

UNIVERZA V LJUBLJANI  
FAKULTETA ZA FARMACIJO

MAJA FERBEŽAR

DIPLOMSKA NALOGA

UNIVERZITETNI ŠTUDIJ FARMACIJE

Ljubljana, 2009

UNIVERZA V LJUBLJANI  
FAKULTETA ZA FARMACIJO

MAJA FERBEŽAR

***IN VITRO* VPLIV STARANEGA ČESNOVEGA VODNEGA IZVLEČKA NA  
PERMEABILNOST IZBRANIH UČINKOVIN ZA KRVOŽILNI SISTEM**

***IN VITRO* INFLUENCE OF THE AQUEOUS AGED GARLIC EXTRACT  
ON PERMEABILITY OF VARIOUS CARDIOVASCULAR DRUGS**

DIPLOMSKA NALOGA

Ljubljana, 2009

Diplomsko nalogo sem opravljala na Fakulteti za farmacijo pod mentorstvom prof. dr. Albina Kristla, mag. farm. ter somentorstvom Katje Berginc, mag. farm.

Ob pripravi diplomske naloge sem imela strokovno pomoč za kar se zahvaljujem mentorju prof. dr. Albinu Kristlu, mag. farm. Še posebna zahvala gre somentorici Katji Šturm, mag. farm., za vso strokovno pomoč in podporo pri izdelavi diplomskega dela. Prav tako pa se zahvaljujem za pomoč tudi zaposlenim na Katedri za biofarmacijo in farmakokinetiko, ki so mi praktično delo mnogokrat olajšali.

#### IZJAVA

Izjavljam, da sem diplomsko delo samostojno izdelala pod vodstvom mentorja prof. dr. Albina Kristla, mag. farm.

Ljubljana, 2009

Maja Ferbežar

Predsednik diplomske komisije: prof. dr. Borut Štrukelj, mag. farm.

Član diplomske komisije: doc. dr. Anamarija Zega, mag. farm.

## Vsebina

|                                                                                         |           |
|-----------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| <b>1 POVZETEK .....</b>                                                                 | <b>2</b>  |
| <b>2 SEZNAM OKRAJŠAV .....</b>                                                          | <b>4</b>  |
| <b>3 UVOD.....</b>                                                                      | <b>6</b>  |
| <b>3.1 ČESEN (<i>Allium sativum</i>).....</b>                                           | <b>6</b>  |
| 3.1.1 Sestava česna .....                                                               | 6         |
| 3.1.2 Pot razpada česnovih žveplo-vsebujočih spojin .....                               | 7         |
| 3.1.3 Česnovi pripravki.....                                                            | 8         |
| 3.1.4 Uporaba česna.....                                                                | 10        |
| 3.1.5 Farmakološki učinki česna.....                                                    | 11        |
| 3.1.6 Farmakokinetične lastnosti posameznih fitokemikalij v česnu .....                 | 18        |
| 3.1.7 Učinki česna na Pgp (P-glikoprotein).....                                         | 19        |
| 3.1.8 Učinki česna na CYP sistem.....                                                   | 19        |
| 3.1.9 Neželeni učinki česna .....                                                       | 20        |
| 3.1.10 Interakcije česna z zdravili .....                                               | 20        |
| <b>3.2 TRANSPORT SNOVI SKOZI EPITELIJ.....</b>                                          | <b>21</b> |
| 3.2.1 ABC prenašalci .....                                                              | 22        |
| 3.2.2. SLC prenašalci.....                                                              | 26        |
| <b>3.3 BCS klasifikacija zdravil (Biopharmaceutics drug Classification System).....</b> | <b>29</b> |
| 3.3.1 Permeabilnostni parametri .....                                                   | 30        |
| 3.3.2 Caco-2 celice.....                                                                | 31        |
| 3.3.3 Podganje črevo.....                                                               | 32        |
| <b>4 NAMEN DELA .....</b>                                                               | <b>36</b> |
| <b>5 MATERIALI IN METODE.....</b>                                                       | <b>38</b> |
| <b>5.1 Reagenti.....</b>                                                                | <b>38</b> |
| <b>5.2 Raztopine .....</b>                                                              | <b>39</b> |
| <b>5.3 Aparature.....</b>                                                               | <b>40</b> |
| <b>5.4 Metode .....</b>                                                                 | <b>40</b> |
| 5.4.1 Priprava elektrod za merjenje električnih parametrov .....                        | 40        |
| 5.4.2 Priprava tkiva .....                                                              | 41        |
| 5.4.3 Priprava Caco-2 celic.....                                                        | 41        |
| 5.4.4 Priprava difuzijskih celic in aparata za merjenje električnih parametrov.....     | 42        |
| 5.4.5 Elektrofiziološki parametri .....                                                 | 43        |
| 5.4.6 Določevanje fluoresceina v vzorcih.....                                           | 45        |
| 5.4.7 Določevanje učinkovin v vzorcih .....                                             | 45        |
| 5.4.8 Izračun permeabilnostnega koeficienta ( $P_{app}$ ).....                          | 47        |
| 5.4.9 Statistični testi.....                                                            | 49        |
| <b>6 REZULTATI.....</b>                                                                 | <b>51</b> |
| <b>7 DISKUSIJA .....</b>                                                                | <b>79</b> |
| <b>7.1 Vpliv AGE na tesne stike .....</b>                                               | <b>79</b> |
| <b>7.2 Pasivna membranska permeabilnost.....</b>                                        | <b>79</b> |
| <b>7.3 Vpliv AGE na sekretorne prenašalce .....</b>                                     | <b>82</b> |
| 7.3.1 Pgp substrati.....                                                                | 83        |
| 7.3.2 Pgp in MRP2 substrati .....                                                       | 86        |
| 7.3.3 BCRP substrati.....                                                               | 88        |
| <b>7.4 Vpliv AGE na absorptivne membranske prenašalce .....</b>                         | <b>89</b> |
| <b>8 SKLEP .....</b>                                                                    | <b>90</b> |
| <b>9 LITERATURA.....</b>                                                                | <b>92</b> |

## 1 POVZETEK

V diplomskem delu smo preučevali *in vitro* vpliv etanolno-vodnega staranega česnovega ekstrakta na permeabilnost izbranih učinkovin, ki se uporabljajo pri terapiji srčnih in sladkornih bolnikov.

Pri eksperimentalnem delu smo upoštevali rezultate, pridobljene na poganjih tkivih in Caco-2 celicah, ki so bile nepoškodovane in so ostale med poizkusom vitalne. Poškodba ali odpiranje tesnih stikov zaradi toksičnosti preučevane substance oz. vpliva staranega ekstrakta česna (AGE) ali slabe vitalnosti uporabljenega modela permeabilnosti bi lahko imelo za posledico povišanje permeabilnosti učinkovin in neustrezne rezultate. Pri tem smo spremljali permeabilnost markerja integritete tesnih stikov fluoresceina (FLU) ter transepitelijsko upornost (TEER).

Izvedli smo serijo poizkusov, kjer smo spremljali prehod posameznih učinkovin z mukozne na serozno stran skozi podganje črevo oz. apikalne na bazolateralno stran skozi Caco-2 celice (M-S/AP-BL) in obratno, s serozne na mukozno oz. z bazolateralne na apikalno stran (S-M/BL-AP). Izračunane povprečne vrednosti navideznih permeabilnostnih koeficientov za posamezno učinkovino v vsako smer smo statistično ovrednotili in iz (ne)signifikantnih razlik predvidevali mehanizem prehoda posamezne učinkovine v odsotnosti AGE.

V nadaljevanju smo ocenili pasivno membransko permeabilnost skozi oba permeabilnostna modela v smeri absorpcije v prisotnosti 1% v/v AGE na mukozni/apikalni strani. Ugotovili smo da so si rezultati na podganjem črevesju in Caco-2 celicah nasprotujoči. Zaključili smo, da Caco-2 celična linija ni ustrezen model napovedovanja sprememb pasivne membranske permeabilnosti učinkovin po dodatku AGE.

Nato smo ovrednotili prispevek intestinalnih sekretornih prenašalcev (Pgp, MRP2, BCRP) pri prehodu učinkovin skozi črevo in Caco-2 celice. Dodatno smo vpletenost prenašalcev potrdili tudi z dodatkom specifičnih inhibitorjev za posamičen prenašalec. Za vse preiskovane učinkovine smo potrdili vpletenost tistih prenašalcev, ki jih navajajo literaturni viri.

V nadaljevanju smo skušali oceniti vpliv 1% v/v AGE na morebitne spremembe plazemskih koncentracij preučevanih učinkovin, ki so hkrati substrati za enega ali več intestinalnih prenašalcev. V splošnem smo opazili, da pride po dodatku AGE na mukozno/apikalno stran do povečane aktivnosti Pgp in MRP2 v podganjem tankem črevesju in Caco-2 celicah ter do povečane aktivnosti BCRP na podganjem ileumu, medtem ko smo pri rakasti celični liniji opazili, da prisotnost AGE povzroči BCRP inhibicijo.

Preučevali smo tudi vpliv AGE na absorptivne prenašalce na primeru pravastatina, ki se aktivno absorbira z OATP (Organic Anion Transporting Polypeptide- polipeptidni prenašalec organskih anionov) in MCT1 (Monocarboxylate Transporter 1 - monokatboksilatni prenašalec 1) prenašalcema. Aktivnost obeh preiskovanih prenašalcev se je signifikantno povečala ob prisotnosti AGE.

## 2 SEZNAM OKRAJŠAV

AGE – staran česnov ekstrakt/Aged Garlic Extract

AP-BL - smer prehoda skozi Caco-2 celice z apikalne na bazolateralno stran

ATP - adenzin trifosfat/adenosine triphosphate

BB – benzbromaron

BCRP – rezistentni protein pri raku na dojki/Breast Cancer Resistance Protein

BL-AP - smer prehoda skozi Caco-2 celice z bazolateralne na apikalno stran

BSEP – prenašalec žolčnih soli/Bile Salt Exporting Protein

CFTR – cistično fibrozni regulator transmembranske prevodnosti/Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator

CHC – ciano-4-hidroksicinamat/cimetna kislina

DADS – dialil disulfid

DAS – dialil sulfid

DASO – dialil sulfoksid

DASO<sub>2</sub> – dialil sulfon

DATS – dialil trisulfid

DEDS – dietil disulfid

DIDS - 4,4-diizotiocianostilben-2,2-disulfonska kislina

F<sub>abs</sub> – faktor/obseg absorpcije

FLU – fluorescein

iNOS - inducibilna NO sintaza / inducible nitric oxide synthase

INR - International Normalized Ratio

I<sub>sc</sub> – kratkostični tok

M-S – smer prehoda skozi črevo z mukozne na serozno stran

MCT - monokarboksilatni prenašalec/MonoCarboxylate Transporter

MDR – protein z rezistenco na več učinkovin/Multidrug Resistance protein

MRP – protein povezan z rezistenco na več učinkovin /Multidrug Resistance-associated Proteine

NS – statistično nesignifikantna razlika

OAT - prenašalec organskih anionov/Organic Anion Transporter

OATP - polipeptidni prenašalec organskih anionov/Organic Anion Transporting Polypeptide

OCT - prenašalec organskih kationov/Organic Cation Transporter

$P_{app}$  – navidezni permeabilnostni koeficient

PepT - oligopeptidni prenašalec/oligopeptide transporter

Pgp – P-glikoprotein

ROS – reaktivne kisikove spojine

S - statistično signifikantna razlika

S-M - smer prehoda skozi črevo s serozne na mukozno stran

SAC – S-alil-cistein

SAMC – S-alil-merkaptocistein

SLC – družina prenašalcev za topljence/ SoLute Carrier family of proteins

SOD – superoksid dismutaza

SUR – receptor za sulfoniluree/SulfonylUrea Receptor

TEER/TEU – transepitelijska električna upornost /Trans Epithelial Electrical Resistance

TEP – transepitelijski potencial

Ver – verapamil

### 3 UVOD

#### 3.1 ČESEN (*Allium sativum*)

Prvi zapisi, ki govorijo o medicinski uporabi česna kot o preventivnem in kurativnem sredstvu, izvirajo že iz antičnega Egipta. V podobne namene so česen uporabljali tudi v drugih kulturah (v antični Grčiji, v Rimu, na Kitajskem, na Japonskem in v Indiji), katere med seboj sicer nikoli niso prišle v stik (1). Česen izvira iz Azije in sicer iz družine *Allium*, kamor sodijo tudi čebula (*Allium cepa*), por (*Allium porrum*), drobnjak (*Allium schoenoprasum*), zimski luk (*Allium fistulosum*) in mnogi drugi, ki se gojijo predvsem zaradi njihovih okrasnih lastnosti (2). Česen se obsežno uporablja kot zdravilno zelišče ter kot hrana ali začimba za hrano (2, 3). Česnovi pripravki kot tudi sama droga so v splošnem varni, vendar je zaradi nasprotujočih se poročil v literaturi težko nedvomno potrditi klinično učinkovitost in varnost teh pripravkov samih ali v kombinaciji s terapevtskimi snovmi. (4) Njegovo učinkovitost pri preprečevanju bolezni so potrdile tudi klinične študije (5).

##### 3.1.1 Sestava česna (2, 3)

Česnovo drogo sestavlja zmes številnih fitokemikalij. Nekatere (tiosulfidi) služijo kot zaščita pred okužbami z glivami ter insekti, medtem ko druge (gama-glutaminski prekursorji okusa) predstavljajo zalogo dušika in žvepla (2). Sestavine česna bi lahko razdelili na naslednje sklope:

- *encime*: alinaze, peroksidaze, mirozinaze
- *žveplo-vsebujoče snovi*:
  - nehlapne substance:
    - S-alk(en)il cistein sulfoksidi (metiin, propiin, aliin)
    - $\gamma$ -glutamil peptidi
    - S-substituirani cisteini
    - cikloaliin

- hlapne substance:
  - sekundarni produkti aliina nastali po encimski poti (alicin, alil propil disulfid, dialil disulfid, dialil trisulfid)
  - sekundarni produkti aliina nastali po neencimski poti (S-alilmerkaptο-cistein, S-metilmerkaptο-cistein)
- *druge snovi*:
  - voda
  - proteini, amino kisline, glutation
  - minerali: K, Zn, P, Se, Ca, Mg, Na, Fe, Mn
  - vitamini: vitamin A, C, E, vitamini B-kompleksa
  - maščodne kisline, lipidi, glikolipidi
  - prostaglandini
  - flavonoidi, flavoni
  - oligofruktani, polisaharidi
  - steroidi, saponini, sapogenini
  - organske spojine s selenom

Za biološke učinke česna so odgovorne predvsem žveplo-vsebujoče snovi, vendar izkazujejo farmakološke učinke tudi ostale česnove komponente (prostaglandini, saponini, flavonoidi in oligofruktani), ki lahko delujejo sinergistično (3, 5).

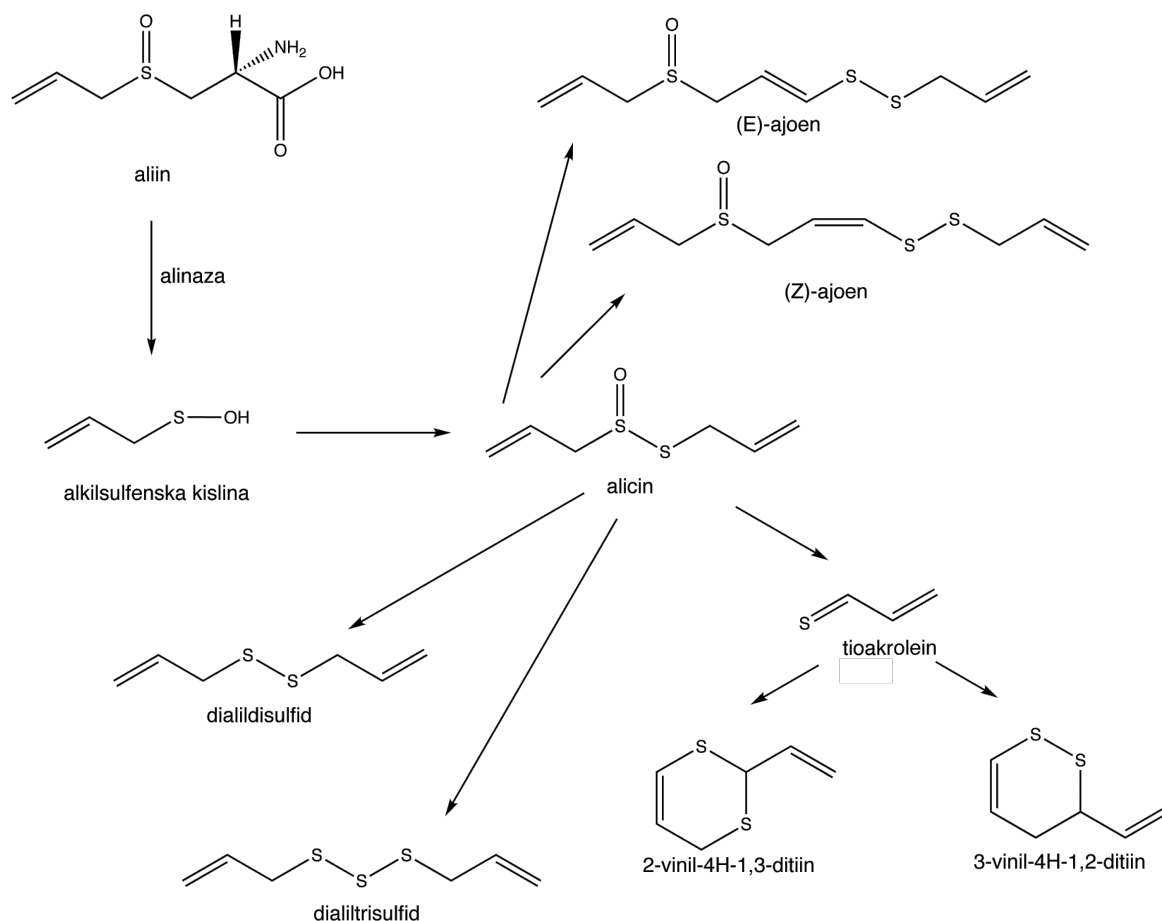
### 3.1.2 Pot razpada česnovih žveplo-vsebujočih spojin

Alinaza je encim, ki katalizira  $\beta$ -eliminacijo iz S-alk(en)il-L-cisteinov. Najdemo jo v različnih izooblikah pri predstavnikih družine *Allium*, kot tudi pri družinah *Liliaceae*, *Iperion*, *Thulbaghia*, *Brassica* in celo pri nekaterih bakterijah. Alinaze se inaktivirajo v kislem pH, s toploto in pri ekstrakciji z organskimi topili (6, 7, 8, 9, 10).

Aliin in encim alinaza sta ločena v intaktnih celicah česna. Ob poškodbi celične membrane (npr. pri kuhanju) se alinaza sprosti iz vakuol in katalizira nastanek alkilsulfenske kisline in ketimina. Zaradi visoke reaktivnosti alkilsulfenska kislina kondenzira do nestabilnega

alicina, ki v nadaljnjih reakcijah vodi do nastanka različnih hlapnih žveplovih spojin (sulfidi, tiosulfonati, tiosulfinati, ajoeni, kapaeni, ditiini in drugi). Ti dajejo česnu značilen vonj in okus.

Omenjena pot razpada je prikazana tudi na shemi 1.



Shema 1: Pot razpada česnovih fitokemikalij (povzeto po referenci št. 2)

### 3.1.3 Česnovi pripravki

Komercialno dostopni česnovi pripravki so pridobljeni iz različnih česnovih virov in s pomočjo različnih procesnih metod. Posledica tega je kompleksna kemijska sestava znotraj posamezne vrste česnovega pripravka, ki pa ni ekvivalentna sestavi v drugih tipih pripravkov. Poglavitna težava pri primerjanju izsledkov različnih kliničnih študij preverjanja terapevtskih lastnosti česna je torej določanje koncentracij aktivnih snovi v

posameznem česnovem pripravku. Njihov delež lahko variira tudi za faktor 10 med posameznimi vrstami pripravkov (2). Česnove dodatke lahko razdelimo na naslednji način:

- **posušen česnov prašek** pridobivajo s sušenjem narezanih ali zdrobljenih česnovih rezin pri temperaturi pod 65°C. Nepoškodovana alinaza v česnovem prašku po zaužitju omogoča sproščanje alicina iz aliina *in vivo* in izkazuje t.i. alicin-sproščujoči potencial (npr. pripravek Garlicin). Omenjeni pripravek vsebuje vse sestavine, ki jih zasledimo tudi v svežem česnu, vendar v spremenjenih koncentracijah in razmerjih. Ti pripravki so običajno nestandardizirani in s predkliničnimi študijami niso potrdili njihove varnosti (11, 12).
- **česno olje pridobljeno z maceracijo ali parno destilacijo** predstavlja nestandardizirane pripravke v obliki mehkih želatinastih kapsul, bogate z lipofilnimi sulfidi. Vsebujejo tudi metabolite aliina (ajoen, vinilditiini, dialil disulfid, dialil trisulfid idr.).
- **česnovi ekstrakti** (staran česnov ekstrakt – aged garlic extract AGE) (2, 5) so pridobljeni s pomočjo namakanja celih ali narezanih česnovih strokov v mešanici vode in etanola skozi daljše časovne obdobje – 20 mesecev. Ekstrakt vsebuje predvsem hidrofilne snovi (S-alil-cistein, S-alilmerkaptocistein, saponine), in nekaj lipofilnih (dialil sulfid, dialil disulfid, dialil trisulfid), ki pretežno razpadejo med 20 mesečnim postopkom staranja AGE, zato jih je v končnem pripravku zelo malo. AGE je standardiziran na vsebnost S-alil-cisteina (SAC) in se je v toksikoloških študijah izkazal kot varen pripravek (11).

Mnogi komercialno uporabni pripravki česna, razen AGE, so standardizirani na vsebnost žveplo-vsebujočih snovi, predvsem na aliin ali alicin, ki pa se ne absorbirata iz gastrointestinalnega trakta (2). Alicin je le prehodna snov, ki razpada v druge žveplo-vsebujoče snovi. Zato alicin ni prava aktivna sestavina česna in je njegova uporaba, kot standardizacijskega markerja, napačna. Nasprotno od alicina pa je SAC, ki se absorbira iz gastrointestinalnega trakta v plazmo, primeren marker pri standardizaciji česnovih pripravkov (12). Ker pripravki niso ekvivalentni v sestavi, je tudi biološki odgovor posameznika na pripravek lahko različen (5).

### 3.1.4 Uporaba česna

- *zgodovinski vidik*: interes uporabnikov za potencialne pozitivne učinke česna izvira že iz antike in je eden zgodnjih dokumentiranih primerov uporabe rastlin pri terapiji bolezni. V mnogih kulturah se je česen uporabljal kot sredstvo za povečevanje delovne kapacitete delavcev in atletov med prvimi olimpijskimi igrami v Grčiji (1). Že več kot 4000 let se uporablja pri lajšanju glavobola, bolečin pri pikih insektov, pri odpravljanju intestinalnih črvov, flatulence in respiratornih težav (12, 5). V Indiji se česen že stoletja uporablja kot antiseptični losjon za spiranje ran in ulkusov. Na Kitajskem so priporočali česnov čaj za zdravljenje vročine, glavobolov, kolere in dizenterije. Med obema svetovnima vojnoma se je česen uporabljal kot antiseptik in kot sredstvo za preprečevanje gangrene (12).
- *tradicionalna uporaba*: uporablja se za zdravljenje kroničnega bronhitisa, respiratornega katarja, ponavljajoče se prehlade, oslovski kašelj, bronhialno astmo in gripo (2).
- *moderna uporaba*: uporablja se zaradi njegovih antihipertenzivnih, antiaterogenih, antitrombotičnih, antimikrobnih, fibrinolitičnih učinkov ter zaradi preprečevanja raka in zniževanja koncentracije lipidov v krvi (2, 13).
- *kot hrana*: česen je široko uporaben kot hrana, sestavina hrane in kot naravna začimba za hrano. Za uporabo česna v prehrani ni omejitev in je zato označen kot varno živilo (2).
- *kot zelišče*: česen se uporablja kot diaforetik, ekspektorans, antispazmolitik, antiseptik, bakteriostatik, virostatik, hipotenziv, antihelminetik in kot promotor levkocitoze (negativna lastnost česna) (2).

### 3.1.5 Farmakološki učinki česna

#### 3.1.5.1 Antiaterogeno delovanje

Bolezni povezane z aterosklerozo (ishemična srčna bolezen, kap) so posledica povišanih koncentracij plazemskih lipidov. Študije na podganah in zajcih s česnovimi esencialnimi olji in surovim česnom so pokazale, da uživanje teh česnovih pripravkov signifikantno zniža vsebnost celokupnega holesterola, LDL in VLDL, kot tudi signifikantno poviša HDL vrednosti. V drugi študiji, kjer so zajce hranili s holesterolom, z namenom povzročiti nastanek aterosklerotičnih plakov, je aplikacija AGE povzročila zmanjšanje akumulacije holesterola in razvoj arteriosklerotičnih plakov v stenah krvnih žil. Po številnih kliničnih podatkih imajo surov česen, česnovo esencialno olje in AGE pozitivne učinke na zniževanje nivoja holesterola (12).

Antiaterogeno delovanje česnovih pripravkov je posledica s posameznimi česnovimi fitokemikalijami povzročene inhibicije encimov, udeleženih v biosintezi holesterola, maščobnih kislin in trigliceridov. Inhibicija HMG-CoA reduktaze, lanosterol-14-demetilaze in skvalen monooksigenaze s česnovimi substancami, vodi v znižanje plazemske koncentracije holesterola. Sočasno pa se poveča tudi aktivnost lipaze in znižajo tkivne koncentracije NADPH. Tako se biosinteza triacilgliceridov zmanjša, njihova hidroliza pa poveča, kar celokupno vodi v znižanje plazemskih trigliceridov. Znižajo pa se tudi plazemske koncentracije maščobnih kislin zaradi inhibicije sintaze maščobnih kislin, encima ki je udeležen pri njihovi *de novo* sintezi. K česnovemu antiaterogenemu delovanju pa prispeva tudi povečana pretvorba holesterola v žolčne kisline in njegova sekrecija v žolč ter inhibicija absorpcije holesterola iz gastrointestinalnega trakta ob prisotnih česnovih saponinih (12).

Rezultati številnih kliničnih študij kažejo, da česen zmerno zniža koncentracije plazemskih lipidov od 15 do 25 mg/dl (5% - 15%). Zdravljenje s česnovimi tabletami (900 mg/dan) je povzročilo znižanje celokupnega serumskega holesterola z 282 mg/dl na 210 mg/dl v 12 tednih, medtem ko je bezafibrat (učinkovina za zdravljenje hiperlipidemij) (600 mg/dan) povzročil znižanje holesterola z 287 mg/dl na 208 mg/dl. Pri obeh terapijah je prišlo do primerljivega znižanja koncentracij LDL in povišanja HDL (6). V nasprotju z izsledki te

študije (6), pa je Gardner v študiji iz leta 2007 pokazal, da niti surov česen niti česnov prašek ali AGE ne izkazujejo statistično signifikantnih učinkov na plazemske koncentracije LDL holesterola ali koncentracije lipidov v plazmi pri odraslih z zmerno hiperholesterolemijo (plazemski holesterol: 300 – 400 mg/dl) (12, 99).

### **3.1.5.2 Antihipertenzivno delovanje**

Učinkovito zniževanje krvnega tlaka s pomočjo česnovih pripravkov je bilo ugotovljeno v predklinični študiji na psih in podganah le za česnov prašek pri dolgotrajnem jemanju, medtem ko etanolni ekstrakt ni bil učinkovit (2). Hipotenzivni učinek česnovih pripravkov je posledica povečane sinteze vazodilatornih snovi, kot sta NO in H<sub>2</sub>S v steni žil, ter direktne relaksacije žilnih gladkih mišic (12). Mnoge klinične študije niso uspele dokazati signifikantnih hipotenzivnih učinkov česna kljub prilagoditvi odmerka in trajanja zdravljenja. Staran česnov ekstrakt, svež surov česen ali njegov prašek nesignifikantno znižata sistolični tlak (14), medtem ko nekatere študije opisujejo signifikantno znižanje diastoličnega tlaka (6).

Nedavno so (Mirin et al., 2004) razvili zdravilo, ki vsebuje kaptopril (zaviralec angiotenzinske konvertaze) in alicin ter ga poimenovali alilmerkaptokaptopril (allylmercaptocaptopril; CPSSA). Kombinirano zdravilo je učinkovitejše pri terapiji hipertenzije, saj ima poleg sposobnosti inhibicije angiotenzinske konvertaze (ACE) tudi sposobnost zniževanja nivoja serumskega holesterola in trigliceridov (12).

### **3.1.5.3 Antitrombotično in fibrinolitično delovanje**

Glavna funkcija trombocitov je ustavljanje krvavitve po poškodbi. Uživanje hrane, bogate z maščobami, vodi v povišanje serumske koncentracije fibrinogena, znižano fibrinolitično aktivnost, skrajšan čas koagulacije in trombozo. Iz česna in česnovega olja so bili izolirani številni inhibitorji agregacije trombocitov (alicin, ajoen), ki so se izkazali za učinkovite tako v *in vitro* kot tudi v *in vivo* študijah (12). Česen ima dokazano pozitivne učinke pri preprečevanju trombotičnih zapletov, saj inhibira agregacijo trombocitov povzročeno z induktorji (ADP, kolagen, arahidonska kislina, adrenalin). Zaradi inhibicije ciklooksigenaze in lipoksigenaze se zniža sinteza tromboksana (dialil disulfid, dialil trisulfid), prav tako pa česnov fitokemikalije povzročijo tudi inhibicijo membranske

fosfolipaze, zmanjšajo inkorporacijo arahidonske kisline v fosfolipidno membrano trombocitov ter inhibirajo privzem kalcija v trombocite (2).

Antiagregatorno delovanje česnovih pripravkov je močno odvisno od genotipa, okolja gojenja in časa shranjevanja česna (12). V literaturi sta opisana dva primera hkratnega uživanja česna in varfarina, kjer je pri pacientih prišlo do povečanja INR (International Normalised Ratio). Tako je uživanje česna po kirurških posegih zaradi povečane verjetnosti krvavitev kontraindicirano. Prihaja lahko tudi do spontanih krvavitev ob uživanju omenjene kombinacije varfarina in česna (13). Rezultati drugih kliničnih študij pa so v nasprotju z zgoraj navedenim pokazali, da česen ni povročil signifikantnih sprememb v agregaciji trombocitov (6).

#### **3.1.5.4 Učinek na hiperhomocisteinemijo**

Hiperhomocisteinemija je nedavno prepoznani faktor tveganja za nastanek ateroskleroze. Homocistein je žveplo-vsebujoča amino kislina, ki nastaja med metabolizmom esencialne amino kisline metionina. Zmerno povišane vrednosti plazemskih koncentracij homocisteina predstavljajo pomemben faktor tveganja za razvoj in nastanek okluzivnih žilnih bolezni in ishemične srčne bolezni pri pacientih s sladkorno boleznijo. Poznamo kongenitalno ali podedovano hiperhomocisteinemijo in pridobljeno zaradi pomanjkanja folata, vitamina B<sub>6</sub> in/ali B<sub>12</sub> oz. uporabe zdravil, ki se vpletajo v metabolizem teh vitaminov.

Ker vsebuje česen veliko vitamina B<sub>6</sub> in B<sub>12</sub>, kot tudi aminotiolne snovi (S-alilmerkaptocistein (SAMC), DAS, dietil disulfid (DEDS), dipropil disulfid (DPDS)) so nekateri avtorji predvidevali, da bi uporaba česna lahko učinkovito znižala plazemske koncentracije homocisteina. Nedavne študije so pokazale učinkovitost AGE pri zniževanju plazemskih koncentracij homocisteina pri podganah z inducirano (odtegnitev folne kisline) hiperhomocisteinemijo, vendar mehanizem delovanja še ni popolnoma pojasnjen (12).

### 3.1.5.5 Antioksidativno delovanje

Staranje in nekatere bolezni (rak, kardiovaskularne, vnetne, neurodegenerativne bolezni) povezujemo z oksidativno poškodbo DNA, proteinov in lipidov z reaktivnimi kisikovimi radikali (ROS). Sadje in zelenjava vsebujejo številne antioksidante kot so vitamin E in C, glutation, fenolne spojine ter pigmente, ki ščitijo celice pred radikalskimi poškodbami (12).

Med česnovimi preparati ima AGE najvišjo antioksidativno aktivnost, ki je celo višja od antioksidativne aktivnosti surovega česna. Ekstrakcijski proces pridobivanja AGE omogoča, da vsebuje končni pripravek visoke količine stabilnih in dobro absorbirajočih se vodotopnih organskih žveplo-vsebujočih snovi (SAC, SAMC) z antioksidativnim delovanjem. Tudi lipofilni alil sulfidi (DAS, DADS, DATS, dialil polisulfidi), derivati tetrahidro- $\beta$ -karbolina, flavonoidi, saponini, Se, makrohranila (lektini) in N-fruktozil-glutamat/arginin/lizin podpirajo antioksidativno delovanje omenjenega pripravka (12).

Antioksidanti v AGE lahko delujejo sinergistično ali aditivno in sicer tako, da preprečijo nastanek ROS, podpirajo endogene encimske mehanizme odstranjevanja prostih radikalov in inhibirajo aktivacijo preko oksidativnega stresa inducirane aktivacije jedrnega faktorja kapa B (NF- $\kappa$ B), s čimer AGE deluje tudi protivnetno, saj je jedrni faktor kapa B (NF- $\kappa$ B) vpleten v ekspresijo proinflamatornih snovi (inducibilna NO sintaza - inducible nitric oxide synthase (iNOS) in ciklooksigenaza-II). Ker je NF- $\kappa$ B vpleten tudi v ekspresijo HIV gena, lahko AGE pomembno vpliva na modulacijo HIV replikacije preko inhibicije faktorja NF- $\kappa$ B (12).

V prisotnosti česnovih antioksidantov se aktivnost superoksid dismutaze (SOD), katalaze in glutation peroksidaze kot tudi koncentracija glutationa v celicah povečajo. Zaradi inhibicije lipidne peroksidacije in oksidacije LDL pa se zmanjša tudi tveganje za nastanek kardiovaskularnih in cerebrovaskularnih bolezni. Antioksidativne lastnosti česnovih prehranskih dodatkov so razlog za antiaterogeno, hepatoprotektivno in antikarcinogeno delovanje, ki je bilo dokumentirano v *in vitro* in *in vivo* živalskih študijah (2, 12).

### 3.1.5.6 Antikarcinogeno in antitumorogeno delovanje

Zavrta rast tumorskih celic v prisotnosti tiosulfinata, ekstrahiranega iz česna, je bila opažena že leta 1950 v *in vitro* kot tudi v in *in vivo* živalskih študijah. Klinične študije dokazujejo, da uživanje česna oz. njegovih pripravkov zmanjšuje tveganje za nastanek sarkoma in karcinoma na želodcu, kolonu, požiralniku, prostati, mehurju, pljučih, dojkah, endometriju, koži in možganih (12). Antikarcinogene učinke lahko pojasnimo z različnimi indirektnimi mehanizmi. Znano je, da se ob prisotnosti česna poveča aktivnost nekaterih detoksifikacijskih encimov druge faze (glutation-S-transferaza), ki povečujejo polarnost karcinogenih snovi in s tem povečujejo njihovo eliminacijo. Sočasno pa inhibicija nekaterih encimov metabolizma prve faze (CYP2E1) prepreči aktivacijo prokarcinogenih snovi v karcinogene. Zaradi antioksidativnega in protivnetnega delovanja česnovih pripravkov se zmanjša oksidativna poškodba kromosomov, mutagenost in genotoksičnost nekaterih snovi. Povečana apoptoza in inhibirana angiogeneza še nadalje prispevajo k antikarcinogenim lastnostim česnovih pripravkov.

Študije so pokazale, da antikarcinogeno delovanje izkazujejo alicin in njegovi razpadni produkti (dialil sulfoksid (DASO), dialil sulfon (DASO<sub>2</sub>), DAS, DADS, DATS, SAC) (2). K antikarcinogenim lastnostim česna in njegovih pripravkov prispevajo tudi steroidni saponin erubozid-B in organske spojine s Se ( $\gamma$ -glutamil-Se-metil selenocistein in Se-metil selenocistein) (12). Staran česnov ekstrakt je v različnih *in vitro* študijah povzročil signifikantno upočasnjeno rast rakastih celičnih kultur (Sarcoma-180, LL/2, CCRF CEM, HepG2, Caco-2). Kombinacija ekstrakta in česnovega praška pa inhibira rast humanih hepatoma celic.

### 3.1.5.7 Imunomodulatorno delovanje

Visokomolekularna proteinska frakcija v AGE in česnovem prašku stimulatorno vpliva na delovanje celic imunskega sistema in sicer tako, da poveča aktivnost efektorskih celic in celic ubijalk, proliferacijo limfocitov, fagocitozo z makrofagi, infiltracijo limfocitov in makrofagov v tumorje ter sproščanje interferona  $\gamma$ , interleukina 2 in faktorja tumorske nekroze  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) (2). Antialergeni in antitumorski učinki so posledica učinkov kombinacije česnovih fitokemikalij na posamezne komponente imunskega sistema.

Številne študije predvidevajo, da bi česen lahko učinkovito preprečeval imunske supresije, ki so posledica različnih snovi in procesov (kemoterapija, UV sevanje, psihološki in fizični stres). Zaradi imunske stimulacije lahko česen preprečuje razvoj raka in poslabšanje imunskega odgovora, ki se pojavi pri s HIV okuženimi pacienti ter izboljša s starostjo povezano poslabšanje kognitivnih funkcij (12). Ker česen oz. njegovi pripravki modificirajo imunske funkcije, lahko z njimi zdravimo in preprečujemo določene bolezni, ki so posledica disfunkcije imunskega sistema, npr. invazivna bolezen zaradi glivic (invasive fungal disease). Česen se lahko uporablja sinergistično z ostalimi protiglivičnimi zdravili zaradi sposobnosti ojačanja gostiteljevega imunskega sistema (12).

### 3.1.5.8 Antimikrobno delovanje

Antimikrobno delovanje česna je dobro poznano že iz tradicionalne medicine, kjer se je uporabljal pri terapiji bakterijskih, virusnih in parazitskih okužb. *In vitro* antimikrobno delovanje česna je najverjetneje posledica alicina in (2) žveplo-vsebujočih snovi, vendar pa lahko k protimikrobnemu delovanju prispevajo tudi nekateri proteini, saponini in fenoli. Ker ima česen visoko antimikrobno aktivnost, bi se lahko uporabljal kot naravni konzervans, pri kontroli rasti mikrobov (12).

- a) **protiglivično delovanje** je bilo prvič znanstveno potrjeno leta 1936, ko sta Schmidt in Marquardt raziskovala kulturo epidermatofitov. *In vitro* in *in vivo* študije so pokazale učinkovitost česna in njegovih derivatov proti širokemu spektru gliv in kvasovk (*Candida*, *Trichophyton*, *Torulopsis*, *Rhodotorula*, *Cryptococcus*, *Aspergillus*, *Trichosporon*). Izsledki *in vitro* študij so tudi pokazali sinergistično aktivnost česna z amfotericinom B, ki je ena glavnih protiglivičnih učinkovin. Aktivne protiglivične snovi v česnu uničijo celice gliv tako, da zmanjšujejo privzema kisika, celično rast, inhibirajo sintezo lipidov, proteinov in nukleinskih kislin, spreminjajo lipidni profil celične membrane ter inhibirajo sintezo celične stene. Glavne protiglivične komponente v česnu so razpadni produkti alicina (DATS, DADS, DAS in ajoen), ki imajo vsi višjo protiglivično učinkovitost kot alicin. Določeni steroidni saponini izolirani iz česna (erubosid-B) imajo tudi protiglivično aktivnost proti *Candidi albicans*.

- b) **protibakterijsko delovanje:** česen inhibira rast gram-pozitivnih, gram-negativnih in acidofilnih bakterij ter produkcijo toksinov. Učinkovitost česnovih pripravkov je bila dokumentirana proti bakterijam *Pseudomonas*, *Proteus*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella*, *Salmonella*, *Micrococcus*, *Bacillus subtilis*, *Mycobacterium* in *Clostridium*, pri čemer so nekatere izmed teh rezistentne na penicilin, streptomycin, doksicilin in cefaleksin. Česen prav tako inhibira del koristne črevesne mikroflore, vendar je bolj učinkovit proti škodljivim enterobakterijam, najverjetneje zaradi večje občutljivosti le-teh na alicin. Učinkovit je tudi proti *Streptococcus mutans* in *Streptococcus sobrinus*, glavnima bakterijama odgovornima za nastanek zobnega kariesa, ter proti *Porphyromonas gingivalis* in *Prevotella intermedia*, ki povzročata zobni periodontitis. Glavne *in vitro* aktivne protibakterijske snovi v česnu so razpadni produkti alicina (DAS, DADS in ajoen), kot tudi ostali tiosulfinati izolirani iz oljnih macerats česna. DAS in DADS ščitita proti infekciji s *Helicobacter pylori* in tako zmanjšata tveganje za želodčno neoplazijo, kajti *Helicobacter pylori* je pomemben rizični faktor pri nastanku raka na želodcu (12).
- c) **protivirusno delovanje:** česnovi produkti z najvišjo vsebnostjo alicina in drugih tiosulfinatov (DAS, DADS in ajoen), so najbolj učinkoviti proti virusnim okužbam. Antivirusni učinek je bil opažen pri Herpes simplex virusu tipa 1 in 2, virusu gripe A in B, humanemu citomegalovirusu, vezikularnemu stomatitis virusu, rinovirusu, HIV, virusni pljučnici in rotavirusu (12).

### 3.1.5.9 Hepatoprotektivno delovanje

Česnovo olje, aliin, S-alilmerkaptocistein (ASSC) in S-metilmerkaptocistein (MSSC) učinkovito prepečujejo *in vitro* hepatotoksičnost povzročeno s CCl<sub>4</sub> in galaktozaminom. Izsledkih drugih *in vitro* študij pa kažejo, da so za hepatoprotektivno delovanje odgovorni tudi SAC in S-propil-cistein (2).

Alicin, njegovi derivati (ajoen, metil ajoen, DAS, DATS, SAC, 2-vinil-4H-1,3-ditiin) ter steroidni saponini so glavne aktivne substance odgovorne za zniževanja nivoja lipidov in holesterola pri človeku kot tudi pri eksperimentalnih živalih (12). Zaradi hepatotoksičnosti,

in posledično znižane sinteze holesterola v jetrih, povzročijo lipofilne žveplo-vsebujoče snovi znižanje plazemske koncentracije holesterola. Vodotopne žveplo-vsebujoče snovi (SAC) niso citotoksične, zato vodno-etanolni ekstrakti, zmanjšajo poškodbe jeter in sočasno delujejo antiaterogeno. (5)

#### **3.1.5.10 Antihiperglikemično ali antidiabetično delovanje**

Dolgotrajna absorpcija naravnih flavonoidov je lahko učinkovita pri preprečevanju napredovane glikacije kolagena, ki prispeva k razvoju kardiovaskularnih zapletov pri pacientih z sladkorno boleznijo. Pri uporabi naravnih snovi za zdravljenje sladkorne bolezni tipa II, se je česen izkazal za učinkovito hipoglikemično sredstvo le pri diabetikih in ne pri zdravih prostovoljcih. Zaradi hipoglikemičnega učinka se pri diabetikih priporoča uporaba kombinacije antidiabetičnih zdravil s česnovimi pripravki, z namenom povečati terapevtski potencial in zmanjšati dozo zdravilnih učinkovin. Metin, alilpropil sulfid in SAC so odgovorni za antidiabetične učinke, ki jih te fitokemikalije izzovejo preko stimulirane produkcije in sekrecije inzulina iz trebušne slinavke (15, 12).

#### **3.1.5.11 Probiotično delovanje**

Zaradi visoke vsebnosti visoko topnih vlaknin, inulina in fruktooligosaharidov se lahko česen oz. njegovi prehranskih dodatki uporabljajo tudi kot probiotiki, ki stimulirajo rast specifičnih mikroorganizmov v kolonu. To so predvsem bifidobakterije in laktobacili, ki imajo v splošnem pozitivni učinek na zdravje (12).

### **3.1.6 Farmakokinetične lastnosti posameznih fitokemikalij v česnu**

Aliin, SAC ter lipofilni razpadni produkti alicina se po peroralni aplikaciji dobro absorbirajo, vendar pa v plazmi kasneje ni moč zaznati lipofilnih ajoinov in DATS. Alicin se po peroralni aplikaciji zaradi nestabilnosti ne absorbira niti pri 90 mg odmerku. Da bi dosegli *in vivo* nastanek alicina iz aliina s pomočjo alinaze, moramo poseči po gastrorezistentnih tabletah, saj kisli želodčni pH encim alinazo denaturira. Sinteza alicina je v gastrointestinalnem traktu še dodatno zmanjšana za 40% zaradi inhibitornega vpliva

črevesnega soka na encim in zaradi metabolizma alicina v samih enterocitih. Če do absorpcije alicina vseeno pride, sledi že po nekaj minutah nastanek alil merkaptana, metabolita ki nastaja pri razpadu tudi drugih česnovih fitokemikalij. Zaznamo ga lahko v izdihanem zraku po zaužitju česna oz. njegovih pripravkov. A ker je izdihan zrak posameznika kombinacija izdihanega zraka iz pljuč in iz želodca, je merjenje koncentracije alil merkaptana, kot indikatorja količine absorbiranih česnovih fitokemikalij, nezanesljivo. Namesto njega lahko spremljamo plazemske koncentracije SAC, ki mu pripisujejo terapevtske učinke in se uporablja pri standardizaciji AGE.

### 3.1.7 Učinki česna na Pgp (P-glikoprotein)

Regulacija sekretornih prenašalcev v gastrointestinalnem traktu pod vplivom česna oz. njegovih posamičnih sestavin še ni dobro poznana. Foster et al. (2001) so v *in vitro* študiji z rekombinantnimi človeškimi Pgp prenašalci ugotovili, da surov česen in česnovi produkti inhibirajo Pgp, vendar je bila inhibicija nižja v primerjavi z znanim Pgp inhibitorjem verapamilom. Snovi v česnu so najverjetneje substrati za Pgp in delujejo kot inhibitorji za substrate istega vezavnega mesta na Pgp (3). V nasprotju z omenjeno študijo pa so v študiji na podganjem črevesju in Caco-2 celičnih kulturah ugotovili povišano aktivnost Pgp in MRP2 prenašalcev *in vitro* ob sočasni uporabi AGE. Sočasna uporaba AGE in zdravil, ki so Pgp in/ali MRP2 substrati, lahko torej vodi v zmanjšano ali nezadostno absorpcijo predpisanih zdravil (11).

### 3.1.8 Učinki česna na CYP sistem

Izsledki *in vitro* študije (16) kažejo, da so številne česnove organske žveplo vsebujoče snovi inhibitorji CYP encimov, pri čemer je inhibicija odvisna od kemijske strukture posamezne fitokemikalije, njene doze, uporabljenega živalskega modela, tkiv in izvora česna. Če povzamemo rezultate posameznih študij, lahko ugotovimo naslednje:

- višje število žveplovih atomov v česnovi fitokemikaliji pomeni tudi močnejšo inhibicijo CYP2E1 in indukcijo CYP1A in CYP2B izooblik
- sestavine z metilnimi skupinami imajo malo ali skoraj nič učinka na CYP (16)
- ekstakti staranega in svežega česna *in vitro* v človeških jetrnih mikrosomih inhibirajo CYP2C9, CYP2C19 in CYP3A4 izooblike

- peroralna aplikacija različnih česnovih snovi pri podganah vodi k povečanju aktivnosti CYP3A izooblike
- dolgotrajna uporaba česnovega ekstrakta ali česnovega olja na zdravih prostovoljcih *in vivo* ne vpliva na aktivnost CYP2D6 in CYP3A4 izooblik (17).

### 3.1.9 Neželeni učinki česna

Česen je v večini primerov varna droga in ga uporabniki dobro prenašajo (6). Najbolj pogosta neželena učinka pri uporabi česnovih prehranskih dodatkov sta neprijeten zadah in telesni vonj. Uporaba večjih količin česna, še posebno na prazen želodec, pa lahko povzroči druge manj pogoste neželene gastrointestinalne učinke: pekoč občutek v želodcu, diareja, flatulenca, dispepsija in sprememba intestinalne flore. Med drugim se lahko pojavijo tudi dermatološke težave (alergijski dermatitis, opekline, mehurji), če svež ali stisnjen česen apliciramo neposredno na kožo. Pri delavcih, ki so izpostavljeni česnovemu prahu, se lahko razvijejo astmatske težave (12). Pri pacientih, sicer stabilnih na terapiji z varfarinom, se lahko vrednosti protrombinskega časa in INR (international normalized ratio) povišata (6).

Za neprijeten zadah, vonj kože, kemične opekline, kontaktni dermatitis in bronhialno astmo je odgovoren predvsem alicin. Žveplo vsebujoče lipofilne snovi, ki izvirajo iz alicina pa so glavni iritanti in alergeni. DAS je pomemben topikalni alergen. Metode priprave posameznih česnovih pripravkov močno vplivajo na kemijsko sestavo končnega prehranskega dodatka. Izbor pravilnega postopka ekstrakcije iz surove droge lahko torej omogoča odstranitev snovi, odgovornih za neželene učinke in sočasno ohrani aktivne snovi kot je npr. SAC v AGE. V akutnih in kroničnih študijah so za AGE dokazali, da je varen tudi v visokih dozah (12).

### 3.1.10 Interakcije česna z zdravili

Zaradi antitrombotičnega česnovega delovanja, je sočasno uživanje velikih količin česna ali nekaterih česnovih pripravkov kontraindicirano pri pacientih, ki jemljejo varfarin zaradi nevarnosti podaljšanih krvavitev. Klinične študije so pokazale varnost AGE s številnimi zdravili, vključno z varfarnom, aspirinom, statini, adriamicinom/doksirubicinom, 5-fluoro-

uracilom, metotreksatom idr. Zaradi načina priprave AGE, ki omogoča odstranitev neželenih fitokemikalij, se le-ta lahko varno kombinira z določenimi komplementarnimi zdravili brez pojava neželenih učinkov.

Česnu kot komplementarnemu zdravilu, ki se uporablja sočasno z drugimi zdravili, se zaradi sposobnosti indukcije CYP-P450 encimov v jetrih posveča posebna pozornost. S česnom povzročene indukcije CYP encimov v jetrih lahko povzročijo znižanje plazemskih koncentracij sakvinavirja in ritonavirja. V študiji, ki so jo izvedli Laroche, Choudhri, Gallicano in Foster leta 1998 je bilo ugotovljeno, da velike količine surovega česna ali česnovega praška v kombinaciji z ritonavirjem, lahko povzročajo gastrointestinalno toksičnost. V nasprotju z lipofilnimi žveplo vsebujočimi snovmi (DAS, DADS) pa naj AGE ne bi povzročal indukcije CYP encimov ali gastrointestinalne toksičnosti, saj je vsebnost lipofilnih snovi zaradi samega postopka priprave pri AGE znatno nižja v primerjavi z oljnimi macerati in ekstrakti ter uprašenim česnom (12)

### 3.2 TRANSPORT SNOVI SKOZI EPITELIJ

Glavno mesto absorpcije zaužitih snovi je tanko črevo, kjer predstavljajo enterociti selektivno bariero pri absorpciji zdravil in ksenobiotikov. Barierna funkcija enterocitov je močno odvisna od specifičnih membranskih transportnih sistemov in intracelularnega encimskega metabolizma (18).

Substance lahko prehajajo intestinalni epitelij po dveh glavnih poteh: *paracelularno* in *transcelularno*:

- Absorpcija majhnih hidrofilnih in ioniziranih snovi poteka pretežno *paracelularno* in je zaradi majhne površine intercelularnih tesnih stikov med enterociti nizka.
- Transcelularna absorpcija iz lumna v kri zahteva prehod substance preko apikalne membrane, transporta skozi citosol in nazadnje izhoda iste snovi preko bazolateralne membrane v kri.

Hidrofilne snovi lahko prehajajo apikalno membrano pretežno s pomočjo olajšane difuzije ali aktivnega transporta s pomočjo specifičnega transportnega sistema, medtem ko lahko lipofilne snovi apikalno membrano prehajajo tudi s pasivno difuzijo. Učinkovine v citosolu so nato lahko substrati za efluksne prenašalce (ABC proteini), ki le-te transportirajo preko apikalne membrane nazaj v lumen črevesja, ali pa se z absorptivnimi prenašalci na bazolateralni strani prenašajo preko bazolateralne membrane v kri. Lahko pa so te iste učinkovine sočasno podvržene tudi intracelularnemu metabolizmu v enterocitih s citokrom P450 sistemom. S citokromi ali z ostalimi intracelularnimi encimi nastali metaboliti se lahko nato skupaj z aplicirano učinkovino absorbirajo v plazmo ali pa so metaboliti tudi sami podvrženi efluksu s prenašalci. Frakcija aplicirane učinkovine, ki preide to prvo intestinalno obrambno linijo, s krvjo nato preide v jetra preko portalnega sistema, kjer potekata metabolizem in sekrecija s podobnimi encimi in ABC prenašalci kot v črevesju. Celotna biološka uporabnost učinkovin je tako odvisna od aktivnosti apikalnih efluksih in bazolateralnih absorptivnih sistemov ter intracelularnega metabolizma tako v črevesju kot tudi v jetrih (18).

### 3.2.1 ABC prenašalci

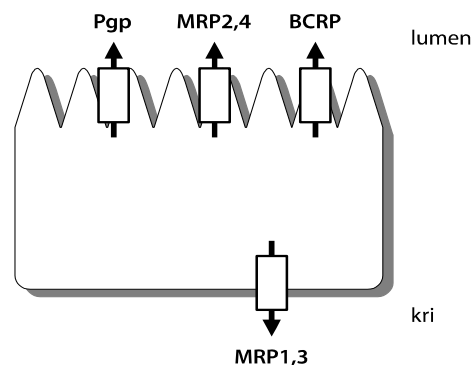
ABC proteini (ATP-binding cassette proteins) so prenašalci, ki omogočajo prenos substratov v nasprotni smeri koncentracijskega gradienta (19) t.j. z mesta z nižjo koncentracijo na mesto z višjo koncentracijo. Nahajajo se tako v zdravem, normalnem tkivu kot tudi v rakastih celicah in skupaj z metabolnimi encimi I. in II. faze omogočajo zaščito celic pred potencialno toksičnimi ksenobiotiki.

ABC proteine lahko razdelimo v 7 družin, poimenovanih A, B, C, D, E, F in G. Za vse je značilno, da za transport substratov potrebujejo ATP energijo in da imajo dokaj podobno strukturo. Glede podobnosti v strukturi lahko ločimo 3 skupine ABC prenašalcev; MDR/TAP (Pgp, MDR3, BSEP, TAP1, TAP2), MRP/CFTR (MRP1-9, CFTR, SUR1, 2) ter BCRP skupino. Glede na njihovo funkcijo, pa jih lahko razdelimo na membranske prenašalce, receptorje ter ionske kanale (18).

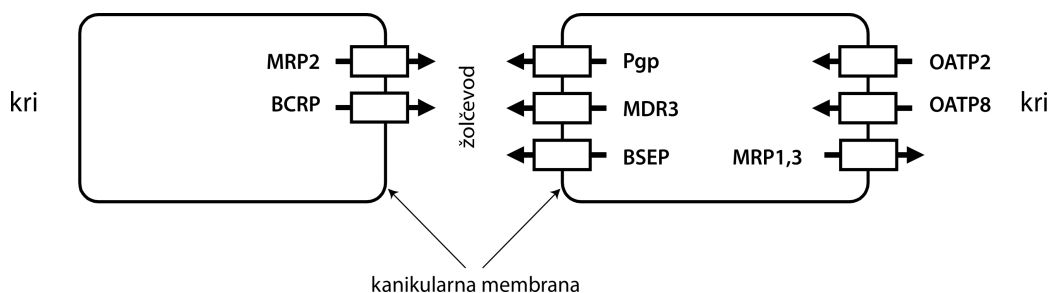
Najpomembnejši sekretorni prenašalci tankega črevesja so P-glikoprotein (Pgp/MDR1 - multidrug resistance protein), MRP2 in MRP4 (prenašalec povezan z rezistenco na več učinkovin/multidrug resistance - associated protein) ter BCRP (rezistentni protein pri raku na dojki/breast cancer resistance protein). Ker so omenjeni prenašalci locirani apikalno in

posredujejo prenos učinkovin iz citoplazme enterocita v lumen gastrointestinalnega trakta, zmanjšujejo absorpcijo in posledično biološko uporabnost peroralno apliciranih učinkovin (20).

Shematska lokalizacija membranskih prenašalcev v črevesju (enterocitih) in jetrih (hepatocitih) je prikazana na Shemi 2 in 3.



Shema 2: Lokalizacija membranskih prenašalcev v črevesju (povzeto po referenci št.18)



Shema 3: Lokalizacija membranskih prenašalcev v hepatocitih (povzeto po referenci št.18)

### 3.2.1.1 MDR1/P-glikoprotein

P-glikoprotein so prvič določili v tumorskih celicah odpornih na citostatike. Strukturo Pgp predstavljata dve homologni polovici, kjer ima vsaka šest transmembranskih heliksov in eno nukleotidno vezavno mesto (21, 22). Pgp se izraža tako v rakastih kot tudi nerakastih tkivih (črevesje, želodec, jetra, ledvica, testisi, placenta, možganska bariera, pljuča, adrenalna žleza, vranica, skeletne mišice, srce, koža, jajčniki, prostata) (19). Njegova ekspresija v gastrointestinalnem traktu narašča od želodca do debelega črevesja, pri čemer je v tankemu črevesju prenašalca več v resici enterocita kot v njegovi kripti (23). Pgp je

tako idealno lociran na poziciji, kjer omejuje absorpcijo in biološko uporabnost zdravil (zdravila za zdravljenje raka, vnetij, imunskih bolezni, HIV, hipertenzije) (18, 24). Pomemben pa je tudi pri distribuciji, metabolizmu in eliminaciji terapevtskih snovi zlasti v jetrih, kjer je transport s Pgp v večini primerov sklopljen tudi z metabolizmom s citokromi (18, 25). Pgp ima široko substratno specifičnost s tendenco predvsem za lipofilne, kationske in v večini primerov nekonjugirane substrate z molekulsko maso 300-2000 kDa (20, 21).

Efluks učinkovin s Pgp je nepomemben pri visoko permeabilnih substancah, saj je glavni način prehoda membran le-teh pasivna difuzija, pri visokih koncentracijah pa se Pgp tudi nasiti. Ker se vzdolž gastrointestinalnega trakta pH lumna spreminja, to še dodatno vpliva na aktivnost Pgp kot tudi na pasivno permeabilnost učinkovin, ki je odvisna od ravnotežja med ionizirano in neionizirano obliko učinkovine (25).

Pri človeku sta normalno prisotni dve izoformi Pgp in sicer MDR1 in MDR2 z različno tkivno distribucijo, ki ju kodirata dva različna gena pri čemer je le MDR1 izooblika prekomerno izražen v tumorskih celicah (22).

### **3.2.1.2 BCRP prenašalec**

BCRP prenašalec (Breast Cancer Resistance Protein) je bil prvič izoliran iz humanih tumorskih celic dojke in placent. V visokih količinah se izraža v placentalnih sincitiotrofoblastih, v manjših pa v dojkah, tankem črevesju, kolonu in jetrih. V polariziranih tumorskih celičnih linijah dojke, kolona in želodca BCRP uravnava sekrecijo učinkovin in ima velik vpliv na biološko uporabnost protitumorskih učinkovin zlasti topotekana (18). Kljub poimenovanju pa ni dokazov, ali se ta prenašalec prednostno izraža v humanem ali tumorskem tkivu (26). Od ostalih ABC proteinov se razlikuje po svoji strukturi in mu pravijo tudi »half-transporter«, saj je za prenos substratov potrebno, da poteče najprej dimerizacija obeh homodimer (18).

Kljub strukturnim razlikam imajo BCRP prenašalci podobne substrate kot Pgp in MRP2 prenašalci, pri čemer pa velja, da si BCRP substrati med seboj niso tako strukturno različni kot lahko to zasledimo pri Pgp in MRP2 prenašalcema. Znano je, da se z BCRP ne pranašajo vinca alkaloidi (vinkristin), paklitaksel ali epipodofilotoksini (etopozid). Antraciklini, mitoksanton, topotekan, aktivni metaboliti irinotekana, azitromicin,

lamivudin in poliglutaminska oblika metotreksata pa so znani BCRP substrati. Metotreksat sam je Pgp in MRP2 ne pa tudi BCRP substrat, kar pomeni, da se s pomočjo Pgp in MRP2 na metotreksat razvije rezistenca že po kratkotrajnem jemanju, medtem ko je BCRP odgovoren za rezistenco po dolgotrajnem jemanju. S pomočjo BCRP se prenašajo tudi nekateri neterapevtski ksenobiotiki. Transport substratov z BCRP prenašalcem je neodvisen od znotrajceličnih koncentracij glutathiona ali njegove oksidirane oblike. BCRP prav tako ne sodeluje pri prenosu glukuronidiranih konjugatov ali konjugatov z glutathionom, prenaša pa sulfatirane konjugate steroidov in ksenobiotikov.

Znani BCRP inhibitorji so GF120918, derivat glivičnega toksina - fumitremorgin C (fungal toxin acridone carboxamide derivate), čigar *in vivo* uporaba je zaradi njegove nevrotoksičnosti omejena. Inhibitorji so tudi estrogenski antagonisti in agonisti ter njihovi derivati in tirozin kinazni inhibitor CI1033 (26).

### 3.2.1.3 MRP2 prenašalec

MRP2 prenašalec je odgovoren za rezistenco na mnoga zdravila pri terapiji malignih tumorjev. Nahaja se na apikalni membrani hepatocitov in epitelijskih celic proksimalnega tubula v ledvicah ter v črevesju. Najdemo ga tudi v pljučih in možganih (27, 28). V podganjem črevesju se MRP2 nahaja na apikalni membrani, pri čemer njegova ekspresija narašča od kript proti koncu resic, podobno kot je to opaziti pri Pgp. V nasprotju s Pgp ter podobno kot pri CYP3A4 pa je ekspresija MRP2 največja v proksimalnih segmentih podganjega in človeškega črevesja, postopoma pa upada proti distalnemu ileumu. Skupaj z apikalno lociranim Pgp, predstavljata oba prenašalca - MRP2 in Pgp veliko oviro pri absorpciji učinkovin (18).

MRP2 omogoča prenos pravastatina, valsartana, furosemda, temokaprilata, metotreksata, irinotekana in produktov metabolizma II. faze (konjugate z glukuronsko kislino, sulfate in konjugate z glutathionom). Fiziološko MRP2 tako omogoča sekrecijo odvečnih snovi (toksinov), sulfatnih konjugatov kot tudi nekonjugiranih oblik anionskih žolčnih kislin v žolč. Pri človeku pomanjkanje MRP2 proteina povzroči Dubin-Johnsonov sindrom, ki je povezan s povišanjem koncentracije konjugiranega bilirubina in ostalih konjugiranih metabolitov v krvi (18, 29).

### **3.2.2. SLC prenašalci (družina prenašalcev za topljence/SoLute Carrier family of proteins)**

SLC družina je največja superdružina prenašalcev, ki kodira kar 225 različnih proteinov od tega jih je danes 31 znanih transporterjev. To so prenašalci, ki omogočajo transport sklopljen z ioni, lahko pa delujejo kot izmenjevalci ali prenašalci in omogočajo olajšano difuzijo. Mednje prištevamo OATP, OAT (prenašalec organskih anionov/organic anion transporter), PepT (oligopeptidni prenašalec/oligopeptide transporter), OCT (prenašalec organskih kationov/organic cation transporter), MCT prenašalce ter prenašalce za žolčne kisline in nukleozide.

#### **3.2.2.1 OATP prenašalci**

Polipeptidni prenašalci organskih anionov (OATP) predstavljajo družino polispecifičnih membranskih transporterjev. Pri ljudeh je bilo do zdaj odkritih 9 različnih skupin OATP prenašalcev, pri podganah 11 in pri miših 8. Izražajo se na bazolateralni membrani hepatocitov (izooblika Oatp4 pri podgani in izooblike OATP-C, OATP2 in OATP8 pri človeku), prisotni pa so tudi ekstrahepatično, in sicer na apikalni membrani tankega črevesja (OATP-B), proksimalnega tubula in celic hematoencefalne bariere (28). Ekstrahepatične izooblike OATP prenašalcev še niso bile dobro okarakterizirane, znano pa je, da ima OATP-B na apikalni membrani enterocitov veliko substratno specifičnost ter posreduje od pH odvisen transport/privzem estron-3-sulfata in pravastatina (28, 30). Privzem estron-3-sulfata je bil pri pH 5,5 več kot dvakrat višji kot pri pH 7,4, kar je dokaz, da OATP-B izraža pH-odvisno aktivnost (30).

OATP prenašalci posredujejo od natrija neodvisni transmembranski transport številnih amfifilnih, nevtralnih in celo tudi kationskih organskih snovi (31):

- organski anioni (bromosulfoftalein, žolčne soli, bilirubin, bilirubin glukuronidi, konjugati estrona)
- nevtralni steroidi (digoksin)
- konjugati steroidov

- lipofilni organski kationi
- organska barvila
- tiroidni hormoni
- anionski oligopeptidi
- številna zdravila in drugi ksenobiotiki (28)

Apikalna lokalizacija OATP prenašalcev v črevesju omogoča absorpcijo učinkovin ter tudi prenos nekaterih učinkovin v jetra, kar je zlasti pomembno za statine, saj tako le-ti v jetrih dosegajo visoke znotrajcelične koncentracije in izražajo ustrezne terapevtske lastnosti na mestu delovanja (28).

#### Inhibitorji OATP:

Nekatere monokarboksilne kisline (pravastatin, benzojska kislina, nikotinska kislina) in dikarboksilna kislina (fitalna kislina) so signifikantno zmanjšale privzem estron-3-sulfata z OATP-B, medtem ko druge monokarboksilne kisline (ocetna kislina, mlečna kislina), dikarboksilne (oksalna kislina) in trikarboksilne kisline (citronska kislina) niso imele inhibitornega učinka. Potentni splošni inhibitor izmenjave anionov DIDS (4,4-diizotiocianostilben-2,2-disulfonska kislina), je prav tako zmanjšal privzem estron-3-sulfata z OATP-B (30).

#### 3.2.2.2 MCT prenašalci

MCT prenašalci so membranski transportni peptidi, ki omogočajo od pH odvisno olajšano difuzijo anionov sklopljeno s protonom, pri čemer ni potrebna ATP hidroliza (32). Endogena funkcija MCT prenašalcev je prenos številnih monokarboksilatov (piruvat, L-laktat,  $\beta$ -acetoacetat, butirat) v in/ali izven celic, kar igra pomembno vlogo pri celičnem metabolizmu v skeletnih mišicah, srcu, možganih in eritrocitih (31). Monokarboksilne kisline predstavljajo vir energije za vse celice v telesu. Izmed teh snovi je laktat kot končni produkt glikolize zelo pomemben, saj njegova povišana intracelularna akumulacija pomeni inhibicijo glikolize. V možganih in skeletnih mišicah se laktat lahko oksidira, kar daje gorivo za celično dihanje. Zato je transport laktata in drugih monokarboksilnih kislin v in izven celic nujen za ohranjanje ustrezne celične funkcije (32).

Znanih je 14 izooblik MCT prenašalcev, vendar vsi niso funkcionalni in tudi prenos monoanionov pri vseh ni sklopljen s prenosom protona. Sedem izooblik je znanih pod imenom MCT1-4, 6, 8, 10 ostalih sedem skupin MCT5, 7, 9, 11-14 pa kot prenašalci sirote (»orphan transporters«), ki imajo nepoznano fiziološko funkcijo (32).

MCT prenašalci se izražajo v številnih tkivih (jetra, ledvica, črevo, srce, eritrociti, možgani). Zaradi take lokalizacije lahko pomembno vplivajo na številne procese, ki odločilno vplivajo na farmakokinetiko in distribucijo učinkovin: nesterodini antirevmatiki, salicilna, nikotinska in benzojska kislina, ter na vse učinkovine, ki so monovalentne šibke kisline z majhno karboksilno skupino v stranski verigi. Inhibicija ledvične reabsorpcije z MCT prenašalci pomeni povečan ledvični očistek učinkovin in tako zmanjšano izpostavljenost pacienta zdravlilu. Prav tako inhibicija črevesne absorpcije z MCT prenašalci lahko posledično zmanjša biološko uporabnost zdravila (32).

Klasični MCT inhibitorji so CHC (ciano-4-hidroksicinamat/cimetna kislina), floretin (phloretin) in pCMB (para kloromerkuribenzoat) (32).

Pri človeku ekspresija MCT1 izooblike vzdolž gastrointestinalnega trakta narašča pri čemer se MCT1 nahaja apikalno, medtem ko sta izoobliki MCT4 in 5 locirani bazolateralno. MCT prenašalci, izraženi v človeškem črevesju, izkazujejo kar 95% enako aminokislinsko zaporedje kot ga najdemo v MCT prenašalcih izraženih v podganjem črevesju. Pri Caco-2 celicah pa se izražajo MCT1, 2, 3, 4, 5 in 6 proteini, ki pa niso podobni človeškim MCT izooblikam (32).

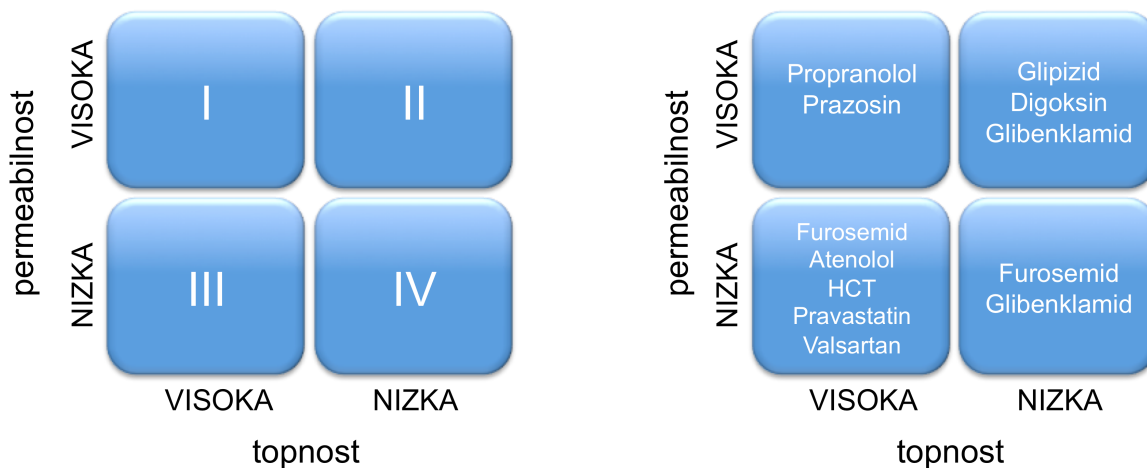
### 3.3 BCS klasifikacija zdravil (Biopharmaceutics drug Classification System)

Peroralna aplikacija je najpogostejši način dostave učinkovin v organizem. Pomembna lastnost tako aplicirane učinkovine je njena biološka uporabnost, ki je definirana kot obseg in hitrost prehoda učinkovine iz mesta aplikacije v centralni krvni obtok. Hitrost in obseg absorpcije sta pomembna farmakokinetična parametra, odvisna od vodotopnosti in gastrointestinalne permeabilnosti peroralno aplicirane učinkovine. Zaželeno je, da je obseg absorpcije čim višji, medtem ko je hitrost absorpcije lahko modificirana, kar dosežemo z ustrezno sestavo in izdelavo farmacevtskih oblik. Na biološko uporabnost vpliva tudi predsistemski metabolizem v lumnu in steni gastrointestinalnega trakta ter v jetrih pri prvem prehodu učinkovine skozi portalni krvni obtok (33).

BCS klasifikacija zdravil je orodje, ki se uporablja pri odkrivanju in razvoju učinkovin za oceno prispevkov treh glavnih faktorjev - topnosti, raztapljanja in intestinalne permeabilnosti k per os absorpciji iz farmacevtskih oblik s takojšnjim sproščanjem (34). BSC sistem na podlagi vodotopnosti in permeabilnosti učinkovin le-te razvršča v 4 razrede (I – IV) (Shema 4) (35). Glavna težava uvrščanja učinkovin v BCS klasifikacijo je določanje njihove permeabilnosti na ljudeh, saj intestinalno permeabilnost težko merimo rutinsko (36). Da učinkovino lahko uvrstimo v BCS sistem pa moramo poznati njeno topnost, dozo in permeabilnost kar je velikokrat, zaradi pomanjkanja prosto dostopnih in natančnih podatkov o topnosti in permeabilnosti učinkovin pri človeku, težavno.

V izogib dolgotrajnim, dragim in etično vprašljivim bioekvivalenčnim študijam na ljudeh, lahko za uvrstitev nekaterih učinkovin v BCS sistem raje uporabimo *in vitro* teste raztapljanja (37). *In vivo* permeabilnost lahko predvidimo z uporabo predkliničnih permeabilnostnih modelov. To so lahko *in vivo*, *in situ* ali *in vitro* perfuzijske študije na živalih, *in vitro* permeabilnostne študije na izoliranem delu črevesja (človeškem ali živalskem; (perfundirana čreva živali)) ali *in vitro* permeabilnostne študije na epitelni celičnih kulturah (Caco-2 celice, PAMPA sistem (parallel artificial membrane permeability assay - umetne membrane za preučevanje pasivne permeabilnosti) (33, 38). *In vitro* metode so primerne za klasifikacijo učinkovin, ki se pasivno absorbirajo. O pasivnem transportu govorimo kadar ima učinkovina linearno farmakokinetiko med odmerkom in biološko

uporabnostjo pri človeku (34). Posebno previdni pa moramo biti pri učinkovinah, ki se prenašajo aktivno (39).



Shema 4: BCS klasifikacija

### 3.3.1 Permeabilnostni parametri

Permeabilnost je lastnost membrane, da omogoča prehod topljenca s pasivno difuzijo in aktivnim transportom. Difuzija topljenca preko membrane je odvisna od strukture membrane, fizikalno kemijskih lastnosti topljenca in interakcij topljenca s topilom (34).

BCS razvršča spojine le v visoko ali nizko permeabilnostni razred. Pri tem pa velja, da so visoko permeabilne vse tiste spojine, katerih  $F_{abs}$  presega vrednost 90%. Vse ostale učinkovine, ki ne zadostijo omenjenemu kriteriju, so uvrščene med nizko permeabilne. Zadnja leta pa drugi avtorji (Polli JE, et al) predlagajo tudi vpeljavo dodatnega permeabilnostnega razreda, in sicer srednje permeabilnostni razred spojin, katerih  $F_{abs}$  znaša med 40% in 85%. Razvrstitev učinkovin v tri permeabilnostne razrede bi tako pripomogla tudi k boljši oceni primernosti posamezne metode za določevanje permeabilnosti ter vpeljala nova dva razreda v BCS, kar bi lahko imelo vpliv za nadaljnji razvoj formulacij.

Substance lahko uvrstimo kot visoko oz. nizko permeabilne le s primerjavo njihovih  $P_{app}$  (navidezni permeabilnostni koeficient) vrednosti s  $P_{app}$  vrednostmi, izmerjenimi na istem

modelu za nizko in visoko permeabilne standarde. FDA kot visoko permeabilne substance predlaga: antipirin, kofein, karbamazepin, fluvastatin, metoprolol, naproksen, propranolol, teofilin, verapamil, medtem ko so predlagani standardi za nizko permeabilne substance: amoksicilin, atenolol, furosemid, manitol,  $\alpha$ -metildopa, polietilenglikol (400, 1000, 4000), ranitidin in klortiazid (33).

Za določevanje efektivne intestinalne permeabilnosti ( $P_{\text{eff}}$ ) zdravil in hranil *in vivo* pri ljudeh se lahko poslužujemo različnih "single-pass" perfuzijskih tehnik, ki temeljijo na preračunavanju hitrosti izginjanja substance iz perfundiranega črevesnega segmenta. Izračun  $P_{\text{eff}}$  je odvisen od hidrodinamike znotraj segmenta, ki ga določa perfuzijska tehnika, hitrosti perfuzije in stopnje intestinalne motilitete. Intestinalni  $P_{\text{eff}}$  predstavlja direktno meritev lokalne hitrosti absorpcije pri človeku in odraža hitrost transporta preko epiteljske bariere.  $P_{\text{eff}}$  za snovi, ki se transportirajo pasivno transcelularno, najverjetneje odraža difuzijo preko kompleksne apikalne membrane v citosol enterocita. Apikalna membrana je kompleksna in najverjetneje predstavlja glavno bariero pri *in vivo* pogojih (39).

### 3.3.2 Caco-2 celice

Caco-2 celice so rakaste celice adenokarcinoma človeškega izvora, ki v *in vitro* pogojih tekom 21 dnevnega gojenja tvorijo polariziran monosloj (t.j. imajo apikalno in bazolateralno površino) diferenciranih celic s tesnimi stiki in z visokimi TEER (transepiteljska upornost) vrednostmi. To so celice, ki navkljub svojemu izvoru tvorijo enterocitom podobne celice z nekaterimi encimi I. faze (določene esteraze, ne vsebujejo pa CYP3A), II. faze (glutation-S-transferaze, sulfotransferaze) ter membranskimi prenašalci (Pgp, MRP, BCRP, MCT, transporterji za glukozo, aminokisline, peptide, žolčne soli, organske in anorganske anione) (40).

Caco-2 celični monosloj predstavlja uporaben model pri »High-through-put« študijah določevanja permeabilnosti in transporta spojin, zlasti za identifikacijo tiste spojine vodnice oz. oblike predzdravila z najvišjo permeabilnostjo, ki bi izkazovala tudi najvišjo biološko uporabnost. Prav tako se lahko omenjene celice uporabljajo za preučevanja vpliva pospeševalcev absorpcije na permeabilnost nizko permeabilnih snovi in za preučevanje interakcij med učinkovinami oz. učinkovinami in hrano ali pomožnimi snovmi na nivoju

sekretornih prenašalcev (Pgp, MRP). Uporabljajo se pri preučevanju odnosa raztapljanje – absorpcija ter pri testih citotoksičnosti učinkovin, dostavnih sistemov in pomožnih snovi.

Caco-2 celice oblikujejo tesen monosloj, kar se odraža z visokimi TEER vrednostmi. To pomeni, da lahko z uporabo Caco-2 celic preučujemo tudi citotoksično delovanje nekaterih spojin, saj se ob njihovi prisotnosti zaradi celične poškodbe TEER vrednosti signifikantno znižajo, permeabilnost paracelularnih markerjev pa signifikantno poveča. Uporaba omenjenega celičnega modela pri določevanju permeabilnosti testiranih spojin pa ima tudi slabe lastnosti, saj moramo pri poizkusih zaradi nemešajočega vodnega sloja zagotoviti ustrezno mešanje testnih raztopin. Nemešajoč vodni sloj je lahko omejujoči korak pri transportu snovi, ki se hitro absorbirajo. Še posebno je to pomembno pri lipofilnih snoveh. Upoštevati pa moramo tudi nespecifično vezavo preučevane spojine na plastiko in membrano celic, kar lahko vodi v izgubo snovi. Prav tako je ekspresija nekaterih prenašalcev (PepT1, OCT, OAT, BCRP) nižja kot *in vivo*, medtem ko je ekspresija drugih zaradi rezistence in rakastega izvora višja (Pgp) kot fiziološko *in vivo* pri človeku. Zaradi različne ekspresije prenašalcev, visokih upornosti in statičnosti (samo en tip celic, ki ne izločajo mukusa) opisanega celičnega modela, so lahko permeabilnosti določene na teh celicah podcenjene. Te celice so primerne za določanje permeabilnosti tistih učinkovin, ki prehajajo apikalno membrano predvsem transcelularno ter za preverjanje, ali je testirana učinkovina substrat za prenašalec, ki ga te celice izražajo (41).

### 3.3.3 Podganje črevo

Kadar želimo podatke pridobljene na živalskem modelu ekstrapolirati na človeka, se moramo zavedati medvrstnih razlik. Anatomija in fiziologija prebavne cevi se med živalskimi vrstami in človekom razlikujeta. Največkrat se pri študijah avtorji poslužujejo podgan, katerih površina intestinalnega trakta ni primerljiva s površino pri človeku. Z različnimi metodami so ugotovili, da večino podganjega črevesja predstavlja tanko črevo z 90% jejunuma, medtem ko pri človeku jejunum predstavlja le 38% tankega črevesja. Cekum podgane je glavno mesto bakterijske razgradnje in predstavlja kar 26% debelega črevesja, pri človeku pa le 5%. Podgane za razliko od človeka nimajo sigmoidnega kolona, njihova absorpcijska površina tankega črevesja pa je 200x manjša kot pri človeku (42).

Za nagubanost prebavnega trakta pri človeku so odgovorne sluznične gube, resice in mikroresice (ščetkasti obrobek/brush border). Prvih podgane nimajo, medtem ko pri človeku povečajo površino za 3x. Resice povečajo površino pri človeku 10x in 5x pri podgani, mikroresice pa pri obeh 20x.

Spodnja tabela prikazuje primerjavo absolutnih površin posameznih GIT segmentov pri človeku in podgani. Ker podatkov ne moremo neposredno primerjati, so v preglednici navedene tudi relativne vrednosti. To so površine posameznega segmenta normirane na telesno površino. Ugotovimo lahko, da ima tanko črevo 4x večjo površino pri človeku kot pri podgani.

Z uporabo podganjega črevesja na Ussingovih celicah lahko določamo transcelularni ter paracelularni transport snovi v kombinaciji z intestinalnim metabolizmom, če poznamo ustrezne faktorje skaliranja. Prav tako lahko ocenjujemo vlogo prenašalcev pri intestinalni absorpciji ali efluksu učinkovin ter določanje *in vitro* – *in vivo* korelacije. Slabost te metode je možna nespecifična vezava preučevanih snovi na membrano ali plastiko, ki se lahko pojavi predvsem pri lipofilnih snoveh (41).

Tabela 1: Primerjava absolutnih površin posameznih GIT segmentov pri človeku in podgani (19).

| segmenti     | človek                   |                          | podgana                  |                          |
|--------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|
|              | Abs. P (m <sup>2</sup> ) | Rel. P (m <sup>2</sup> ) | Abs. P (m <sup>2</sup> ) | Rel. P (m <sup>2</sup> ) |
| telo         | 1,8                      | 1                        | 0,04                     | 1                        |
| želodec      | 0,053                    | 0,029                    | 0,00062                  | 0,016                    |
| tanko črevo  | 200                      | 111                      | 1                        | 25                       |
| debelo črevo | 0,35                     | 0,19                     | 0,034                    | 0,85                     |

**Tabela 2: Pregled lastnosti preiskovanih učinkovin**

| <b>učinkovina</b>        | <b>ATC klasifikacija</b>                                                   | <b>hidro-<br/>/lipofilnost</b> | <b>absorpcija</b>                    | <b>B.U.</b> | <b>metabolizem</b>                                    | <b>prenašalci</b>                                                                                                         | <b>BCS</b>   | <b>logP</b> |
|--------------------------|----------------------------------------------------------------------------|--------------------------------|--------------------------------------|-------------|-------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------|-------------|
| <b>ATENOLOL</b>          | C07AB – selektivni zaviralci adrenergičnih receptorjev $\beta_1$           | hidrofilnen (44)               | hitra, nepopolna (44,45)<br>50% (46) | 50-60% (44) | 10% v jetrih (44)                                     | ni Pgp substrat (24)                                                                                                      | III (55, 56) | 0,16 (100)  |
| <b>DIGOKSIN</b>          | C01AA – digitalisovi glikozidi                                             | slabo topen v vodi (47)        | 88% (57)                             | 70% (47)    | ne s CYP (49)<br>15 % metabolizem v jetrih (50)       | Pgp substrat (49)<br>»up-regulacija« Pgp z digoksinom v Caco-2 (51);<br>OATP4C1 (52)                                      | II (55)      | 1,51 (101)  |
| <b>FINASTERID</b>        | G04CB - zaviralci testosteron-5-alfa reduktaze                             | slabo topen v vodi (53)        | hitra, skoraj popolna (95%) (54)     | 80% (54)    | v jetrih (oksidacija) (54)                            |                                                                                                                           |              | 30,3 (53)   |
| <b>FUROSEMID</b>         | C03CA- sulfonamidi; diuretiki vhodnega kraka Henlejeve zanke               | lipidotopen (61)               | variabilna 61% (57)                  | 60-70% (29) | v jetrih CYP2E1, 2C11, 3A1/2 (62)                     | MRP2 (27),<br>MRP4 in BCRP substrat (63)                                                                                  | IV (55, 56)  | 0,47 (102)  |
| <b>GLIBENKLAMID</b>      | A10BB - sulfonamidni antidiabetiki, derivati sečnine                       | slabo topen v vodi (64)        | hitro in v celoti iz GIT (65)        | 100% (65)   | v jetrih - oksidativna pot s citokrom P450 sist. (66) | Pgp substrat in inhibitor (splošen inhibitor ABC prenašalcev) (22)<br>nekompet. inhibitor PEPT1 in PEPT2 prenašalcev (67) | II/IV (56)   | 1,65 (103)  |
| <b>GLIPIZID</b>          | A10BB - sulfonamidni antidiabetiki, derivati sečnine                       | dobra lipidotopnost (68)       | skoraj popolna iz GIT (68)           |             | obsežen; citokrom P450 v jetrih (CYP2C9) (69)         |                                                                                                                           | II (55)      | 2,31 (104)  |
| <b>HIDROKLORO-TIAZID</b> | C03EA – diuretiki dilucijskega segmenta; diuretiki, ki varčujejo s kalijem | netopen v vodi (70)            | 70% iz GIT (71)                      | slaba       | v majhnem obsegu                                      | MRP4, BCRP, OAT1 in/ali OAT3 substrat (63)                                                                                | III (55, 56) | -0,03 (105) |

| učinkovina          | ATC klasifikacija                                                  | kemizem                                        | absorpcija                         | B.U.             | metabolizem                                                 | prenašalci                                                                                                        | BCS      | logP        |
|---------------------|--------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------|------------------------------------|------------------|-------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------|-------------|
| <b>LOSARTAN</b>     | C09CA – antagonisti angiotenzina II na AT <sub>1</sub> receptorjih | hidrofilen (72)                                | slaba iz GIT (72)                  | 32% (73)         | v jetrih s CYP3A4 in CYP2C9 (EXP 3174 ) (73, 74)            | Pgp substrat (40)                                                                                                 |          | 1,3 (106)   |
| <b>PRAVASTATIN</b>  | C10AA – zaviralci reduktaze HMG CoA                                | hidrofilen (75)                                | 30% iz GIT (30)                    | 18% (75, 76)     | v želodcu (77) tudi s CYP3A (75, 76)                        | lahko tudi Pgp substrat (78) ni substrat za Pgp (76) MRP2, OATP2 (76), BSEP (79), BCRP (77), OATP-C (30) substrat | III (55) | -0,23 (107) |
| <b>PRAZOSIN</b>     | C02CA – zaviralci adrenergičnih receptorjev α <sub>1</sub>         | hidrofilen (46)                                | dobra (80) 57% (46)                | 44% - 77% (81)   | v jerih (81, 80)                                            | Pgp substrat (82)                                                                                                 | I (58)   | 2,16 (108)  |
| <b>PROPRANOLOL</b>  | C07AA – neselektivni zaviralci adrenergičnih receptorjev β         | lipofilen (83)                                 | P.O. v celoti iz GIT (84) 90% (46) | 10% - 30% (84)   | v jetrih (84)                                               | lahko tudi Pgp substrat (85)                                                                                      | I (117)  | 3,21 (100)  |
| <b>ROSUVASTATIN</b> | C10AA – zaviralci reduktaze HMG CoA                                | hidrofilen (86)                                | 50% (87)                           | 20% (88, 89)     | 10% v jetrih (88, 89)                                       | OATP1B1, BCRP substrat (ne Pgp) (88)                                                                              |          | 0,42 (109)  |
| <b>SILDENAFIL</b>   | G04BE – pripravki za zdravljenje erektilne disfunkcije             | lipofilen (90)                                 | 92% (91, 92) 41% (60)              | 38%-40% (91, 92) | v jetrih; predvsem s CYP3A4 (N-desmetilsildenafil) (91, 93) |                                                                                                                   |          | 2,51 (110)  |
| <b>VALSARTAN</b>    | C09CA – antagonisti angiotenzina II na AT <sub>1</sub> receptorjih | hifrofilnen - močno topnen pri fiziol. pH (94) | hitra (94) 23 – 39% (59)           | 23-43% (94)      | v majhnem obsegu (94)                                       | OATP1B1, OATP1B3, MRP2 substrat (95)                                                                              | III (55) | -1,49 (111) |

## 4 NAMEN DELA

V diplomskem delu bomo preučevali *in vitro* vpliv etanolno-vodnega staranega česnovega ekstrakta na permeabilnost nekaterih učinkovin, ki se uporabljajo pri terapiji srčnih in sladkornih bolnikov. Permeabilnost izbranih učinkovin bomo spremljali v difuzijskih celicah Easy Mount skozi podganje črevo in Caco-2 celično kulturo, ki izvira iz humanega adenokarcinoma. Upoštevali bomo le tiste izmerjene permeabilnosti učinkovin, pri katerih bodo tkiva podganjega črevesja oz. Caco-2 celic ohranila ustrezno vitalnost in integriteto skozi celoten poizkus. Vitalnost tkiv bomo opredelili s pomočjo elektrofizioloških parametrov (povprečna upornost - TEER, padec transepitelnega potenciala/napetosti po dodatku glukoze – TEP ter porast kratkostičnega toka po dodatku glukoze pri podganjem črevesju -  $I_{sc}$ ), integriteto pa s pomočjo rezultatov permeabilnosti integritetnega markerja fluoresceina (FLU). Koncentracije učinkovin v akceptorskih raztopinah bomo kvantificirali s HPLC metodo, koncentracije FLU pa bomo ovrednotili s pomočjo merjenja fluorescence na mikrotitrskem čitalcu.

Ovrednotili bomo vpliv staranega česnovega ekstrakta za 14 učinkovin. Te učinkovine bodo naslednje: atenolol (selektivni zaviralec  $\beta_1$ -adrenergičnih receptorjev), digoksin (kardiotonični glikozid), finasterid (antagonist  $\alpha$ -adrenergičnih receptorjev), furosemid (diuretik), glibenklamid (sulfonamidni antidiabetik), glipizid (sulfonamidni antidiabetik), hidroklorotiazid (diuretik), losartan (antagonist angiotenzina II na  $AT_1$  receptorjih), pravastatin (zaviralec HMG-CoA reduktaze), prazosin (zaviralec  $\alpha_1$ -adrenergičnih receptorjev), propranolol (zaviralec  $\beta$ -adrenergičnih receptorjev), rosuvastatin (zaviralec HMG-CoA reduktaze), sildenafil (zdravilo za zdravljenje erektilne disfunkcije) in valsartan (antagonist angiotenzina II na  $AT_1$  receptorjih).

Poizkuse bomo na začetku izvedli na podganjem črevesju in sicer v treh fazah. V prvi fazi bomo spremljali permeabilnost same učinkovine, v drugi fazi pa bomo po dodatku koncentrata staranega česnovega ekstrakta preučevali vpliv česnovih fitokemikalij na absorpcijo in sekrecijo iste učinkovine. S pomočjo različnih inhibitorjev intestinalnih sekretornih ali absorptivnih prenašalcev (P-glikoprotein, BCRP, MRP2, MCT, OATP) bomo v tretji fazi ovrednotili vpliv uporabljenega prehranskega dodatka na omenjene prenašalce. V vsaki fazi bomo permeabilnost učinkovin spremljali v smeri absorpcije (M-

S) kot tudi v smeri sekrecije (S-M). Nekateri poizkusi bodo izvedeni samo z inhibitorji intestinalnih prenašalcev, saj bomo tako lahko preverili, kateri izmed njih so dejansko udeleženi pri prenosu učinkovin skozi črevesni epitelij.

V drugem sklopu bomo enako zasnovno poizkusov uporabili tudi za preučevanje vpliva staranega česnovega ekstrakta na permeabilnost le nekaterih izmed v tej diplomii navedenih učinkovin skozi Caco-2 celice, ki so substrati za membranske prenašalce. Prav tako bomo lahko iz rezultatov po dodatku česna oz. specifičnih inhibitorjev prenašalcev opredelili spremembe permeabilnosti posameznih učinkovin v smeri absorpcije (AP-BL) in smeri sekrecije (BL-AP). Ugotovitve bomo primerjali z rezultati analiz izvedenimi na podganjem črevesju ter opredelili razlike in podobnosti med uporabljenima modeloma ter nakazali, kateri izmed modelov je primernejši za spremljanje morebitnih *in vitro* interakcij med testiranim česnovim prehranskim dodatkom in izbranimi učinkovinami.

## 5 MATERIALI IN METODE

### 5.1 Reagenti

- atenolol
- digoksin
- finasterid
- furosemid
- glibenklamid
- glipizid
- hidroklorotiazid
- losartan
- pravastatin
- prazosin
- propranolol
- rosuvastatin
- sildenafil
- valsartan
- verapamil
- benzbromaron
- dinatrijeva sol fluoresceina
- glukoza
- manitol
- agar-agar v prahu
- natrijev hidrojenkarbonat
- natrijev hidrojenfosfat monohidrat
- natrijev klorid
- kalijev klorid
- kalcijev klorid dihidrat
- magnezijev klorid heksahidrat
- dinatrijev hidrojenfosfat dihidrat
- 1 M NaOH
- ciano-4-hidroksicinamat
- 4,4-diizotiocianostilben-2,2-disulfonska kislina

## 5.2 Raztopine

- **Ringerjev pufer, pH=7,4:** Reagenti: 4,2 g  $\text{NaHCO}_3$ , 0,11 g  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ , 13,082 g  $\text{NaCl}$ , 0,746 g  $\text{KCl}$ , 0,352 g  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ , 0,488 g  $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ , 0,569 g  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ . 2-litrsko bučo napolnimo z ohlajeno bidestilirano vodo do 80% volumna in nato postopoma po predpisanem zaporedju dodajamo navedene soli tako, da naslednjo dodamo šele, ko se je predhodna popolnoma raztopila. Po dodatku zadnje soli prepihamo s karbogenom (95%  $\text{O}_2$ , 5%  $\text{CO}_2$ ), s čimer v raztopino uvedemo  $\text{CO}_2$ , znižamo pH ter omogočimo raztapljanje dinatrijevega hidrogen fosfata.
- **Ringerjev pufer, pH=6,5:** Reagenti: 0,21 g  $\text{NaHCO}_3$ , 0,966 g  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ , 15,781 g  $\text{NaCl}$ , 0,746 g  $\text{KCl}$ , 0,352 g  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ , 0,488 g  $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ , 0,285 g  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ . 2-litrsko bučo napolnimo z ohlajeno bidestilirano vodo do 80% volumna in nato postopoma po predpisanem zaporedju dodajamo navedene soli tako, da naslednjo dodamo šele, ko se je predhodna popolnoma raztopila. Nato z 1M  $\text{NaOH}$  umerimo pH na 6,95 in prepihamo s karbogenom (95%  $\text{O}_2$ , 5%  $\text{CO}_2$ ), da znižamo pH na 6,5.
- **0,625 mM raztopina dinatrijeve soli fluoresceina:** 11,6 mg natehte raztopimo v 50 mL bidestilirane vode.
- **625 mM glukoza:** 2,815 g glukoze raztopimo v 25 mL bidestilirane vode.
- **625 mM manitol:** 2,850 g manitola raztopimo v 25 mL bidestilirane vode.
- **10 mM glukoza/manitol v Ringerjevem pufu:** 1600  $\mu\text{L}$  625 mM raztopine glukoze/manitola redčimo v 100 mL bučki z Ringerjevim pufrom.
- **3 M raztopina KCl:** 55,9 g  $\text{KCl}$  raztopimo v 250 mL bidestilirane vode.
- **3-4% raztopina agarja v 3M KCl:** Na vodni kopeli v čaši segrejemo 100 mL  $\text{KCl}$  in med mešanjem dodamo 3,5 g agarja. Mešamo toliko časa, da nastane gel, ki ne sme vsebovati zračnih mehurčkov.

### 5.3 Aparature

- Easy mount difuzijske celice z napetostnimi in tokovnimi elektrodami ter s 6 ali 8 kanalnim potenciometrom z možnostjo vpenjanja napetosti ter toka (Multichannel voltage-current clamp (VCC MC6 in VCC MC8), Physiologic Instruments, Inc.)
- termostatirana vodna kopel M3 LAUDA
- digitalni termometer DT02, Dalmacija
- tehtnica: Mettler toledo AB54-S
- tehtnica Mettler H54AR
- pH meter Iskra-MA 5750
- HPLC sistem
- mikrotitrski čitalec: Tecan GENios s pripadajočima filtroma

### 5.4 Metode

Pri eksperimentalnem delu smo uporabili difuzijske celice, ki so sestavljene iz dveh komor volumna 2,5 mL (za podganje črevo) ali 3 mL (za rakave celice). Vsaka izmed parov celic ima odprtine za dva para elektrod za merjenje toka in napetosti, in nastavek za tkivo, katerega izpostavljena površina znaša 1 cm<sup>2</sup> ali nastavek s polikarbonatno membrano za rakave celice površine 1,13 cm<sup>2</sup>. Uporabljali smo set z osmimi in šestimi celicami, pri čemer smo morali natančno regulirati temperaturo hranilnega medija z markerji in učinkovino na izbrani strani tkiva (mukozna ali serozna) med 36 in 37<sup>0</sup>C ter dovajati ustrezno mešanico kisika in ogljikovega dioksida (95:5) za oksigenacijo tkiva in zagotavljanja mešanja.

#### 5.4.1 Priprava elektrod za merjenje električnih parametrov

Elektrode smo pripravili dan pred preizkusom. Elektrolitski ključ je bil narejen iz modificiranega nastavka za 100 µL pipeto z odrezano konico. Pripravili smo 3 M raztopino KCl v bidestilirani vodi in v vročo počasi vmešali agar med konstantnim mešanjem. Pustili smo, da se je agar ohladil in primerno zgostil. S to maso smo do 110 µL napolnili pipete, jih pustili v raztopini KCl in zatesnili s parafilmom. Če so v elektrodah bili prisotni zračni

mehurčki, če je prišlo do rumenega obarvanja agarja ali je ta razpadal, smo morali elektrode zamenjati. Do poizkusa smo hranili elektrode v hladilniku tako, da so bile konice ves čas potopljene v raztopino KCl. Pripravljene elektrode smo testirali 3 ure, kolikor časa je trajal poizkus. Pri tem je morala biti asimetrija nižja od 10 mV in konstantna. Sprejemljivo je bilo, če se v tem času simetrija ni spremenila za več kot 1 mV. Električne meritve izvajamo s šest ali osem kanalnim potenciometrom z možnostjo vpenjanja napetosti ter toka (Multichannel voltage-current clamp).

#### 5.4.2 Priprava tkiva

Eksperimente na podganjem črevesju smo izvajali v skladu z zakonom za varovanje živali. Podganje tanko črevo je bilo pridobljeno iz podganjih samcev (250-320g), ki so predhodno bili stradani 18 ur. Po evtanaziji in laparotomiji je bilo črevo prenešeno v ledeno hladno Ringerjevo raztopino z 10 mM glukozo. Glede na ekspresijo transporterjev, ki smo jih preučevali, smo nato uporabili ustrezen del črevesja. Duodenum se nahaja 15 cm proksimalno od piloričnega sfinktra, jejunum 25-60 cm distalno od piloričnega sfinktra in ileum do 20 cm proksimalno od ileocekalne regije. Črevesno tkivo smo narezali na 3 cm dolge segmente in izključili tiste z vidnimi Peyerjevimi ploščami. Segmente smo prerezali po mezenterični meji in napeli na inserte, tako da je znašala izpostavljena površina 1 cm<sup>2</sup>. Inserte smo nato vstavili med dve EasyMount difuzijski celici (EasyMount side-by-side diffusion chambers; Physiologic Instruments, San Diego, USA). Eksperimente smo izvedli v dveh ali treh fazah. Permeabilnost smo spremljali v eni ali obeh smereh, t.j.: M-S (mukozno-serozno) in/ali S-M (serozno-mukozno).

#### 5.4.3 Priprava Caco-2 celic

Caco-2 celice smo pridobili iz American Tissue Culture Collection (ATCC) HTB.37, lot 2463681. Celice so rasle na Transwell ali Snapwell Costar insertih s polikarbonatno membrano (premer 12 mm in velikost por 0,4 µm). Za sajenje smo uporabili 100.000 celic na filter. Medij smo zamenjali vsake 2 dni. 15. dan smo merili transepitelijsko upornost (TEER) za vsak filter s Caco-2 celicami. Če so bile vrednosti TEER v območju 450 – 750 Ωcm<sup>2</sup>, smo Caco-2 celice 21. dan uporabili za testiranja.

Inserte s Caco-2 celicami smo nato previdno sprali z Ringerjevim pufrom pH 7,4 in vstavili med dve EasyMount difuzijski celici. Temperaturo inkubacijskega medija smo uravnavali med 36 in 37°C in prepihovali s karbogenom.

#### 5.4.4 Priprava difuzijskih celic in aparata za merjenje električnih parametrov

1. Vse potenciale na aparaturi na začetku nastavimo na 0,0.
2. Celice s praznimi nastavki za tkivo ali membrane s Caco-2 celicami, pritrdimo na stojala za celice.
3. Vključimo vodno kopel in aparaturu ter počakamo 10 min, da se segreje na 37°C.
4. Elektrode speremo s prečiščeno vodo in jih vstavimo v celice. Napetostne (črne) namestimo v odprtine bližje insertom, tokovne (bele) pa v odprtine, ki so bolj oddaljene od insertov. Izhoda za elektrode na upravljalcu I-1 in V-1 morata biti na levi strani insertov, I-2 in V-2 pa na desni, če delamo z VVC MC6 aparaturu. Pri VVC MC8 so desne elektrode označene z obročki.
5. Celice napolnimo z Ringerjevim ali ustreznim modificiranim pufrom (2-3 mL v vsako polovico celice).
6. Priključimo dotok karbogena (95% O<sub>2</sub> in 5% CO<sub>2</sub>).
7. Upravljalce, na katerih so izhodi za elektrode, nastavimo na OPERATE.
8. Nastavimo FUNCTION na OPEN (zelena lučka) in METER na VOLTAGE (zelena lučka). Izmerjena napetost je posledica asimetrije med elektrodama. Če je absolutna vrednost asimetrije višja od 10 mV, takšne asimetrije ni možno kompenzirati in moramo zato napetostni elektrodi zamenjati. Za kompenzacijo negativne asimetrije nastavimo OFFSET na minus (-) (zelena lučka). Z OFFSET potenciometrom naravnamo napetost na 0,0 mV.
9. METER nastavimo na CURRENT (rdeča lučka) ter pritisnemo testni gumb PUSH TO ADJUST. Tok, ki ga izmeri aparatura, mora biti stabilen, njegova vrednost pa med 60 in 68 µA. Če je tok manjši ali če pada, uporabimo novi tokovni elektrodi. Včasih je tudi že dovolj, če zamenjamo levo in desno elektrodo med seboj.
10. Upornost raztopine kompenziramo tako, da nastavimo METER na VOLTAGE in med držanjem gumba PUSH TO ADJUST s potenciometrom FLUID RES COMPENSATION nastavimo vrednost na 0,0.
11. Nastavimo FUNCTION na ZERO (ne gori nobena lučka).

12. Z injekcijsko brizgo odstranimo pufer iz celic.
13. Izvlečemo inserte za tkivo ali Caco-2 celice in nanje namestimo tkivo ali membrano s Caco-2 celicami.
14. Inserte vstavimo nazaj v celice.
15. V celice dodamo ustrezne raztopine.
16. Nastavimo FUNCTION na OPEN ter METER na VOLTAGE, da odčitamo transepitelijski potencial (TEP).
17. Nastavimo FUNCTION na CLAMP ter METER na CURRENT, da odčitamo kratkostični tok ( $I_{sc}$ ).
18. Po določenih intervalih jemljemo vzorce (250  $\mu$ L) z akceptorske strani in vračamo enak volumen 10 mM raztopine manitola v Ringerjevem pufru na mukozno/apikalno stran oz. 10 mM raztopine glukoze v Ringerjevem pufru na serozno/bazolateralno stran, ter vsakič odčitamo električne parametre.
19. Ob koncu poizkusa dodamo (samo pri podganjem črevu) 100  $\mu$ L 625 mM raztopine glukoze na mukozno stran in še 10 min spremljamo električne parametre.
20. Nastavimo FUNCTION na ZERO in iz celic s črpalko posrkamo pufer. Iz celic vzamemo elektrode in izmerimo njihovo asimetrijo, nastalo med poizkusom v Ringerjevem pufru. Elektrode nato speremo s prečiščeno vodo in shranimo v 3 M raztopini KCl v hladilniku.
21. Iz insertov odstranimo tkivo ali membrano s Caco-2 celicami. Celice očistimo v ultrazvočni kadički, jih speremo s prečiščeno vodo in posušimo na sobni temperaturi.
22. Ostanke podganjega črevesja shranimo v zmrzovalniku, membrano s Caco-2 celicami pa v 98% etanolu do odvoza bioloških odpadkov na sežig.

#### 5.4.5 Elektrofiziološki parametri

Vsaka difuzijska celica je opremljena z dvema paroma Ag/AgCl elektrod, povezanih preko modificiranih elektrolitskih ključev iz 3 M KCl/3,5% agarja za merjenje spremembe transepitelijskega potenciala(PD)/transepitelijske napetosti (TEP), kratkostičnega toka ( $I_{sc}$ ) in transepitelijske upornosti (TEU/TEER) s šest ali osem kanalnim potenciometrom z možnostjo vpenjanja napetosti ter toka (Multichannel voltage-current clamp; VCC MC6 in

VCC MC8, Physiologic instruments). Vitalnost in integriteto tkiva smo opredelili s pomočjo spremljanja teh elektrofizioloških parametrov po določenih časovnih intervalih (43).

Zaradi polarizacije membrane enterocitov se nekateri prenašalci nahajajo le na apikalni strani (prenašalci za  $\text{Na}^+$ -glukoza,  $\text{Na}^+$ -aminokisline), drugi pa na bazolateralni strani ( $\text{Na}^+$ - $\text{K}^+$ -ATPaza). To daje celicam sposobnost transporta prebitka ionov z ene strani na drugo. Apikalna stran je zaradi absorpcije kationov in/ali sekrecije anionov negativno nabita napram bazolateralni strani, zaradi česar se na apikalni strani ustvarja negativni transepitelijski potencial, ki ga s parom napetostnih elektrod izmerimo in mora biti tekom poizkusa najmanj -1,0 mV, saj le vitalna celica s produkcijo ATP-ja omogoča delovanje prenašalcev.

*Transepitelijska električna upornost* (TEU/TEER) predstavlja upornost tkiva proti pasivnemu pretoku ionov skozi pore v njem in je vsota upornosti celic in tesnih stikov. S TEU/TEER ovrednotimo vitalnost tkiva in integriteto.

*Kratkostični tok* ( $I_{sc}$ ) je tok, ki je potreben za spremembo transepitelijskega potenciala iz prvotne vrednosti na vrednost nič. Pri tem dosežemo pogoje, ko skozi epitelij ne prehajajo nobeni ioni.  $I_{sc}$  je pretežno odvisen od delovanja  $\text{Na}^+$ - $\text{K}^+$ -ATPaze. Zato nizke vrednosti  $I_{sc}$ , pomenijo tudi nizko vitalnost tkiva.  $I_{sc}$  močno poraste, če na mukozno stran dodamo substrate za SGLT1 ( $\text{Na}^+$ /glukozni kotransporter), kot je npr. glukoza. Zato smo na koncu poizkusov pri podganjem črevesju preverili vitalnost tkiva z dodatkom glukoze. Če je prišlo do porasta  $I_{sc}$ , je bil to znak dobrega delovanja  $\text{Na}^+$ - $\text{K}^+$ -ATPaze ter s tem dobre vitalnosti.

Tkivo smo opredelili kot vitalno tedaj, kadar sta bila izpolnjena vsaj dva od naslednjih pogojev:

- porast napetosti po dodatku glukoze na koncu poizkusa za vsaj 0,3 mV
- napetost med poizkusom vsaj -1,0 mV ali manj
- povprečen upor od 15. minute dalje vsaj  $20 \Omega\text{cm}^2$

V nasprotnem primeru izmerjenih  $P_{app}$  nismo upoštevali. Integriteto tkiv smo ovrednotili s permeabilnostnim koeficientom markerja fluoresceina ( $P_{app}$  FLU) in TEER. Če se je tkivo

pri izolaciji, čiščenju ali napenjanju na inserte poškodovalo, je FLU hitreje prehajal skozi tkivo, s tem pa tudi preiskovana učinkovina. TEER vrednosti pa so bile signifikantno nižje kot pri nepoškodovanih tkivih. Če so vrednosti  $P_{app}$  za FLU presegale referenčne vrednosti za tkivo primerne integritete ( $3-6 \times 10^{-6}$  cm/s), meritev nismo upoštevali (19).

Prav tako se pri vitalnih Caco-2 celicah PD,  $I_{sc}$  in TEER niso signifikantno spremenili tekom poizkusa. Caco-2 celične linije smo opredelili kot vitalne, če je bil povprečen TEER med 40. in 120. min v območju med 450 in 750  $\Omega\text{cm}^2$  in če je bil PD višji od -0,5 mV tekom poizkusa (43). Integriteto celic smo prav tako kot pri podganjem črevu ovrednotili s permeabilnostnim koeficientom fluoresceina, ki pri vitalnih in nepoškodovanih Caco-2 monoslojih ne presega meje  $1 \times 10^{-6}$  cm/s.

#### 5.4.6 Določevanje fluoresceina v vzorcih

Pri vsakem poizkusu smo sproti pripravili standardne raztopine FLU za umeritveno krivuljo v koncentracijskem območju od 0,02% do 20% od začetne donorske koncentracije FLU (10  $\mu\text{M}$  za podganje črevo, 20  $\mu\text{M}$  za Caco-2 celični monosloj). Vzorce odvzete ob posameznih časovnih intervalih in standardne raztopine volumna 50  $\mu\text{L}$  smo čim bolj enakomerno odpipetirali na mikrotitrsko ploščico in jih naalkalili s 150  $\mu\text{L}$  0,025 M NaOH. S tem smo dosegli pH višji od 10. Pri teh pH vrednostih FLU ne fluoresceira več v odvisnosti od pH. Fluorimetrično analizo FLU smo izvedli isti dan kot smo izvedli poizkus. Koncentracije FLU smo merili na fluorescentnem detektorju Tecan GENious ( $\lambda_{ex}=485$  nm,  $\lambda_{em}=535$  nm). Na osnovi umeritvene krivulje smo določili koncentracije FLU na akceptorski strani.

#### 5.4.7 Določevanje učinkovin v vzorcih

Vzorce smo običajno analizirali sproti, na dan poizkusa. Če smo jih analizirali dan ali dva kasneje, smo jih do analize zamrznili, standardne raztopine učinkovin za umeritveno krivuljo pa smo nato pripravili vsakič znova, na dan analize. Običajno smo pripravili 100  $\mu\text{M}$  koncentracijo začetne donorske raztopine učinkovine in standardne raztopine

učinkovine v koncentracijskem območju med 0,02% in 20% od začetne donorske koncentracije za umeritveno krivuljo.

Vzorce smo analizirali s tekočinskim kromatografom visoke ločljivosti - HPLC (vse komponente: binarna črpalka, well-plate sampler, termostat za kolono in diode-array UV detektor so bile Serije 1100 iz Agilent Technologies, Waldbronn, Nemčija). Koncentracije učinkovin na akceptorski strani smo izračunali na osnovi umeritvene krivulje.

Tabela 3: **HPLC parametri**: tip kolone (C), temperatura kolone (T), pretok (FR), razmerje vodna:organska faza v mobilni fazi (A:B), pH fosfatnega pufra v mobilni fazi (pH), čas retencije ( $t_r$ ) in valovna dolžina detekcije ( $\lambda_{\max}$ ).

| učinkovina       | C <sup>a</sup> | T (°C) | FR (ml/min) | A:B <sup>b</sup>                               | pH  | $t_r$ (min) | $\lambda_{\max}$ (nm) |
|------------------|----------------|--------|-------------|------------------------------------------------|-----|-------------|-----------------------|
| Atenolol         | C              | 25     | 0,7         | 83:17                                          | 7,0 | 3,2         | 225                   |
| Digoksin         | B              | 30     | 2,5         | 73:27                                          | 3,0 | 2,3         | 220                   |
| Finasterid       | A              | 35     | 1,5         | 64:36                                          | 3,0 | 2,8         | 210                   |
| Furosemid        | B              | 35     | 1,7         | 77:23                                          | 3,0 | 3,1         | 234                   |
| Glibenklamid     | B              | 50     | 3           | 70:30                                          | 3,0 | 4,1         | 230                   |
| Glipizid         | B              | 50     | 2,5         | 74:26                                          | 3,0 | 1,5         | 230                   |
| Hidroklorotiazid | C              | 25     | 0,7         | 85:15                                          | 3,0 | 3,7         | 225                   |
| Losartan         | B              | 50     | 1,6         | 74:26                                          | 7,0 | 2,5         | 254                   |
| Pravastatin      | A              | 30     | 1,6         | 73:27                                          | 3,0 | 1,9         | 237                   |
| Prazosin         | A              | 30     | 1,5         | 81,5:18,5                                      | 3,0 | 1,7         | 254                   |
| Rosuvastatin     | A              | 35     | 2           | 60:40                                          | 3,0 | 1,8         | 245                   |
| Sildenafil       | A              | 35     | 2           | 70:30 $\xrightarrow{1,8 \text{ min}}$<br>50:50 | 3,0 | 1,7         | 225                   |
| Valsartan        | B              | 30     | 2,7         | 70:30                                          | 2,8 | 2,6         | 205                   |

C<sup>a</sup>: - kolona A: Phenomenex Onyx Monolythic C18 100 x 3.0 mm

- kolona B: Phenomenex Onyx Monolythic C18 25 x 4.6 mm

- kolona C: Synergie 2.5  $\mu$  Polar RP 100A, 100 x 3.0 mm

<sup>b</sup>Organska komponenta v mobilni fazi je acetonitril v vseh primerih. S puščico in časom, ob katerem so se pogoji spremenili, je prikazan gradient pogojev.

### 5.4.8 Izračun permeabilnostnega koeficienta ( $P_{app}$ )

Pri določanju permeabilnostnega koeficienta ( $P_{app}$ ) za določeno spojino skozi tkivo, je potrebno najprej izračunati pretok ( $J$ ) te spojine skozi tkivo. Spojine, ki pasivno difundirajo skozi tkivo velja, da je  $P_{app}$  neodvisen od koncentracije te spojine na donorski strani, medtem ko je za spojine, ki aktivno prehajajo skozi tkivo,  $P_{app}$  odvisen od koncentracije te spojine na donorski strani.  $P_{app}$  izračunamo po enačbi (1):

$$P_{app} = \frac{J}{C} \quad (1)$$

$P_{app}$  ..... (navidezni) permeabilnostni koeficient [cm/s]

$J$  ..... fluks/pretok [nmol/h·cm<sup>2</sup>]

$C$  ..... začetna koncentracija spojine na donorski strani [mol/L]

Pretok je definiran kot množina snovi, ki difundira skozi 1 cm<sup>2</sup> membrane v eni uri in ga izračunamo po enačbi (2):

$$J = \frac{k_d}{A} \quad (2)$$

$k_d$  ..... konstanta difuzije [mol/h]

$A$  ..... površina tkiva, skozi katero prehaja snov [cm<sup>2</sup>]

Hitrost difuzije opisuje enačba (3):

$$\frac{dQ}{dt} = k_d (C_d - C_a) \quad (3)$$

$\frac{dQ}{dt}$  ..... hitrost difuzije [mol/h]

$C_d$  ..... koncentracija spojine na donorski strani [mol/L]

$C_a$  ..... koncentracija spojine na akceptorski strani [mol/L]

Faktor  $(C_d - C_a)$  v enačbi (3) se med poizkusom zanemarljivo malo spreminja, zato to razliko vključimo v konstanto difuzije  $k_d$  in velja:

$$\frac{dQ}{dt} = k_d' \quad (4)$$

$$\int_0^{Q(t)} dQ = k_d' \int_0^t dt \quad (5)$$

$$Q(t) = k_d' t + n \quad (6)$$

$Q(t)$ ..... množina spojine, ki je difundirala v času  $t$  [mol]

Množino spojine, ki je v času  $t$  difundirala skozi tkivo oz. membrano, izračunamo po enačbi (7):

$$Q(t) = \left( \sum_{i=1}^{N-1} V_v c_i \right) + c_t V_c \quad (7)$$

$V_v$  ... volumen vzorca [L]

$c_i$  .... koncentracija spojine na akceptorski strani v predhodnih vzorcih [mol/L]

$c_t$  .... koncentracija spojine na akceptorski strani v času  $t$ , ko vzamemo vzorec [mol/L]

$V_c$ .... volumen raztopine na akceptorski strani celice [L]

Po izračunu množine spojine v času  $t$  ( $Q(t)$ ) lahko s pomočjo linearne regresije po enačbi (6) izračunamo konstanto difuzije ( $k_d$ ). Pearsonov koeficient ( $R$ ) nam poda moč povezave. Ko je znana konstanta difuzije, lahko naprej izračunamo pretok snovi skozi tkivo ( $J$ ) po enačbi (2) in nazadnje permeabilnostni koeficient ( $P_{eff}$ ) po enačbi (1).

### 5.4.9 Statistični testi

Statistično obdelavo podatkov smo izvedli v programu Microsoft Excel s pomočjo paketa Analiza podatkov.

Obdelavo smo izvedli tako, da smo testirali hipotezo o aritmetični sredini za dva neodvisna vzorca s pomočjo Studentovega t-testa. Pri tem smo morali predhodno izvesti F-test, da smo ugotovili ali sta varianci obeh vzorcev enaki ali različni in na podlagi tega smo nato izvedli ustrezen t-test.

$$s^2 = \frac{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2}{n - 1} \quad (8)$$

$s^2$  ..... varianca

Postavimo ničelno hipotezo  $H_0$  in njej nasprotno alternativo hipotezo  $H_1$ :

$$\begin{aligned} H_0 : s_x^2 &= s_y^2 \\ H_1 : s_x^2 &\neq s_y^2 \end{aligned} \quad (9)$$

Ničelna hipoteza govori, da se varianci dveh vzorcev ne razlikujeta signifikantno, alternativna pa nasprotno, da se varianci signifikantno razlikujeta. F-test izvedemo po enačbi (10):

$$F = \frac{s_x^2}{s_y^2} \quad (10)$$

Če ugotovimo, da je  $F_{eks} < F_{tab} (p > \alpha)$ , ničelne hipoteze ne zavrnemo in privzamemo, da sta varianci obeh vzorcev enaki. Za primerjavo aritmetičnih sredin lahko uporabimo t-test za enaki varianci:

$$t = \frac{\bar{x} - \bar{y}}{s} \sqrt{\frac{mn}{m + n}} \quad (11)$$

|                 |                                                                 |
|-----------------|-----------------------------------------------------------------|
| $\bar{x}$ ..... | povprečna vrednost meritev v prvi skupini primerjalnih meritev  |
| $\bar{y}$ ..... | povprečna vrednost meritev v drugi skupini primerjalnih meritev |
| $s$ .....       | skupna standardna deviacija                                     |
| $m$ .....       | število meritev v prvi skupini primerjalnih meritev             |
| $n$ .....       | število meritev v drugi skupini primerjalnih meritev            |
| $\alpha$ .....  | stopnja tveganja                                                |
| $f$ .....       | stopnje prostosti ( $f = m + n - 2$ )                           |

Če pa ugotovimo, da je  $F_{eks} > F_{tab}$  ( $p < \alpha$ ), ničelno hipotezo zavrnilo in sprejmemo alternativno. Zato uporabimo t-test, kjer upoštevamo, da sta varianci vzorcev različni.

$$t = \frac{\bar{x} - \bar{y}}{\sqrt{\frac{s_1^2}{m} + \frac{s_2^2}{n}}} \quad (12)$$

|               |                                                           |
|---------------|-----------------------------------------------------------|
| $s_1^2$ ..... | standardna deviacija v eni skupini primerjalnih meritev   |
| $s_2^2$ ..... | standardna deviacija v drugi skupini primerjalnih meritev |

Kadar je  $t_{eks} < t_{tab}$  ( $\alpha, f$ ) in s tem  $p < \alpha$ , označimo razliko permeabilnostnih koeficientov dveh vzorcev kot nesignifikantno (NS). Če je pa  $t_{eks} > t_{tab}$  ( $\alpha, f$ ) in s tem  $p > \alpha$ , potem je razlika signifikantna (S).

## 6 REZULTATI

Prehajanje učinkovin in FLU smo spremljali *in vitro* na izoliranih segmentih podganjega črevesja in rakasti celični liniji človeškega izvora – Caco-2 s pomočjo difuzijskih celic Easy mount. FLU služi kot marker integritete tesnih stikov. Če sta se tkivo in Caco-2 celični monosloj med izolacijo, čiščenjem ali vpenjanjem poškodovali, so se poškodovale tudi celice in tesni stiki, zato so učinkovine in FLU skozenj prehajale hitreje. V takšnih primerih rezultatov pridobljenih na poškodovanih tkivih nismo uporabili pri obdelavi podatkov. Prav tako nismo upoštevali rezultatov na slabo vitalnih ali nevitalnih tkivih ali rakastih celicah.

V nadaljevanju so predstavljeni posamezni poizkusi, ki so bili izvedeni za različne učinkovine na podganjem črevesju in Caco-2 celični liniji. Za vsak poizkus so podane preglednice, ki prikazujejo elektrofiziološke parametre, permeabilnostne koeficiente ( $P_{app}$  v cm/s) v posamezni fazi poizkusa za FLU in učinkovino ter rezultate statistične obdelave podatkov.

V prvi fazi so donorske raztopine na mukozni/apikalni strani vsebovale raztopino Ringerjevega pufru pH 7,4, ustrezno koncentracijo učinkovine (največkrat 100  $\mu$ M), 10 mM manitol ter 10  $\mu$ M FLU pri podganjem črevesju in 20  $\mu$ M FLU pri Caco-2 celicah. Donorske raztopine na serozni/bazolateralni strani so vsebovale raztopino Ringerjevega pufru pH 7,4, ustrezno koncentracijo učinkovine, 10 mM glukozo ter 10  $\mu$ M FLU pri podganjem črevesju in 20  $\mu$ M FLU pri Caco-2 celicah. Na akceptorski strani pa je bila raztopina Ringerjevega pufru pH 7,4 z 10 mM manitolom na mukozni/apikalni strani oz. z 10 mM glukozo na serozni/bazolateralni strani. Le v primeru pravastatina smo pri preučevanju absorptivnih prenašalcev na mukozno stran podganjega tankega črevesja aplicirali kisel Ringerjev pufer s pH 6,5, medtem ko smo na serozni strani ohranili Ringerjev pufer pH 7,4. Z manitolom smo uravnavali osmolarnost na obeh straneh, glukozo na serozni/bazolateralni strani pa služi kot hranilo. Uporaba manitola na mukozni/apikalni ima sledečo prednost: na tej strani ni glukoze, zato jo lahko dodamo na koncu poizkusa (100  $\mu$ L 625 mM glukoze) in spremljamo  $\Delta TEP_{glu}$ , ki nam služi kot eden izmed kriterijev vitalnosti tkiva. Pri poizkusih na podganjem črevesju smo Ringerjevim raztopinam dodali še L-glutamin kot hranilno sredstvo za celice. Po določenih časovnih

intervalih smo iz akceptorskih strani jemali 250  $\mu$ L vzorce in jih nadomestili z Ringerjevim pufrom z manitolom ali glukozo.

V drugi fazi smo na mukozno/apikalno stran dodali raztopino staranega ekstrakta česna (AGE), da smo na koncu imeli 1 v/v % raztopino AGE v difuzijskih celicah in poizkus nadaljevali kot v prvi fazi. Odvzete vzorce na mukozni/apikalni strani smo nadomestili z raztopino Ringerjevega pufru z manitolom in AGE, na serozni/bazolateralni pa z isto raztopino kot v prvi fazi.

Pri trofaznem poizkusu smo v tretji fazi dodali na donorske strani specifične inhibitorje sekretornih/absorptivnih prenašalcev (MRP2, Pgp, MCT, OATP) z namenom okarakteriziranja le teh pri sekreciji/absorpciji preiskovane učinkovine. Odvzete vzorce na mukozni/apikalni strani smo nadomestili z raztopino Ringerjevega pufru z manitolom, AGE in inhibitorjem, na serozni/bazolateralni pa z raztopino Ringerjevega pufru z glukozo. V prvi fazi smo vzorce jemali vsakih 20 min, v drugi in tretji fazi pa vsakih 15 min.

Poizkuse smo izvedli na podganjem črevesju in nato za nekatere učinkovine tudi na Caco-2 celični liniji.

Pri statističnem vrednotenju rezultatov pomenijo oznake v tabelah naslednje:

- **1. faza:** primerjava S-M/BL-AP  $P_{app}$  z M-S/AP-BL  $P_{app}$  v prvi fazi na podganjem črevesju ali Caco-2 celicah ob prisotnosti same učinkovine (brez AGE in inhibitorjev prenašalcev)
- **2. faza:** primerjava S-M/BL-AP  $P_{app}$  z M-S/AP-BL  $P_{app}$  v drugi fazi na podganjem črevesju ali Caco-2 celicah po dodatku AGE ali pri nekaterih poizkusih tudi inhibitorjev prenašalcev
- **3. faza:** primerjava S-M/BL-AP  $P_{app}$  z M-S/AP-BL  $P_{app}$  v tretji fazi na podganjem črevesju ali Caco-2 celicah po dodatku inhibitorjev prenašalcev
- **M-S/AP-BL (AGE):** primerjava M-S/AP-BL  $P_{app}$  v drugi fazi (z AGE) z M-S/AP-BL v prvi fazi (brez AGE)
- **M-S (Ver/BB)/AP-BL (Ver/BB):** primerjava M-S/AP-BL  $P_{app}$  v tretji fazi (z inhibitorjem Ver ali BB) z M-S/AP-BL v drugi fazi (z AGE) ali prvi fazi (brez AGE)
- **S-M/BL-AP (AGE):** primerjava S-M/BL-AP  $P_{app}$  v drugi fazi (z AGE) z S-M/BL-AP v prvi fazi (brez AGE)

- **S-M (Ver/BB)/BL-AP (Ver/BB):** primerjava S-M/BL-AP  $P_{app}$  v tretji fazi (z inhibitorjem Ver ali BB) z S-M/BL-AP v drugi fazi (z AGE) ali prvi fazi (brez AGE)
- **NS:** nesignifikantna sprememba
- **S:** signifikantna sprememba
- $\bar{x} \pm SD$  **(1.faza):** povprečje  $\pm$  standardna deviacija  $P_{app}$  v 1. fazi pred dodatkom AGE ali inhibitorja
- $\bar{x} \pm SD$  **(2.faza):** povprečje  $\pm$  standardna deviacija  $P_{app}$  v 2. fazi po dodatku AGE ali inhibitorja
- $\bar{x} \pm SD$  **(3.faza):** povprečje  $\pm$  standardna deviacija  $P_{app}$  v 3. fazi po dodatku inhibitorja

## 6.1 Atenolol

- a) podganje črevo:
- 1. faza: raztopina s 100  $\mu$ M atenololom
  - 2. faza: dodamo 1% AGE

**Tabela 4a: Elektrofiziološki parametri,  $P_{app}$  za FLU in atenolol ter statistični rezultati pri dvofaznem poizkusu na podganjem črevesju.**

|                                             |                                     |          |          |                                  |          |          |
|---------------------------------------------|-------------------------------------|----------|----------|----------------------------------|----------|----------|
|                                             | ELEKTRIKA                           |          |          |                                  |          |          |
|                                             | S-M                                 |          |          | M-S                              |          |          |
| TEER <sub>povpr</sub> (Ω)                   | 39,61                               | 35,61    | 24,26    | 42,29                            | 56,23    |          |
| TEP <sub>kon</sub> -TEP <sub>glu</sub> (mV) | -1,90                               | -1,00    | -2,40    | -2,30                            | -3,70    |          |
| ΔTEP <sub>glu</sub> (mV)                    | -1,10                               | -0,50    | -0,60    | -0,50                            | -0,50    |          |
| ΔI <sub>sc</sub> (μA)                       | 19,50                               | 14,90    | -7,30    | 7,80                             | 7,70     |          |
|                                             | P <sub>app</sub> za FLU (cm/s)      |          |          |                                  |          |          |
|                                             | S-M                                 |          |          | M-S                              |          |          |
| 1. faza                                     | 7,95E-06                            | 1,07E-05 | 8,75E-06 | 4,64E-06                         | 8,71E-06 | 1,35E-05 |
| 2. faza                                     | 8,68E-06                            | 7,78E-06 | 5,78E-06 | 6,34E-06                         | 6,52E-06 | 3,56E-06 |
| $\bar{x} \pm SD$ (1.faza)                   | 9,1 ± 1,4 (x 10 <sup>-6</sup> )     |          |          | 9,0 ± 4,4 (x 10 <sup>-6</sup> )  |          |          |
| $\bar{x} \pm SD$ (2. faza)                  | 7,7 ± 1,5 (x 10 <sup>-6</sup> )     |          |          | 5,5 ± 1,7 (x 10 <sup>-6</sup> )  |          |          |
|                                             | P <sub>app</sub> za ATENOLOL (cm/s) |          |          |                                  |          |          |
|                                             | S-M                                 |          |          | M-S                              |          |          |
| 1. faza                                     | 4,32E-06                            | 6,58E-06 | 3,67E-06 | 2,19E-06                         | 4,61E-06 | 6,52E-06 |
| 2. faza                                     | 4,70E-06                            | 4,20E-06 | 4,99E-06 | 4,61E-06                         | 4,68E-06 | 5,51E-06 |
| $\bar{x} \pm SD$ (1.faza)                   | 4,9 ± 1,3 (x 10 <sup>-6</sup> )     |          |          | 4,4 ± 2,1 (x 10 <sup>-6</sup> )  |          |          |
| $\bar{x} \pm SD$ (2. faza)                  | 4,6 ± 0,33 (x 10 <sup>-6</sup> )    |          |          | 4,9 ± 0,50 (x 10 <sup>-6</sup> ) |          |          |
|                                             | STATISTIKA                          |          |          |                                  |          |          |
|                                             | F-test                              |          | T-test   |                                  |          |          |
| 1. faza                                     | 0,663                               |          | 0,798    |                                  | NS       |          |
| 2 .faza                                     | 0,787                               |          | 0,461    |                                  | NS       |          |
| S-M (AGE)                                   | 0,131                               |          | 0,816    |                                  | NS       |          |
| M-S (AGE)                                   | 0,102                               |          | 0,720    |                                  | NS       |          |

- b) Caco-2 celična linija:      - 1. faza: raztopina s 100  $\mu\text{M}$  atenololom  
                                              - 2. faza: dodamo 1% AGE

**Tabela 4b: Elektrofiziološki parametri,  $P_{\text{app}}$  za FLU in atenolol ter statistični rezultati pri dvofaznem poizkusu na Caco-2 celicah.**

|                                    | POVPREČEN UPOR                                        |          |          |
|------------------------------------|-------------------------------------------------------|----------|----------|
|                                    |                                                       | AP-BL    |          |
| TEER <sub>povpr</sub> ( $\Omega$ ) | 466,35                                                | 509,27   | 430,22   |
|                                    | <b><math>P_{\text{app}}</math> za FLU (cm/s)</b>      |          |          |
|                                    | AP-BL                                                 |          |          |
| 1. faza                            | 1,20E-07                                              | 9,79E-08 | 7,86E-08 |
| 2. faza                            | 1,14E-07                                              | 9,14E-08 | 1,18E-07 |
| $\bar{x} \pm \text{SD}$ (1.faza)   | $0,10 \pm 0,021 (x 10^{-6})$                          |          |          |
| $\bar{x} \pm \text{SD}$ (2. faza)  | $0,11 \pm 0,014 (x 10^{-6})$                          |          |          |
|                                    | <b><math>P_{\text{app}}</math> za ATENOLOL (cm/s)</b> |          |          |
|                                    | AP-BL                                                 |          |          |
| 1. faza                            | 6,81E-07                                              | 5,36E-07 | 3,70E-07 |
| 2. faza                            | 8,65E-07                                              | 9,95E-07 | 8,89E-07 |
| $\bar{x} \pm \text{SD}$ (1.faza)   | $0,51 \pm 0,12 (x 10^{-6})$                           |          |          |
| $\bar{x} \pm \text{SD}$ (2. faza)  | $0,92 \pm 0,057 (x 10^{-6})$                          |          |          |
|                                    | <b>STATISTIKA</b>                                     |          |          |
|                                    | F-test                                                | T-test   |          |
| AP-BL (AGE)                        | 0,329                                                 | 0,017    | S        |

## 6.2 Digoksin

- a) podganje črevo:                      - 1. faza: raztopina s 100  $\mu\text{M}$  digoksinom  
                                                      - 2. faza: dodamo 1% AGE  
                                                      - 3. faza: dodamo 200  $\mu\text{M}$  verapamila

**Tabela 5a: Elektrofiziološki parametri,  $P_{\text{app}}$  za FLU in digoksin ter statistični rezultati pri trofaznem poizkusu na podganjem črevesju.**

|                                             | ELEKTRIKA                           |          |          |                                 |          |          |
|---------------------------------------------|-------------------------------------|----------|----------|---------------------------------|----------|----------|
|                                             | S-M                                 |          |          | M-S                             |          |          |
| TEER <sub>povpr</sub> (Ω)                   | 27,53                               | 22,36    | 42,65    | 28,82                           | 26,67    | 26,66    |
| TEP <sub>kon</sub> -TEP <sub>glu</sub> (mV) | -2,50                               | -2,20    | -2,30    | -1,4                            | -1,60    | -1,80    |
| ΔTEP <sub>glu</sub> (mV)                    | -1,00                               | -0,80    | -0,90    | -0,2                            | -0,40    | -0,90    |
| ΔI <sub>sc</sub> (μA)                       | 21,60                               | 21,20    | 1,70     | -1,8                            | 10,20    | 25,90    |
|                                             | P <sub>app</sub> za FLU (cm/s)      |          |          |                                 |          |          |
|                                             | S-M                                 |          |          | M-S                             |          |          |
| 1. faza                                     | 6,42E-06                            | 8,85E-06 | 6,70E-06 | 1,37E-05                        | 1,11E-05 | 6,29E-06 |
| 2. faza                                     | 8,37E-06                            | 5,60E-06 | 5,03E-06 | 1,46E-05                        | 8,34E-06 | 4,80E-06 |
| 3. faza                                     | 6,08E-06                            | 2,30E-06 | 1,64E-06 | 1,42E-05                        | 9,86E-06 | 3,26E-06 |
| $\bar{x} \pm \text{SD}$ (1.faza)            | 7,3 ± 1,3 (x 10 <sup>-6</sup> )     |          |          | 10 ± 3,7 (x 10 <sup>-6</sup> )  |          |          |
| $\bar{x} \pm \text{SD}$ (2. faza)           | 6,3 ± 1,8 (x 10 <sup>-6</sup> )     |          |          | 9,3 ± 5,0 (x 10 <sup>-6</sup> ) |          |          |
|                                             | P <sub>app</sub> za DIGOKSIN (cm/s) |          |          |                                 |          |          |
|                                             | S-M                                 |          |          | M-S                             |          |          |

|                            |                                       |          |          |                                     |          |          |
|----------------------------|---------------------------------------|----------|----------|-------------------------------------|----------|----------|
| 1. faza                    | 1,51E-05                              | 2,39E-05 | 2,53E-05 | 4,52E-06                            | 3,39E-06 | 1,65E-06 |
| 2. faza                    | 5,50E-06                              | 2,74E-05 | 2,88E-05 | 4,38E-06                            | 1,82E-06 | 8,67E-07 |
| 3. faza                    | 7,53E-06                              | 1,45E-05 | 1,03E-05 | 8,22E-06                            | 7,23E-06 | 1,10E-05 |
| $\bar{x} \pm SD$ (1.faza)  | 21 $\pm$ 5,6 (x 10 <sup>-6</sup> )    |          |          | 3,2 $\pm$ 1,4 (x 10 <sup>-6</sup> ) |          |          |
| $\bar{x} \pm SD$ (2. faza) | 20,6 $\pm$ 13,1 (x 10 <sup>-6</sup> ) |          |          | 2,4 $\pm$ 1,8 (x 10 <sup>-6</sup> ) |          |          |
|                            | STATISTIKA                            |          |          |                                     |          |          |
|                            | F-test                                |          | T-test   |                                     |          |          |
| 1. faza                    | 0,127                                 |          | 0,005    |                                     | S        |          |
| 2 .faza                    | 0,743                                 |          | 0,000    |                                     | S        |          |
| 3. faza                    | 0,471                                 |          | 0,446    |                                     | NS       |          |
| S-M (AGE)                  | 0,259                                 |          | 0,209    |                                     | NS       |          |
| S-M (Ver)                  | 0,405                                 |          | 0,007    |                                     | S        |          |
| M-S (AGE)                  | 0,775                                 |          | 0,568    |                                     | NS       |          |
| M-S (Ver)                  | 0,929                                 |          | 0,014    |                                     | S        |          |

- b) Caco-2 celična linija:
- 1. faza: raztopina z 20  $\mu\text{M}$  digoksinom
  - 2. faza: dodamo 1% AGE

**Tabela 5b: Elektrofiziološki parametri,  $P_{\text{app}}$  za FLU in digoksin (20  $\mu\text{M}$ ) ter statistični rezultati pri dvofaznem poizkusu na Caco-2 celicah.**

|                            |                                     |          |          |                                      |          |          |
|----------------------------|-------------------------------------|----------|----------|--------------------------------------|----------|----------|
|                            | POVPREČEN UPOR                      |          |          |                                      |          |          |
|                            | BL-AP                               |          |          | AP-BL                                |          |          |
| TEER <sub>povpr</sub> (Ω)  | 820,33                              | 772,39   | 779,65   | 783,64                               | 907,87   | 733,22   |
|                            | P <sub>app</sub> za FLU (cm/s)      |          |          |                                      |          |          |
|                            | BL-AP                               |          |          | AP-BL                                |          |          |
| 1. faza                    | 1,98E-07                            | 1,87E-07 | 1,87E-07 | 8,44E-08                             | 9,18E-08 | 8,77E-08 |
| 2. faza                    | 1,68E-07                            | 2,56E-07 | 2,58E-07 | 9,63E-09                             | 2,26E-08 | 1,39E-07 |
| $\bar{X} \pm SD$ (1.faza)  | 0,19 ± 0,0061 (x 10 <sup>-6</sup> ) |          |          | 0,088 ± 0,0037 (x 10 <sup>-6</sup> ) |          |          |
| $\bar{X} \pm SD$ (2. faza) | 0,23 ± 0,051 (x 10 <sup>-6</sup> )  |          |          | 0,057 ± 0,071 (x 10 <sup>-6</sup> )  |          |          |
|                            | P <sub>app</sub> za DIGOKSIN (cm/s) |          |          |                                      |          |          |
|                            | BL-AP                               |          |          | AP-BL                                |          |          |
| 1. faza                    | 1,99E-05                            | 2,14E-05 | 1,75E-05 | 6,72E-06                             | 6,52E-06 | 8,18E-06 |
| 2. faza                    | 3,91E-05                            | 4,02E-05 | 3,28E-05 | 1,01E-05                             | 1,18E-05 | 1,12E-05 |
| $\bar{X} \pm SD$ (1.faza)  | 19 ± 1,9 (x 10 <sup>-6</sup> )      |          |          | 7,1 ± 0,90 (x 10 <sup>-6</sup> )     |          |          |
| $\bar{X} \pm SD$ (2. faza) | 37 ± 4,0 (x 10 <sup>-6</sup> )      |          |          | 11 ± 0,80 (x 10 <sup>-6</sup> )      |          |          |
|                            | STATISTIKA                          |          |          |                                      |          |          |
|                            | F-test                              |          | T-test   |                                      |          |          |
| 1. faza                    | 0,358                               |          | 0,000    |                                      | S        |          |
| 2. faza                    | 0,087                               |          | 0,000    |                                      | S        |          |
| BL-AP (AGE)                | 0,382                               |          | 0,002    |                                      | S        |          |
| AP-BL (AGE)                | 0,935                               |          | 0,005    |                                      | S        |          |

- c) Caco-2 celična linija:
- 1. faza: raztopina s 100  $\mu\text{M}$  digoksinom
  - 2. faza: dodamo 200  $\mu\text{M}$  verapamila

**Tabela 5c: Elektrofiziološki parametri,  $P_{\text{app}}$  za FLU in digoksin (100  $\mu\text{M}$ ) ter statistični rezultati pri dvofaznem poizkusu na Caco-2 celicah.**

|                            | POVPREČEN UPOR                      |          |          |                                   |          |          |
|----------------------------|-------------------------------------|----------|----------|-----------------------------------|----------|----------|
|                            | BL-AP                               |          |          | AP-BL                             |          |          |
| TEER <sub>povpr</sub> (Ω)  | 649,57                              | 446,16   | 489,16   | 308,92                            | 611,39   | 572,15   |
|                            | P <sub>app</sub> za FLU (cm/s)      |          |          |                                   |          |          |
|                            | BL-AP                               |          |          | AP-BL                             |          |          |
| 1. faza                    | 3,21E-07                            | 7,13E-07 | 4,81E-07 | 8,59E-07                          | 1,71E-07 | 1,47E-07 |
| 2. faza                    | 3,44E-07                            | 7,43E-07 | 3,98E-07 | 1,24E-06                          | 2,19E-07 | 1,94E-07 |
| $\bar{x} \pm SD$ (1.faza)  | 0,051 ± 0,020 (x 10 <sup>-6</sup> ) |          |          | 0,39 ± 0,40 (x 10 <sup>-6</sup> ) |          |          |
| $\bar{x} \pm SD$ (2. faza) | 0,050 ± 0,022 (x 10 <sup>-6</sup> ) |          |          | 0,55 ± 0,60 (x 10 <sup>-6</sup> ) |          |          |
|                            | P <sub>app</sub> za DIGOKSIN (cm/s) |          |          |                                   |          |          |
|                            | BL-AP                               |          |          | AP-BL                             |          |          |
| 1. faza                    | 1,09E-04                            | 8,34E-05 | 9,19E-05 | 5,11E-05                          | 4,31E-05 | 4,60E-05 |
| 2. faza                    | 1,11E-04                            | 1,17E-04 | 9,08E-05 | 7,05E-05                          | 6,17E-05 | 7,30E-05 |
|                            | STATISTIKA                          |          |          |                                   |          |          |
|                            | F-test                              |          | T-test   |                                   |          |          |
| 1. faza                    | 0,179                               |          | 0,004    |                                   | S        |          |
| 2 .faza                    | 0,316                               |          | 0,012    |                                   | S        |          |
| BL-AP (Ver)                | 0,948                               |          | 0,351    |                                   | NS       |          |
| AP-BL (Ver)                | 0,641                               |          | 0,006    |                                   | S        |          |

### 6.3 Finasterid

- a) podganje črevo:
- 1. faza: raztopina s 100 μM finasteridom
  - 2. faza: dodamo 1% AGE

**Tabela 6a: Elektrofiziološki parametri, P<sub>app</sub> za FLU in finasterid ter statistični rezultati pri dvofaznem poizkusu na podganjem črevesju.**

|                                             | ELEKTRIKA                             |          |          |                                  |          |          |
|---------------------------------------------|---------------------------------------|----------|----------|----------------------------------|----------|----------|
|                                             | S-M                                   |          |          | M-S                              |          |          |
| TEER <sub>povpr</sub> (Ω)                   | 30,74                                 | 51,44    | 34,35    | 33,04                            | 38,65    |          |
| TEP <sub>kon</sub> -TEP <sub>glu</sub> (mV) | -1,90                                 | -2,70    | -1,70    | -2,60                            | -9,90    |          |
| ΔTEP <sub>glu</sub> (mV)                    | -2,70                                 | -1,00    | -1,20    | -0,40                            | -1,60    |          |
| ΔI <sub>sc</sub> (μA)                       | 41,50                                 | 9,40     | 38,00    | 7,40                             | 0,00     |          |
|                                             | P <sub>app</sub> za FLU (cm/s)        |          |          |                                  |          |          |
|                                             | S-M                                   |          |          | M-S                              |          |          |
| 1. faza                                     | 5,81E-06                              | 3,05E-06 | 4,78E-06 | 1,31E-06                         | 3,67E-06 | 1,01E-06 |
| 2. faza                                     | 9,54E-06                              | 5,38E-06 | 8,06E-06 | 2,20E-06                         | 2,80E-06 | 1,14E-06 |
| $\bar{x} \pm SD$ (1.faza)                   | 4,6 ± 1,4 (x 10 <sup>-6</sup> )       |          |          | 2,0 ± 1,5 (x 10 <sup>-6</sup> )  |          |          |
| $\bar{x} \pm SD$ (2. faza)                  | 7,7 ± 2,1 (x 10 <sup>-6</sup> )       |          |          | 2,1 ± 0,84 (x 10 <sup>-6</sup> ) |          |          |
|                                             | P <sub>app</sub> za FINASTERID (cm/s) |          |          |                                  |          |          |
|                                             | S-M                                   |          |          | M-S                              |          |          |
| 1. faza                                     | 2,21E-06                              | 3,15E-06 | 2,87E-06 | 3,05E-06                         | 2,85E-06 | 9,98E-07 |
| 2. faza                                     | 2,60E-06                              | 2,83E-06 | 2,86E-06 | 1,96E-06                         | 2,16E-06 | 1,20E-06 |
| $\bar{x} \pm SD$ (1.faza)                   | 2,7 ± 0,48 (x 10 <sup>-6</sup> )      |          |          | 2,3 ± 1,1 (x 10 <sup>-6</sup> )  |          |          |
| $\bar{x} \pm SD$ (2. faza)                  | 2,8 ± 0,14 (x 10 <sup>-6</sup> )      |          |          | 1,8 ± 0,50 (x 10 <sup>-6</sup> ) |          |          |
|                                             | STATISTIKA                            |          |          |                                  |          |          |
|                                             | F-test                                |          | T-test   |                                  |          |          |

|           |       |       |    |
|-----------|-------|-------|----|
| 1. faza   | 0,311 | 0,563 | NS |
| 2. faza   | 0,144 | 0,031 | S  |
| S-M (AGE) | 0,155 | 0,959 | NS |
| M-S (AGE) | 0,330 | 0,503 | NS |

## 6.4 Furosemid

- a) podganje črevo:
- 1. faza: raztopina s 100  $\mu$ M furosemidom
  - 2. faza: dodamo 1% AGE
  - 3. faza: dodamo 200  $\mu$ M verapamila

**Tabela 7a: Elektrofiziološki parametri,  $P_{app}$  za FLU in furosemid ter statistični rezultati pri trofaznem poizkusu na podganjem črevesju.**

|                                             | ELEKTRIKA                            |          |          |                                  |          |          |
|---------------------------------------------|--------------------------------------|----------|----------|----------------------------------|----------|----------|
|                                             | S-M                                  |          |          | M-S                              |          |          |
| TEER <sub>povpr</sub> (Ω)                   | 31,84                                | 27,33    | 38,59    | 43,75                            | 35,82    | 33,81    |
| TEP <sub>kon</sub> -TEP <sub>glu</sub> (mV) | -2,10                                | -1,40    | -3,20    | -3,00                            | -2,40    | -2,20    |
| ΔTEP <sub>glu</sub> (mV)                    | -1,40                                | -0,20    | -1,30    | -1,70                            | -1,20    | -1,40    |
| ΔI <sub>sc</sub> (μA)                       | 27,50                                | 4,50     | 24,00    | 36,00                            | 28,50    | 34,50    |
|                                             | P <sub>app</sub> za FLU (cm/s)       |          |          |                                  |          |          |
|                                             | S-M                                  |          |          | M-S                              |          |          |
| 1. faza                                     | 1,36E-05                             | 7,24E-06 | 1,19E-05 | 2,52E-06                         | 3,41E-06 | 3,28E-06 |
| 2. faza                                     | 9,03E-06                             | 7,90E-06 | 1,45E-05 | 2,76E-06                         | 3,54E-06 | 3,32E-06 |
| 3. faza                                     | 1,01E-05                             | 1,12E-05 | 1,15E-05 | 2,18E-06                         | 5,52E-06 | 4,13E-06 |
| $\bar{X} \pm SD$ (1.faza)                   | 11 ± 3,3 (x 10 <sup>-6</sup> )       |          |          | 3,1 ± 0,48 (x 10 <sup>-6</sup> ) |          |          |
| $\bar{X} \pm SD$ (2. faza)                  | 11 ± 3,6 (x 10 <sup>-6</sup> )       |          |          | 3,2 ± 0,40 (x 10 <sup>-6</sup> ) |          |          |
|                                             | P <sub>app</sub> za FUROSEMID (cm/s) |          |          |                                  |          |          |
|                                             | S-M                                  |          |          | M-S                              |          |          |
| 1. faza                                     | 1,93E-05                             | 1,37E-05 | 2,84E-05 | 1,99E-06                         | 2,90E-06 | 3,52E-06 |
| 2. faza                                     | 1,28E-05                             | 1,25E-05 | 3,15E-05 | 1,90E-06                         | 2,59E-06 | 2,19E-06 |
| 3. faza                                     | 1,35E-05                             | 1,64E-05 | 1,91E-05 | 1,61E-06                         | 3,11E-06 | 3,17E-06 |
| $\bar{X} \pm SD$ (1.faza)                   | 20 ± 7,5 (x 10 <sup>-6</sup> )       |          |          | 2,8 ± 0,80 (x 10 <sup>-6</sup> ) |          |          |
| $\bar{X} \pm SD$ (2. faza)                  | 19 ± 10 (x 10 <sup>-6</sup> )        |          |          | 2,3 ± 0,30 (x 10 <sup>-6</sup> ) |          |          |
|                                             | STATISTIKA                           |          |          |                                  |          |          |
|                                             | F-test                               |          | T-test   |                                  |          |          |
| 1. faza                                     | 0,021                                |          | 0,007    |                                  | S        |          |
| 2. faza                                     | 0,002                                |          | 0,028    |                                  | S        |          |
| 3. faza                                     | 0,184                                |          | 0,001    |                                  | S        |          |
| S-M (AGE)                                   | 0,638                                |          | 0,852    |                                  | NS       |          |
| S-M (Ver)                                   | 0,121                                |          | 0,707    |                                  | NS       |          |
| M-S (AGE)                                   | 0,337                                |          | 0,306    |                                  | NS       |          |
| M-S (Ver)                                   | 0,268                                |          | 0,505    |                                  | NS       |          |

- b) podganje črevo:
- 1. faza: raztopina s 100  $\mu$ M furosemidom
  - 2. faza: dodamo 200  $\mu$ M verapamila

**Tabela 7b: Elektrofiziološki parametri,  $P_{app}$  za FLU in furosemid ter statistični rezultati pri dvofaznem poizkusu na podganjem črevesju (prispevek Pgp prenašalca).**

|                                             | ELEKTRIKA                     |          |          |
|---------------------------------------------|-------------------------------|----------|----------|
|                                             | S-M                           |          |          |
| TEER <sub>povpr</sub> ( $\Omega$ )          | 34,28                         | 43,43    | 41,29    |
| TEP <sub>kon</sub> -TEP <sub>glu</sub> (mV) | -1,40                         | -2,50    | -1,60    |
| $\Delta$ TEP <sub>glu</sub> (mV)            | -0,40                         | -1,90    | -1,10    |
| $\Delta I_{sc}$ ( $\mu$ A)                  | 12,80                         | 33,50    | 24,90    |
|                                             | $P_{app}$ za FLU (cm/s)       |          |          |
|                                             | S-M                           |          |          |
| 1. faza                                     | 1,06E-05                      | 1,07E-05 | 7,31E-06 |
| 2. faza                                     | 1,06E-05                      | 8,02E-06 | 5,95E-06 |
| $\bar{x} \pm SD$ (2. faza)                  | $9,4 \pm 2,7 (x 10^{-6})$     |          |          |
|                                             | $P_{app}$ za FUROSEMID (cm/s) |          |          |
|                                             | S-M                           |          |          |
| 1. faza                                     | 1,44E-05                      | 1,76E-05 | 1,00E-05 |
| 2. faza                                     | 1,25E-05                      | 7,80E-06 | 7,98E-06 |
|                                             | STATISTIKA                    |          |          |
|                                             | F-test                        | T-test   |          |
| S-M (Ver)                                   | 0,665                         | 0,165    | NS       |

c) podganje črevo:

- 1. faza: raztopina s 100  $\mu$ M furosemidom
- 2. faza: dodamo 50  $\mu$ M benzbromarona

**Tabela 7c: Elektrofiziološki parametri,  $P_{app}$  za FLU in furosemid ter statistični rezultati pri dvofaznem poizkusu na podganjem črevesju (prispevek MRP2 prenašalca).**

|                                             | ELEKTRIKA                     |          |          |
|---------------------------------------------|-------------------------------|----------|----------|
|                                             | S-M                           |          |          |
| TEER <sub>povpr</sub> ( $\Omega$ )          | 31,80                         | 27,10    | 30,70    |
| TEP <sub>kon</sub> -TEP <sub>glu</sub> (mV) | -1,10                         | -2,10    | -1,20    |
| $\Delta$ TEP <sub>glu</sub> (mV)            | -0,30                         | -0,60    | -0,40    |
| $\Delta I_{sc}$ ( $\mu$ A)                  | 9,80                          | 22,20    | 13,20    |
|                                             | $P_{app}$ za FLU (cm/s)       |          |          |
|                                             | S-M                           |          |          |
| 1. faza                                     | 8,08E-06                      | 1,29E-05 | 1,09E-05 |
| 2. faza                                     | 8,50E-06                      | 1,04E-05 | 7,54E-06 |
|                                             | $P_{app}$ za FUROSEMID (cm/s) |          |          |
|                                             | S-M                           |          |          |
| 1. faza                                     | 1,24E-05                      | 2,02E-05 | 1,74E-05 |
| 2. faza                                     | 5,64E-06                      | 4,73E-06 | 5,00E-06 |
| $\bar{x} \pm SD$ (2. faza)                  | $5,1 \pm 0,50 (x 10^{-6})$    |          |          |
|                                             | STATISTIKA                    |          |          |
|                                             | F-test                        | T-test   |          |
| S-M (BB)                                    | 0,027                         | 0,007    | S        |

- d) Caco-2 celična linija:
- 1. faza: raztopina s 100  $\mu\text{M}$  furosemidom
  - 2. faza: dodamo 1% AGE
  - 3. faza: dodamo 150  $\mu\text{M}$  benzbromarona

**Tabela 7d: Elektrofiziološki parametri,  $P_{\text{app}}$  za FLU in furosemid ter statistični rezultati pri trofaznem poizkusu na Caco-2 celicah.**

|                                   | POVPREČEN UPOR                       |           |           |                                    |          |          |
|-----------------------------------|--------------------------------------|-----------|-----------|------------------------------------|----------|----------|
|                                   | S-M                                  |           |           | M-S                                |          |          |
| TEER <sub>povpr</sub> (Ω)         | 878,58                               | 1002,17   | 877,49    | 1035,11                            | 941,16   | 887,47   |
|                                   | P <sub>app</sub> za FLU (cm/s)       |           |           |                                    |          |          |
|                                   | S-M                                  |           |           | M-S                                |          |          |
| 1. faza                           | 1,32E-07                             | -2,31E-08 | 1,79E-08  | 2,48E-07                           | 2,98E-07 | 3,37E-07 |
| 2. faza                           | -5,77E-09                            | -1,01E-07 | -8,72E-08 | 2,94E-07                           | 3,54E-07 | 1,13E-07 |
| 3. faza                           | -1,28E-07                            | -2,25E-07 | -1,19E-07 | 2,79E-07                           | 4,77E-07 | 2,58E-07 |
| $\bar{x} \pm \text{SD}$ (1.faza)  | 0,075 ± 0,0081 (x 10 <sup>-6</sup> ) |           |           | 0,30 ± 0,045 (x 10 <sup>-6</sup> ) |          |          |
| $\bar{x} \pm \text{SD}$ (2. faza) | /                                    |           |           | 0,25 ± 0,13 (x 10 <sup>-6</sup> )  |          |          |
|                                   | P <sub>app</sub> za FUROSEMID (cm/s) |           |           |                                    |          |          |
|                                   | S-M                                  |           |           | M-S                                |          |          |
| 1. faza                           | 2,00E-07                             | 2,16E-07  | 3,25E-07  | 6,64E-06                           | 7,83E-06 | 6,77E-06 |
| 2. faza                           | 2,71E-07                             | 7,61E-07  | 4,92E-07  | 1,21E-05                           | 1,25E-05 | 1,09E-05 |
| 3. faza                           | 3,11E-07                             | 7,85E-07  | 6,18E-07  | 5,92E-06                           | 3,38E-06 | 5,36E-06 |
| $\bar{x} \pm \text{SD}$ (1.faza)  | 0,25 ± 0,068 (x 10 <sup>-6</sup> )   |           |           | 7,1 ± 0,65 (x 10 <sup>-6</sup> )   |          |          |
| $\bar{x} \pm \text{SD}$ (2. faza) | 0,50 ± 0,20 (x 10 <sup>-6</sup> )    |           |           | 12 ± 0,79 (x 10 <sup>-6</sup> )    |          |          |
|                                   | STATISTIKA                           |           |           |                                    |          |          |
|                                   | F-test                               |           | T-test    |                                    |          |          |
| 1. faza                           | 0,192                                |           | 0,000     |                                    | S        |          |
| 2. faza                           | 0,277                                |           | 0,000     |                                    | S        |          |
| 3. faza                           | 0,437                                |           | 0,010     |                                    | S        |          |
| BL-AP (AGE)                       | 0,806                                |           | 0,001     |                                    | S        |          |
| BL-AP (BB)                        | 0,785                                |           | 0,000     |                                    | S        |          |
| AP-BL (AGE)                       | 0,657                                |           | 0,449     |                                    | NS       |          |
| AP-BL (BB)                        | 0,592                                |           | 0,699     |                                    | NS       |          |

## 6.5 Glibenklamid

- a) podganje črevo:
- 1. faza: raztopina s 100  $\mu\text{M}$  glibenklamidom
  - 2. faza: dodamo 1% AGE
  - 3. faza: dodamo 600  $\mu\text{M}$  verapamila

**Tabela 8a: Elektrofiziološki parametri,  $P_{\text{app}}$  za FLU in glibenklamid ter statistični rezultati pri trofaznem poizkusu na podganjem črevesju.**

|                                             | ELEKTRIKA |       |       |       |       |  |
|---------------------------------------------|-----------|-------|-------|-------|-------|--|
|                                             | S-M       |       |       | M-S   |       |  |
| TEER <sub>povpr</sub> ( $\Omega$ )          | 26,19     | 30,32 | 36,25 | 37,58 | 39,62 |  |
| TEP <sub>kon</sub> -TEP <sub>glu</sub> (mV) | -0,50     | -0,60 | -1,50 | -1,00 | -6,90 |  |
| $\Delta\text{TEP}_{\text{glu}}$ (mV)        | 0,00      | -0,10 | -0,50 | -0,20 | -0,60 |  |

| $\Delta I_{sc}$ ( $\mu A$ ) | 3,90                                          | 2,50     | 14,00    | 0,50                                 | 0,00     |          |
|-----------------------------|-----------------------------------------------|----------|----------|--------------------------------------|----------|----------|
|                             | <b>P<sub>app</sub> za FLU (cm/s)</b>          |          |          |                                      |          |          |
|                             | S-M                                           |          |          | M-S                                  |          |          |
| 1. faza                     | 9,79E-06                                      | 1,31E-05 | 1,10E-05 | 8,26E-06                             | 4,44E-06 | 9,05E-06 |
| 2. faza                     | 6,28E-06                                      | 8,85E-06 | 8,48E-06 | 6,95E-06                             | 4,29E-06 | 6,36E-06 |
| 3. faza                     | 8,81E-06                                      | 1,62E-05 | 1,48E-05 | 8,90E-06                             | 5,36E-06 | 1,32E-06 |
| $\bar{X} \pm SD$ (1.faza)   | 11 $\pm$ 1,7 (x 10 <sup>-6</sup> )            |          |          | 7,3 $\pm$ 2,5 (x 10 <sup>-6</sup> )  |          |          |
| $\bar{X} \pm SD$ (2. faza)  | 7,9 $\pm$ 1,4 (x 10 <sup>-6</sup> )           |          |          | 5,9 $\pm$ 1,4 (x 10 <sup>-6</sup> )  |          |          |
|                             | <b>P<sub>app</sub> za GLIBENKLAMID (cm/s)</b> |          |          |                                      |          |          |
|                             | S-M                                           |          |          | M-S                                  |          |          |
| 1. faza                     | 1,73E-05                                      | 2,26E-05 | 1,64E-05 | 1,91E-06                             | 1,02E-06 | 2,40E-06 |
| 2. faza                     | 2,11E-05                                      | 2,69E-05 | 1,86E-05 | 4,14E-06                             | 2,51E-06 | 1,83E-06 |
| 3. faza                     | 1,29E-05                                      | 1,47E-05 | 1,47E-05 | 9,27E-06                             | 1,07E-05 | 1,18E-05 |
| $\bar{X} \pm SD$ (1.faza)   | 18 $\pm$ 3,4 (x 10 <sup>-6</sup> )            |          |          | 1,8 $\pm$ 0,70 (x 10 <sup>-6</sup> ) |          |          |
| $\bar{X} \pm SD$ (2. faza)  | 22 $\pm$ 4,3 (x 10 <sup>-6</sup> )            |          |          | 2,8 $\pm$ 0,50 (x 10 <sup>-6</sup> ) |          |          |
|                             | <b>STATISTIKA</b>                             |          |          |                                      |          |          |
|                             | F-test                                        |          | T-test   |                                      |          |          |
| 1. faza                     | 0,083                                         |          | 0,001    |                                      | S        |          |
| 2. faza                     | 0,143                                         |          | 0,002    |                                      | S        |          |
| 3. faza                     | 0,137                                         |          | 0,020    |                                      | S        |          |
| S-M (AGE)                   | 0,766                                         |          | 0,338    |                                      | NS       |          |
| S-M (Ver)                   | 0,111                                         |          | 0,033    |                                      | S        |          |
| M-S (AGE)                   | 0,516                                         |          | 0,256    |                                      | NS       |          |
| M-S (Ver)                   | 0,920                                         |          | 0,002    |                                      | S        |          |

- b) Caco-2 celična linija:
- 1. faza: raztopina s 110  $\mu M$  glibenklamidom
  - 2. faza: dodamo 1% AGE
  - 3. faza: dodamo 200  $\mu M$  verapamila

**Tabela 8b: Elektrofiziološki parametri, P<sub>app</sub> za FLU in glibenklamid ter statistični rezultati pri trofaznem poizkusu na Caco-2 celicah.**

|                                    |                                               |          |          |                            |           |           |
|------------------------------------|-----------------------------------------------|----------|----------|----------------------------|-----------|-----------|
|                                    | <b>POVPREČEN UPOR</b>                         |          |          |                            |           |           |
|                                    | BL-AP                                         |          |          | AP-BL                      |           |           |
| TEER <sub>povpr</sub> ( $\Omega$ ) | 890,03                                        | 991,20   | 835,42   | 976,85                     | 794,69    | 885,33    |
|                                    | <b>P<sub>app</sub> za FLU (cm/s)</b>          |          |          |                            |           |           |
|                                    | BL-AP                                         |          |          | AP-BL                      |           |           |
| 1. faza                            | 8,71E-08                                      | 1,77E-07 | 1,78E-07 | 8,31E-08                   | 2,24E-08  | -4,46E-08 |
| 2. faza                            | 5,20E-08                                      | 2,42E-07 | 2,32E-08 | -1,06E-07                  | -3,36E-08 | 1,25E-09  |
| 3. faza                            | 2,48E-07                                      | 3,62E-07 | 2,90E-07 | 6,30E-08                   | 1,17E-07  | 3,76E-08  |
|                                    | <b>P<sub>app</sub> za GLIBENKLAMID (cm/s)</b> |          |          |                            |           |           |
|                                    | BL-AP                                         |          |          | AP-BL                      |           |           |
| 1. faza                            | 3,74E-05                                      | 5,04E-05 | 5,04E-05 | 1,73E-05                   | 1,82E-05  | 1,88E-05  |
| 2. faza                            | 2,99E-05                                      | 2,82E-05 | 1,60E-05 | 1,86E-05                   | 2,58E-05  | 2,09E-05  |
| 3. faza                            | 2,67E-05                                      | 3,48E-05 | 1,46E-05 | 2,07E-05                   | 2,26E-05  | 3,14E-05  |
| $\bar{x} \pm SD$ (1.faza)          | $46 \pm 7,5 (x 10^{-6})$                      |          |          | $18 \pm 0,80 (x 10^{-6})$  |           |           |
| $\bar{x} \pm SD$ (2. faza)         | $24 \pm 7,6 (x 10^{-6})$                      |          |          | $21,8 \pm 3,7 (x 10^{-6})$ |           |           |

|             | STATISTIKA |        |    |
|-------------|------------|--------|----|
|             | F-test     | T-test |    |
| 1. faza     | 0,020      | 0,003  | S  |
| 2. faza     | 0,378      | 0,587  | NS |
| 3. faza     | 0,477      | 0,950  | NS |
| BL-AP (AGE) | 0,990      | 0,026  | S  |
| BL-AP (Ver) | 0,716      | 0,929  | NS |
| AP-BL (AGE) | 0,080      | 0,162  | NS |
| AP-BL (Ver) | 0,587      | 0,470  | NS |

## 6.6 Glipizid

- a) podganje črevo:
- 1. faza: raztopina s 100  $\mu\text{M}$  glipizidom
  - 2. faza: dodamo 1% AGE
  - 3. faza: dodamo 200  $\mu\text{M}$  verapamila

**Tabela 9a: Elektrofiziološki parametri,  $P_{\text{app}}$  za FLU in glipizid ter statistični rezultati pri trofaznem poizkusu na podganjem črevesju.**

|                                             | ELEKTRIKA                           |          |          |                                 |          |          |
|---------------------------------------------|-------------------------------------|----------|----------|---------------------------------|----------|----------|
|                                             | S-M                                 |          |          | M-S                             |          |          |
| TEER <sub>povpr</sub> (Ω)                   | 51,62                               | 39,22    | 32,37    | 62,44                           | 16,21    | 29,88    |
| TEP <sub>kon</sub> -TEP <sub>glu</sub> (mV) | -3,00                               | -2,80    | -1,50    | -0,40                           | -2,80    | -1,70    |
| ΔTEP <sub>glu</sub> (mV)                    | -1,00                               | -0,80    | -0,60    | -0,30                           | -0,20    | -1,20    |
| ΔI <sub>sc</sub> (μA)                       | 15,80                               | 18,50    | 16,50    | 3,20                            | -29,10   | 35,00    |
|                                             | P <sub>app</sub> za FLU (cm/s)      |          |          |                                 |          |          |
|                                             | S-M                                 |          |          | M-S                             |          |          |
| 1. faza                                     | 2,80E-06                            | 4,17E-06 | 2,33E-06 | 1,58E-06                        | 6,08E-06 | 2,44E-06 |
| 2. faza                                     | 3,64E-06                            | 3,97E-06 | 4,44E-06 | 2,04E-06                        | 6,48E-06 | 3,78E-06 |
| 3. faza                                     | 3,20E-06                            | 3,86E-06 | 3,41E-06 | 1,53E-06                        | 3,66E-06 | 2,61E-06 |
| $\bar{x} \pm \text{SD}$ (1.faza)            | 3,1 ± ,96 (x 10 <sup>-6</sup> )     |          |          | 3,4 ± 2,4 (x 10 <sup>-6</sup> ) |          |          |
| $\bar{x} \pm \text{SD}$ (2. faza)           | 4,0 ± 0,40 (x 10 <sup>-6</sup> )    |          |          | 4,1 ± 2,2 (x 10 <sup>-6</sup> ) |          |          |
|                                             | P <sub>app</sub> za GLIPIZID (cm/s) |          |          |                                 |          |          |
|                                             | S-M                                 |          |          | M-S                             |          |          |
| 1. faza                                     | 1,96E-05                            | 2,62E-05 | 1,28E-05 | 5,94E-06                        | 1,74E-05 | 7,46E-06 |
| 2. faza                                     | 2,50E-05                            | 2,00E-05 | 2,11E-05 | 8,97E-06                        | 2,63E-05 | 1,63E-05 |
| 3. faza                                     | 2,93E-05                            | 2,24E-05 | 1,52E-05 | 9,71E-06                        | 2,30E-05 | 1,89E-05 |
| $\bar{x} \pm \text{SD}$ (1.faza)            | 19 ± 6,7 (x 10 <sup>-6</sup> )      |          |          | 10 ± 6,2 (x 10 <sup>-6</sup> )  |          |          |
| $\bar{x} \pm \text{SD}$ (2. faza)           | 22 ± 2,6 (x 10 <sup>-6</sup> )      |          |          | 17 ± 8,7 (x 10 <sup>-6</sup> )  |          |          |
|                                             | STATISTIKA                          |          |          |                                 |          |          |
|                                             | F-test                              |          | T-test   |                                 |          |          |
| 1. faza                                     | 0,223                               |          | 0,085    |                                 | NS       |          |
| 2. faza                                     | 0,381                               |          | 0,067    |                                 | NS       |          |
| 3. faza                                     | 0,910                               |          | 0,291    |                                 | NS       |          |
| S-M (AGE)                                   | 0,267                               |          | 0,578    |                                 | NS       |          |
| S-M (Ver)                                   | 0,247                               |          | 0,955    |                                 | NS       |          |
| M-S (AGE)                                   | 0,261                               |          | 0,253    |                                 | NS       |          |
| M-S (Ver)                                   | 0,856                               |          | 0,801    |                                 | NS       |          |

- b) Caco-2 celična linija: - 1. faza: raztopina s 100  $\mu\text{M}$  glipizidom  
 - 2. faza: dodamo 1% AGE

**Tabela 9b: Elektrofiziološki parametri,  $P_{\text{app}}$  za FLU in glipizid ter statistični rezultati pri dvofaznem poizkusu na Caco-2 celicah.**

|                                   | POVPREČEN UPOR                      |          |          |                                    |          |          |
|-----------------------------------|-------------------------------------|----------|----------|------------------------------------|----------|----------|
|                                   | BL-AP                               |          |          | AP-BL                              |          |          |
| TEER <sub>povpr</sub> (Ω)         | 1234,87                             | 566,76   | 511,57   | 268,44                             | 606,61   | 467,12   |
|                                   | P <sub>app</sub> za FLU (cm/s)      |          |          |                                    |          |          |
|                                   | BL-AP                               |          |          | AP-BL                              |          |          |
| 1. faza                           | 1,99E-07                            | 2,56E-07 | 2,42E-07 | 1,78E-07                           | 8,15E-08 | 1,88E-07 |
| 2. faza                           | 3,28E-07                            | 4,11E-07 | 3,59E-07 | 2,74E-07                           | 1,49E-07 | 2,86E-07 |
| $\bar{x} \pm \text{SD}$ (1.faza)  | 0,23 ± 0,080 (x 10 <sup>-6</sup> )  |          |          | 0,15 ± 0,059 (x 10 <sup>-6</sup> ) |          |          |
| $\bar{x} \pm \text{SD}$ (2. faza) | 0,37 ± 0,042 (x 10 <sup>-6</sup> )  |          |          | 0,24 ± 0,076 (x 10 <sup>-6</sup> ) |          |          |
|                                   | P <sub>app</sub> za GLIPIZID (cm/s) |          |          |                                    |          |          |
|                                   | BL-AP                               |          |          | AP-BL                              |          |          |
| 1. faza                           | 6,54E-06                            | 7,10E-06 | 8,30E-06 | 5,16E-06                           | 4,33E-06 | 4,64E-06 |
| 2. faza                           | 8,45E-06                            | 7,55E-06 | 8,93E-06 | 6,25E-06                           | 7,48E-06 | 8,75E-06 |
| $\bar{x} \pm \text{SD}$ (1.faza)  | 7,3 ± 0,90 (x 10 <sup>-6</sup> )    |          |          | 4,7 ± 0,40 (x 10 <sup>-6</sup> )   |          |          |
| $\bar{x} \pm \text{SD}$ (2. faza) | 8,3 ± 0,70 (x 10 <sup>-6</sup> )    |          |          | 7,5 ± 1,3 (x 10 <sup>-6</sup> )    |          |          |
|                                   | STATISTIKA                          |          |          |                                    |          |          |
|                                   | F-test                              |          | T-test   |                                    |          |          |
| 1. faza                           | 0,360                               |          | 0,010    |                                    | S        |          |
| 2 .faza                           | 0,479                               |          | 0,381    |                                    | NS       |          |
| BL-AP (AGE)                       | 0,759                               |          | 0,205    |                                    | NS       |          |
| AP-BL (AGE)                       | 0,203                               |          | 0,022    |                                    | S        |          |

## 6.7 Hidroklorotiazid

- a) podganje črevo: - 1. faza: raztopina s 100  $\mu\text{M}$  hidroklorotiazidom  
 - 2. faza: dodamo 1% AGE

**Tabela 10a: Elektrofiziološki parametri,  $P_{\text{app}}$  za FLU in hidroklorotiazid ter statistični rezultati pri dvofaznem poizkusu na podganjem črevesju.**

|                                             | ELEKTRIKA                      |          |          |                            |          |          |
|---------------------------------------------|--------------------------------|----------|----------|----------------------------|----------|----------|
|                                             | S-M                            |          |          | M-S                        |          |          |
| TEER <sub>povpr</sub> ( $\Omega$ )          | 17,35                          | 33,77    | 44,76    | 31,53                      | 27,17    | 39,69    |
| TEP <sub>kon</sub> -TEP <sub>glu</sub> (mV) | -1,40                          | -2,80    | -4,90    | -4,10                      | -3,00    | -4,60    |
| $\Delta\text{TEP}_{\text{glu}}$ (mV)        | -4,60                          | -4,20    | -4,70    | -2,20                      | -4,50    | -5,40    |
| $\Delta I_{\text{sc}}$ ( $\mu\text{A}$ )    | 99,00                          | 64,30    | 73,00    | 59,30                      | 54,00    | 51,60    |
|                                             | $P_{\text{app}}$ za FLU (cm/s) |          |          |                            |          |          |
|                                             | S-M                            |          |          | M-S                        |          |          |
| 1. faza                                     | 4,74E-06                       | 3,04E-06 | 3,19E-06 | 2,77E-06                   | 6,03E-06 | 5,10E-06 |
| 2. faza                                     | 8,37E-06                       | 6,04E-06 | 3,94E-06 | 4,33E-06                   | 4,57E-06 | 4,75E-06 |
| $\bar{x} \pm \text{SD}$ (1.faza)            | $3,7 \pm 0,94 (x 10^{-6})$     |          |          | $4,6 \pm 1,7 (x 10^{-6})$  |          |          |
| $\bar{x} \pm \text{SD}$ (2. faza)           | $6,1 \pm 2,2 (x 10^{-6})$      |          |          | $4,6 \pm 0,21 (x 10^{-6})$ |          |          |

|                            | P <sub>app</sub> za HIDROKLOROTIAZID (cm/s) |          |          |                                 |          |          |
|----------------------------|---------------------------------------------|----------|----------|---------------------------------|----------|----------|
|                            | S-M                                         |          |          | M-S                             |          |          |
| 1. faza                    | 1,70E-05                                    | 9,53E-06 | 9,66E-06 | 5,58E-06                        | 8,65E-06 | 7,76E-06 |
| 2. faza                    | 1,82E-05                                    | 9,83E-06 | 1,29E-05 | 7,90E-06                        | 5,07E-06 | 6,60E-06 |
| $\bar{x} \pm SD$ (1.faza)  | 12 ± 4,3 (x 10 <sup>-6</sup> )              |          |          | 7,3 ± 1,6 (x 10 <sup>-6</sup> ) |          |          |
| $\bar{x} \pm SD$ (2. faza) | 13 ± 4,2 (x 10 <sup>-6</sup> )              |          |          | 6,5 ± 1,4 (x 10 <sup>-6</sup> ) |          |          |
|                            | STATISTIKA                                  |          |          |                                 |          |          |
|                            | F-test                                      |          | T-test   |                                 |          |          |
| 1. faza                    | 0,493                                       |          | 0,200    |                                 | NS       |          |
| 2 .faza                    | 0,202                                       |          | 0,051    |                                 | S        |          |
| S-M (AGE)                  | 0,987                                       |          | 0,675    |                                 | NS       |          |
| M-S (AGE)                  | 0,782                                       |          | 0,920    |                                 | NS       |          |

- b) Caco-2 celična linija:
- 1. faza: raztopina s 100  $\mu$ M hidroklorotiazidom
  - 2. faza: dodamo 1% AGE
  - 3. faza: dodamo 200  $\mu$ M verapamila

**Tabela 10b: Elektrofiziološki parametri, P<sub>app</sub> za FLU in hidroklorotiazid ter statistični rezultati pri trofaznem poizkusu na Caco-2 celicah.**

|                            | POVPREČEN UPOR                              |          |          |                                     |           |           |
|----------------------------|---------------------------------------------|----------|----------|-------------------------------------|-----------|-----------|
|                            | BL-AP                                       |          |          | AP-BL                               |           |           |
| TEER <sub>povpr</sub> (Ω)  | 586,93                                      | 609,23   | 497,95   | 550,14                              | 513,80    | 492,40    |
|                            | P <sub>app</sub> za FLU (cm/s)              |          |          |                                     |           |           |
|                            | BL-AP                                       |          |          | AP-BL                               |           |           |
| 1. faza                    | 4,06E-07                                    | 4,82E-07 | 5,38E-07 | 1,03E-07                            | 1,51E-07  | 1,62E-07  |
| 2. faza                    | 4,05E-07                                    | 4,95E-07 | 5,49E-07 | 1,44E-07                            | 1,55E-07  | 2,82E-07  |
| 3. faza                    | 1,73E-06                                    | 7,13E-07 | 6,93E-07 | 6,68E-08                            | -2,70E-07 | -1,09E-07 |
| $\bar{x} \pm SD$ (1.faza)  | 0,48 ± 0,066 (x 10 <sup>-6</sup> )          |          |          | 0,14 ± 0,031 (x 10 <sup>-6</sup> )  |           |           |
| $\bar{x} \pm SD$ (2. faza) | 0,48 ± 0,073 (x 10 <sup>-6</sup> )          |          |          | 0,19 ± 0,077 (x 10 <sup>-6</sup> )  |           |           |
|                            | P <sub>app</sub> za HIDROKLOROTIAZID (cm/s) |          |          |                                     |           |           |
|                            | BL-AP                                       |          |          | AP-BL                               |           |           |
| 1. faza                    | 8,67E-07                                    | 1,14E-06 | 1,39E-06 | 6,15E-07                            | 6,78E-07  | 4,92E-07  |
| 2. faza                    | 3,41E-06                                    | 3,85E-06 | 3,75E-06 | 7,62E-07                            | 8,98E-07  | 8,24E-07  |
| 3. faza                    | 3,43E-06                                    | 8,27E-07 | 2,23E-06 | 7,66E-07                            | 7,19E-07  | 8,66E-07  |
| $\bar{x} \pm SD$ (1.faza)  | 1,1 ± 0,26 (x 10 <sup>-6</sup> )            |          |          | 0,60 ± 0,0095 (x 10 <sup>-6</sup> ) |           |           |
| $\bar{x} \pm SD$ (2. faza) | 3,7 ± 0,20 (x 10 <sup>-6</sup> )            |          |          | 0,83 ± 0,0068 (x 10 <sup>-6</sup> ) |           |           |
|                            | STATISTIKA                                  |          |          |                                     |           |           |
|                            | F-test                                      |          | T-test   |                                     |           |           |
| 1. faza                    | 0,231                                       |          | 0,029    |                                     | S         |           |
| 2. faza                    | 0,160                                       |          | 0,000    |                                     | S         |           |
| 3. faza                    | 0,011                                       |          | 0,126    |                                     | NS        |           |
| BL-AP (AGE)                | 0,876                                       |          | 0,000    |                                     | S         |           |
| BL-AP (Ver)                | 0,101                                       |          | 0,030    |                                     | S         |           |
| AP-BL (AGE)                | 0,682                                       |          | 0,026    |                                     | S         |           |
| AP-BL (Ver)                | 0,90666                                     |          | 0,49151  |                                     | NS        |           |

## 6.8 Losartan

- a) podganje črevo:
- 1. faza: raztopina s 100  $\mu\text{M}$  losartanom
  - 2. faza: dodamo 1% AGE
  - 3. faza: dodamo 200  $\mu\text{M}$  verapamila

**Tabela 11a: Elektrofiziološki parametri,  $P_{\text{app}}$  za FLU in losartan ter statistični rezultati pri trofaznem poizkusu na podganjem črevesju.**

|                                             | ELEKTRIKA                           |          |          |                                  |          |          |
|---------------------------------------------|-------------------------------------|----------|----------|----------------------------------|----------|----------|
|                                             | S-M                                 |          |          | M-S                              |          |          |
| TEER <sub>povpr</sub> (Ω)                   | 35,59                               | 33,28    | 25,31    | 19,22                            | 17,69    |          |
| TEP <sub>kon</sub> -TEP <sub>glu</sub> (mV) | -1,30                               | -1,90    | -2,10    | -1,10                            | -2,70    |          |
| ΔTEP <sub>glu</sub> (mV)                    | -1,40                               | -1,00    | -1,10    | -0,30                            | -0,90    |          |
| ΔI <sub>sc</sub> (μA)                       | 36,70                               | 27,50    | 36,20    | -1,10                            | -19,40   |          |
|                                             | P <sub>app</sub> za FLU (cm/s)      |          |          |                                  |          |          |
|                                             | S-M                                 |          |          | M-S                              |          |          |
| 1. faza                                     | 7,86E-06                            | 6,24E-06 | 6,54E-06 | 5,77E-06                         | 2,81E-06 | 5,29E-06 |
| 2. faza                                     | 1,78E-05                            | 1,60E-05 | 1,27E-05 | 1,24E-05                         | 4,30E-06 | 1,02E-05 |
| 3. faza                                     | 1,20E-05                            | 1,24E-05 | 1,30E-05 | 1,31E-05                         | 4,09E-06 | 4,83E-06 |
| $\bar{X} \pm \text{SD}$ (1.faza)            | 6,9 ± 0,86 (x 10 <sup>-6</sup> )    |          |          | 4,6 ± 1,6 (x 10 <sup>-6</sup> )  |          |          |
| $\bar{X} \pm \text{SD}$ (2. faza)           | 15 ± 2,6 (x 10 <sup>-6</sup> )      |          |          | 9,0 ± 4,2 (x 10 <sup>-6</sup> )  |          |          |
|                                             | P <sub>app</sub> za LOSARTAN (cm/s) |          |          |                                  |          |          |
|                                             | S-M                                 |          |          | M-S                              |          |          |
| 1. faza                                     | 1,91E-05                            | 1,27E-05 | 1,47E-05 | 3,91E-06                         | 2,13E-06 | 3,90E-06 |
| 2. faza                                     | 2,51E-05                            | 2,00E-05 | 2,62E-05 | 3,70E-06                         | 4,28E-06 | 1,25E-05 |
| 3. faza                                     | 2,15E-05                            | 1,86E-05 | 1,84E-05 | 1,37E-05                         | 4,21E-06 | 8,12E-06 |
| $\bar{X} \pm \text{SD}$ (1.faza)            | 15 ± 3,3 (x 10 <sup>-6</sup> )      |          |          | 3,3 ± 1,0 (x 10 <sup>-6</sup> )  |          |          |
| $\bar{X} \pm \text{SD}$ (2. faza)           | 23 ± 3,3 (x 10 <sup>-6</sup> )      |          |          | 4,0 ± 0,40 (x 10 <sup>-6</sup> ) |          |          |
| $\bar{X} \pm \text{SD}$ (3. faza)           | 19 ± 1,7 (x 10 <sup>-6</sup> )      |          |          | 8,7 ± 4,7 (x 10 <sup>-6</sup> )  |          |          |
|                                             | STATISTIKA                          |          |          |                                  |          |          |
|                                             | F-test                              |          | T-test   |                                  |          |          |
| 1. faza                                     | 0,179                               |          | 0,004    |                                  | S        |          |
| 2. faza                                     | 0,176                               |          | 0,004    |                                  | S        |          |
| 3. faza                                     | 0,121                               |          | 0,067    |                                  | NS       |          |
| S-M (AGE)                                   | 0,993                               |          | 0,037    |                                  | S        |          |
| S-M (Ver)                                   | 0,432                               |          | 0,116    |                                  | NS       |          |
| M-S (AGE)                                   | 0,546                               |          | 0,456    |                                  | NS       |          |
| M-S (Ver)                                   | 0,078                               |          | 0,406    |                                  | NS       |          |

- b) Caco-2 celična linija:
- 1. faza: raztopina s 100  $\mu\text{M}$  losartanom
  - 2. faza: dodamo 1% AGE
  - 3. faza: dodamo 200  $\mu\text{M}$  verapamila

**Tabela 11b: Elektrofiziološki parametri,  $P_{\text{app}}$  za FLU in losartan ter statistični rezultati pri trofaznem poizkusu na Caco-2 celicah.**

|                            | POVPREČEN UPOR                      |          |          |                                     |          |          |
|----------------------------|-------------------------------------|----------|----------|-------------------------------------|----------|----------|
|                            | BL-AP                               |          |          | AP-BL                               |          |          |
| TEER <sub>povpr</sub> (Ω)  | 899,20                              | 1103,03  | 868,55   | 1032,69                             | 832,57   | 858,17   |
|                            | P <sub>app</sub> za FLU (cm/s)      |          |          |                                     |          |          |
|                            | BL-AP                               |          |          | AP-BL                               |          |          |
| 1. faza                    | 1,11E-07                            | 5,63E-08 | 8,03E-08 | 3,70E-08                            | 6,20E-08 | 4,70E-08 |
| 2. faza                    | 9,67E-08                            | 2,07E-07 | 1,57E-07 | 5,30E-08                            | 2,45E-07 | 6,47E-08 |
| 3. faza                    | 3,58E-07                            | 3,01E-07 | 2,72E-07 | 5,48E-08                            | 2,14E-07 | 2,46E-08 |
| $\bar{x} \pm SD$ (1.faza)  | 0,082 ± 0,027 (x 10 <sup>-6</sup> ) |          |          | 0,049 ± 0,013 (x 10 <sup>-6</sup> ) |          |          |
| $\bar{x} \pm SD$ (2. faza) | 0,15 ± 0,055 (x 10 <sup>-6</sup> )  |          |          | 0,12 ± 0,11 (x 10 <sup>-6</sup> )   |          |          |
|                            | P <sub>app</sub> za LOSARTAN (cm/s) |          |          |                                     |          |          |
|                            | BL-AP                               |          |          | AP-BL                               |          |          |
| 1. faza                    | 3,81E-06                            | 3,48E-06 | 3,84E-06 | 1,92E-07                            | 2,42E-07 | 2,33E-07 |
| 2. faza                    | 7,38E-06                            | 7,35E-06 | 8,40E-06 | 3,67E-07                            | 4,35E-07 | 4,26E-07 |
| 3. faza                    | 1,07E-06                            | 1,15E-06 | 1,33E-06 | 8,34E-07                            | 2,13E-07 | 7,80E-07 |
| $\bar{x} \pm SD$ (1.faza)  | 3,7 ± 0,19 (x 10 <sup>-6</sup> )    |          |          | 0,22 ± 0,027 (x 10 <sup>-6</sup> )  |          |          |
| $\bar{x} \pm SD$ (2. faza) | 7,7 ± 0,60 (x 10 <sup>-6</sup> )    |          |          | 0,41 ± 0,037 (x 10 <sup>-6</sup> )  |          |          |
|                            | STATISTIKA                          |          |          |                                     |          |          |
|                            | F-test                              |          | T-test   |                                     |          |          |
| 1. faza                    | 0,035                               |          | 0,000    |                                     | S        |          |
| 2. faza                    | 0,008                               |          | 0,000    |                                     | S        |          |
| 3. faza                    | 0,252                               |          | 0,054    |                                     | NS       |          |
| BL-AP (AGE)                | 0,197                               |          | 0,000    |                                     | S        |          |
| BL-AP (Ver)                | 0,090                               |          | 0,000    |                                     | S        |          |
| AP-BL (AGE)                | 0,678                               |          | 0,002    |                                     | S        |          |
| AP-BL (Ver)                | 0,023                               |          | 0,375    |                                     | NS       |          |

## 6.9 Pravastatin

- a) podganje črevo:
- 1. faza: raztopina s 100 μM pravastatinom
  - 2. faza: dodamo 200 μM verapamila

**Tabela 12a: Elektrofiziološki parametri, P<sub>app</sub> za FLU in pravastatin ter statistični rezultati pri dvofaznem poizkusu na podganjem črevesju.**

|                                             | ELEKTRIKA                              |          |          |          |          |          |          |          |
|---------------------------------------------|----------------------------------------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|
|                                             | S-M                                    |          |          |          | M-S      |          |          |          |
| TEER <sub>povpr</sub> (Ω)                   |                                        | 28,54    | 29,73    | 42,23    | 0,10     | 0,00     | 0,00     | -2,40    |
| TEP <sub>kon</sub> -TEP <sub>glu</sub> (mV) | -1,90                                  | -3,40    | -2,00    | -2,80    | -0,20    | 0,00     | 0,00     | -3,50    |
| ΔTEP <sub>glu</sub> (mV)                    | -1,30                                  | -1,70    | -2,00    | -0,90    | 1,90     | 0,00     | 0,00     | 84,00    |
| ΔI <sub>sc</sub> (μA)                       | 0,00                                   | -2,00    | 98,00    | 34,00    | 30,86    |          |          | 27,18    |
|                                             | P <sub>app</sub> za FLU (cm/s)         |          |          |          |          |          |          |          |
|                                             | S-M                                    |          |          |          | M-S      |          |          |          |
| 1. faza                                     | 7,27E-06                               | 1,05E-05 | 1,48E-05 | 6,89E-06 | 4,07E-06 | 2,76E-06 | 2,80E-06 | 6,47E-06 |
| 2. faza                                     | 1,09E-05                               | 1,34E-05 | 2,09E-05 | 8,80E-06 | 8,46E-06 | 5,79E-06 | 7,91E-06 | 1,12E-05 |
|                                             | P <sub>app</sub> za PRAVASTATIN (cm/s) |          |          |          |          |          |          |          |
|                                             | S-M                                    |          |          |          | M-S      |          |          |          |

|                   |          |          |          |          |          |          |          |          |
|-------------------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|
| 1. faza           | 7,90E-06 | 3,19E-06 | 3,59E-06 | 3,62E-06 | 6,88E-06 | 6,14E-06 | 4,07E-06 | 8,48E-06 |
| 2. faza           | 1,00E-05 | 4,12E-06 | 5,05E-06 | 4,99E-06 | 1,17E-05 | 7,18E-06 | 5,33E-06 | 9,71E-06 |
| <b>STATISTIKA</b> |          |          |          |          |          |          |          |          |
|                   | F-test   |          |          | T-test   |          |          |          |          |
| 1. faza           | 0,078    |          |          | 0,006    |          |          | S        |          |
| 2. faza           | 0,100    |          |          | 0,023    |          |          | S        |          |
| S-M (Ver)         | 0,351    |          |          | 0,019    |          |          | S        |          |
| M-S (Ver)         | 0,435    |          |          | 0,185    |          |          | NS       |          |

b) podganje črevo:

- 1. faza: raztopina s 50  $\mu$ M pravastatinom
- 2. faza: dodamo 1% AGE
- 3. faza: dodamo 150  $\mu$ M verapamila

**Tabela 12b: Elektrofiziološki parametri,  $P_{app}$  za FLU in pravastatin ter statistični rezultati pri trofaznem poizkusu na podganjem črevesju (prispevek Pgp prenašalca).**

|                                             |                                                   |          |          |
|---------------------------------------------|---------------------------------------------------|----------|----------|
|                                             | <b>ELEKTRIKA</b>                                  |          |          |
|                                             | S-M                                               |          |          |
| TEER <sub>povpr</sub> ( $\Omega$ )          | 32,66                                             | 22,29    | 40,39    |
| TEP <sub>kon</sub> -TEP <sub>glu</sub> (mV) | -1,10                                             | -1,50    | -2,40    |
| $\Delta$ TEP <sub>glu</sub> (mV)            | -0,60                                             | -1,60    | -0,90    |
| $\Delta I_{sc}$ ( $\mu$ A)                  | 16,80                                             | 70,40    | 18,20    |
|                                             | <b><math>P_{app}</math> za FLU (cm/s)</b>         |          |          |
|                                             | S-M                                               |          |          |
| 1. faza                                     | 8,43E-06                                          | 6,57E-06 | 5,79E-06 |
| 2. faza                                     | 1,74E-05                                          | 1,14E-05 | 7,44E-06 |
| 3. faza                                     | 1,23E-05                                          | 9,65E-06 | 6,20E-06 |
|                                             | <b><math>P_{app}</math> za PRAVASTATIN (cm/s)</b> |          |          |
|                                             | S-M                                               |          |          |
| 1. faza                                     | 1,25E-05                                          | 1,21E-05 | 1,25E-05 |
| 2. faza                                     | 1,59E-05                                          | 1,63E-05 | 1,40E-05 |
| 3. faza                                     | 1,10E-05                                          | 7,83E-06 | 4,02E-06 |
| $\bar{x} \pm SD$ (1. faza)                  | $12 \pm 0,23 (x 10^{-6})$                         |          |          |
| $\bar{x} \pm SD$ (2. faza)                  | $15 \pm 1,2 (x 10^{-6})$                          |          |          |
| $\bar{x} \pm SD$ (3. faza)                  | $9,4 \pm 2,8 (x 10^{-6})$                         |          |          |
|                                             | <b>STATISTIKA</b>                                 |          |          |
|                                             | F-test                                            | T-test   |          |
| S-M (AGE)                                   | 0,072                                             | 0,012    | S        |
| S-M (Ver)                                   | 0,301                                             | 0,028    | S        |

c) podganje črevo:

- 1. faza: raztopina s 50  $\mu$ M pravastatinom
- 2. faza: dodamo 1% AGE
- 3. faza: dodamo 50  $\mu$ M benzbromarona

**Tabela 12c: Elektrofiziološki parametri,  $P_{app}$  za FLU in pravastatin ter statistični rezultati pri trofaznem poizkusu na podganjem črevesju (prispevek MRP2 prenašalca).**

|                                             | ELEKTRIKA                       |          |          |
|---------------------------------------------|---------------------------------|----------|----------|
|                                             | S-M                             |          |          |
| TEER <sub>povpr</sub> ( $\Omega$ )          | 33,03                           | 42,91    |          |
| TEP <sub>kon</sub> -TEP <sub>glu</sub> (mV) | -1,10                           | -1,50    |          |
| $\Delta$ TEP <sub>glu</sub> (mV)            | -0,10                           | -0,10    |          |
| $\Delta I_{sc}$ ( $\mu$ A)                  | -2,30                           | 1,80     |          |
|                                             | $P_{app}$ za FLU (cm/s)         |          |          |
|                                             | S-M                             |          |          |
| 1. faza                                     | 3,88E-06                        | 6,56E-06 | 6,06E-06 |
| 2. faza                                     | 9,04E-06                        | 9,75E-06 | 8,39E-06 |
| 3. faza                                     | 7,59E-06                        | 5,94E-06 | 6,55E-06 |
|                                             | $P_{app}$ za PRAVASTATIN (cm/s) |          |          |
|                                             | S-M                             |          |          |
| 1. faza                                     | 7,66E-06                        | 1,32E-05 | 1,14E-05 |
| 2. faza                                     | 1,20E-05                        | 1,60E-05 | 1,31E-05 |
| 3. faza                                     | 7,03E-06                        | 6,26E-06 | 4,45E-06 |
| $\bar{x} \pm SD$ (1.faza)                   | $10 \pm 2,8 (x 10^{-6})$        |          |          |
| $\bar{x} \pm SD$ (2. faza)                  | $13 \pm 2,0 (x 10^{-6})$        |          |          |
| $\bar{x} \pm SD$ (3. faza)                  | $5,8 \pm 2,1 (x 10^{-6})$       |          |          |
|                                             | STATISTIKA                      |          |          |
|                                             | F-test                          | T-test   |          |
| S-M (AGE)                                   | 0,691                           | 0,211    | NS       |
| S-M (BB)                                    | 0,991                           | 0,009    | S        |

- d) podganje črevo:
- 1. faza: raztopina s 100  $\mu$ M pravastatinom (polovica celic brez AGE, polovica z AGE)
  - 2. faza: dodamo 0,5 mM CHC (ciano-4-hidroksicinamata)

**Tabela 12d: Elektrofiziološki parametri,  $P_{app}$  za FLU in pravastatin ter statistični rezultati pri dvofaznem poizkusu na podganjem črevesju (prispevek MCT prenašalca).**

|                                             | ELEKTRIKA               |       |       |  |          |       |  |
|---------------------------------------------|-------------------------|-------|-------|--|----------|-------|--|
|                                             | M-S                     |       |       |  |          |       |  |
|                                             | z AGE                   |       |       |  | brez AGE |       |  |
| TEER <sub>povpr</sub> ( $\Omega$ )          | 34,82                   | 30,27 | 23,45 |  | 9,55     | 8,26  |  |
| TEP <sub>kon</sub> -TEP <sub>glu</sub> (mV) | -0,80                   | -1,10 | -1,60 |  | -0,40    | -0,70 |  |
| $\Delta$ TEP <sub>glu</sub> (mV)            | -0,50                   | -0,50 | -0,10 |  | 0,00     | 0,80  |  |
| $\Delta I_{sc}$ ( $\mu$ A)                  | 0,00                    | 0,00  | 0,00  |  | 0,00     | 0,00  |  |
|                                             | $P_{app}$ za FLU (cm/s) |       |       |  |          |       |  |
|                                             | M-S                     |       |       |  |          |       |  |
|                                             | z AGE                   |       |       |  | brez AGE |       |  |

|                    |                                        |          |          |          |                                |          |          |          |
|--------------------|----------------------------------------|----------|----------|----------|--------------------------------|----------|----------|----------|
| 1. faza            | 1,05E-05                               | 1,18E-05 | 1,29E-05 | 8,70E-06 | 8,35E-06                       | 1,39E-05 | 1,20E-05 | 1,02E-05 |
| 2. faza            | 1,37E-05                               | 2,06E-05 | 1,98E-05 | 1,41E-05 | 1,74E-05                       | 1,78E-05 | 1,13E-05 | 1,28E-05 |
| $\bar{x} \pm SD$   | 11 ± 1,8 (x 10 <sup>-6</sup> )         |          |          |          | 11 ± 2,4 (x 10 <sup>-6</sup> ) |          |          |          |
|                    | P <sub>app</sub> za PRAVASTATIN (cm/s) |          |          |          |                                |          |          |          |
|                    | M-S                                    |          |          |          |                                |          |          |          |
|                    | z AGE                                  |          |          |          | brez AGE                       |          |          |          |
| 1. faza            | 7,54E-06                               | 9,10E-06 | 1,11E-05 | 3,60E-06 | 6,28E-06                       | 1,31E-05 | 1,02E-05 | 6,30E-06 |
| 2. faza            | 1,02E-05                               | 1,66E-05 | 1,58E-05 | 5,79E-06 | 1,01E-05                       | 1,59E-05 | 1,30E-05 | 1,00E-05 |
|                    | STATISTIKA                             |          |          |          |                                |          |          |          |
|                    | F-test                                 |          |          | T-test   |                                |          |          |          |
| M-S (AGE)          | 0,008                                  |          |          | 0,056    |                                |          | S        |          |
| M-S (CHC) brez AGE | 0,325                                  |          |          | 0,000    |                                |          | S        |          |
| M-S (CHC) z AGE    | 0,414                                  |          |          | 0,092    |                                |          | NS       |          |

## 6.10 Prazosin

- a) podganje črevo:
- 1. faza: raztopina s 100  $\mu$ M prazosinom
  - 2. faza: dodamo 1% AGE

**Tabela 13a: Elektrofiziološki parametri, P<sub>app</sub> za FLU in prazosin ter statistični rezultati pri dvofaznem poizkusu na podganjem črevesju.**

|                                             |                                     |          |          |                                  |          |           |
|---------------------------------------------|-------------------------------------|----------|----------|----------------------------------|----------|-----------|
|                                             | ELEKTRIKA                           |          |          |                                  |          |           |
|                                             | S-M                                 |          |          | M-S                              |          |           |
| TEER <sub>povpr</sub> (Ω)                   | 74,62                               | 23,37    | 29,82    | 35,46                            | 1017,65  | 20,80     |
| TEP <sub>kon</sub> -TEP <sub>glu</sub> (mV) | -2,00                               | -1,40    | -1,80    | 3,10                             | 0,10     | 4,20      |
| ΔTEP <sub>glu</sub> (mV)                    | -0,20                               | -0,40    | -0,50    | -0,10                            | -0,30    | -0,60     |
| ΔI <sub>sc</sub> (μA)                       | 4,60                                | 18,80    | 24,10    | 3,50                             | 8,70     | 53,50     |
|                                             | P <sub>app</sub> za FLU (cm/s)      |          |          |                                  |          |           |
|                                             | S-M                                 |          |          | M-S                              |          |           |
| 1. faza                                     | 1,48E-05                            | 1,26E-05 | 9,37E-06 | 1,02E-05                         | 7,77E-06 | 1,07E-05  |
| 2. faza                                     | 2,08E-05                            | 1,66E-05 | 1,24E-05 | 1,39E-05                         | 7,60E-06 | -2,32E-06 |
| $\bar{X} \pm SD$ (1.faza)                   | 12 ± 2,7 (x 10 <sup>-6</sup> )      |          |          | 9,6 ± 1,6 (x 10 <sup>-6</sup> )  |          |           |
| $\bar{X} \pm SD$ (2. faza)                  | 17 ± 4,2 (x 10 <sup>-6</sup> )      |          |          | 10,4 ± 4,4 (x 10 <sup>-6</sup> ) |          |           |
|                                             | P <sub>app</sub> za PRAZOSIN (cm/s) |          |          |                                  |          |           |
|                                             | S-M                                 |          |          | M-S                              |          |           |
| 1. faza                                     | 2,70E-05                            | 2,14E-05 | 1,83E-05 | 6,52E-06                         | 5,93E-06 | 9,32E-06  |
| 2. faza                                     | 4,34E-05                            | 2,84E-05 | 3,23E-05 | 1,23E-05                         | 7,07E-06 | 1,18E-05  |
| $\bar{X} \pm SD$ (1.faza)                   | 22 ± 4,4 (x 10 <sup>-6</sup> )      |          |          | 7,3 ± 1,8 (x 10 <sup>-6</sup> )  |          |           |
| $\bar{X} \pm SD$ (2. faza)                  | 34 ± 7,8 (x 10 <sup>-6</sup> )      |          |          | 10 ± 2,9 (x 10 <sup>-6</sup> )   |          |           |
|                                             | STATISTIKA                          |          |          |                                  |          |           |
|                                             | F-test                              |          | T-test   |                                  |          |           |
| 1. faza                                     | 0,287                               |          | 0,005    |                                  | S        |           |
| 2. faza                                     | 0,244                               |          | 0,007    |                                  | S        |           |
| S-M (AGE)                                   | 0,490                               |          | 0,073    |                                  | NS       |           |
| M-S (AGE)                                   | 0,563                               |          | 0,187    |                                  | NS       |           |

## 6.11 Propranolol

- a) podganje črevo:
- 1. faza: raztopina s 100  $\mu\text{M}$  propranololom
  - 2. faza: dodamo 1% AGE

**Tabela 14a: Elektrofiziološki parametri,  $P_{\text{app}}$  za FLU in propranolol ter statistični rezultati pri dvofaznem poizkusu na podganjem črevesju.**

|                                             | ELEKTRIKA                              |          |          |          |          |          |
|---------------------------------------------|----------------------------------------|----------|----------|----------|----------|----------|
|                                             | S-M                                    |          |          | M-S      |          |          |
| TEER <sub>povpr</sub> ( $\Omega$ )          | 32,86                                  | 10,97    |          | 6,81     | 27,96    | 4,38     |
| TEP <sub>kon</sub> -TEP <sub>glu</sub> (mV) | -0,80                                  | 0,30     | -0,30    | -0,30    | -0,20    | -0,20    |
| $\Delta\text{TEP}_{\text{glu}}$ (mV)        | -0,20                                  | 1,10     | -0,10    | 0,00     | 0,00     | 0,00     |
| $\Delta I_{\text{sc}}$ ( $\mu\text{A}$ )    | 2,00                                   | -125,00  | 0,00     | -3,10    | -1,00    | 7,80     |
|                                             | $P_{\text{app}}$ za FLU (cm/s)         |          |          |          |          |          |
|                                             | S-M                                    |          |          | M-S      |          |          |
| 1. faza                                     | 1,30E-05                               | 2,30E-05 | 2,22E-05 | 9,12E-06 | 2,40E-05 | 2,70E-05 |
| 2. faza                                     | 1,68E-05                               | 2,96E-05 | 2,89E-05 | 1,35E-05 | 2,80E-05 | 3,67E-05 |
|                                             | $P_{\text{app}}$ za PROPRANOLOL (cm/s) |          |          |          |          |          |
|                                             | S-M                                    |          |          | M-S      |          |          |
| 1. faza                                     | 2,48E-05                               | 3,81E-05 | 3,70E-05 | 1,60E-05 | 2,40E-05 | 3,50E-05 |
| 2. faza                                     | /                                      | /        | /        | /        | /        | /        |
|                                             | STATISTIKA                             |          |          |          |          |          |
|                                             | F-test                                 |          | T-test   |          |          |          |
| 1. faza                                     | 0,753                                  |          | 0,301    |          | NS       |          |

## 6.12 Rosuvastatin

- a) podganje črevo:
- 1. faza: raztopina s 150  $\mu\text{M}$  rosuvastatinom
  - 2. faza: dodamo 1% AGE

**Tabela 15a: Elektrofiziološki parametri,  $P_{\text{app}}$  za FLU in rosuvastatin ter statistični rezultati pri dvofaznem poizkusu na podganjem črevesju.**

|                                             | ELEKTRIKA                               |          |          |                                   |          |          |
|---------------------------------------------|-----------------------------------------|----------|----------|-----------------------------------|----------|----------|
|                                             | S-M                                     |          |          | M-S                               |          |          |
| TEER <sub>povpr</sub> (Ω)                   | 39,00                                   | 51,64    |          | 51,66                             | 54,03    | 35,37    |
| TEP <sub>kon</sub> -TEP <sub>glu</sub> (mV) | -3,10                                   | -3,10    |          | -1,70                             | -2,90    | -2,40    |
| ΔTEP <sub>glu</sub> (mV)                    | -0,80                                   | -1,10    |          | -0,10                             | -1,30    | -1,20    |
| ΔI <sub>sc</sub> (μA)                       | 19,00                                   | 23,00    |          | 1,00                              | 22,80    | 33,60    |
|                                             | P <sub>app</sub> za FLU (cm/s)          |          |          |                                   |          |          |
|                                             | S-M                                     |          |          | M-S                               |          |          |
| 1. faza                                     | 9,41E-06                                | 7,79E-06 | 6,67E-06 | 4,97E-06                          | 4,55E-06 | 3,83E-06 |
| 2. faza                                     | 9,54E-06                                | 8,71E-06 | 9,11E-06 | 3,82E-06                          | 3,45E-06 | 2,20E-06 |
| $\bar{x} \pm \text{SD}$ (1.faza)            | 8,0 ± 1,4 (x 10 <sup>-6</sup> )         |          |          | 4,5 ± 0,6 (x 10 <sup>-6</sup> )   |          |          |
| $\bar{x} \pm \text{SD}$ (2. faza)           | 9,1 ± 0,41 (x 10 <sup>-6</sup> )        |          |          | 3,2 ± 0,085 (x 10 <sup>-6</sup> ) |          |          |
|                                             | P <sub>app</sub> za ROSUVASTATIN (cm/s) |          |          |                                   |          |          |
|                                             | S-M                                     |          |          | M-S                               |          |          |

|                            |                                    |          |          |                                     |          |          |
|----------------------------|------------------------------------|----------|----------|-------------------------------------|----------|----------|
| 1. faza                    | 1,64E-05                           | 1,89E-05 | 1,57E-05 | 4,51E-06                            | 2,70E-06 | 2,59E-06 |
| 2. faza                    | 2,15E-05                           | 2,34E-05 | 2,41E-05 | 4,37E-06                            | 2,96E-06 | 1,35E-06 |
| $\bar{x} \pm SD$ (1.faza)  | 17 $\pm$ 1,7 (x 10 <sup>-6</sup> ) |          |          | 3,3 $\pm$ 1,5 (x 10 <sup>-6</sup> ) |          |          |
| $\bar{x} \pm SD$ (2. faza) | 23 $\pm$ 1,3 (x 10 <sup>-6</sup> ) |          |          | 2,9 $\pm$ 1,5 (x 10 <sup>-6</sup> ) |          |          |
|                            | STATISTIKA                         |          |          |                                     |          |          |
|                            | F-test                             |          | T-test   |                                     |          |          |
| 1. faza                    | 0,592                              |          | 0,000    |                                     | S        |          |
| 2 .faza                    | 0,890                              |          | 0,000    |                                     | S        |          |
| S-M (AGE)                  | 0,799                              |          | 0,008    |                                     | S        |          |
| M-S (AGE)                  | 0,672                              |          | 0,742    |                                     | NS       |          |

- b) Caco-2 celična linija:      - 1. faza: raztopina s 50  $\mu\text{M}$  rosuvastatinom  
                                              - 2. faza: dodamo 1% AGE

**Tabela 15b: Elektrofiziološki parametri,  $P_{\text{app}}$  za FLU in rosuvastatin ter statistični rezultati pri dvofaznem poizkusu na Caco-2 celicah.**

|                            |                                         |          |          |                                     |          |          |
|----------------------------|-----------------------------------------|----------|----------|-------------------------------------|----------|----------|
|                            | POVPREČEN UPOR                          |          |          |                                     |          |          |
|                            | BL-AP                                   |          |          | AP-BL                               |          |          |
| TEER <sub>povpr</sub> (Ω)  | 865,87                                  | 839,88   | 704,58   | 765,06                              | 816,19   | 641,70   |
|                            | P <sub>app</sub> za FLU (cm/s)          |          |          |                                     |          |          |
|                            | BL-AP                                   |          |          | AP-BL                               |          |          |
| 1. faza                    | 1,53E-07                                | 1,64E-07 | 2,26E-07 | 8,09E-08                            | 5,74E-08 | 1,06E-07 |
| 2. faza                    | 1,48E-07                                | 1,99E-07 | 2,56E-07 | 7,97E-08                            | 2,12E-07 | 1,49E-07 |
| $\bar{X} \pm SD$ (1.faza)  | 0,18 ± 0,040 (x 10 <sup>-6</sup> )      |          |          | 0,081 ± 0,024 (x 10 <sup>-6</sup> ) |          |          |
| $\bar{X} \pm SD$ (2. faza) | 0,20 ± 0,054 (x 10 <sup>-6</sup> )      |          |          | 0,15 ± 0,066 (x 10 <sup>-6</sup> )  |          |          |
|                            | P <sub>app</sub> za ROSUVASTATIN (cm/s) |          |          |                                     |          |          |
|                            | BL-AP                                   |          |          | AP-BL                               |          |          |
| 1. faza                    | 6,54E-06                                | 6,26E-06 | 7,08E-06 | 7,00E-08                            | 7,00E-08 | 7,00E-08 |
| 2. faza                    | 5,11E-06                                | 4,51E-06 | 4,50E-06 | 9,33E-08                            | 9,33E-08 | 9,33E-08 |
| $\bar{X} \pm SD$ (1.faza)  | 6,6 ± 0,41 (x 10 <sup>-6</sup> )        |          |          | /                                   |          |          |
| $\bar{X} \pm SD$ (2. faza) | 4,7 ± 0,35 (x 10 <sup>-6</sup> )        |          |          | /                                   |          |          |
|                            | STATISTIKA                              |          |          |                                     |          |          |
|                            | F-test                                  |          | T-test   |                                     |          |          |
| BL-AP (AGE)                | 0,825                                   |          | 0,004    |                                     | S        |          |

### 6.13 Sildenafil

- a) podganje črevo:                      - 1. faza: raztopina s 100  $\mu\text{M}$  sildenafilom  
                                                      - 2. faza: dodamo 1% AGE

**Tabela 16a: Elektrofiziološki parametri,  $P_{\text{app}}$  za FLU in sildenafil (100  $\mu\text{M}$ ) ter statistični rezultati pri dvofaznem poizkusu na podganjem črevesju.**

|                                    |                  |       |       |       |       |       |
|------------------------------------|------------------|-------|-------|-------|-------|-------|
|                                    | <b>ELEKTRIKA</b> |       |       |       |       |       |
|                                    | S-M              |       |       | M-S   |       |       |
| TEER <sub>povpr</sub> ( $\Omega$ ) | 26,82            | 26,38 | 24,12 | 35,06 | 35,22 | 22,50 |

|                                             |                                       |          |          |                                 |          |          |
|---------------------------------------------|---------------------------------------|----------|----------|---------------------------------|----------|----------|
| TEP <sub>kon</sub> -TEP <sub>glu</sub> (mV) | -2,90                                 | -3,20    | -2,00    | -1,90                           | -3,20    | -1,40    |
| ΔTEP <sub>glu</sub> (mV)                    | -1,00                                 | -0,80    | -1,20    | -0,60                           | -1,20    | -0,30    |
| ΔI <sub>sc</sub> (μA)                       | 36,90                                 | 17,70    | 51,00    |                                 | 34,60    | 9,10     |
|                                             | P <sub>app</sub> za FLU (cm/s)        |          |          |                                 |          |          |
|                                             | S-M                                   |          |          | M-S                             |          |          |
| 1. faza                                     | 9,29E-06                              | 6,19E-06 | 6,51E-06 | 7,59E-06                        | 4,84E-06 | 9,09E-06 |
| 2. faza                                     | 9,27E-06                              | 8,57E-06 | 6,76E-06 | 6,04E-06                        | 4,44E-06 | 1,02E-05 |
| $\bar{x} \pm SD$ (1.faza)                   | 7,3 ± 1,7 (x 10 <sup>-6</sup> )       |          |          | 7,2 ± 2,2 (x 10 <sup>-6</sup> ) |          |          |
| $\bar{x} \pm SD$ (2. faza)                  | 8,2 ± 1,3 (x 10 <sup>-6</sup> )       |          |          | 7,0 ± 3,0 (x 10 <sup>-6</sup> ) |          |          |
|                                             | P <sub>app</sub> za SILDENAFIL (cm/s) |          |          |                                 |          |          |
|                                             | S-M                                   |          |          | M-S                             |          |          |
| 1. faza                                     | 2,25E-05                              | 2,24E-05 | 2,11E-05 | 1,17E-05                        | 1,03E-05 | 1,18E-05 |
| 2. faza                                     | 1,36E-05                              | 2,06E-05 | 1,61E-05 | 1,37E-05                        | 1,17E-05 | 2,25E-05 |
| $\bar{x} \pm SD$ (1. faza)                  | 22 ± 0,78 (x 10 <sup>-6</sup> )       |          |          | 11 ± 3,0 (x 10 <sup>-6</sup> )  |          |          |
| $\bar{x} \pm SD$ (2. faza)                  | 17 ± 3,6 (x 10 <sup>-6</sup> )        |          |          | 11 ± 5,7 (x 10 <sup>-6</sup> )  |          |          |
|                                             | STATISTIKA                            |          |          |                                 |          |          |
|                                             | F-test                                |          | T-test   |                                 |          |          |
| 1. faza                                     | 0,901                                 |          | 0,000    |                                 | S        |          |
| 2. faza                                     | 0,542                                 |          | 0,239    |                                 | NS       |          |
| S-M (AGE)                                   | 0,092                                 |          | 0,067    |                                 | NS       |          |
| M-S (AGE)                                   | 0,483                                 |          | 0,235    |                                 | NS       |          |

b) podganje črevo:

- 1. faza: raztopina s 150  $\mu$ M sildenafilom
- 2. faza: dodamo 1% AGE
- 3. faza: dodamo 200  $\mu$ M verapamila

**Tabela 16b: Elektrofiziološki parametri, P<sub>app</sub> za FLU in sildenafil (150  $\mu$ M) ter statistični rezultati pri trofaznem poizkusu na podganjem črevesju.**

|                                             |                  |           |          |          |          |          |
|---------------------------------------------|------------------|-----------|----------|----------|----------|----------|
|                                             | <b>ELEKTRIKA</b> |           |          |          |          |          |
|                                             | S-M              |           |          | M-S      |          |          |
| TEER <sub>povpr</sub> ( $\Omega$ )          | 48,43            | 22,58     | 45,04    | 47,01    | 40,48    | 33,73    |
| TEP <sub>kon</sub> -TEP <sub>glu</sub> (mV) | -3,50            | -3,40     | -2,40    | -4,00    | -2,20    | -3,80    |
| $\Delta$ TEP <sub>glu</sub> (mV)            | -1,60            | -1,70     | -0,30    | -0,40    | -0,40    | -0,20    |
| $\Delta I_{sc}$ ( $\mu$ A)                  | 16,00            | -1,00     | 3,00     | 11,00    | 4,50     | 3,30     |
| <b>P<sub>app</sub> za FLU (cm/s)</b>        |                  |           |          |          |          |          |
|                                             | S-M              |           |          | M-S      |          |          |
| 1. faza                                     | 8,15E-06         | 6,80E-06  | 3,23E-06 | 5,59E-06 | 4,52E-06 | 1,95E-05 |
| 2. faza                                     | 1,47E-05         | 1,25E-05  | 8,19E-06 | 9,20E-06 | 7,97E-06 | 1,87E-05 |
| 3. faza                                     | 1,76E-05         | 1,36E-05  | 1,97E-05 | 5,59E-06 | 1,17E-05 | 1,57E-05 |
| <b>P<sub>app</sub> za SILDENAFIL (cm/s)</b> |                  |           |          |          |          |          |
|                                             | S-M              |           |          | M-S      |          |          |
| 1. faza                                     | 1,40E-05         | 1,47E-05  | 7,06E-06 | 9,81E-06 | 1,40E-05 | 2,09E-05 |
| 2. faza                                     | 2,39E-05         | 1,31E-05  | 1,25E-05 | 6,52E-06 | 1,03E-05 | 1,78E-05 |
| 3. faza                                     | 2,00E-05         | -1,87E-05 | 4,46E-05 | 1,60E-05 | 1,32E-05 | 9,85E-06 |
| <b>STATISTIKA</b>                           |                  |           |          |          |          |          |
|                                             | F-test           |           | T-test   |          |          |          |

|           |       |       |    |
|-----------|-------|-------|----|
| 1. faza   | 0,895 | 0,998 | NS |
| 2. faza   | 0,893 | 0,378 | NS |
| 3. faza   | 0,060 | 0,936 | NS |
| S-M (AGE) | 0,603 | 0,359 | NS |
| S-M (Ver) | 0,226 | 0,224 | NS |
| M-S (AGE) | 0,688 | 0,942 | NS |
| M-S (Ver) | 0,449 | 0,714 | NS |

## 6.14 Valsartan

- a) podganje črevo:
- 1. faza: raztopina s 100  $\mu$ M valsartanom
  - 2. faza: dodamo 1% AGE

**Tabela 17a: Elektrofiziološki parametri,  $P_{app}$  za FLU in valsartan (100  $\mu$ M) ter statistični rezultati pri dvofaznem poizkusu na podganjem črevesju.**

|                                             | ELEKTRIKA                            |          |          |                                  |          |          |
|---------------------------------------------|--------------------------------------|----------|----------|----------------------------------|----------|----------|
|                                             | S-M                                  |          |          | M-S                              |          |          |
| TEER <sub>povpr</sub> (Ω)                   | 28,16                                | 24,17    | 18,28    | 33,58                            | 25,20    | 22,97    |
| TEP <sub>kon</sub> -TEP <sub>glu</sub> (mV) | -3,50                                | -4,60    | -4,50    | -0,60                            | -2,70    | -2,70    |
| ΔTEP <sub>glu</sub> (mV)                    | -2,50                                | -1,70    | -0,60    | -1,60                            | -1,90    | -1,70    |
| ΔI <sub>sc</sub> (μA)                       | 73,50                                | 0,00     | 0,00     | 56,00                            | 73,60    | 70,00    |
|                                             | P <sub>app</sub> za FLU (cm/s)       |          |          |                                  |          |          |
|                                             | S-M                                  |          |          | M-S                              |          |          |
| 1. faza                                     | 1,16E-05                             | 1,14E-05 | 1,83E-05 | 3,07E-06                         | 3,36E-06 | 8,53E-06 |
| 2. faza                                     | 1,13E-05                             | 1,35E-05 | 1,37E-05 | 1,88E-06                         | 3,75E-06 | 8,75E-06 |
| $\bar{X} \pm SD$ (1.faza)                   | 14 ± 3,9 (x 10 <sup>-6</sup> )       |          |          | 5,0 ± 3,1 (x 10 <sup>-6</sup> )  |          |          |
| $\bar{X} \pm SD$ (2. faza)                  | 13 ± 1,3 (x 10 <sup>-6</sup> )       |          |          | 4,8 ± 3,6 (x 10 <sup>-6</sup> )  |          |          |
|                                             | P <sub>app</sub> za VALSARTAN (cm/s) |          |          |                                  |          |          |
|                                             | S-M                                  |          |          | M-S                              |          |          |
| 1. faza                                     | 7,20E-06                             | 7,60E-06 | 1,21E-05 | 1,74E-06                         | 1,71E-06 | 3,32E-06 |
| 2. faza                                     | 7,61E-06                             | 1,09E-05 | 1,33E-05 | 1,79E-06                         | 3,84E-06 | 5,23E-06 |
| $\bar{X} \pm SD$ (1.faza)                   | 9,0 ± 2,7 (x 10 <sup>-6</sup> )      |          |          | 2,3 ± 0,10 (x 10 <sup>-6</sup> ) |          |          |
| $\bar{X} \pm SD$ (2. faza)                  | 10 ± 2,9 (x 10 <sup>-6</sup> )       |          |          | 3,6 ± 1,7 (x 10 <sup>-6</sup> )  |          |          |
|                                             | STATISTIKA                           |          |          |                                  |          |          |
|                                             | F-test                               |          | T-test   |                                  |          |          |
| 1. faza                                     | 0,206                                |          | 0,015    |                                  | S        |          |
| 2. faza                                     | 0,531                                |          | 0,023    |                                  | S        |          |
| S-M (AGE)                                   | 0,943                                |          | 0,512    |                                  | NS       |          |
| M-S (AGE)                                   | 0,441                                |          | 0,293    |                                  | NS       |          |

- b) podganje črevo:
- 1. faza: raztopina s 100  $\mu\text{M}$  valsartanom (polovica celic brez AGE, polovica z AGE)
  - 2. faza: dodamo 200  $\mu\text{M}$  verapamila

**Tabela 17b: Elektrofiziološki parametri,  $P_{\text{app}}$  za FLU in valsartan ter statistični rezultati pri dvofaznem poizkusu na podganjem črevesju (prispevek Pgp prenašalca).**

|                                             | ELEKTRIKA                            |          |          |          |                                 |          |          |
|---------------------------------------------|--------------------------------------|----------|----------|----------|---------------------------------|----------|----------|
|                                             | S-M                                  |          |          |          |                                 |          |          |
|                                             | z AGE                                |          |          |          | brez AGE                        |          |          |
| TEER <sub>povpr</sub> (Ω)                   | 35,45                                | 25,01    | 29,58    | 55,26    | 40,23                           | 27,13    | 22,87    |
| TEP <sub>kon</sub> -TEP <sub>glu</sub> (mV) | -2,10                                | -0,60    | -1,10    | -0,60    | -1,70                           | -0,90    | -0,30    |
| ΔTEP <sub>glu</sub> (mV)                    | -0,20                                | 0,00     | -0,10    | -0,20    | -0,50                           | -0,10    | -0,60    |
| ΔI <sub>sc</sub> (μA)                       | 4,80                                 | 0,40     | 0,50     | 7,60     | 5,30                            | 3,00     | 22,60    |
|                                             | P <sub>app</sub> za FLU (cm/s)       |          |          |          |                                 |          |          |
|                                             | S-M                                  |          |          |          |                                 |          |          |
|                                             | z AGE                                |          |          |          | brez AGE                        |          |          |
| 1. faza                                     | 1,04E-05                             | 7,09E-06 | 1,01E-05 | 7,98E-06 | 2,23E-05                        | 1,41E-05 | 1,89E-05 |
| 2. faza                                     | 8,95E-06                             | 1,17E-05 | 6,49E-06 | 8,92E-06 | 9,16E-06                        | 9,18E-06 | 1,38E-05 |
|                                             | P <sub>app</sub> za VALSARTAN (cm/s) |          |          |          |                                 |          |          |
|                                             | S-M                                  |          |          |          |                                 |          |          |
|                                             | z AGE                                |          |          |          | brez AGE                        |          |          |
| 1. faza                                     | 1,20E-05                             | 7,55E-06 | 1,26E-05 | 9,11E-06 | 1,42E-05                        | 8,30E-06 | 8,78E-06 |
| 2. faza                                     | 9,64E-06                             | 1,35E-05 | 6,91E-06 | 8,72E-06 | 7,23E-06                        | 1,10E-05 | 1,14E-05 |
| $\bar{x} \pm \text{SD}$ (2. faza)           | 9,7 ± 2,8 (x 10 <sup>-6</sup> )      |          |          |          | 9,9 ± 2,3 (x 10 <sup>-6</sup> ) |          |          |
|                                             | STATISTIKA                           |          |          |          |                                 |          |          |
|                                             | F-test                               |          | T-test   |          |                                 |          |          |
| S-M (AGE)                                   | 0,260                                |          | 0,150    |          | NS                              |          |          |
| S-M (Ver) brez AGE                          | 0,208                                |          | 0,491    |          | NS                              |          |          |
| S-M (Ver) z AGE                             | 0,722                                |          | 0,105    |          | NS                              |          |          |

- c) podganje črevo:
- 1. faza: raztopina s 100  $\mu\text{M}$  valsartanom
  - 2. faza: dodamo 50  $\mu\text{M}$  benzbromarona

**Tabela 17c: Elektrofiziološki parametri,  $P_{\text{app}}$  za FLU in valsartan ter statistični rezultati pri dvofaznem poizkusu na podganjem črevesju (prispevek MRP2 prenašalca).**

|                                             | ELEKTRIKA                      |          |          |
|---------------------------------------------|--------------------------------|----------|----------|
|                                             | S-M                            |          |          |
| TEER <sub>povpr</sub> ( $\Omega$ )          | 54,63                          | 51,70    |          |
| TEP <sub>kon</sub> -TEP <sub>glu</sub> (mV) | -1,90                          | -1,10    |          |
| $\Delta\text{TEP}_{\text{glu}}$ (mV)        | -0,20                          | -0,20    |          |
| $\Delta I_{\text{sc}}$ ( $\mu\text{A}$ )    | 4,20                           | 3,80     |          |
|                                             | $P_{\text{app}}$ za FLU (cm/s) |          |          |
|                                             | S-M                            |          |          |
| 1. faza                                     | 1,26E-05                       | 1,78E-05 | 1,52E-05 |

|                            |                                      |          |          |
|----------------------------|--------------------------------------|----------|----------|
| 2. faza                    | 8,37E-06                             | 1,01E-05 | 8,92E-06 |
|                            | P <sub>app</sub> za VALSARTAN (cm/s) |          |          |
|                            | S-M                                  |          |          |
| 1. faza                    | 8,62E-06                             | 1,06E-05 | 1,02E-05 |
| 2. faza                    | 5,91E-06                             | 5,37E-06 | 6,59E-06 |
| $\bar{X} \pm SD$ (2. faza) | 6,0 ± 0,60 (x 10 <sup>-6</sup> )     |          |          |
|                            | STATISTIKA                           |          |          |
|                            | F-test                               | T-test   |          |
| S-M (BB)                   | 0,518                                | 0,005    | S        |

- d) Caco-2 celična linija:
- 1. faza: raztopina s 100  $\mu$ M valsartanom
  - 2. faza: dodamo 1% AGE
  - 3. faza: dodamo 600  $\mu$ M verapamila

**Tabela 17d: Elektrofiziološki parametri, P<sub>app</sub> za FLU in valsartan ter statistični rezultati pri trofaznem poizkusu na Caco-2 celicah (prispevek Pgp prenašalca).**

|                            | POVPREČEN UPOR                       |          |          |                                      |           |          |
|----------------------------|--------------------------------------|----------|----------|--------------------------------------|-----------|----------|
|                            | BL-AP                                |          |          | AP-BL                                |           |          |
| TEER <sub>povpr</sub> (Ω)  | 932,22                               | 1003,84  | 731,48   | 1043,80                              | 962,34    | 814,91   |
|                            | P <sub>app</sub> za FLU (cm/s)       |          |          |                                      |           |          |
|                            | BL-AP                                |          |          | AP-BL                                |           |          |
| 1. faza                    | 1,01E-07                             | 7,72E-08 | 8,04E-08 | 2,85E-08                             | 4,22E-08  | 3,76E-08 |
| 2. faza                    | 1,22E-07                             | 1,22E-07 | 1,50E-07 | 3,48E-08                             | -1,20E-08 | 8,00E-09 |
| 3. faza                    | -6,73E-08                            | 3,06E-07 | 3,14E-07 | 8,97E-08                             | 3,41E-08  | 1,98E-07 |
| $\bar{x} \pm SD$ (1.faza)  | 0,086 ± 0,013 (x 10 <sup>-6</sup> )  |          |          | 0,036 ± 0,0070 (x 10 <sup>-6</sup> ) |           |          |
| $\bar{x} \pm SD$ (2. faza) | 0,13 ± 0,017 (x 10 <sup>-6</sup> )   |          |          | 0,021 ± 0,019 (x 10 <sup>-6</sup> )  |           |          |
|                            | P <sub>app</sub> za VALSARTAN (cm/s) |          |          |                                      |           |          |
|                            | BL-AP                                |          |          | AP-BL                                |           |          |
| 1. faza                    | 6,23E-07                             | 7,01E-07 | 6,30E-07 | 2,09E-07                             | 2,03E-07  | 2,25E-07 |
| 2. faza                    | 1,34E-06                             | 1,33E-06 | 1,23E-06 | 4,28E-07                             | 4,08E-07  | 4,55E-07 |
| 3. faza                    | 9,64E-07                             | 9,69E-07 | 1,34E-06 | 7,22E-07                             | 4,54E-07  | 5,91E-07 |
| $\bar{x} \pm SD$ (1.faza)  | 0,65 ± 0,043 (x 10 <sup>-6</sup> )   |          |          | 0,21 ± 0,011 (x 10 <sup>-6</sup> )   |           |          |
| $\bar{x} \pm SD$ (2. faza) | 1,3 ± 0,061 (x 10 <sup>-6</sup> )    |          |          | 0,43 ± 0,024 (x 10 <sup>-6</sup> )   |           |          |
|                            | STATISTIKA                           |          |          |                                      |           |          |
|                            | F-test                               |          | T-test   |                                      |           |          |
| 1. faza                    | 0,127                                |          | 0,000    |                                      | S         |          |
| 2 .faza                    | 0,259                                |          | 0,000    |                                      | S         |          |
| 3. faza                    | 0,557                                |          | 0,027    |                                      | S         |          |
| BL-AP (AGE)                | 0,670                                |          | 0,000    |                                      | S         |          |
| BL-AP (Ver)                | 0,306                                |          | 0,003    |                                      | S         |          |
| AP-BL (AGE)                | 0,372                                |          | 0,000    |                                      | S         |          |
| AP-BL (Ver)                | 0,130                                |          | 0,519    |                                      | NS        |          |

- e) Caco-2 celična linija:      - 1. faza: raztopina s 100  $\mu\text{M}$  valsartanom  
                                              - 2. faza: dodamo 50  $\mu\text{M}$  benzbromarona

**Tabela 17e: Elektrofiziološki parametri,  $P_{\text{app}}$  za FLU in valsartan ter statistični rezultati pri dvofaznem poizkusu na Caco-2 celicah (prispevek MRP2 prenašalca).**

|                                    | POVPREČEN UPOR                       |          |          |
|------------------------------------|--------------------------------------|----------|----------|
|                                    | BL-AP                                |          |          |
| TEER <sub>povpr</sub> ( $\Omega$ ) | 537,20                               | 479,64   | 509,44   |
|                                    | $P_{\text{app}}$ za FLU (cm/s)       |          |          |
|                                    | BL-AP                                |          |          |
| 1. faza                            | 1,12E-07                             | 1,34E-07 | 9,38E-08 |
| 2. faza                            | 7,22E-08                             | 1,46E-07 | 1,85E-07 |
| $\bar{x} \pm \text{SD}$ (1.faza)   | $0,11 \pm 0,020 \times 10^{-6}$      |          |          |
| $\bar{x} \pm \text{SD}$ (2. faza)  | $0,13 \pm 0,057 \times 10^{-6}$      |          |          |
|                                    | $P_{\text{app}}$ za VALSARTAN (cm/s) |          |          |
|                                    | BL-AP                                |          |          |
| 1. faza                            | 5,29E-07                             | 4,20E-07 | 4,64E-07 |
| 2. faza                            | 2,29E-07                             | 2,64E-07 | 2,80E-08 |
| $\bar{x} \pm \text{SD}$ (1.faza)   | $0,47 \pm 0,055 (x 10^{-6})$         |          |          |
| $\bar{x} \pm \text{SD}$ (2. faza)  | $0,17 \pm 0,13 (x 10^{-6})$          |          |          |
|                                    | STATISTIKA                           |          |          |
|                                    | F-test                               | T-test   |          |
| BL-AP (BB)                         | 0,314                                | 0,021    | S        |

## 6.15 Zbrani rezultati

Rezultate povprečnih vrednosti in standardnih deviacij permeabilnostnih koeficientov ( $P_{app}$  x  $10^{-6}$  cm/s) vseh poizkusov smo zbrali in prikazali v sledečih sedmih tabelah. Vrstni red tabel sledi tudi vrstnemu redu razlagi rezultatov v poglavju Diskusija. Z ND (non-detectable) smo označili primere, kjer koncentracije učinkovin na akceptorskih straneh nismo mogli detektirati.

**Tabela 18a: Permeabilnostni koeficienti FLU v M-S/AP-BL smeri pred (ref) in po dodatku AGE (AGE) skozi podganje črevo in Caco-2 celice.** (V tabeli so zbrani rezultati le za poizkuse izvedene z Ringerjevim pufrom z enakim pH na mukozni/apikalni in serozni/bazolateralni strani (7,4/7,4)).

| učinkovina        | M-S        |             |    | AP-BL          |               |    |
|-------------------|------------|-------------|----|----------------|---------------|----|
|                   | ref        | AGE         |    | ref            | AGE           |    |
| atenolol          | 9,0 ± 4,4  | 5,5 ± 1,7   | NS | 0,10 ± 0,021   | 0,11 ± 0,014  | NS |
| digoksin (100 µM) | 10 ± 3,7   | 9,3 ± 5,0   | NS | 0,39 ± 0,40    | 0,55 ± 0,60   | NS |
| digoksin (20 µM)  |            |             |    | 0,088 ± 0,0037 | 0,057 ± 0,071 | NS |
| finasterid        | 2,0 ± 1,5  | 2,1 ± 0,84  | NS |                |               |    |
| furosemid         | 3,1 ± 0,48 | 3,2 ± 0,40  | NS | 0,30 ± 0,045   | 0,25 ± 0,13   | NS |
| glibenklamid      | 7,3 ± 2,5  | 5,9 ± 1,4   | NS |                |               |    |
| glipizid          | 3,4 ± 2,4  | 4,1 ± 2,2   | NS | 0,15 ± 0,059   | 0,24 ± 0,076  | NS |
| hidroklorotiazid  | 4,6 ± 1,7  | 4,6 ± 0,21  | NS | 0,14 ± 0,031   | 0,19 ± 0,077  | NS |
| losartan          | 4,6 ± 1,6  | 9,0 ± 4,2   | NS | 0,049 ± 0,013  | 0,12 ± 0,11   | NS |
| pravastatin       | 11 ± 2,4   | 11 ± 1,8    | NS |                |               |    |
| prazosin          | 9,6 ± 1,6  | 10 ± 4,4    | NS |                |               |    |
| rosuvastatin      | 4,5 ± 0,6  | 3,2 ± 0,085 | NS | 0,081 ± 0,024  | 0,15 ± 0,066  | NS |
| sildenafil        | 7,2 ± 2,2  | 7,0 ± 3,0   | NS |                |               |    |
| valsartan         | 5,0 ± 3,1  | 4,8 ± 3,6   | NS | 0,036 ± 0,0070 | 0,021 ± 0,019 | NS |

**Tabela 18b: Pasivna membranska permeabilnost preučevanih učinkovin v M-S/AP-BL smeri pred (ref) in po dodatku AGE (AGE) skozi podganje črevo in Caco-2 celice (pH Ringerjevega pufra 7,4/7,4).**

| učinkovina       | M-S        |            |    | AP-BL         |               |    |
|------------------|------------|------------|----|---------------|---------------|----|
|                  | brez AGE   | z AGE      |    | brez AGE      | z AGE         |    |
| atenolol         | 4,4 ± 2,1  | 4,9 ± 0,50 | NS | 0,53 ± 0,12   | 0,92 ± 0,057  | S  |
| digoksin         | 3,2 ± 1,4  | 2,4 ± 1,8  | NS | 7,1 ± 0,90    | 11 ± 0,80     | S  |
| finasterid       | 2,3 ± 1,1  | 1,8 ± 0,50 | NS |               |               |    |
| furosemid        | 2,8 ± 0,80 | 2,3 ± 0,30 | NS | 7,1 ± 0,65    | 12 ± 0,79     | S  |
| glibenklamid     | 1,8 ± 0,70 | 2,8 ± 1,2  | NS | 18 ± 0,80     | 21,8 ± 3,7    | NS |
| glipizid         | 10 ± 6,2   | 17 ± 8,7   | NS | 4,7 ± 0,40    | 7,5 ± 1,3     | S  |
| hidroklorotiazid | 7,3 ± 1,6  | 6,5 ± 1,4  | NS | 0,60 ± 0,0095 | 0,83 ± 0,0068 | S  |
| losartan         | 3,3 ± 1,0  | 4,0 ± 0,40 | NS | 0,22 ± 0,027  | 0,41 ± 0,037  | S  |
| pravastatin      | 6,3 ± 0,10 | 14 ± 3,5   | S  |               |               |    |

|              |            |           |    |              |              |   |
|--------------|------------|-----------|----|--------------|--------------|---|
| prazosin     | 7,3 ± 1,8  | 10 ± 2,9  | NS |              |              |   |
| rosuvastatin | 3,3 ± 1,5  | 2,9 ± 1,5 | NS | ND           | ND           |   |
| sildenafil   | 11 ± 3,0   | 11 ± 5,7  | NS |              |              |   |
| valsartan    | 2,3 ± 0,10 | 3,6 ± 1,7 | NS | 0,21 ± 0,011 | 0,43 ± 0,024 | S |

**Tabela 18c: Permeabilnost Pgp substratov v S-M/BL-AP smeri v primerjavi z M-S/AP-BL pred (ref) in po dodatku AGE (AGE) ter v S-M/BL-AP pred (ref) in po dodatku AGE (AGE) skozi podganje črevo (PČ) in Caco-2 celični monosloj (C) (pH Ringerjevega pufra 7,4/7,4).**

| učinkovina       |    | ref          |            | a  | AGE           |             | b  | c  |
|------------------|----|--------------|------------|----|---------------|-------------|----|----|
|                  |    | M-S/AP-BL    | S-M/BL-AP  |    | M-S/AP-BL     | S-M/BL-AP   |    |    |
| digoksin         | PČ | 3,2 ± 1,4    | 21 ± 5,6   | /  | 2,4 ± 1,8     | 20,6 ± 13,1 | /  | /  |
|                  | C  | 7,1 ± 0,90   | 19 ± 1,9   | S  | 11 ± 0,8      | 37 ± 4,0    | S  | S  |
| hidroklorotiazid | PČ | 7,3 ± 1,6    | 12 ± 4,3   | NS | 6,5 ± 1,4     | 13 ± 4,2    | S  | NS |
|                  | C  | 0,60 ± 0,095 | 1,1 ± 0,26 | S  | 0,83 ± 0,0068 | 3,7 ± 0,20  | S  | S  |
| glipizid         | PČ | 10 ± 6,2     | 19 ± 6,7   | NS | 17 ± 8,7      | 22 ± 2,6    | NS | NS |
|                  | C  | 4,7 ± 0,40   | 7,3 ± 0,90 | S  | 7,5 ± 1,3     | 8,3 ± 0,70  | NS | NS |
| glibenklamid     | PČ | 1,8 ± 0,70   | 18 ± 3,4   | S  | 2,8 ± 1,2     | 22 ± 4,3    | S  | NS |
|                  | C  | 18,1 ± 0,80  | 46 ± 7,5   | S  | 21 ± 3,7      | 24 ± 7,6    | NS | S  |

a:  $P_{app}$  učinkovin v S-M/BL-AP smeri v primerjavi s  $P_{app}$  v M-S/AP-BL smeri pred dodatkom AGE

b:  $P_{app}$  učinkovin v S-M/BL-AP smeri v primerjavi s  $P_{app}$  v M-S/AP-BL smeri po dodatku AGE

c:  $P_{app}$  učinkovin v S-M/BL-AP smeri pred dodatkom AGE v primerjavi s  $P_{app}$  v S-M/BL-AP po dodatku AGE

**Tabela 18d: Permeabilnost Pgp in MRP2 substratov, v S-M/BL-AP pred (ref) in po dodatku AGE (AGE) skozi podganje črevo in Caco-2 celični monosloj (pH Ringerjevega pufra 7,4/7,4)**

| učinkovina  | S-M       |            |    | BL-AP        |             |   |
|-------------|-----------|------------|----|--------------|-------------|---|
|             | ref       | AGE        |    | ref          | AGE         |   |
| furosemid   | 20 ± 7,5  | 19 ± 10    | NS | 0,25 ± 0,068 | 0,50 ± 0,20 | S |
| losartan    | 15 ± 3,3  | 23 ± 3,3   | S  | 3,7 ± 0,19   | 7,7 ± 0,60  | S |
| pravastatin | 10 ± 2,8  | 13 ± 2,0   | NS |              |             |   |
|             | 12 ± 0,20 | 15,4 ± 1,2 | S  |              |             |   |
| valsartan   | 9,0 ± 2,7 | 10 ± 2,9   | NS | 0,65 ± 0,043 | 1,3 ± 0,061 | S |

| učinkovina  | inhibitor (na podganjem črevesju) |    |            |   |
|-------------|-----------------------------------|----|------------|---|
|             | S-M (Ver)                         |    | S-M (BB)   |   |
| furosemid   | 9,4 ± 2,7                         | NS | 5,1 ± 0,50 | S |
| losartan    | 19 ± 1,7                          | NS |            |   |
| pravastatin |                                   |    | 5,8 ± 2,1  | S |
|             | 9,4 ± 2,8                         | S  |            |   |
| valsartan   | 9,7 ± 2,8                         | NS | 6,0 ± 0,60 | S |

**Tabela 18e: Permeabilnost učinkovine prazosin (Pgp in BCRP substrat) v S-M pred (ref) in po dodatku AGE (AGE) skozi podganje črevo (pH Ringerjevega pufra 7,4/7,4)**

| učinkovina | S-M      |          |    |
|------------|----------|----------|----|
|            | ref      | AGE      |    |
| prazosin   | 22 ± 4,4 | 34 ± 7,8 | NS |

**Tabela 18f: Permeabilnost BCRP substrata rosuvastatina v S-M/BL-AP pred (ref) in po dodatku AGE (AGE) skozi podganje črevo in Caco-2 celični monosloj (pH Ringerjevega pufra 7,4/7,4)**

| učinkovina   | S-M      |          |   | BL-AP      |            |   |
|--------------|----------|----------|---|------------|------------|---|
|              | ref      | AGE      |   | ref        | AGE        |   |
| rosuvastatin | 17 ± 1,7 | 23 ± 1,3 | S | 6,6 ± 0,41 | 4,7 ± 0,35 | S |

**Tabela 18g: Vpliv AGE na absorptivna prenašalca (MCT1, OATP): M-S permeabilnost pred (ref) in po dodatku AGE (AGE) skozi podganji jejunum ter po dodatku inhibitorjev (CHC, DIDS) ob prisotnosti AGE (pH Ringerjevega pufra 6,5/7,4)**

| učinkovina  | M-S        |          |   | inhibitor  |   |
|-------------|------------|----------|---|------------|---|
|             | ref        | AGE      |   | DIDS + CHC |   |
| pravastatin | 6,3 ± 0,10 | 14 ± 3,5 | S | 10 ± 0,0   | S |

## 7 DISKUSIJA

### 7.1 Vpliv AGE na tesne stike

FLU je fluorescentno barvilo z dvema ionizirajočima funkcionalnima skupinama; karboksilno (pKa 4.36) in fenolno (pKa 6.38) skupino (96). Pri poizkusih skozi podganje tanko črevo in Caco-2 celične kulture smo na obeh staneh tkiv oz. celic uporabili Ringerjev pufer pH 7.4. Pri teh pogojih se FLU nahaja predvsem v obliki dvojnega aniona. To pomeni, da je njegova transcelularna permeabilnost zanemarljivo majhna v primerjavi s paracelularno permeabilnostjo skozi tesne stike. Zaradi navedenega, se FLU v *in vitro* poizkusih permeabilnosti skozi podganje črevo ali celične kulture lahko uporablja kot marker integritete tesnih stikov. Poškodba ali odpiranje tesnih stikov zaradi toksičnosti preučevane substance ali slabe vitalnosti uporabljenega modela permeabilnosti bo tako imelo za posledico povišanje permeabilnosti FLU (11).

Po rezultatih, zbranih v Tabeli 18a v tem diplomskem delu po dodatku 1 v/v % AGE na mukozno/apikalno stran nismo na podganjem črevesju kot tudi ne na Caco-2 celicah opazili signifikatnega povišanje permeabilnosti FLU v M-S/AP-BL smeri, kar sočasno z nespremenjenimi vrednostmi transepitelne električne upornosti kaže na to, da staran česnov ekstrakt v uporabljeni koncentraciji nima vpliva na tesne stike.

### 7.2 Pasivna membranska permeabilnost

Preiskovane učinkovine smo izbrali tako, da smo zajeli vse razrede BCS klasifikacije s širokim razponom vrednosti faktorjev absorpcije ( $F_{abs}$ ). Kjer v literaturi nismo dobili podatka o  $F_{abs}$ , smo namesto tega upoštevali biološko uporabnost (BU) (Tabela 2).

Permeabilnost učinkovin smo določali v obeh smereh: v AP-BL oz. M-S ( $P_{app}$  (AP-BL/M-S)) in BL-AP oz. S-M smeri ( $P_{app}$  (BL-AP/S-M)). PDR (permeability directional ratio) je razmerje definirano kot kvocient med  $P_{app}$  (BL-AP/S-M) ter  $P_{app}$  (AP-BL/M-S) in se uporablja za napovedovanje potencialnih interakcij preučevanih učinkovin s celičnimi efluksnimi prenašalci. Snovi, ki prehajajo membrane le s pasivno difuzijo, naj bi imele podobne vrednosti permeabilnostnih koeficientov v obe smeri in zato PDR vrednosti okoli 1. Za učinkovine, ki pa imajo afiniteto do efluksnih prenašalcev in se aktivno prenašajo iz

celic, pa je  $P_{app}$  (BL-AP/S-M) večji kot  $P_{app}$  (AP-BL/M-S) in tako PDR vrednosti večje od 1. Za snovi s PDR vrednostmi večjimi od 2, lahko z zagotovostjo predvidevamo, da interagirajo z efluksnimi prenašalci (97). Pasivno membransko permeabilnost v M-S/AP-BL smeri smo preučevali za učinkovine, ki niso predmet aktivnega transporta.

### **7.2.1 Pasivna membranska permeabilnost izbranih učinkovin v M-S smeri skozi podganje črevo ob prisotnosti AGE**

M-S permeabilnosti testiranih učinkovin, določene skozi podganje tanko črevo v Ringerjevem pufru pH 7.4 na mukozni in serozni strani, se signifikantno niso spremenile ob prisotnosti 1 v/v% AGE na mukozni strani v primerjavi z referenčnimi permeabilnostmi, določenimi pri enakih pogojih. Izjema je le inhibitor HMG-CoA reduktaze pravastatin, čigar permeabilnost v M-S smeri je po dodatku staranega česnovnega ekstrakta signifikantno narasla (Tabela 18b).

Vzrok za povišanje permeabilnosti pravastatina je lahko posledica sprememb v sestavi ali fluidnosti membrane. Na podlagi naših *in vitro* meritev permeabilnosti in izsledkov kliničnih študij, ki so pokazale, da lahko uživanje AGE vodi v znižanje nivoja lipidov in holesterola, lahko v primeru pravastatina sklepamo, da bo sočasno uživanje te učinkovine z AGE oz. morebiti tudi z drugimi česnovnimi prehranskimi dodatki prišlo do farmakodinamskih interakcij poleg farmakokinetičnih, torej do višjih plazemskih koncentracij pravastatina kot tudi do sinergističnega ali aditivnega inhibitornega učinka na HMG-CoA reduktazo.

Na podlagi izmerjenih permeabilnosti v referenčni fazi in ob prisotnosti staranega česnovnega ekstrakta smo pokazali, da na permeabilnost učinkovin z visoko topnostjo in visoko permeabilnostjo (I. razred po BCS klasifikaciji) kot je prazosin, prisotnost AGE nima vpliva na M-S permeabilnost. Majhne spremembe M-S permeabilnosti visoko permeabilnih učinkovin namreč nimajo signifikantnih vplivov na koncentracijski profil učinkovine v človeški plazmi, kar so dokazali tudi drugi (55). Podobno bi lahko pričakovali tudi za propranolol, ki je visoko permeabilna učinkovina. V nasprotju pa povišanje permeabilnosti nizko permeabilnih učinkovin ali učinkovin z nizkim  $F_{abs}$  (razred

III, IV) ob prisotnosti hrane oz. v našem primeru AGE bi lahko pomenilo povišanje deleža absorbirane učinkovine in posledično morebitne presežene maksimalne terapevtske plazemske koncentracije učinkovine, nad katerimi se lahko pojavijo neželeni učinki. Ker smo pri našem delu opazili, da se M-S permeabilnost FLU po dodatku staranega česnovega ekstrakta ni signifikantno spremenila, smo sklepali, da morebitno povišanje permeabilnosti učinkovin v smeri absorpcije ni posledica odpiranja tesnih stikov in povišanja paracelularne permeabilnosti, temveč je najverjetneje posledica spremenjene fluidnosti ali sestave membrane.

### **7.2.2 Pasivna membranska permeabilnost izbranih učinkovin v AP-BL smeri v prisotnosti AGE skozi Caco-2 celični monosloj**

V nasprotju z rezultati na podganjem črevesju so AP-BL permeabilnosti istih testiranih učinkovin skozi Caco-2 celični monosloj signifikantno porasle (Tabela 18b) v prisotnosti AGE za vse preiskovane učinkovine, razen za glibenklamid, katerega permeabilnost se ni statistično signifikantno spremenila. Ta učinkovina je glede na BCS klasifikacijo nizko permeabilna in sodi v razred IV po BCS klasifikaciji. Permeabilnost atenolola, ki je prav tako nizko permeabilen standard glede na FDA predpise, pa se je signifikantno zvišala. Iz navedenega lahko sklepamo, da je pasivna permeabilnost v AP-BL smeri odvisna ne le od uporabljenega modela permeabilnosti, temveč tudi od testirane učinkovine in morebiti tudi njene koncentracije.

Signifikantno povišanje absorptivne permeabilnosti v AP-BL smeri skozi Caco-2 celični monosloj za vse učinkovine ne glede na njihovo BCS klasifikacijo razen za že prej omenjen glibenklamid je lahko posledica drugačne sestave in fluidnosti membrane rakaste celične linije v primerjavi s podganjim črevesjem ter višje tesnosti tesnih stikov Caco-2 celičnega monosloja. Caco-2 celice tvorijo zelo tesen monosloj (TEER vrednosti so v območju med 600-800  $\Omega\text{cm}^2$ ) v primerjavi s podganjim tankim črevesjem (TEER vrednosti v območju med 30-40  $\Omega\text{cm}^2$ ) ter imajo drugačno membransko sestavo. Zaradi teh lastnosti so zelo občutljiv oz. neprimeren model za preučevanje vloge različnih aditivov ali solubilizatorjev kot pospeševalcev permeabilnosti. Ker se referenčne povprečne TEER vrednosti pri Caco-2 celicah niso signifikantno razlikovale od povprečnih TEER vrednosti po dodatku AGE, je povišanje permeabilnosti glibenklamida

najverjetneje posledica sprememb v membranski fluidnosti ali njeni sestavi, povzročenimi z AGE. Spremembe permeabilnosti, ki smo jih opazili pri Caco-2 celicah najverjetneje ne odražajo prave situacije in slike *in vivo* učinkov, ki bi zaradi tega lahko vodile v klinično pomembne dogodke, saj enako statistično signifikantnih sprememb v prisotnosti AGE skozi podganje tanko črevo nismo zaznali.

### 7.3 Vpliv AGE na sekretorne prenašalce

Za ugotavljanje vpliva AGE na črevesne sekretorne prenašalce smo izbrali strukturno različne učinkovine, ki se uporabljajo za zdravljenje srčnožilnih bolezni ter sladkorne bolezni.

Glede na različne literaturne vire in naše meritve permeabilnosti izbranih učinkovin v referenčni fazi in ob prisotnosti specifičnih inhibitorjev posameznih sekretornih prenašalcev smo zaključili, da so digoksin, glibenklamid, hidroklorotiazid ne pa tudi glipizid Pgp substrati, medtem ko so furosemid, losartan, pravastatin in valsartan podvrženi intestinalni sekreciji v črevesni lumen s Pgp in MRP2 prenašalcema. Prazosin je substrat za Pgp in BCRP, medtem ko se rosuvastatin izloča samo z BCRP. Atenolol, ki je nizko permeabilni marker, se aktivno ne transportira preko črevesnega tkiva.

Signifikantno višje S-M permeabilnosti v primerjavi z M-S skozi podganji ileum smo opazili pri sildenafilu, kar pomeni, da se učinkovina aktivno izloča v lumen črevesja, vendar pa literatura o prenašalcih, vpletenih v aktivni transport sildenafil v gastrointestinalnem traktu ne poroča. V prisotnosti AGE se permeabilnosti sildenafil v M-S ali S-M smereh nista statistično signifikantno spremenili (Tabela 16a) iz česar smo slepali, da bi bile tudi možne *in vivo* farmakokinetične interakcije nepomembne.

Pri preučevanju permeabilnosti finasterida smo prav tako ugotovili, da statistično signifikantnih razlik med M-S in S-M  $P_{app}$  vrednostmi v referenčni fazi ni in zato sklepali, da v njegov prenos skozi enterocite ni vpletenih sekretorni prenašalcev. Tudi prisotnost AGE ni signifikantno vplivala niti na M-S niti na S-M permeabilnost (Tabela 6a).

Učinkovine II-IV razreda po BCS klasifikaciji, ki so hkrati tudi substrati za efluksne transporterje, smo uporabili za preverjanje hipoteze, ali lahko vpliv AGE na prenašalce

predstavlja tveganje za resne neželene učinke. Nekatere preiskovane učinkovine v tej študiji so bile izbrane tako, da se za dosego terapevtske plazemske koncentracije in učinka morajo aktivno absorbirati skozi črevo zaradi njihove nizke permeabilnosti (razred III in IV) ali topnosti. Hkrati pa so nekatere učinkovine (BCS razred II in IV) pri absorpciji v enterocite podvržene aktivni sekreciji nazaj v črevesni lumen, saj zaradi njihove nizke topnosti na mukozni strani tankega črevesja ne pride do saturacije ali inhibicije efluksnih prenašalcev.

Pri prazosinu, ki je Pgp in BCRP substrat in ga hkrati uvrščamo v I. razred po BCS klasifikaciji, smo opazili signifikantno višje S-M permeabilnosti v primerjavi z M-S skozi podganji ileum že pred dodatkom staranega česnovega ekstrakta. Podganji ileum smo uporabili zato, ker je to tisti segment tankega črevesja z najvišjo BCRP in Pgp ekspresijo. V prisotnosti AGE se je S-M permeabilnost prazosina sicer povišala, vendar ta sprememba ni bila signifikantna ( $P=0,07$ ), kar prikazuje Tabela 18e. Zaradi visoke topnosti in visoke permeabilnosti prazosina se le-ta hitro raztopi v gastrointestinalnih tekočinah, kjer doseže zadostno visoke koncentracije za nasičenje sekretornih črevesnih prenašalcev. Zato je vpliv intestinalnih sekretornih prenašalcev na biološko uporabnost učinkovin iz BCS razreda I klinično nepomemben ob sočasni aplikaciji substanc, ki modificirajo aktivnost prenašalcev (hrana, česnovi nadomestki itd.). To je pa tudi v skladu z našimi rezultati, saj signifikantnih sprememb nismo zaznali.

### **7.3.1 Pgp substrati**

#### **7.3.1.1 Permeabilnost Pgp substratov v S-M/BL-AP smeri v primerjavi z M-S/AP-BL smerjo skozi podganje črevo in Caco-2 celični monosloj**

Asimetričnost permeabilnosti (t.j. višje S-M/BL-AP  $P_{app}$  kot M-S/AP-BL  $P_{app}$  vrednosti) izbranih učinkovin smo najprej preiskovali v referenčni fazi dvo- ali tro- faznega poizkusa brez prisotnosti AGE (Ref) skozi Caco-2 celični monosloj in podganji ileum. Z uporabo inhibitorja verapamila za Pgp smo dodatno potrdili vlogo tega sekretornega prenašalca v absorptivnih procesih za preiskovane učinkovine.

Permeabilnost Pgp substratov (digoksin, hidroklorotiazid, glibenklamid) in glipizida smo preučevali v referenčni fazi (1.fazi) brez dodanega AGE skozi podganji ileum in Caco-2 celični monosloj. Za vse preiskovane učinkovine smo ugotovili signifikantno višje S-M/BL-AP  $P_{app}$  kot M-S/AP-BL  $P_{app}$  vrednosti, kar potrjuje vpletenost Pgp prenašalca pri aktivni sekreciji teh učinkovin. Le pri glipizidu in hidroklortiazidu smo na podganjem ileumu opazili, da se S-M  $P_{app}$  vrednosti od ustreznih M-S vrednosti ne razlikujejo signifikantno. BL-AP permeabilnosti, ki smo jih izmerili skozi Caco-2 celični monosloj pa so za zgoraj navedene Pgp substrate vse signifikantno višje od ustreznih AP-BL permeabilnosti, kar prikazuje Tabela 18c.

Permeabilnost digoksina in vpliv staranega česnovega ekstrakta na Pgp prenašalec nismo mogli preučevati skozi podganji ileum, saj po podatkih avtorjev Bennet et al v podganjem črevesju poteka obsežen metabolizem digoksina, ki pa ni prisoten oz. je zanemarljivo majhen v črevesju človeka *in vivo*. Ker Caco-2 celična kultura ne izraža metabolnega encima CYP3A4, ki je glavni encim udeležen pri metabolizmu te kardioprotektivne učinkovine, smo permeabilnost digoksina in vpliv AGE na Pgp prenašalce lahko za to učinkovino preučevali le na teh celičnih kulturah, nismo pa upoštevali permeabilnosti digoksina, določene skozi podganji ileum.

#### **7.3.1.2 Permeabilnost Pgp substratov v S-M/BL-AP po dodatku AGE skozi podganji ileum in Caco-2 celični monosloj**

Rezultati dobljeni na Caco-2 celicah za učinkovini digoksin in hidroklorotiazid kažejo na signifikantno povišan efluks s Pgp v prisotnosti AGE ter signifikantno znižan sekretorni transport v primeru glibenklamida. Pri vseh preiskovanih Pgp substratih skozi podganji ileum pa smo ugotovili, da se S-M permeabilnosti sicer povišajo, vendar prisotnost 1 v/v% AGE nima signifikantnega vpliva na Pgp transportno aktivnost. Za antidiabetično učinkovino glipizid, ki ni Pgp substrat, pa nismo opazili sprememb v permeabilnosti tako na podganjem črevesju kot tudi ne na Caco-2 celicah (Tabela 18c).

Zaradi prenizke občutljivosti HPLC analitike je bila 20  $\mu$ M koncentracija digoksina najnižja koncentracija, ki smo jo uporabili v donorskih raztopinah pri Caco-2 celicah, da smo še lahko detektirali merljive koncentracije učinkovine v akceptorski raztopini. Te

koncentracije pa so še vedno signifikantno višje kot so intraluminalne koncentracije digoksina dosežene s terapevtskimi dozami *in vivo* in se nahajajo v nM območju, preračunano na 250 mL vode. Vpliv AGE na Pgp sekrecijo digoksina iz enterocitov v črevesni lumen bi bil lahko v nM območju izrazitejši. Digoksin sam kot inhibitor  $\text{Na}^+\text{-K}^+$ -ATPaze je za enterocite toksična snov, ki preprečuje obnavljanje ATP zaloga v celicah, to pa pomeni tudi nižjo Pgp aktivnost. V nM peroralnih dozah pa je obnavljanje ATP zaloge manj okrnjeno, kar pomeni višji Pgp transport digoksina. Posledično lahko sklepamo, da bi bil *in vitro* tudi vpliv AGE na Pgp bolj izrazit. Za *in vivo* pogoje z nM dozami prisotnost AGE glede na rezultate za digoksin skozi Caco-2 celični monosloj pomeni morebitno signifikantno znižanje plazemskih koncentracij in potencialno odsotnost terapevtskega učinka preučevanega kardiotoničnega glikozida, saj je to učinkovina z ozkim terapevtskim območjem.

V primeru spremljanja vpliva AGE na BL-AP permeabilnost oz. Pgp transport glibenklamida skozi Caco-2 celični monosloj smo nasprotno kot pri ostalih Pgp substratih skozi te celice in skozi podganji ileum opazili signifikantno znižanje permeabilnosti. Glibenklamid je slabo topna učinkovina z visoko permeabilnostjo, o kateri literatura poroča, da deluje tudi kot Pgp inhibitor (22). Ker so Pgp prenašalci pri Caco-2 celični liniji prekomerno izraženi in potencialno tudi drugače regulirani kot Pgp izraženi na nerakastem črevesnem tkivu (60), je vpliv AGE na permeabilnost glibenklamida skozi uporabljeno celično linijo lahko posledica različnih učinkov. Pgp ima 4 vezavna/transportna mesta. Ker je permeabilnost glibenklamida, določena skozi Caco-2 celični monosloj edina, ki se je po dodatku AGE znižala, smo sklepali, da je glibenklamid edina učinkovina iz nabora testiranih Pgp substratov/inhibitorjev, ki se veže na isto Pgp vezavno/transportno mesto kot česnove fitokemikalije. Zaradi kompeticije za isto transportno Pgp mesto so najverjetneje česnove fitokemikalije z višjo afiniteto izpodrinile glibenklamid, kar se je pokazalo kot signifikantno znižanje njegove BL-AP permeabilnosti skozi Caco-2 celični monosloj. S-M permeabilnosti glibenklamida skozi podganji ileum po dodatku AGE ostajajo nespremenjene, kar lahko pripišemo drugačni afiniteti česnovih fitokemikalij in glibenklamida do Pgp transportnih mest na nerakastem tkivu. Morda bi enak učinek kot na Caco-2 celičnem monosloju lahko zaznali, če bi uporabili nižje koncentracije glibenklamida oz. višje koncentracije AGE, kar pa verjetno ne bi odražalo realne *in vivo* pogoje. Če bi torej do enakih efektov česnovih fitokemikalij, kot smo jih zaznali skozi

Caco-2 celični monosloj, prišlo tudi *in vivo*, bi to pomenilo nižji efluks glibenklamida iz enterocitov v lumen in višje plazemske koncentracije tega antidiabetika ter tudi bolj izražen antidiabetični učinek oz. potencialno po presegu maksimalne terapevtske koncentracije neželene učinke. Zaradi antidiabetičnega učinka česnovih prehranskih dodatkov, ki je bil potrjen v nekaterih kliničnih študijah, lahko sklepamo, da bi potencialno lahko prišlo ob sočasni aplikaciji česnovih prehranskih dodatkov in glibenklamida ne le do farmakokinetičnih interakcij pri absorpciji učinkovine iz gastrointestinalnega trakta, temveč tudi do farmakodinamskih interakcij in izrazitejšega zniževanja plazemske koncentracije glukoze.

### 7.3.2 Pgp in MRP2 substrati

Furosemid, losartan, valsartan in pravastatin so v intestinalnem tkivu podvrženi sekreciji iz enterocitov v lumen gastrointestinalnega trakta s Pgp in MRP2 prenašalci. Za določanje vpletenosti sekretornih prenašalcev za vsako izmed preiskovanih učinkovin smo izvedli poizkuse na ileumu (z najvišjo ekspresijo Pgp) in duodenumu (z najvišjo ekspresijo MRP2) ter v zadnji fazi poizkusa njihovo vlogo pri transportu posamične učinkovine potrdili z uporabo Pgp (Ver) ali MRP2 (BB) inhibitorjev na mukozni oz. apikalni strani.

Glede na naše rezultate (Tabela 18d) lahko trdimo, da je v aktivni transport furosemida vpleten pretežno MRP2, Pgp pa ima le manjši vpliv, saj smo po dodatku BB zaznali signifikantno znižanje efluksa furosemida, v primeru Ver pa je bila sprememba permeabilnosti furosemida v S-M smeri nesignifikantna. Permeabilnost valsartana smo sprva spremljali skozi podganji ileum in duodenum. S pomočjo benzbromarona in verapamila smo ugotovili, da je MRP2 tisti sekretorni prenašalec s signifikantnim prispevkom k S-M permeabilnosti te učinkovine. V primeru losartana smo skozi Caco-2 celice opazili signifikantno znižanje S-M/BL-AP permeabilnosti ob prisotnosti Pgp inhibitorja Ver in tako sklepali, da je pri transportu te substance vloga MRP2 manj pomembna kot je vloga Pgp prenašalca. Oba transporterja, MRP2 in Pgp pa participirata enakovredno pri efluksu pravastatina, saj je po dodatku obeh inhibitorjev prišlo do signifikantnega znižanja efluksa.

### 7.3.2.1 Permeabilnost Pgp in MRP2 substratov v S-M/BL-AP po dodatku AGE skozi podganje tanko črevo in Caco-2 celični monosloj

Po dodatku AGE na mukozno stran podganjega tankega črevesja smo opazili nesignifikantne S-M spremembe permeabilnosti MRP2 substratov furosemida in valsartana. V nasprotju pa je bil porast efluksa losartana in pravastatina po dodatku AGE signifikanten. Pri uporabi Caco-2 celičnih kultur pa smo opazili, da se permeabilnosti za vse testirane učinkovine po dodatku AGE na apikalno stran signifikantno zvišajo, kar je prikazano v Tabeli 18d.

Diuretik furosemid, je učinkovina, ki sodi v IV razred BCS klasifikacije po FDA smernicah in izkazuje relativno nizko biološko uporabnost (61%). Čeprav smo opazili signifikatno povišanje njegove sekrecije po dodatku AGE skozi Caco-2 celični monosloj, vpliva AGE na njegovo permeabilnost skozi podganje tanko črevo nismo zaznali. Zato lahko sklepamo, da interakcij med česnovimi pripravki in furosemidom po peroralni sočasni aplikaciji najverjetneje ne bo, ne moremo pa izključiti, da do potencialnih interakcij z MRP2 prenašalci ne bo prišlo v hepatocitih, kjer poteka metabolizem furosemida (62) in je MRP2 prenašalec pomemben pri njegovem transportu v žolč in enterohepatični cirkulaciji.

Antagonista angiotenzina II, valsartan in losartan, imata zaradi obsežnega metabolizma v jetrih in enterohepatičnega kroženja BU nižjo od 40%. Zaradi signifikantnega povišanja S-M/BL-AP permeabilnosti losartana skozi podganji duodenum in obeh učinkovin skozi Caco-2 celični monosloj v prisotnosti AGE, lahko sklepamo da bo pri absorpciji losartana iz gastrointestinalnega trakta prišlo do sprememb  $F_{abs}$ . Ker so Pgp in MRP2 prenašalci prisotni tudi v jetrih, kjer poteka obsežen metabolizem obeh modelnih substanc, ima lahko sočasna aplikacija AGE tako kot v primeru furosemida pomemben vpliv na jetrne prenašalce in/ali encime. Pgp in MRP2 jetrni prenašalci omogočajo sekrecijo substratov iz hepatocitov v plazmo oz. v žolč, s čimer se intrahepatične koncentracije teh učinkovin znižujejo, to pa pomeni tudi spremenjen metabolizem oz. plazemski profil tako učinkovine kot njenega metabolita ter možne *in vivo* klinične manifestacije.

Tudi pravastatin je učinkovina, ki se slabo absorbira ( $F_{abs}$  približno 30%). Signifikantno povečanje aktivnega transporta pravastatina z MRP2 in Pgp iz enterocitov v gastrointestinalni lumen z AGE, lahko kot že omenjeno zgoraj vodi v znižanje  $F_{abs}$  ter

podobne učinke kot pri antagonistih angiotenzina v jetrih. Vendar pa znižanje koncentracije inhibitorjev HMG-CoA reduktaze v jetrih nima le vpliva na plazemski profil teh učinkovin, temveč tudi na farmakodinamsko delovanje. Mesto delovanja statinov so jetra, kjer zavirajo HMG-CoA reduktazo. Nižje intracelularne koncentracije, ki bi bile potencialno dosežene ob sočasni aplikaciji AGE, pa pomenijo nižji oz. nezadostni terapevtski učinek in potencialni slabši lipidogram. Ker AGE klinično dokazano zmanjšuje simptome arterioskleroze, za kar so statini običajno predpisani, omenjen aspekt možnih interakcij na nivoju jetrnih prenašalcev in encimov v primeru statinov potrebuje nadaljnje raziskave.

### 7.3.3 BCRP substrati

Preučevali smo tudi vpliv AGE na permeabilnost BCRP substrata rosuvastatina z nizkim  $F_{abs}$ . Pri spremljanju permeabilnosti tega statina skozi podganji ileum in Caco-2 celični monosloj smo opazili, da ima AGE nasprotujoči si vpliv na BCRP prenašalce izražene v ileumu in Caco-2 celicah. Medtem ko se je po dodatku AGE S-M permeabilnost rosuvastatina skozi podganji ileum signifikantno povišala, smo pri celičnih kulturah opazili signifikantno znižanje BL-AP permeabilnosti (Tabela 18f).

Pri rakastih celičnih linijah so avtorji (Taipalensuu, Törnblom, Lindberg et al.) (98) opazili znižano BCRP ekspresijo v primerjavi z normalnimi celicami. Različna ekspresija in celična funkcija BCRP sta zato lahko vzrok za različno regulacijo BCRP v malignih celicah v primerjavi z normalnimi, s čimer lahko tudi razjasnimo nasprotujoče si rezultate permeabilnosti rosuvastatina. Rezultati, pridobljeni za rosuvastatin na podganjem ileumu, so najverjetneje bolj fiziološko relevantni kot tisti, pridobljeni na Caco-2 celicah, zato lahko na nivoju absorpcije ob sočasni aplikaciji AGE z rosuvastatinom pričakujemo nižjo frakcijo absorbirane učinkovine.

Pomembno pa je tudi, da se 90% peroralno aplicirane doze rosuvastatina izloči v nespremenjeni obliki z žolčem in fecesom, torej ima jetrni metabolizem rosuvastatina manjšo vlogo pri eliminaciji te učinkovine in je nizka BU rosuvastatina (20%) dejansko posledica nizke permeabilnosti in signifikantnega efluksa z BCRP. Dodatno povišan efluks rosuvastatina v prisotnosti AGE opažen skozi podganji ileum v tem diplomskem delu pa lahko dodatno pomeni zmanjšanje BU in morda tudi izgubo terapevtskega učinka rosuvastatina.

## 7.4 Vpliv AGE na absorptivne membranske prenašalce

Poleg sekretornih prenašalcev so za nekatere učinkovine pomembni tudi absorptivni prenašalci. Zlasti hidrofilne učinkovine zaradi svoje vodotopnosti težko pasivno difundirajo skozi fosfolipidni dvosloj enterocitov. Za doseganje ustreznih plazemskih koncentracij, ki že zagotavljajo terapevtski učinek, pa potrebujejo te učinkovine dodatne mehanizme, ki jim olajšajo prehod gastrointestinalne membrane. Fiziološko absorptivni prenašalci v črevesju omogočajo absorpcijo za organizem pomembnih hranil kot so peptidi, monokarboksilne kisline (L-laktat, butirat, acetoacetat, idr.), organski anioni. Učinkovine, ki posnemajo strukturne lastnosti naravnih substratov za absorptivne prenašalce, se lahko prenašajo aktivno v smeri absorpcije in s tem dosegajo višjo biološko uporabnost in terapevtski učinek. V naši diplomski nalogi smo preučevali dva pomembna absorptivna prenašalca; MCT1, odgovoren za absorpcijo ketonskih teles in monokarboksilnih spojin ter OATP, organski anionski transportirajoči polipeptid. Aktivnost obeh prenašalcev je pH odvisna. MCT1 prenašalci omogočajo olajšano difuzijo monokarboksilnih substratov skupaj s protonom brez porabe ATP. OATP pa omogočajo od natrija neodvisen transmembranski prenos. Da bi zagotovili take pogoje kot so *in vivo* v gastrointestinalnem traktu, smo vpliv AGE na omenjena prenašalca opazovali tako, da smo na mukozno stran podganjega tankega črevesja aplicirali kisel Ringerjev pufer s pH 6.5, medtem ko smo na serozni strani ohranili Ringerjev pufer pH 7.4.

Kot modelno učinkovino samo uporabili pravastatin, ki se aktivno absorbira z OATP in MCT1 prenašalcema. M-S permeabilnost pravastatina skozi podganji jejunum je pri danih pogojih po dodatku AGE na mukozno stran tkiva signifikatno narasla. V potrditev, da je vzrok za opažen porast permeabilnosti pravastatina v prisotnosti AGE, povišana aktivnost obeh prenašalcev, smo v tretji fazi poizkusa na mukozno stran aplicirali 0,5 mM CHC (MCT1 inhibitor) in 0,5 mM DIDS (OATP inhibitor). Kombinacija obeh inhibitorjev je povzročila signifikantno znižanje permeabilnosti pravastatina. Zaključili smo, da se aktivnost obeh preiskovanih prenašalcev OATP in MCT1 signifikantno poveča ob prisotnosti AGE (Tabela 18g)

## 8 SKLEP

Ugotovili smo, da se permeabilnosti fluoresceina kot markerja integritete tesnih stikov po dodatku 1 v/v % AGE na mukozno/apikalno stran niso signifikatno povišale v M-S/AP-BL smeri, kar sočasno z nespremenjenimi vrednostmi transepitelne električne upornosti kaže na to, da staran česnov ekstrakt nima vpliva na tesne stike. Morebitna sprememba permeabilnosti učinkovin v smeri absorpcije in sekrecije tako ni posledica odpiranje tesnih stikov, temveč je najverjetneje posledica spremenjene fluidnosti ali sestave membrane in/ali aktivnosti prenašalcev.

Pasivna membranska permeabilnosti vseh testiranih učinkovin skozi podganje tanko črevo se signifikantno niso spremenile ob prisotnosti 1 v/v% AGE na mukozni strani (izjema pravastatin), katerega sprememba permeabilnosti je najverjetneje posledica sprememb fluidnosti ali sestave membrane, povzročenimi z AGE.

Rezultati preučevanja pasivne membranske permeabilnosti na Caco-2 celicah so si nasprotni z rezultati pridobljenimi na podganjem črevesju. Pasivna permeabilnost v smeri absorpcije je odvisna od uporabljenega modela permeabilnosti, testirane učinkovine in tudi njene koncentracije. Spremembe AP-BL permeabilnosti, ki smo jih opazili pri Caco-2 celicah najverjetneje ne odražajo prave situacije in slike *in vivo* učinkov, ki bi zaradi tega lahko vodile v klinično pomembne dogodke.

Na končno plazemsko koncentracijo učinkovin, ki so substrati tako za sekretorne kot tudi absorptivne prenašalce, bo imel najpomembnejši vpliv tisti prenašalec, ki v največji meri prispeva k permeabilnosti posamezne komponente. Vpliv česnovih fitokemikalij na spremembe plazemskih koncentracij učinkovin, ki so substrati za katerega koli od prenašalcev, ki smo ga vrednotili v tem diplomskem delu, bo torej odvisen od vpliva AGE na tisti prenešalec, čigar spremenjena aktivnost bo v največji meri prispevala k permeabilnosti učinkovine.

V splošnem pride po dodatku 1 v/v% AGE na mukozno/apikalno stran do povečane aktivnosti Pgp in MRP2 v podganjem tankem črevesju in Caco-2 celicah ter povečane aktivnosti BCRP le na podganjem ileumu. Zato lahko sklepamo, da lahko pride do možnih

farmakokinetičnih interakcij med učinkovinami in sočasno administracijo AGE, vendar to zavisi od preiskovane učinkovine, njene uvrstitve v BCS klasifikacijo in afinitete do določenega prenašalca.

Vpliv intestinalnih sekretornih prenašalcev na biološko uporabnost učinkovin iz BCS razreda I je klinično nepomemben, ob sočasni aplikaciji substanc, ki modificirajo aktivnost prenašalcev.

Kjer nismo opazili signifikantnih sprememb sekrecije učinkovin, ki so Pgp in/ali MRP2 substrati, smo sklepali, da interakcij med česnovimi pripravki in učinkovinami po peroralni sočasni aplikaciji najverjetneje ne bo, ne moremo pa izključiti, da do potencialnih interakcij s Pgp ali z MRP2 prenašalci ne bo prišlo v hepatocitih, če tu poteka tudi njihov metabolizem. Kjer je do signifikantnih sprememb prišlo, bi to lahko vodilo do sprememb v količini absorbirane učinkovine in prav tako do potencialnih interakcij v hepatocitih, če poteka tu tudi njihov metabolizem ali so jetra mesto farmakodinamskega delovanja teh učinkovin.

Znižana ekspresija in različna celična funkcija BCRP pri Caco-2 celicah sta lahko vzrok za različno regulacijo BCRP v malignih celicah v primerjavi z normalnimi, s čimer lahko razjasnimo nasprotujoče si rezultate permeabilnosti na teh dveh modelih za učinkovine, ki so BCRP substrati (rosuvastatin).

## 9 LITERATURA

1. Rivlin RS, Historical Perspective on the Use of Garlic. *J Nutr* 2001, vol. 131: 951S-954S
2. Barnes J, Anderson LA, Phillipson JD: Garlic. In: *Herbal medicines*. 3<sup>rd</sup> ed. London Chicago, Pharmaceutical Press 2007, p: 279–89
3. Zhou S, Lim LY, Chowbay B: Herbal modulation of P-glycoprotein. *Drug Metab Rev* 2004, vol. 36: 57-104
4. Foster BC, Arnason JT, Briggs C: Natural health products and drug disposition. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 2005, vol. 45: 203-226
5. Amagase H, Petesch BL, Matsuura H, Kasuga S: Intake of garlic and its bioactive components. *J Nutr* 2001, vol. 131(3): S955–62
6. Valli G, Giardina EGV: Benefits, adverse effects and drug interactions of herbal therapies with cardiovascular effects. *J Am Coll Cardiol* 2002, vol. 39: 1083–1095
7. Lancaster JE, Boland MJ: Flavor biochemistry. In: Brewster JL, Rabinowitch HD, editors: *Onions and allied crops*. Biochemistry Food Science and Minor Crops USA, CRC Press 1989, p: 34–54
8. Whitaker JR: Development of flavor, odor and pungency in onion and garlic. *Adv Foods Res* 22 1976, p: 73-133
9. Jones MG, Hughes J, Tregova A, Milne J, Tomsett AB, Collin HA: Biosynthesis of the flavour precursors of onion and garlic. *J Exp Bot* 2004, vol. 55: 1903–18
10. Holub BJ, Arnott K, Davis JP, Nagpurkar A, Peschell J: Organosulfur compounds from garlic. In: Shi J, Mazza G, Maguer M, editors. *Functional foods, biochemical and processing aspects USA*, CRC Press, 2002, p: 214–31
11. Berginc K, Žakelj S, Uršič D, Kristl A: Aged Garlic Extract Stimulates P-Glycoprotein and Multidrug Resistance Associated Protein 2 Mediated Effluxes. *Biol Pharm Bull* 2009, vol. 32(4): 694–699
12. Corzo-MartínezM, Corzo N, Villamiel M: Biological properties of onions and garlic. *Trends Food Sci Tech* 2007, vol. 18: 609-625
13. Kac J, Mlinarič A: Pomembne interakcije nekaterih zdravilnih rastlin z zdravili. *Zdravstveni vestnik* 2004, vol. 73: 667-71
14. Rahman K, Lowe GM: Garlic and cardiovascular disease: a critical review. *J Nutr* 2006, vol. 136(3): S736–40
15. McKenna DJ, Jones K, Hughes K: *Botanical medicines: The desk reference for major herbal supplements*, 2<sup>nd</sup> edition
16. Zhou S, Gao Y, Jiang W, Huang M, Xu A, Paxton JW: Interactions of herbs with cytochrome P450. *Drug Metab Rev* 2003, vol. 35: 35-98
17. Van den Bout-van den Beukel CJP, Koopmans PP, Van der Ven AJAM: Possible drug-metabolism interactions of medicinal herbs with antiretroviral agents, *Drug Metab Rev* 2006, vol. 38: 477-514
18. Chan LMS, Lowes S, Hirst BH: The ABCs of drug transport in intestine and liver: efflux proteins limiting drug absorption and bioavailability. *J Pharm Sci* 2004, vol. 21: 25-51
19. Šturm K: Vpliv različnih eksperimentalnih pogojev na prehod ciprofloksacina skozi črevo podgane *in vitro*. Diplomsko delo, Univerza v Ljubljani, Fakulteta za farmacijo, Ljubljana, 2004
20. Petzinger E, Geyer J: Drug transporters in pharmacokinetics. *N-S Arch Pharmacol* 2006, vol. 372: 465-475

21. Sauna ZE, Andrus MB, Turner TM, Ambudkar SV: Biological basis of polyvalency as a strategy for enhancing the efficacy of P-glycoprotein (ABCB1) modulators: stipiamide homodimers separated with defined-length spacers reverse drug efflux with greater efficacy. *J Am Chem Soc* 2004, vol. 43(8): 2262-2271
22. Golstein PE, Boom A, Van Geffel J, Jacobs P, Masereel B, Beauwens R: P-glycoprotein inhibition by glibenclamide and related compounds. *Eur J Physiol* 1999, vol. 437: 652-660
23. Beringer PM, Slaughter RL: Transporters and their impact on drug disposition. *Ann Pharmacother* 2005, vol. 39: 1097-1106
24. Moaddel R, Hamid R, Patel S, Bullock PL, Wainer IW: Identification of P-glycoprotein substrates using open tubular chromatography on an immobilized P-glycoprotein column: Comparison of chromatographic results with Caco-2 permeability. *Anal Chim Acta* 2006, vol. 578: 25-30
25. Varma MVS, Sarkar M, Kapoor N, Panchagnula R: pH-dependent functional activity of P-glycoprotein in limiting intestinal absorption of protic drugs. *J Chromatogr B* 2005, vol. 816: 243-249
26. Haimeur A, Conseil G, Deeley RG, Cole SPC: The MRP-Related and BCRP/ABCG2 Multidrug Resistance Proteins: Biology, Substrate Specificity and regulation. *Curr Drug Metab* 2004, vol. 5: 21-53
27. Bakos E, Evers R, Sinkó E, Váradi A, Borst P, Sarkadi B: Interactions of the human multidrug resistance proteins MRP1 and MRP2 with organic anions. *Am Soc Pharm Exp Ther* 2000, vol. 57: 760-768
28. Kunta JR, Sinko PJ: Intestinal drug transporters: *In vivo* function and clinical importance. *Curr Drug Metab* 2004, vol. 5: 109-124
29. Agyralides GG, Dallas PP, Rekkas DM: Development and in vitro evaluation of furosemide transdermal formulations using experimental design techniques. *Int J Pharm* 2004, vol. 281: 35-43
30. Kobayashi D, Nozawa T, Imai K, Nezu J-I, Tsuji A, Tamai I: Involvement of Human Organic Anion Transporting Polypeptide OATP-B (SLC21A9) in pH-Dependent Transport across Intestinal Apical Membrane. *Am Soc Pharm Exp Ther* 2003, vol. 306: 703-708
31. Steffansen B, Nielsen CU, Brodin B, Eriksson AH, Andersen R, Frokjaer S: Intestinal solute carriers: an overview of trends and strategies for improving oral drug absorption. *J Pharm Sci* 2004, vol. 21: 3-16
32. Morris ME, Felmler MA: Overview of the proton-coupled MCT (SLC16A) family of transporters. *AAPS J* 2008, vol. 10(2): 311-321
33. Določevanje vrednosti permeabilnosti koeficienta nekaterih učinkovin in njihova razvrstitev v biofarmacevtski klasifikacijski shemi. Diplomsko delo, Univerza v Ljubljani, Fakulteta za farmacijo, Ljubljana, 2006
34. Volpe DA: Drug permeability studies in regulatory biowaiver applications, In: Ehrhardt C, Kim K-J editors: *Drug absorption studies; in situ, in vitro and in silico models*, Ch. 28
35. Löbenberg R, Amidon GL: Modern bioavailability, bioequivalence and biopharmaceutics classification system. New scientific approaches to international regulatory standards. *Eur J Pharm Biopharm* 2000, vol. 50: 3-12
36. Benet LZ, Amidon GL, Barends DM, Lennernäs H, Polli JE, Shah VP, Stavchansky SA, Yu LX: The use of BDDCS in classifying the permeability of marketed drugs. *Pharm Res* 2008, vol. 52(3): 483-488

37. Blume HH, Schug BS: The biopharmaceutics classification system (BCS): Class III drugs – better candidates for BA/BE waiver?. J Pharm Sci 1999, vol. 9: 117-121
38. Li C, Wainhaus S, Uss AS, Cheng K-C: High-throughput screening using Caco-2 cell and PAMPA systems, In: Ehrhardt C, Kim K-J editors: Drug absorption studies; in situ, in vitro and in silico models, Ch. 18, p: 418-429
39. Lennernäs H: Human intestinal permeability. J Pharm Sci 1998, vol. 87: 403-410
40. Soldner A, Benet LZ, Mutschler E, Christians U: Active transport of the angiotensin-II antagonist losartan and its main metabolite EXP 3174 across MDCK-MDR1 and Caco-2 cell monolayers. Br J Clin Pharmacol 2003, vol. 129: 1235-1243
41. Deferme S, Annaert P, Augustijns P: In vitro screening models to assess intestinal drug absorption and metabolism, In: Ehrhardt C, Kim K-J editors: Drug absorption studies; in situ, in vitro and in silico models, Ch. 8, p: 182-215
42. DeSesso JM, Jacobson CF: Anatomical and physiological parameters affecting gastrointestinal absorption in humans and rats. Food Chem Toxicol 2001, vol. 39: 209-228
43. Šturm K, Levstik L, Demopoulos VJ, Krist A: Permeability characteristics of novel aldose reductaseinhibitors using rat jejunum in vitro. Eur J Pharm Sci 2006, vol. 28: 128-133
44. Tabacova SA, Kimmel CA: Atenolol: pharmacokinetic/dynamic aspects of comparative development toxicity. Reprod Toxicol 2002, vol. 16: 1-7
45. Lennernäs H, Palm K, Fagerholm U, Artursson P: Comparison between active and passive drug transport in human intestinal epithelial (Caco-2) cells in vitro and human jejunum *in vivo*. Int J Pharm 1996, vol. 127: 103-107
46. Varma MVS, Sateesh K, Panchagnula R: Functional Role of P-Glycoprotein in Limiting Intestinal Absorption of Drugs: Contribution of Passive Permeability to P-Glycoprotein Mediated Efflux Transport. Mol Pharmaceut 2005, vol. 2(1): 12-21
47. Kallinteri P, Antimisariis SG: Solubility of drugs in the presence of gelatin: effect of druglipophilicity and degree of ionization. Int Journal Pharm 2001, vol. 221: 219-226
48. Kirby B, Kharasch ED, Thummel KT, Narang VS, Hoffer CJ, Unadka JD: Simultaneous measurement of in vivo P-glycoprotein and cytochrome P450 3A activities. J Clin Pharmacol 2006, vol. 46:1313-1319
49. Fenner KS, Troutman MD, Kempshall S, Cook JA, Ware JA, Smith DA, Lee CA: Drug-drug interactions mediated through P-glycoprotein: Clinical relevance and *in vitro-in vivo* correlation using digoxin as a probe drug. Clin Pharmacol Ther 2009, vol. 85: 173-181
50. Wójcicki M, Drozdziak M, Sulikowski T, Wójcicki J, Gawronska-Szklarz B, Zielinski S, Rózewicka L: Pharmacokinetics of intravenously administered digoxin and histopathological picture in rabbits with experimental bile duct obstruction. Eur J Pharm Sci 2000, vol. 11: 215-222
51. Takara K, Tsujimoto M, Ohnishi N, Yokoyama T: Digoxin up-regulates MDR1 in human colon carcinoma Caco-2 cells. Biochem Bioph Res Co 2002, vol. 292: 190-194
52. Mikkaichi T, Suzuki T, Onogawa T, Tanemoto M, Mizutamari H, Okada M, Chaki T, Masuda S, Tokui T, Eto N, Abe M, Satoh F, Unno M, Hishinuma T, Inui K, Ito S, Goto J, Abe T: Isolation and characterization of digoxin transporter and its rat homologue expressed in the kidney. Proc Natl Acad Sci USA 2004, vol. 101(10): 3569-3574

53. Macek J: Separation of finasteride and analogues. *J Chromatogr B* 2001, vol. 764: 207-215
54. Gormley GJ: Finasteride: a clinical review. *Biomed Pharmacother* 1995, vol. 49: 319-324
55. Wu CY, Benet LZ: Predicting drug disposition via application of BCS: Transport/absorption/elimination interplay and development of a Biopharmaceutical Drug Disposition Classification System. *Pharm Res* 2005, vol. 22 (1): 11 – 23
56. Halestrap AP, Meredith D. The SLC16 gene family - from monocarboxylate transporters (MCTs) to aromatic amino acid transporters and beyond. *Eur J Physiol* 2004, vol. 447: 619-628
57. Gupta N, Martin PM, Miyauchi S, Ananth S, Herdman AV, Martindale RG, Podolsky R, Ganapathy V. Down-regulation of BCRP/ABCG2 in colorectal and cervical cancer. *Biochem Biophys Res Commun* 2006, vol. 343: 571-577
58. Heimeur A, Conseil G, Deeley RG, Cole SPC. The MRP-related and BCRP/ABCG2 multidrug resistance proteins: biology, substrate specificity and regulation. *Curr Drug Metab* 2004, vol. 5: 21-53
59. Anderle P, Huang Y, Sadee W. Intestinal membrane transport of drugs and nutrients: genomics of membrane transporters using expression microarrays. *Eur J Pharm Sci* 2004, vol. 21:17-24
60. Berginc K, Žakelj S, Kristl A: In vitro interactions between aged garlic extract and drugs used for the treatment of cardiovascular and diabetic patients. Under review
61. Agyralides GG, Dallas PP, Rekkas DM: Development and in vitro evaluation of furosemide transdermal formulations using experimental design techniques. *Int J Pharm* 2001, vol. 281: 35-43
62. Yang KH, Choi YH, Lee U, Lee JH, Lee MG: Effects of cytochrome P450 inducers and inhibitors on the pharmacokinetics of intravenous furosemide in rats: involvement of CYP2C11, 2E1, 3A1 and 3A2 in furosemide metabolism. *J Pharm Pharmacol* 2009, vol. 61: 47-54
63. Hasegawa M, Kusuhara H, Adachi M, Schuetz JD, Takeuchi K, Sugiyama Y: Multidrug Resistance-Associated Protein 4 Is Involved in the Urinary Excretion of Hydrochlorothiazide and Furosemide. *J Am Soc Nephrol* 2007, vol. 18: 37-45
64. Löbenberg R, Krämer J, Shah VP, Amidon GL, Dressman JB: Dissolution testing as a prognostic tool for oral drug absorption: Dissolution behavior of glibenclamide. *Pharm Res* 2000, vol. 17(4): 439-444
65. Niopas I, Daftsios AC: A validated high-performance liquid chromatographic method for the determination of glibenclamide in human plasma and its application to pharmacokinetic studies. *J Pharm Biomed Anal* 2002, vol. 28: 653-657
66. Radwan MA, Zaghloul IY, Al-Hadiyah BM, Al-Khamis KI: The influence of fluvoxamine administration on glibenclamide pharmacokinetics after multiple oral dosing in rats. *Saudi Pharm J* 2000, vol. 8(2-3): 116-121
67. Sawada K, Terada T, Saito H, Hashimoto Y, Inui K: Effects of glibenclamide in glycylsarcosine transport by the rat peptide transporters PEPT1 and PEPT2. *Br J Pharmacol* 1999, vol. 1159-1164
68. Balant L, Zahnd G, Gorgia A, Schwarz R, Fabre J: Pharmacokinetics of glipizide in man: Influence of renal insufficiency. *Diabetologia* 1973, vol. 9: 331-338
69. Bussing R, Gende A: Severe hypoglycemia from clarithromycin-sulfonylurea drug interaction. *Diabetes Care* 2002, vol. 25(9):1659-1668
70. Corveleyn S, Remon JP: Bioavailability of hydrochlorothiazide: conventional

- versus freeze-dried tablets. *Int J Pharm* 1998, vol. 173: 149-155
71. Beermann B, Groschinsky-Grind G: Pharmacokinetics of hydrochlorothiazide in patients with congestive heart failure. *Br J Clin Pharmacol* 1979, vol. 7: 579-583
  72. Wong PC, Barnes TB, Chiu AT, Christ DD, Duncia JV, Herblin WF, Timmermans PB: Losartan (DuP 753), An Orally Active Nonpeptide Angiotensin II Receptor Antagonist. *Cardiovasc Drug Rev* 1991, vol. 9(4): 317-339
  73. Lo M-W, Goldberg MR, McCrea JB, Lu H, Furtek CI, Bjornsson TD: Pharmacokinetics of losartan, an angiotensin II receptor antagonist, and its active metabolite EXP3174 in humans. *Clin Pharmacol Ther* 1995, vol. 58: 641-649
  74. McCrea JB, Cribb A, Rushmore T, Osborne B, Gillen L, Lo M-W, Waldman S, Bjornsson T, Spielberg S, Goldberg MR: Phenotypic and genotypic investigations of a healthy volunteer deficient in the conversion of losartan to its active metabolite EXP3174. *Clin Pharmacol Ther* 1999, vol. 65: 348-352
  75. Hatanaka T: Clinical pharmacokinetics of pravastatin. *Clin Pharmacokinet* 2000, vol. 39(6): 397-412
  76. Kyrklund C, Backman JT, Neuvonen M, Neuvonen PJ: Effect of rifampicin on pravastatin pharmacokinetics in healthy subjects. *Br J Clin Pharmacol* 2003, vol. 57(2): 181-187
  77. Kivistö KT, Niemi M: Influence of drug transporter polymorphisms on pravastatin pharmacokinetics in human. *Pharm Res* 2006, vol. 24(2): 239-247
  78. Willwams CD: Clinical decision making on statin drug interactions, *J Am Coll Cardiol* 2003, vol. 42(2): 394-399
  79. Hirano M, Maeda K, Hayashi H, Kusuhashi H, Sugiyama Y: Bile salt export pump (BSEP/ABCB11) can transport a nonbile acid substrate, pravastatin. *J Pharmacol Exp Ther* 2005, vol. 314: 876-882
  80. Akduman B, Crawford ED: Terazosin, doxazosin and prazosin: current clinical experience. *Urology* 2001, vol. 58(suppl 6A): 49-54
  81. Erve JCL, Vashishtha SC, DeMaio W, Talaat RE: Metabolism of prazosin in rat, dog and human liver microsomes and cryopreserved rat and human hepatocytes and characterization of metabolites by liquid chromatography/tandem mass spectrometry. *Drug Metab Dispos* 2007, vol. 35: 908-916
  82. Rautio J, Humphreys JE, Webster LO, Balakrishnan A, Keogh JP, Kunta JR, Serabjit-Singh CJ, Polli JW: In vitro P-glycoprotein inhibition assays for assessment of clinical drug interaction potential of new drug candidates: a recommendation for probe substrates. *Drug Metab Dispos* 2005, vol. 34: 786-792
  83. Wójcicki J, Jaroszynska M, Drozdziak M, Pawlik A, Gawronska-Szklarz B, Sterna R: Comparative pharmacokinetics and pharmacodynamics of propranolol and atenolol in normolipidemic and hyperlipidemic obese subjects. *Biopharm Drug Dispos* 2003, vol. 24: 211-218
  84. Mansur AP, Avakin SD, Paula RS, Donzella H, Santos SRCJ, Ramires JAF: Pharmacokinetics and pharmacodynamics of propranolol in hypertensive patients after sublingual administration: systemic availability. *Braz J Med Biol Res* 1998, vol. 31(5): 691-696
  85. Hamilton KO, Yazdanian MA, Audus KL: Modulation of P-glycoprotein activity in Calu-3 cells using steroids and  $\beta$ -ligands. *Int J Pharm* 2001, vol. 228: 171-179
  86. Lee E, Ryan S, Birmingham B, Zalickowski J, March R, Ambrose H, Moore R, Lee C, Chen Y, Schneck D: Rosuvastatin pharmacokinetics and pharmacogenetics in white and Asian subjects residing in the same environment. *Clin Pharmacol Ther* 2005, vol. 78: 330-341

87. Martin PD, Warwick MJ, Dane AL, Brindley C, Tracy Short T: Absolute Oral Bioavailability of Rosuvastatin in Healthy White Adult Male Volunteers. *Clin Ther* 2003, vol. 25(10): 2553-2563
88. Huang L, Wang Y, Grimm S: ATP-dependent transport of rosuvastatin in membrane vesicles expressing breast cancer resistance protein. *Drug Metab Dispos* 2006, vol. 34: 738-742
89. Martin PD, Kemp J, Dane AL, Warwick MJ, Schneck DW: No effect of rosuvastatin on the pharmacokinetics of digoxin in healthy volunteers. *J Clin Pharmacol* 2002, vol. 42: 1352-1357
90. Wang Y, Chow MS, Zuo Z: Mechanistic analysis of pH-dependent solubility and trans-membrane permeability of amphoteric compounds: Application to sildenafil. *Int J Pharm* 2008, vol. 352: 217-224
91. Muirhead GJ, Rance DJ, Walker DK, Wastall P: Comparative human pharmacokinetics and metabolism of single-dose oral and intravenous sildenafil citrate. *Br J Clin Pharmacol* 2002, vol. 53: 13S-20S
92. Giraldi A, Alm P, Werkström V, Myllymäki L, Wagner G, Andersson KE: Morphological and functional characterisation of a rat vaginal smooth muscle sphincter. *Int J Impot Res* 2002, vol. 14: 271-282
93. Kane GC, Lipsky JJ: Drug-grapefruit juice interactions. *Mayo Clin Proc* 2000, vol. 75: 933-942
94. Flesch G, Müller P, Lloyd P: Absolute bioavailability and pharmacokinetics of valsartan an angiotensin II receptor antagonist, in man. *Eur J Clin Pharmacol* 1997, vol. 52: 115-120
95. Yamashiro W, Maeda K, Hirouchi M, Adachi Y, Hu Z, Sugiyama Y: Involvement of transporters in hepatic uptake and biliary excretion of valsartan, a selective antagonist of the angiotensin II AT<sub>1</sub>-receptor, in humans. *Drug Metab Dispos* 2006, vol. 34: 1247-1254
96. Berginc K, Žakelj S, Levstik L, Uršič D, Albin Kristl A: Fluorescein transport properties across artificial lipid membranes, Caco-2 cell monolayers and rat jejunum. *Eur J Pharm Biopharm* 2007, vol. 66: 281-285
97. Yazdani M, Briggs K, Jankovsky C, Hawi A: The »High solubility« definition of the current FDA guidance on biopharmaceutical classification system may be too strict for acidic drugs. *Pharm Res* 2004, vol. 21(2): 293-299
98. Taipalensuu J, Törnblom H, Lindberg G, Einarsson C, Sjöqvist F, Melhus H, Garberg P, Sjöström B, Lundgren B, Artursson P: Correlation of Gene Expression of Ten Drug Efflux Proteins of the ATP-Binding Cassette Transporter Family in Normal Human Jejunum and in Human Intestinal Epithelial Caco-2 Cell Monolayers. *J Pharmacol Exp Ther* 2001, vol. 299: 164-170
99. Cancer Therapy Evaluation Program, Common Terminology Criteria for Adverse Events, Version 3.0, 2006
100. Forbes B, Shah A, Martin GP, Lansley AB: The human bronchial epithelial cell line 16HBE14o—as a model system of the airways for studying drug transport. *Int J Pharm* 2003, vol. 257: 161-167
101. Constantinides PP, Wasan KM: Lipid Formulation Strategies for Enhancing Intestinal Transport and Absorption of P-Glycoprotein (P-gp) Substrate Drugs: In vitro/In vivo Case Studies. *J Pharm Sci* 2007, vol. 96: 235-248
102. Beyers H, Malan SF, Van der Watt JG, Villiers MM: Structure-Solubility Relationship and Thermal Decomposition of Furosemide. *Drug Dev Ind Pharm* 2000, vol. 26(10): 1077 – 1083

103. Masereel B, Ouedraogo R, Dogrk JM, Antoine MH, Tullio P, Pirottet B, Pochet L, Delarge J, Lebrun P: Synthesis and biological evaluation of sulfonylcyanoguanidines and sulfonamidonitroethylenes as bioisosteres of hypoglycemic sulfonylureas. *Eur J Med Chem* 1997, vol. 32: 453-456
104. Seedher N, Kanojia M: Mechanism of interaction of hypoglycemic agents glimepiride and glipizide with human serum albumin. *Cent Eur J Chem* 2009, vol. 7(1): 96-104
105. Avdeef A, Berger CM, Brownell C: pH-Metric Solubility. 2: Correlationthe Acid-Base Titration andthe Saturation Shake-Flask Solubility-pH Methods. *Pharm Res* 2000, vol. 17(1): 85-89
106. Aungst BJ, Nguyen NH, Bulgarelli JP, Oates-Lenz K: The Influence of Donor and Reservoir Additives on Caco-2 Permeability and Secretory Transportof HIV Protease Inhibitors and other Lipophilic Compounds. *Pharm Res* 2000, vol. 17(10):1175-1180
107. Ohtawa M, Masuda N, Akasaka I, Nakashima A, Ochiai K, Moriyasu M: Cellular uptake of fluvastatin, an inhibitor of HMG-CoA reductase, by rat cultured hepatocytes and human aortic endothelial cells. *Br J Clin Pharmacol* 1999, vol. 47: 383-389
108. Avdeef A: Absorption and Drug Development - Solubility, Permeability, and Charge State, Published by John Wiley & Sons 2003
109. Wang S-R, Chen Y, Wu L-P, Miao W-J, Xiong M-J, Chen C, Zhong Z-R, Ye L-M: Development of predictive quantitative retention-activity relationship models of HMG-CoA reductase inhibitors by biopartitioning micellar chromatography, *J Pharmaceut Biomed* 2008, vol. 46: 243-249
110. Antunes JE, Freitas MP, Cunha EFF, Ramalho TC, Rittner R: In silico prediction of novel phosphodiesterase type-5 inhibitors derived from Sildenafil, Vardenafil and Tadalafil. *Bioorgan Med Chem* 2008, vol. 16: 7599-7606
111. Habtemariam B, Sallas W, Sunkara G, Kern S, Jarugula V, Pillai G: Population Pharmacokinetics of Valsartan in Pediatrics. *Drug Metab Pharmacokinet* 2009, vol. 24(2): 145-152