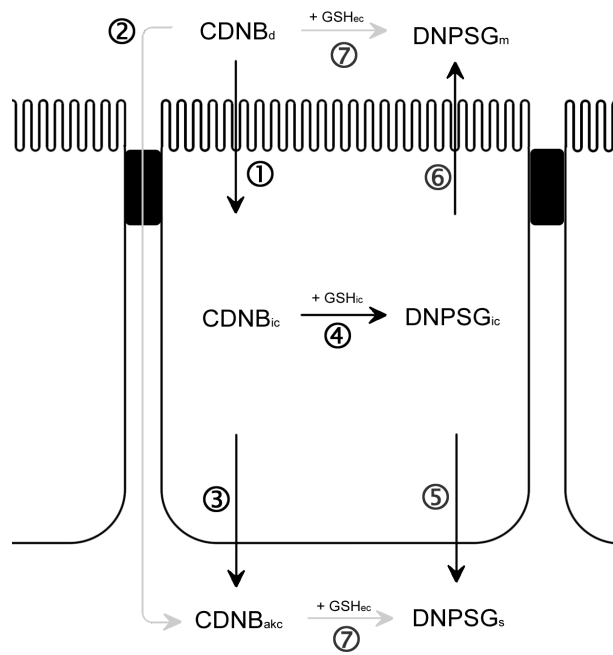
Električni parametri so bili ves čas poskusa v dovoljenih mejah (TER od 50 do 20 Ω), kar je dokaz za preživetje tkiva.

V navedenih poskusih (6.2.1 in 6.2.2) smo vzorce jemali tako z akceptorske kot tudi z donorske strani, saj se je konjugat (DNP-SG) tvoril v enterocitih med poskusom in nato pasivno ali s prenašalci prehajal na mukozno in/ali serozno stran. Z vzorčenjem z obeh strani smo opazovali potek prehajanja konjugata iz enterocitov.

Po primerjavi obeh poskusov smo ugotovili, da se razmerji S-M/M-S med poskusoma z manitolom oziroma glukozo razlikujeta za faktor 2 in sta statistično signifikantno različni. Na osnovi tega smo v primeru prisotnosti glukoze na mukozni strani zaključili, da je najverjetneje povečan transport v S-M smeri. Sklepali smo, da so v proces prehoda v tem primeru vključeni apikalni MRP2 prenašalci, ki spojine usmerjajo v lumen črevesa. Možno je sicer, da pride do inhibicije prenašalcev na bazolateralni membrani, vendar je po dostopnih literaturnih virih verjetnejša aktivacija MRP2.

Z veliko verjetnostjo sklepamo, da se prekursor (CDNB) intracelularno konjugira z GSH. Nastane konjugat DNP-SG (slika 16 - točka 1 in 4). Pri konjugaciji naj bi sodeloval encim GST. Konjugat lahko preide skozi membrano na serozno stran (slika 16 - točka 5) ali pa se vrne na isto (mukozno) stran (slika 16 - točka 6). Glede na domnevno prisotnost GSH tudi ekstracelularno, se lahko konjugat tvori tudi zunaj celice (slika 16 - točka 7). Ta proces se dogaja na mukozni in, kadar skozi celice ne prehaja konjugat, ampak kar prekursor, tudi na serozni strani (slika 16 - točka 3 in 7). Ena od verjetnih poti je še pot skozi tesne stike, po kateri prekursor prehaja na drugo stran ter s tem daje možnost za ekstracelularno tvorbo konjugata na serozni strani (slika 16 - točka 2 in 7). Proces prehoda po paracelularni poti sta sicer obstranskega pomena, saj se prekursor bolj ali manj v celoti konjugira v notranjosti enterocita. Zaradi svoje lipofilne narave pasivno transcelularno prehaja membrano in tvori konjugat, ki je za samo celico z vidika toksičnosti sprejemljivejša oblika. Prehod CDNB po paracelularni poti je torej minimalen. Tvorba konjugata zunaj celice je malo verjetna tudi zaradi nahajanja ekstracelularnega GSH, ki ga je mnogo manj kot v samem enterocitu. Zunaj naj ne bi bilo prisotnega niti encima (GST), kar še dodatno upočasni potencialno možno konjugacijo.

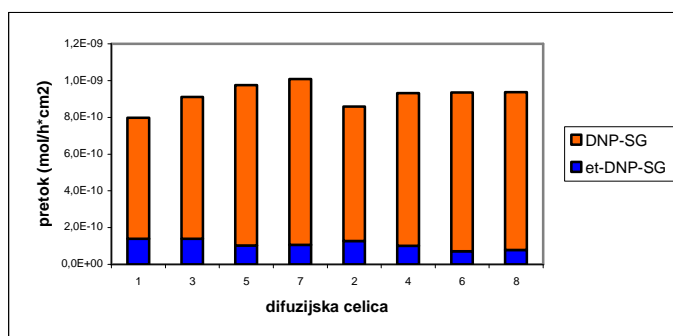
Opisani procesi veljajo za poskus, kjer je donorska stran mukozna in akceptorska serozna. V obratnem primeru je obrnjena tudi slika (primerjava opisa pri sliki 12).



Slika 16: Prehod CDNB skozi enterocit

6.2.3 Poskus et-DNP-SG manitol/glukoza

Pretoke za estrski konjugat smo primerjali s podatki za konjugat DNP-SG. Ugotovili smo (slika 17), da skozi enterocit preide le malo estra. Rezultati nam nakazujejo, da se ester v veliki meri hidrolizira do konjugata že v notranjosti celice.



Slika 17: Primerjava pretokov DNP-SG in et-DNP-SG skozi enterocit

Vzorce smo jemali tako z akceptorske kot tudi z donorske strani, saj je konjugat nastajal tekom prehoda skozi enterocit, potem ko so ga hidrolizirale esteraze in prehajal na obe strani. Skozi eno ali drugo membrano (v S-M ali M-S smeri) je torej večinoma prehajal hidroliziran DNP-SG, kar smo potrdili tudi z izračunom odstotka hidrolize estra. Le-ta je v obeh primerih, tako pri dodatku estra na mukozno (celice C1, C3, C5, C7) kot tudi na serozno stran (celice C2, C4, C6, C8), dosegal okoli 90% ali več (preglednica VI).

Preglednica VI: Izračun hidrolize estra pri prehodu skozi enterocit po posameznih celicah

dodatek estra	J[mol/(h*cm ²)]							
	mukozna stran				serozna stran			
	C1*	C3*	C5*	C7*	C2*	C4*	C6*	C8*
<i>et-DNPSG</i> (1)	1,40E-10	1,39E-10	1,02E-10	1,07E-10	1,27E-10	1,01E-10	7,11E-11	7,77E-11
<i>DNPSG_{M-S}</i> (2)	6,58E-10	7,72E-10	8,73E-10	9,02E-10	7,31E-10	8,31E-10	8,65E-10	8,60E-10
<i>DNPSG_{S-M}</i> (3)	2,93E-09	8,45E-09	1,66E-08	1,88E-08	1,07E-09	2,58E-11	2,97E-09	1,80E-09
skupaj (1+2+3)	3,73E-09	9,36E-09	1,76E-08	1,98E-08	1,93E-09	9,58E-10	3,91E-09	2,74E-09
hidroliza [%]**	96,3	98,5	99,4	99,5	93,4	89,4	98,2	97,2

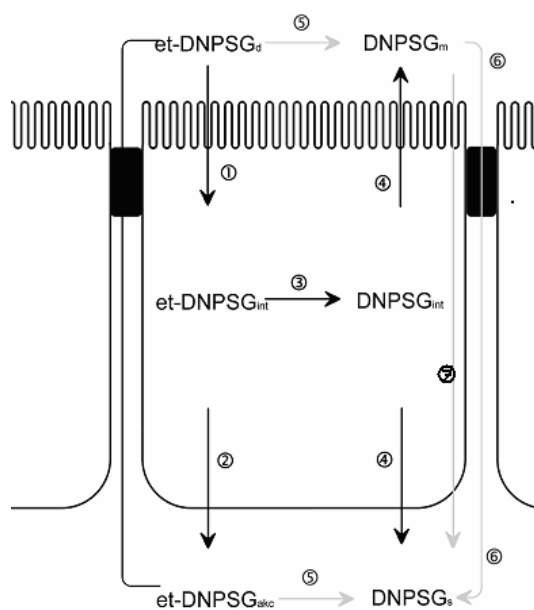
*C in dodana številka je oznaka za difuzijsko celico

** izračun % = $100 \times (J_{DNP-SGser} + J_{DNP-SGmuk}) / J_{skupaj}$

V splošnem je prehod konjugata DNP-SG v smeri S-M večji, ne glede na to, kam dodajamo ester (povprečni pretok $J_{S-M} = 6,58 \times 10^{-9}$, $J_{M-S} = 8,11 \times 10^{-10}$). V proces so najverjetneje vključeni MRP2, ki omogočajo prenos spojin v S-M smeri.

Pri prehodu estrskih konjugatov se v proces intenzivno vključujejo esterase, ki hidrolizirajo ester. Do hidrolize najbolj verjetno pride intracelularno. Zaestren konjugat prehaja z donorske strani, ki je na navedeni sliki mukozna, skozi apikalno bariero v notranjost celice (slika 18 – točka 1). V celici se lahko zgodi dvoje: ali konjugat preide celico, nato pa se skozi bazolateralno membrano izloči v enaki obliki (slika 18 - točka 2) ali pa se v celici zaradi vpliva esteraz hidrolizira (slika 18 - točka 3) in preide na serozno stran kot v veliki večini hidroliziran ester (slika 18 - točka 4 spodaj). Sam konjugat lahko preide tudi nazaj na mukozno stran (slika 18 - točka 4 zgoraj). Na zunanji strani celice (tako na mukozni kot serozni) je delovanje esteraz, ki lahko hidrolizirajo ester in s tem tvorijo konjugat že v zunanosti, malo verjetno (slika 18 - točka 5). Svojevrstna ovira so še tesni stiki, skozi katere lahko prehaja tako zaestren konjugat kot hidroliziran ester (slika 18 - točki 6 in 7).

Opisani procesi veljajo tedaj, ko je donorska stran mukozna, sicer je slika obrnjena.



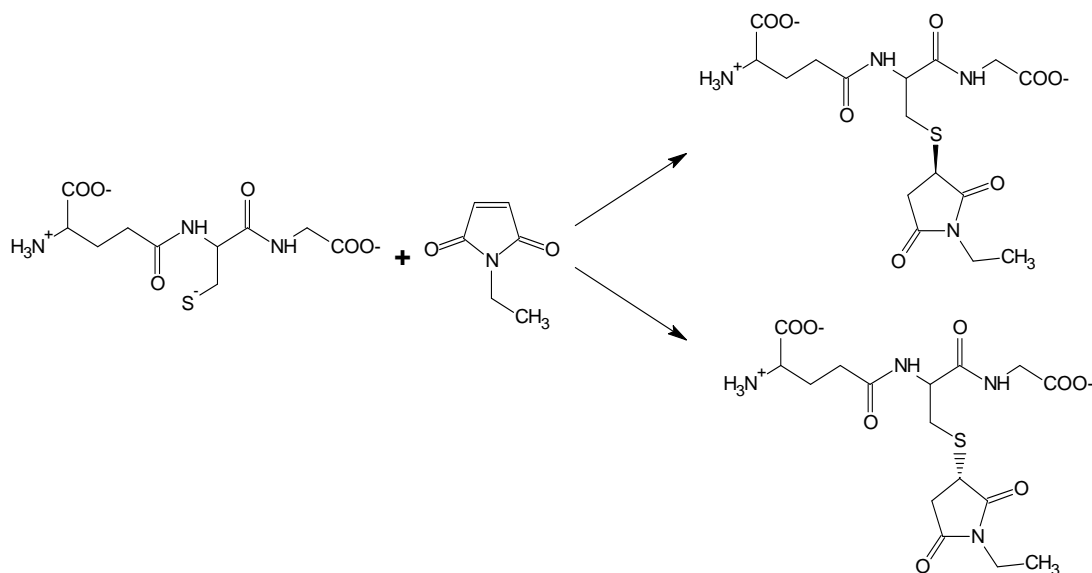
Slika 18: Prehod et-DNP-SG skozi enterocit

Na podlagi lipofilnosti (ki je večja v primeru estra), lahko rečemo, da et-DNP-SG vstopa v celico hitreje kot konjugat DNP-SG. Hkrati pa v celici pride do hidrolize estra in iz rezultatov razberemo (slika 17), da je zaradi tega dodatnega procesa realna intracelularna koncentracija et-DNP-SG, ki je na voljo za transport, nižja kot pri DNP-SG. Posledično je povprečni pretok et-DNP-SG v eno in drugo smer nižji (povprečni pretok $J_{\text{et-DNP-SG}} = 1,1 \cdot 10^{-10} \pm 2,6 \cdot 10^{-11}$, povprečni pretok $J_{\text{DNP-SG}} = 8,1 \cdot 10^{-10} \pm 8,4 \cdot 10^{-11}$).

6.3 IN VITRO POSKUSI V DVOPROSTORNIH DIFUZIJSKIH CELICAH Z NEM-SG IN ET-NEM-SG

Reakcija med GSH in NEM poteka z adicijo tiolne skupine iz GSH na dvojno vez na NEM. Ker pri tem nastane nov stereogeni center, reakcija pa ni stereospecifična, dobimo dva diastereoizomera NEM-SG (slika 19). Pri HPLC analizi zato na kromatogramu zaznamo dva enaka vrhova, ki nam predstavljata dokaz za opisano reakcijo.

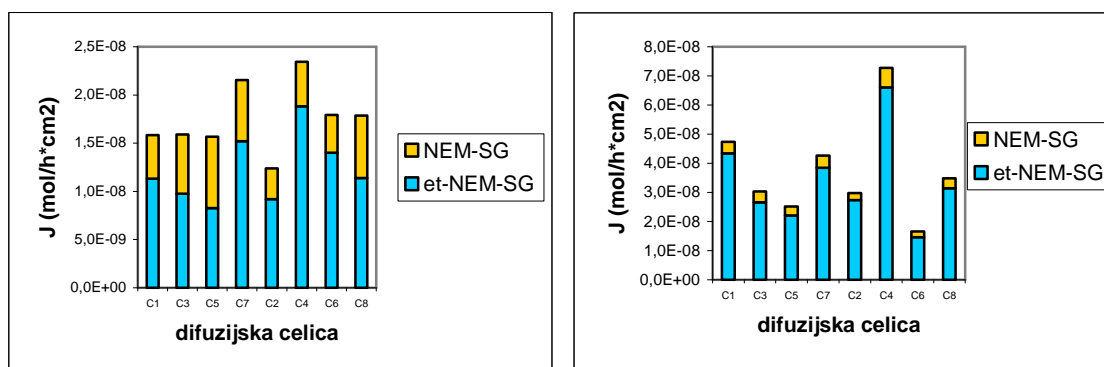
V literaturi je opisan podoben produkt reakcije med cisteinom in NEM, kjer so prav tako dobili dva diastereoizomera. Spojini so ločili, po dveh urah segrevanja na 50°C in pri pH 3,2 pa so ju ponovno nanесли in zopet dobili dva vrhova, iz česar so sklepali, da pride tudi do delne racemizacije vsakega posameznega diastereoizomera (43).



Slika 19: Tvorba diastereoizomer NEM-SG

V našem primeru smo za poskuse v difuzijskih celicah uporabili NEM-SG in et-NEM-SG, Pripravili smo ju po zgoraj opisanem postopku *in situ* v Ringerjevem pufru, po HPLC analizi pa smo dobili dva enaka vrhova. Rezultate obeh poskusov smo ovrednotili in medsebojno primerjali.

Poskusa MAN/GLU in GLU/GLU med estrom et-NEM-SG in NEM-SG smo primerjali (slika 20) ter ugotovili, da se tekom prehoda skozi enterocit ester hidrolizira le v manjši meri. Ester smo dodali tako na serozno kot mukozno stran, nato pa opazovali prehod v obeh smereh (M-S in S-M). Sam prehod je bil boljši v primeru poskusa z glukozo, kjer ester et-NEM-SG prehaja hitreje (povprečen pretok $J_{\text{MAN/GLU}} = 1,23 \cdot 10^{-8} \pm 3,55 \cdot 10^{-9}$, $J_{\text{GLU/GLU}} = 3,38 \cdot 10^{-8} \pm 1,58 \cdot 10^{-8}$). Pri poskusu z manitolom pa je bil povprečen pretok NEM-SG v eni ali drugi smeri večji, kar v tem primeru nakazuje večjo hidrolizo estra ($J_{\text{MAN/GLU}} = 5,33 \cdot 10^{-8} \pm 1,46 \cdot 10^{-9}$, $J_{\text{GLU/GLU}} = 3,68 \cdot 10^{-9} \pm 1,43 \cdot 10^{-9}$).



Slika 20: Primerjava pretokov NEM-SG in et-NEM-SG pri poskusu MAN/GLU (levo) ter GLU/GLU (desno)

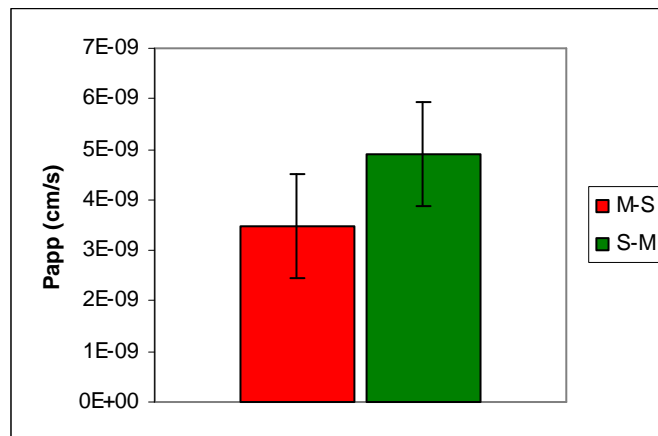
Vseeno smo lahko domnevali, da je oblika et-NEM-SG veliko bolj stabilna kot predhodno opisana spojina et-DNP-SG, pri kateri v večji meri pride do hidrolize. Za to je najverjetneje odgovorna različna dovzetnost teh spojin za interakcijo z esterazo, ki je v primeru et-NEM-SG nižja.

6.3.1 Poskus NEM-SG manitol/glukoza

Preglednica VII: Statistična obdelava izračunov za P_{app} pri poskusu NEM-SG MAN/GLU

Parameter	M-S				S-M			
	C2	C4	C6	C8	C1	C3	C5	C7
P_{app} [cm/s]	3,13E-09	4,43E-09	4,19E-09	2,22E-09	5,18E-09	6,00E-09	4,31E-09	4,12E-09
povprečje	3,49E-09				4,90E-09			
SD	1,02E-09				8,65E-10			
RSD [%]	29,3				17,6			
F TEST	0,79	RV						
T TEST	0,08	NS						
RAZMERJE	1,40							

Pri tem poskusu smo opazovali permeabilnost 1 mM NEM-SG le v eni smeri. Po dodatku na serozno stran, smo opazovali prehod v S-M smeri in pri dodatku na mukozno v M-S smeri. Permeabilnost M-S ali S-M je bila pri tem poskusu statistično enaka v obeh smereh. Po izračunu F-testa smo uporabili t-test z različnima variancama, ki nam je podal p vrednost višjo od dovoljene napake α . Zato smo zavrnili alternativno hipotezo in sprejeli ničelno, ki govori o enakosti parametrov. Iz rezultatov tako ne moremo sklepati na prehajanje, ki bi bilo značilno usmerjeno.



Slika 21: Primerjava permeabilnostnih koeficientov in standardne deviacije pri poskusu NEM-SG MAN/GLU v različnih smereh

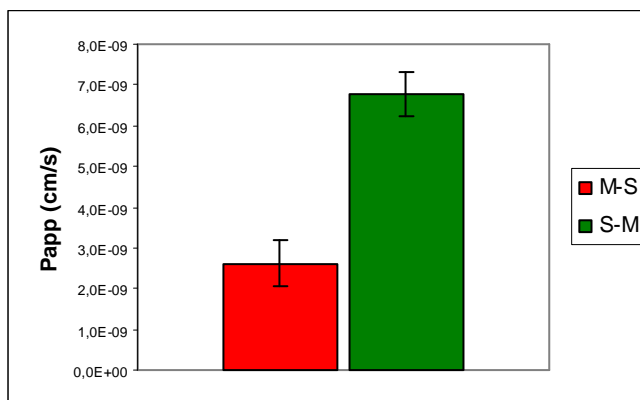
Električni parametri so bili ves čas poskusa v dovoljenih mejah. TER se je gibal od 50 do 20 Ω . Po končanem poskusu smo dodali raztopino glukoze na mukozno stran in Pd se je v povprečju spremenil iz 1,9 na 3,8 mV, kar je v predpisanih mejah za ΔPd .

6.3.2 Poskus NEM-SG glukoza/glukoza

Preglednica VIII: Statistična obdelava izračunov za P_{app} pri poskusu NEM-SG GLU/GLU

Parameter	M-S				S-M			
	C1	C3	C5	C7	C2	C4	C6	C8
P_{app} [cm/s]		2,56E-09	2,52E-09	2,79E-09	6,15E-09	6,45E-09	7,28E-09	7,21E-09
povprečje	2,62E-09				6,77E-09			
SD	1,48E-10				5,63E-10			
RSD [%]	5,6				8,3			
F TEST	0,13	RV						
T TEST	0,0001	S						
RAZMERJE	2,58							

Pri navedenem poskusu smo prav tako opazovali permeabilnost 1 mM NEM-SG le v eni smeri. Po tem, ko smo dodali glukoza na obe strani, smo izračunali statistično značilno različno stopnjo permeabilnosti za S-M smer. Vrednost p po izračunu t-testa je bila mnogo nižja od dovoljene napake α , zato smo lahko sprejeli hipotezo o neenakosti. Permeabilnostni koeficient je bil približno 2,5-krat višji v primeru S-M kot v primeru M-S prehoda. Rezultati nakazujejo, da dodatek glukoze tudi na mukozno stran povečuje aktivni transport s prenašalci v lumen črevesa.



Slika 22: Primerjava permeabilnostnih koeficientov in standardne deviacije pri poskusu z NEM-SG GLU/GLU v različnih smereh

Če smo poskusa primerjali med seboj, smo dobili vrednost razmerij okoli 3:5 v korist poskusa GLU/GLU. To pomeni, da dodatek glukoze dejansko poveča transport v S-M smeri, kar lahko povežemo z vključenostjo MRP2 prenašalcev v proces permeabilnosti. Električni parametri so bili ves čas poskusa v dovoljenih mejah.

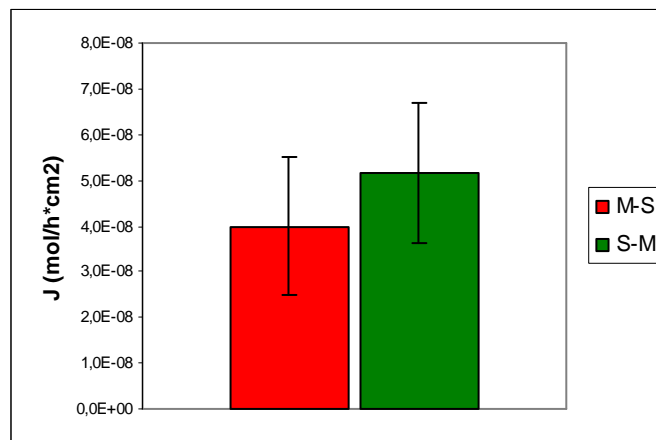
6.3.3 Poskus et-NEM-SG manitol/glukoza

Preglednica IX: Statistična obdelava izračunov za pretok pri poskusu et-NEM-SG MAN/GLU

Parameter	M-S				S-M			
	C1	C3	C5	C7	C2	C4	C6	C8
J[mol/(h*cm²)]	1,13E-08	9,76E-09	8,28E-09	1,52E-08	9,19E-09	1,88E-08	1,4E-08	1,14E-08
povprečje	3,99E-08				5,15E-08			
SD	9,49E-09				1,52E-08			
RSD [%]	23,8				29,4			
F TEST	0,46	RV						
T TEST	0,24	NS						
RAZMERJE	1,29							

Po dodatku 1mM raztopine et-NEM-SG na eno ali drugo stran, smo opazovali prehod v obe smeri.

Izračun pretoka pri poskusu z manitolom in glukozo nam poda statistično nepomemben rezultat glede na M-S ali S-M prehod. Tukaj je p vrednost višja od dovoljene napake α . Rezultati torej povedo, da smer pretoka ni odvisna od tega, na katero stran v difuzijskih celicah dodajamo izbran ester.



Slika 23: Primerjava pretokov in standardne deviacije pri poskusu et-NEM-SG MAN/GLU v različnih smereh

Električni parametri so bili ves čas poskusa v dovoljenih mejah. Po končanem poskusu smo dodali raztopino glukoze na mukozno stran in Pd se je v povprečju spremenil iz 1,6 na 3,6 mV, kar je v skladu s predpisano mejo 1,0 mV za ΔPd .

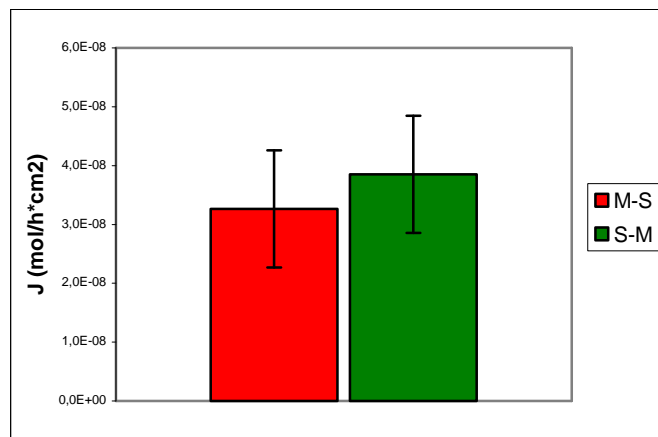
6.3.4 Poskus et-NEM-SG glukoza/glukoza

Preglednica X: Statistična obdelava izračunov za pretok pri poskusu et-NEM-SG GLU/GLU

Parameter	M-S				S-M			
	C1	C3	C5	C7	C2	C4	C6	C8
J[mol/(h*cm²)]	4,34E-08	2,66E-08	2,21E-08	3,85E-08	2,73E-08	6,61E-08	1,47E-08	3,14E-08
povprečje	3,26E-08				3,49E-08			
SD	9,94E-09				2,20E-08			
RSD [%]	30,5				63,1			
F TEST	0,23	RV						
T TEST	0,86	NS						
RAZMERJE	1,07							

Po dodatku 1mM raztopine et-NEM-SG na serozno ali mukozno stran, smo opazovali prehod v obe smeri.

Navedeni poskus z glukozo na obeh straneh nam po izračunih ne da statistično pomembnih rezultatov. Vrednost p je previsoka glede na dovoljeno napako α ($0,86 \gg 0,05$), kar nazorno kaže, da parametra nista različna. Iz grafa lahko razberemo tudi, da je razmerje S-M ali M-S približno enako ena ter s tem potrdimo, da ni značilnega vpliva glede na smer prehajanja tega estra.



Slika 24: Primerjava pretokov in standardne deviacije pri poskusu et-NEM-SG GLU/GLU v različnih smereh

Primerjava teh dveh poskusov (6.3.3 in 6.3.4) nam pokaže, da dodatek glukoze na mukozno stran nima posebnega učinka pri poskusih z et-NEM-SG. Pri teh poskusih smo vzorčili z obeh strani, saj je hidroliziran produkt (NEM-SG) šele nastajal.

Električni parametri so bili ves čas poskusa v dovoljenih mejah.

V primerjavah poskusov z manitolom in glukozo (namesto manitola) na mukozni strani se je pokazala razlika v primeru poskusov s CDNB ter z NEM-SG. Estrske oblike sicer hitro prehajajo skozi membrano v enterocit, a so v celici najverjetneje podvržene dodatnemu procesu hidrolize z esterazami, kar sam prehod skozi enterocit upočasni, na drugo stran pa nato prehaja hidroliziran ester. Rezultati so pokazali, da se et-DNP-SG v primerjavi z et-NEM-SG v celici bolje hidrolizira, saj skozi bazolateralno membrano prehaja več produkta DNP-SG kot NEM-SG. Vzrok za to je najverjetneje razlika v afinitetah estrov do esteraz. Glede na rezultate vseh opravljenih poskusov *in vitro* lahko rečemo, da dobimo najboljši odziv na glukozo pri uporabi prekursorja CDNB, ki se v celici konjugira v DNP-SG. Na osnovi tega smo sklepali, da so v tem primeru v proces dejansko vključeni MRP2 prenašalci, medtem ko za ostale substrate tega ne moremo trditi.

6.4 PRIMERJAVA SUBSTRATOV

Proučevali smo različne GSH konjugate, ki so substrati za MRP2 prenašalce. Preverjali smo njihove lastnosti, s tem da smo teoretično in eksperimentalno ugotavljali ustreznost glede na navedene zahteve (preglednica XI).

Preglednica XI: Primerjava preiskovanih spojin glede na navedene zahteve

preiskovana spojina zahteva	CDNB*	DNP-SG	et-DNP-SG**	NEM-SG	et-NEM-SG**	NPM-SG	EA*	EA-SG
a) Specifičnost in selektivnost za MRP2	DA	DA	DA	DA	DA	DA	DA	DA
b) Ustrezna dostava do transporterja – transcelularna pot	+++	+	++	+	++	+	+++	+
c) Ustrezna dostava do transporterja – cepitev ali konjugacija	DA	NE	DA	NE	DA	NE	DA	NE
d) Odsotnost citotoksičnosti	DA	DA	DA	DA	DA	DA	?	DA
e) Topnost v Ringerjevem puftru	delno	DA	DA	DA	DA	NE	DA	DA
f) Stabilnost	DA	DA	DA	DA	DA	NE	DA	DA
g) Analiza s HPLC	DA	DA	DA	DA	DA	DA	DA	DA
h) Enostavna priprava	DA	DA	NE	DA	DA	DA	DA	NE
i) Ekonomičnost	DA	DA	DA	DA	DA	DA	DA	DA

* CDNB in EA sta pravzaprav prekurzorja in ne konjugata GSH, vendar se v enterocitu konjugirata z GSH, zato smo ju uvrstili v našo obravnavo

** estrski obliki preideta v konjugat šele v organizmu, ko ju esterase hidrolizirajo

+ pomeni lipofilnost (večje kot je število plusov, boljše je prehajanje)

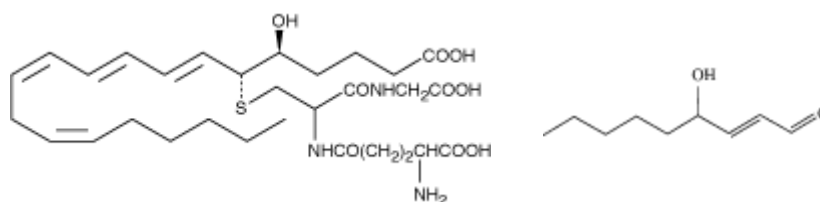
? ni znano, kolikšen je dejanski vpliv na citotoksičnost

a) Specifičnost in selektivnost za MRP2

Vse izbrane spojine so substrati za MRP2 prenašalec, kar je nujno potrebno. Po navedenem kriteriju lahko rečemo, da so specifični, ne pa selektivni. MRP2 jih namreč specifično prepozna, vendar je možen prenos tudi preko drugih prenašalcev (neselektivno). Za prenos GSH konjugatov je odkritih več transporterjev (drugi MRP, RLIP76), vendar ostali niso bili toliko predmet našega raziskovanja.

Ker so si MRP prenašalci med seboj zelo podobni, se zahteve za substrate v marsičem ujemajo. Na primer žolčne soli so substrati za MRP2, vendar so kompatibilne tudi z ostalimi MRP prenašalci in tako niso selektivne le za navedenega. MRP2 torej tudi ni edini prenašalec, ki prenaša GSH konjugate. Odkrili so RLIP76, ATPazno delujoč protein, ki je alternativen prenašalec končnih produktov detoksifikacije. Omenjeni protein omogoča

transport fizioloških ligandov, kot so levkotrien C₄ (LTC₄), konjugati 4-hidroksinonenala (ki na C=C dvojni vezi reagira z GSH) in konjugati GSH.



Slika 25: Levkotrien C₄ (levo) in 4-hidroksinonenal (desno)

Študije dokazujejo, da ima transport organskih ionov (anionov in kationov) preko RLIP76 fiziološko ter toksikološko pomembnost. Na ta način je pomemben tudi v mehanizmu rezistence in deluje paralelno z ABC prenašalci (51). Vsi prenašalci MRP1-3 lahko prenašajo konjugate z GSH, vendar je hitrost prenosa pri MRP3 tako nizka, da dostikrat sploh ne govorimo o sposobnosti transporta. Za MRP1 je značilno, da prenaša LTC₄ z veliko učinkovitostjo (18).

b) Ustrezna dostava do transporterja – transcelularna pot

V primeru naštetih spojin po tej poti v veliki meri prehajata CDNB in EA kot prekurzorja. Možna pot preko tesnih stikov (paracelularno) je v tem primeru še najmanj moteča. Ostale spojine imajo bolj izrazito dodatno paracelularno pot, ki vpliva na dogajanje v samem enterocitu. Na razmerje transcelularna/paracelularna pot namreč vpliva lipofilnost spojin. Hitrost prehajanja v celico lahko razložimo tudi s tega vidika. Najvišja je pri najbolj lipofilnih spojinah. V našem primeru so to prekurzorji (CDNB, EA), ki v celici tvorijo konjugat, sledijo ji estri, kjer konjugat nastane s hidrolizo etilnega estra v celici in na repu po hitrosti prehajanja so sami konjugati.

c) Ustrezna dostava do transporterja – hidroliza estra ali konjugacija

Ta stolpec označuje prisotnost dodatnega procesa, ki je potreben za tvorbo substrata. V primeru prekurzorja ali estra opazimo en ali drug proces, medtem ko pri samih konjugatih tega ni. Tak proces na eni strani omogoča lažji prehod spojin v celico (lipofilnost!), na drugi strani pa se lahko spojina po procesu v celici zadržuje dlje časa.

d) Odsotnost citotoksičnosti

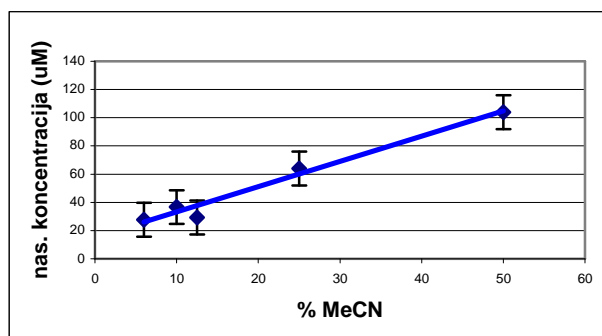
Večinoma smo našete spojine glede na ta parameter ovrednotili kot primerne, saj so bile njihove intracelularne koncentracije dovolj nizke, da niso povzročale škode, ki bi jo sicer lahko. Prekurzorja (CDNB, EA) sta v tem sklopu problematična, ker po vstopu v celico

povzročata znižanje intracelularne koncentracije GSH v celici, kar posredno deluje citotoksično. Etakrinska kislina lahko poleg tega povzroči oksidativen stres ter s tem zviša koncentracijo Ca^{2+} v celici, kar zopet vodi v okvaro celice (52). Zmerna oksidacija že vodi v apoptozo (programirana celična smrt), medtem ko več intenzivnih stresov pripelje do nekroze (celična smrt).

Glede na to, da konkretnih poskusov z EA nismo izvedli, ne moremo zagotovo trditi, da gre za citotoksičnost. Pri permeabilnostnem poskusu s CDNB pa smo zaznavali ugodne elektrofiziološke parametre, ki so zagotavljali živost tkiva in s tem odsotnost citotoksičnosti.

e) Topnost

Preiskovane spojine so v večini topne v Ringerjevem puftru. Izjemi sta le CDNB, ki za ustrezno topnost potrebuje dodatek etanola ter NPM, ki ga je potrebno raztopiti v acetonitrilu. Etanol, ki ga dodamo CDNB (da dobimo $100 \mu\text{M}$ koncentracijo), je v ustreznih mejah (1% raztopina). Iz spodnjega grafa (slika 26) pa lahko vidimo, da za dosego potrebne koncentracije NPM (običajno $100 \mu\text{M}$) acetonitril močno presega 5 vol.% (cca. 50 vol.%), kar je za naše potrebe odločno preveč. Naveden razlog nam povzroča probleme tudi na nivoju priprave konjugata NPM-SG, ki ga bi sicer pri permeabilnostnem poskusu uporabili za aplikacijo na tkivo.

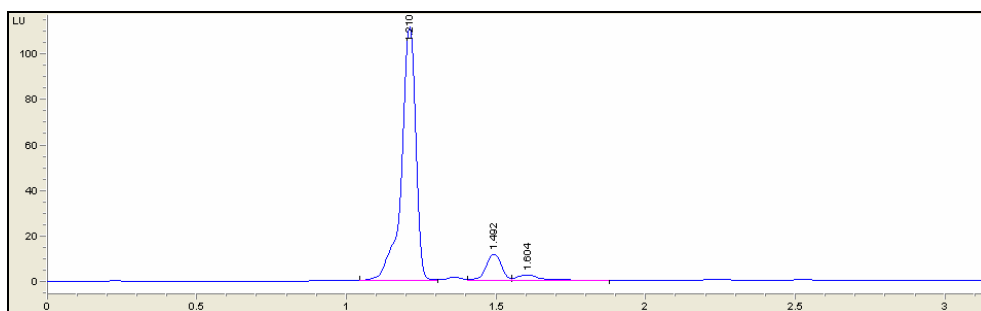


Slika 26: Odvisnost koncentracije NPM od odstotka topila

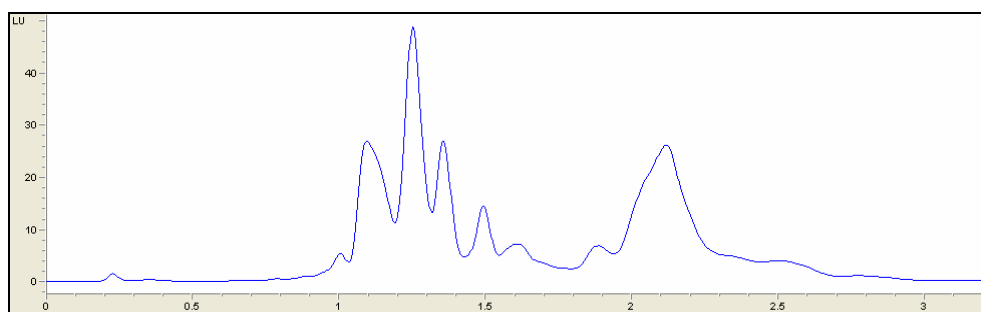
f) Stabilnost

Navedene spojine so bile v izpostavljenih pogojih (atmosferski kisik, sobna temperatura) stabilne. pH tekom poskusov je bil z Ringerjevim pufrom uravnan na 7,4, kar je dovolj ugodno. V bolj bazičnih pogojih spojine ne bi bile obstojne. Atmosfera v celici je bila sestavljena iz karbogene (95% kisika in 5% ogljikovega dioksida), temperatura pa je bila

vzdrževana na 37°C. Oboje je omogočalo preživetje vstavljenemu tkivu, spojine pa so v teh pogojih prav tako ohranile svoje karakteristike. Poseben primer (ne)stabilnosti je bil NPM-SG, pri katerem smo opravili poskus stabilnosti v prisotnosti tkiva. Po primerjavi kromatogramov (sliki 27 in 28) smo po poskusu s tkivom zaznali več neidentificiranih spojin. Sklepali smo, da je najverjetneje prišlo do oksidacije na pirenskem obroču.



Slika 27: Kromatogram NPM-SG v začetku



Slika 28: Kromatogram NPM-SG po poskusu s tkivom

Med samimi permeabilnostnimi poskusi smo spojine dodatno stabilizirali z dodatkom acivicina na mukozni strani, da ni prišlo do hidrolize tripeptida v enterocitu. Acivicin, inhibitor GGT (encima, ki deluje na apikalni strani), je namreč v celoti ohranil peptidne vezi (ni prišlo do hidrolize γ -glutaminske kisline) in s tem GSH.

g) Analiza

Za konjugate je najbolj uporabna reverznofazna HPLC. UV spektrofotometrija je problematična zaradi motenj različnih snovi, ki se nahajajo v črevesu in predstavljajo nečistote. Fluorescentna detekcija na mikrotitrski ploščici bi bila uporabna le za NPM.

Pri večini navedenih spojin smo uporabili reverznofazno HPLC analizo. V primeru NPM smo se zaradi navzočnosti pirenskega obroča, ki je fluorofor, poslužili HPLC s fluorescenčnim detektorjem. Na kromatogramu smo zaznali več neidentificiranih vrhov (najbrž zaradi oksidacije). Iz tega razloga niti nismo uporabili fluorescenčne metode na

mikrotitrski ploščici, ki bi bila dodatna možnost. Pri ostalih spojinah smo delali na HPLC analizatorju z UV detektorjem. Analiza cca. 130 vzorcev je bila običajno končana v največ 15 urah.

h) Enostavna priprava

Izbrani konjugati so v veliki meri ustrezali temu kriteriju, kajti glede na zapletenost struktur je bila njihova sinteza v Ringerjevem puftru hitra in preprosta. Najmanj ugodna kemijska reakcija je sinteza et-DNP-SG, kjer je potrebno produkt na koncu očistiti s preparativno reverznofazno kromatografijo, vendar smo v našem primeru uporabili že pripravljen produkt. Pri pripravi EA-SG je najpogosteje uporabna encimska sinteza, ki zahteva specifične pogoje (priprava in vključitev encima) ter pozorno načrtovanje dela. Iz tega razloga je taka sinteza zahtevnejša.

i) Ekonomičnost

Izbrani konjugati GSH so le eden od možnih substratov za MRP2 prenašalec, vendar so v primerjavi z ostalimi cenejši (preglednica XII). Nobeden od naštetih konjugatov ni presegal vrednosti 2 EUR na poskus (za en poskus smo porabili približno 5 mg reagenta), kar je glede na ostale primerjalne reagente izredno ugodno.

Preglednica XII: Primerjava cen konjugatov (vir: Sigma-Aldrich)

<i>konjugat</i>	<i>Mw (g/mol)</i>	<i>EUR/1g</i>	<i>EUR/poskus (5mg)</i>
DNP-SG	473	2	0,01
NEM-SG	432	28	0,14
EA	303	37,5	0,19
NPM-SG	604	182	0,91
et-GSH	335	326,5	1,63
bim-SG	497	4000	20,00
SBD-SG	522	10000	50,00
LTC₄*	626	ni podatka	cca.31000,00

*v primeru tega reagenta sam poskus poteka precej drugače kot pri ostalih, tako da je realna cena za poskus nižja, a še vseeno precej visoka

Ugotovili smo, da navedenim zahtevam od a) do i) v največji meri ustreza CDNB. Sam je sicer slabše topen v Ringerjevem puftru, ampak z dodatkom etanola smo topnost dvignili na zadovoljivo raven (uporabili smo 1% raztopino etanola in s tem zadostili zahtevi po netoksičnosti). Pri tem reagentu se sicer še vedno postavlja vprašanje, v koliki meri vpliva na znižanje GSH v celicah, kar je potencialno citotoksično. Kljub temu smo se odločili za izvajanje permeabilnostnega poskusa, kjer so se parametri živosti pokazali kot ustrezni. Poleg tega smo permeabilnostne poskuse izvedli še z et-DNP-SG, ki smo ga primerjali z

DNP-SG ter NEM-SG in et-NEM-SG, ki smo ju prav tako primerjali. Največje pomanjkljivosti smo opazili pri NPM, ki je imel neustrezno topnost in ni bil stabilen. EA bi bila dokaj primeren kandidat za obravnavo, vendar je bila pri njej največja ovira iz našega vidika neobičajna sinteza.

7 SKLEP

Preiskovane spojine smo vrednotili na različne načine. Kot neprimerne smo jih označili zaradi njihovega neustreznega transporta, pomanjkanja stabilnosti, citotoksičnosti, neobičajne sinteze ali zaradi ostalih neželenih lastnosti (previsok/prenizek logP, preveč proton donorjev/akceptorjev, neustrezna PSA, prevelika molekulska masa...).

Med izbranimi substrati smo kot manj uporabne ovrednotili predvsem EA zaradi potrebne encimske sinteze ter NPM-SG zaradi nestabilnosti. Konjugat DNP-SG smo obdelali v primerjavi z et-DNP-SG, sam poskus pa smo izvajali s slednjim. Za CDNB, NEM-SG in njegov etilni ester smo prav tako izvedli permeabilnostne poskuse. Na koncu smo izračunali pretoke ali permeabilnostne koeficiente ter na podlagi teh sklepali, kaj se je v enterocitu dogajalo.

Rezultati poskusov so pokazali, da estri v primerjavi z njihovimi konjugati prehajajo hitro skozi membrano v celico, a v celoti počasneje skozi njo, za kar so najverjetneje odgovorne esteraze (dodaten proces hidrolize v celici). Nadalje smo ugotovili, da et-DNP-SG v primerjavi z et-NEM-SG v celici hidrolizira v večji meri. Sklepali smo, da je slabša hidroliza et-NEM-SG najbrž posledica večje stabilnosti oziroma manjše afinitete do esteraz.

Statistično pomembne razlike pri prehodu membran v primeru poskusov s samo glukozo (GLU/GLU) glede na poskuse z manitolom (MAN/GLU) so se pokazale pri NEM-SG in CDNB. Navsezadnje smo prekursor CDNB opredelili kot najboljši med izbranimi spojinami, saj je bila po dodatku glukoze pri njem izrazita sprememba v razmerju med permeabilnostjo v smeri S-M in M-S. Sklepali smo, da so v proces verjetno vključeni MRP2 prenašalci.

V nadaljnjih raziskavah MRP2 prenašalcev bi bilo smiselno uporabiti še drug izbran prekursor (EA). EA sicer zahteva svojevrstne pogoje za sintezo (encimska sinteza), vendar bi s poskusom mogoče dobili dobre rezultate permeabilnosti oziroma pretoka skozi apikalno membrano, kjer se v proces aktivno vključujejo MRP2 prenašalci.

8 LITERATURA

1. Burton PS, Goodwin JT, Vidmar TJ et al. Predicting drug absorption: How nature made it a difficult problem. *JPET* 2002; 303: 889-895.
2. DeSesso JM, Jacobson CF. Anatomical and physiological parameters affecting gastrointestinal absorption in humans and rats. *Food Chem Toxicol* 2001; 39(3): 209-228.
3. Mutschler E, Derendorf H. *Drug Actions: Basic Principles and Therapeutic Aspects. Small Intestine*, Medpharm, Stuttgart, CRC Press, 1995: 417-418.
4. Despopoulos A, Silbernagl S. Nutrition and Digestion. In: *Color Atlas of Physiology*. Thieme New York, 2003: 244-246.
5. Tortora GJ, Grabowski SR. *Principles of anatomy and physiology*. 8th Ed, California 1996.
6. Podzeck F, Newton JM, Yuen KH. The description of the gastrointestinal transit of pellets assessed by gamma scintigraphy using statistical moments. *Pharm Res* 1995; 12: 376-379.
7. Doherty MM, Charman WN. The mucosa of the small intestine: How clinically relevant as an organ of drug metabolism? *Clin Pharmacokinet* 2002; 42: 235-253.
8. Hunter J, Hirst BH. Intestinal secretion of drugs: The role of P-glycoprotein and related drug efflux systems in limiting oral drug absorption. *Adv Drug Del Rev* 1997; 25: 129-157.
9. He YL, Murby S, Warhrust G et al. Species Differences in Size Discrimination in the Paracellular Pathway Reflected by Oral Bioavailability of Poly(ethylene glycol) and D-Peptides. *J Pharm Sci* 1998; 87 (5): 626-633.
10. Rouge N, Buri P, Doelker E. Drug absorption sites in the gastrointestinal tract and dosage forms for site-specific delivery. *Int Journ Pharm* 1996; 136: 117-139.
11. Artursson P, Karlsson J. Correlation between oral drug absorption in humans and apparent drug permeability coefficients in human intestinal epithelial (Caco-2) cells. *Biochem Biophys Res Commun* 1991; 175: 880-885.
12. Wils P, Warnery A, Phung-Ba V et al. High lipophilicity decreases drug transport across intestinal epithelial cells. *JPET* 1994; 269: 654-658.

13. Mithani SD, Bakatselou V, Ten Hoor CN et al. Estimation of the increase in solubility of drugs as a function of bile salt concentration. *Pharm Res* 1996; 13: 163-167.
14. Lipinski CA, Lombardo F, Dominy BW et al. Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings. *Adv Drug Del Rev* 1997; 23: 3-25.
15. Tsuji A, Tamai I. Carrier-mediated intestinal transport of drugs. *Pharm Res* 1996; 13: 963-977.
16. Kellet GL. The facilitated component of intestinal glucose absorption. *J Physiol* 2001; 531(3): 585-595.
17. Barthe L, Woodley J, Houin G. Gastrointestinal absorption of drugs: methods and studies. *Fundam Clin Pharmacol* 1999; 13: 154-168.
18. Schinkel AH, Jonker JW. Mammalian drug efflux transporters of the ATP binding cassette (ABC) family: an overview. *Adv Drug Del Rev* 2003; 55(1): 3-29.
19. Taipelansuu J, Törnblom H, Lindberg G et al. Correlation of gene expression of ten drug efflux proteins of the ATP-binding cassette transporter family in normal human jejunum and in human epithelial Caco-2 cell monolayers. *J Pharmacol Exp Ther* 2001; 299: 164-170.
20. Kristl A. Thermodynamic investigation of the effect of the mutual miscibility of some higher alkanols and water on the partitioning and solubility of some guanine derivatives. *J Chem Soc Faraday Trans* 1996; 92: 1721-1724.
21. Zhu C, Jiang L, Chen TM et al. A comparative study of artificial membrane permeability assay for high throughput profiling of drug absorption potential. *Eur J Med Chem* 2002; 37: 399-407.
22. Gerk PM, Vore M. Regulation of Expression of the Multidrug Resistance-Associated Protein 2 (MRP2) and Its Role in Drug Disposition. *JPET* 2002; 302: 407-415.
23. Chan LMS, Lowes S, Hirst BH. The ABC of drug transport in intestine and liver: efflux proteins limiting drug absorption and bioavailability. *Eur J Pharm Sci* 2004; 21: 25-51.
24. Cherrington NJ, Hartley DP, Li N et al. Organ Distribution of Multidrug Resistance Proteins 1, 2 and 3 (Mrp1, 2 in 3) mRNA and Hepatic Induction of Mrp3 by Constitutive Androstane Receptor Activators in Rats. *JPET* 2002; 300: 97-104.

25. Smit JJ, Schinkel AH, Elferink RPO et al. Homozygous disruption of the murine *mdr2* P-glycoprotein gene leads to a complete absence of phospholipid from bile and to liver disease. *Cell* 1993; 75(3): 451-462.
26. van der Valk P, van Kalken CK, Ketelaars H et al. Distribution of multidrug resistance-associated P-glycoprotein in normal and neoplastic human tissues. *Anal Oncol* 1990; 1: 56-64.
27. Jonker JW, Wagenaar E, van Deemter L et al. Role of blood-brain barrier P-glycoprotein in limiting brain accumulation and sedative side-effects of asimadoline, a peripherally acting analgaesic drug. *Br J Pharmacol* 1999; 127: 43-50.
28. Palm K, Luthman K, Ungell AL et al. Correlation of drug absorption with molecular surface properties. *J Pharm Sci* 1996; 85: 32-39.
29. Gotoh Y, Suzuki H, Kinoshita S et al. Involvement of an Organic Anion Transporter (Canalicular Multispecific Organic Anion Transporter/Multidrug Resistance-Associated Protein 2) in Gastrointestinal Secretion of Glutathione Conjugates in Rats. *J Pharmacol Exp Ther* 2000; 292: 433-439.
30. Keppler D, Leier I, Jedlitschky G et al. ATP-dependent transport glutathione S-conjugates by multidrug resistance protein MRP1 and its apical isoform MRP2. *Chemico-Biological Interactions* 1998; 111-112: 153-161.
31. Zelcer N, Huisan MT, Reid G. Evidence for Two Interacting Ligand Binding Sites in Human Multidrug Resistance Protein 2 (ATP Binding Cassette C2). *J Biol Chem* 2003; 278: 23538-23544.
32. Bakos E, Evers R, Sinko E et al. Interactions of Human Multidrug Resistance Proteins MRP1 and MRP2 with Organic Anions. *JPET* 2000; 57: 760-768.
33. Winters RA, Zukowski J, Ercal N et al. Analysis of Glutathione, Glutathione Disulfide, Cysteine, Homocysteine, and Other Biological Thiols by High-Performance Liquid Chromatography Following Derivatization by *N*-(1-Pyrenyl)maleimide. *Analytical Biochemistry* 1995; 227: 14-21.
34. Samiec PS, Dahm LJ, Jones DP. Glutathione *S*-Transferase in Mucus of Rat Small Intestine. *Toxicol Sci* 2000; 54: 52-59.
35. Wu G, Fang YZ, Yang S et al. Glutathione Metabolism and Its Implications for Health. *J Nutr* 2004; 134: 489-492.

36. Liou JY, Huang TM, Chang GG. Reverse micelles as a catalyst for the nucleophilic aromatic substitution between glutathione and 2,4-dinitrochlorobenzene. *J Chem Soc, Perkin Trans. 2*, 1999; 10: 2171-2176.
37. He X, Sugawara M, Takehuma Y et al. Absorption of Ester Prodrugs in Caco-2 and Rat Intestine Models. *Am Soc Microb* 2004; 48(7): 2604-2609.
38. Stadnyk AW, Befus AD, Gauldie J. Characterization of Nonspecific Esterase Activity in Macrophages and Intestinal Epithelium of the Rat. *Journ Hist and Cyt* 1990; 38(1): 1-6.
39. Waterman KC, Adami RC, Alsante KM et al. Stabilization of Pharmaceuticals to Oxidative Degradation. *Pharm Dev Technol* 2002; 7(1): 1-7.
40. Peacock MD, Schenk DA, Lawrence RA et al. Elimination of glutathione-induced protection from hyperbaric hyperoxia by acivicin. *J Appl Physiol* 1994; 76: 1279-1284.
41. Hill KE, Von Hoff DD, Burk RF. Effect of inhibition of γ -glutamyltranspeptidase by AT-125 (Acivicin) on glutathione and cysteine levels in rat brain and plasma. *Invest New Drugs* 1985; 3(1): 31-34.
42. Thornalley PK. Esterification of Reduced Glutathione. *Biochem J* 1991; 275: 535-539.
43. Smyth DG, Blumenfeld OO, Konigsberg W. Reactions of *N*-Ethylmaleimide with Peptides and Amino Acids. *Biochem J* 1964; 91: 589-595.
44. Wu CW, Yarbrough LR, Ying-Hsiueh Wu F. *N*-(1-Pyrene)maleimide: A Fluorescent Cross-Linking Reagent. *Biochem* 1976; 15: 2863-2868.
45. Sigman ME, Schuler PF, Ghosh MM et al. Mechanism of Pyrene Photochemical Oxidation in Aqueous and Surfactant Solutions. *Environ Sci Tehnol* 1998; 32: 3980-3985.
46. Tirona RG, Pang KS. Bimolecular Glutathione Conjugation Kinetics of Ethacrynic Acid in Rat Liver: In Vitro and Perfusion Studies. *JPET* 1999; 290: 1230-1241.
47. Veber DF, Johnson SR, Cheng HY et al. Molecular Properties That Influence the Oral Bioavailability of Drug Candidates. *J Med Chem* 2002; 45: 2615-2623.
48. Stenberg P, Luthman K, Artursson P. Virtual screening of intestinal drug permeability. *J Con Rel* 2000; 65: 231-243.

49. Zakeri-Milani P, Tajerzadeh H, Islambolchilar Z et al. The relation between molecular properties of drugs and their transport across the intestinal membrane. *DARU* 2006; 14(4): 164-170.
50. Kristl A, Pečar S, Kmetec V. Are calculated logP values for some guanine derivatives by different computer programs reliable? *Int Journ Pharm* 1999; 181(2): 219-226.
51. Awasthi S, Sharma R, Singhal SS et al. RLIP76, A Novel Transporter Catalyzing ATP-Dependent Efflux of Xenobiotics. *Drug Metabolism and Disposition, ASPET* 2002; 30 (12): 1300-1310.
52. Sekine S, Ito K, Horie T. Oxidative stress and Mrp2 internalization. *Free Radical Biology & Medicine* 2006; 40: 2116-2174.