

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FRAMACIJO

SANJA FEMIĆ

**IDENTIFIKACIJA PRENAŠALCEV RALOKSIFENA IN NJEGOVIH
METABOLITOV TER BAZEDOKSIFENA NA MEMBRANAH CELIC
TRANSFECIRANIH S PRENAŠALNIMI PROTEINI**

**IDENTIFICATION OF RALOXIFENE AND ITS METABOLITES
AND BAZEDOXIFENE TRANSPORTER PROTEINS EXPRESSED
ON CELL MEMBRANES**

Ljubljana, 2010

Diplomsko naložbo sem opravljala na Fakulteti za farmacijo, na Katedri za biofarmacijo in farmakokinetiko, pod mentorstvom prof. dr. Aleša Mrharja in somentorstvom asist. dr. Jurija Trontlja.

Izjava

Izjavljam, da sem diplomsko naložbo izdelala samostojno pod vodstvom mentorja prof. dr. Aleša Mrharja in somentorja asist. dr. Jurija Trontlja.

Sanja Femić

Predsednik diplomske komisije: prof. dr. Samo Kreft, mag. farm.

Članica diplomske komisije: doc. dr. Barbara Ostanek, mag. farm.

Ljubljana, oktober 2010

KAZALO VSEBINE

1 UVOD	5
1.1 Osteoporoza	5
1.1.1 Oblike osteoporoze	7
1.1.2 Diagnoza	8
1.1.3 Zdravljenje	9
1.2 SERM – selektivni modulatorji estrogenskih receptorjev	9
1.2.1 Raloksifen	10
1.2.2 Bazedoksifen	15
1.3 Prenašalni proteini	20
1.3.1 ABC prenašalni proteini	20
1.3.2 <i>In vitro</i> modeli za preučevanje prenašalnih proteinov	26
2 NAMEN DELA	27
3 MATERIALI IN METODA	28
3.1 Materiali	28
3.2 Metoda	29
3.3 Eksperimentalni del	30
3.3.1 Postopek	31
3.3.2 Kontrolni postopek	35
3.4 Analiza podatkov	39
4 REZULTATI IN RAZPRAVA	41
4.1 Poskusi na kontrolnih membranah	41
4.1.1 Raloksifen	41
4.1.2 M1	42
4.1.3 M2	43
4.1.4 M3	44
4.1.5 Bazedoksifen	45
4.2 Poskusi na membranah z izraženim prenašalnim proteinom	46
4.2.1 Raloksifen	46
4.2.2 M1	49
4.2.3 M2	52
4.2.4 M3	55
4.2.5 Bazedoksifen	58
4.3 Povzetek vseh rezultatov	61
5 SKLEP	63
6 LITERATURA	64

POVZETEK

Raloksifen in bazedoksifen spadata v skupino selektivnih modulatorjev estrogenih receptorjev (SERM), ki se uporablajo za zdravljenje in preprečevanje pomenopavzne osteoporoze, raloksifen pa tudi za preprečevanje raka dojk. Pri terapiji z raloksifensom so opazili pomembne interindividualne razlike v plazemskih koncentracijah raloksifena in njegovih metabolitov. Vzrok za to bi lahko iskali v prisotnosti in variabilnosti prenašalnih proteinov in metabolnih encimov v kompleksni presnovi raloksifena. Ker je bazedoksifen strukturno zelo podoben raloksifenu, predvidevamo, da tudi pri njem prihaja do velikih interindividualnih razlik in da imajo prenašalni proteini podoben vpliv. V dosedanjih raziskavah so že ugotovili, da sta tako raloksifen kot bazedoksifen substrata za P-gp (ang. »P-glycoprotein«), vendar pa še niso preučili vpliva P-gp na metabolite raloksifena, niti vpliva ostalih prenašalnih proteinov na farmakokinetiko bazedoksifena, raloksifena in njegovih metabolitov. Prenašalni proteini ABC (ang. »ATP binding cassette«) družine imajo v primeru nekaterih učinkov zelo velik vpliv na plazemske koncentracije in posledično na farmakološko delovanje ter pojavljanje neželenih učinkov. Namen naše naloge je bil ugotoviti vpliv prenašalnih proteinov na nizko absolutno biološko uporabnost. V raziskavi smo uporabili membranske pripravke iz insektnih celic predhodno transfeiranih z bakulovirusi kot vektorjem za vnos gena za prenašalne proteine. Te celice so transfeirane z geni za enega od transmembranskih proteinov iz družine ABC, in sicer so to P-gp, BCRP (ang. breast cancer resistance protein), MRP1 (ang. multidrug resistance-associated protein), MRP2 in MRP3 prenašalni proteini.

Ti prenašalni proteini za prenos substrata iz celice potrebujejo energijo, ki jo pridobijo s hidrolizo ATP, pri čemer se sprosti anorganski fosfat (Pi), ki ga lahko določimo s kolorimetrično reakcijo. Količina sproščenega Pi je sorazmerna z aktivnostjo prenašalnega proteina. Iz naših rezultatov smo poskušali tudi okvirno oceniti vrednost IC₅₀ in s tem sklepati o intenziteti interakcij med substrati in prenašalnimi proteini.

Na podlagi naših rezultatov lahko potrdimo, da sta raloksifen in bazedoksifen substrata za P-gp in ker se P-gp nahaja v jetrih, tankem črevesu in kolonu, lahko sklepamo, da ima ta prenašalni protein vlogo pri njuni nizki biološki uporabnosti. Nadalje, iz naših rezultatov vidimo, da bi raloksifen-6,4'-diglukuronid lahko bil substrat za P-gp in MRP1. Pri MRP3 membranah je prišlo do velike variabilnosti podatkov, zato ne moremo zagotovo trditi, ali so raloksifen, raloksifen-6-glukuronid, raloksifen-4'-glukuronid ali bazedoksifen substrati za ta prenašalni protein.

Membrane transfeciranih sf9 celic s prenašalnimi proteini so orodje, ki se uporablja le za pridobivanje preliminarnih podatkov o tem, ali neka substanca stopa v interakcijo s prenašalnim proteinom ali ne, in približno intenziteto te interakcije. Gre za zelo enostaven model za študije prenašalnih proteinov, zato moramo za potrditev opažanj uporabiti kompleksnejše *in vitro* modele, kot so npr. celične linije in tkivne rezine. Kljub temu bodo rezultati te naloge koristni za načrtovanje in razlago nadalnjih raziskav transporta in metabolizma raloksifena in bazedoksifena.

ABECEDNI SEZNAM OKRAJŠAV

ABC	ATP kasetni prenašalci (ang. »ATP binding cassette«)
ATP	adenozin trifosfat
BMD	mineralna kostna gostota (ang. »bone mineral density«)
BCRP	resistentni protein izoliran pri raku na dojki (ang. »breast cancer resistance protein«)
DMSO	dimetil sulfoksid (ang. »dimethyl sulfoxid«)
DXA	dvoenergetska rentgenska absorpciometrija (ang. dual energy X-ray absorptiometry)
FDA	agencija za zdravila in prehrano (ang. »Food and Drug Administration«)
HNZ	hormonsko nadomestno zdravljenje
M1	metabolit raloksifena: raloksifen-6-glukuronid
M2	metabolit raloksifena: raloksifen-4'-glukuronid
M3	metabolit raloksifena: raloksifen-6,4'-diglukuronid
MRP	družina proteinov povezanih z resistenco na več spojin (ang. »multidrug resistance-associated protein«)
P-gp ali MDR1	P-glikoprotein (ang. »multi drug resistance protein« ali »P-glycoprotein«)
PTH	parathormon
SERM	selektivni modulatorji estrogenskih receptorjev (ang. »Selective Estrogen Receptor Modulator«)
TSEC	ang. »Tissue – Selective Estrogen Complexes«
UGT	uridindifosfat glukuronozil transferaza (ang. »UDP-glucuronyl transferase«)

1 UVOD

1.1 *Osteoporoza*

Osteoporoza je sistemski skeletni bolezen, za katero je značilno stanje znižane kostne gostote in spremenjene mikroarhitekture kostnega tkiva s povečano nevarnostjo zlomov zaradi krhkih kosti. Že majhna obremenitev lahko povzroči zlom. Najpogostejsa mesta, kjer se pojavijo zlomi, so kolk, zapestje in hrbtenica (vretenca). Svetovna zdravstvena organizacija je definirala osteoporozo na osnovi merjenja mineralne gostote kosti (BMD, ang. »bone mineral density«), diagnozo pa lahko potrdimo tudi na osnovi že dokazanih osteoporotičnih zlomov. Za osteoporozo označimo zmanjšanje mineralne kostne gostote za 2,5 ali več standardnih deviacij (SD) od največje kostne gostote v zgodnji odrasli dobi, upoštevajoč spol in raso [1].

Pri obeh spolih se po 35. letu starosti začne kostna gostota zmanjševati, vendar pa pri ženskah pride do zelo velike in hitre izgube v prvih desetih letih po menopavzi zaradi sprememb v hormonskem ravnotežju. Pojavnost bolezni je verjetno zato pogostejša pri ženskah, čeprav je vedno več tudi osteoporoze pri moških [3]. Velja, da sta pomanjkanje estrogena v pomenopavzalnem obdobju ter s starostjo povezano porušenje ravnovesja med razgradnjo in izgradnjo kosti najpomembnejša vzroka osteoporoze. Pri ženskah se kasneje v starosti v mehanizme razgradnje kostne mase vpletejo še zvišana koncentracija parathormona, znižana koncentracija kalcitriola in zmanjšana absorpcija kalcija iz črevesa. Za razvoj osteoporoze pri moških je verjetno pomembno postopno zmanjševanje sekrecije androgenov iz testisov in nadledvičnih žlez. Prav tako pa ne smemo zanemariti pomena estrogenov pri razvoju in ohranjanju kostne mase pri moških, ki so zelo verjetno tako pomembni kot androgeni za trdnost kosti [1].

Osteoporoza pa je lahko tudi posledica drugih dejavnikov tveganja kot so prezgodnja menopavza, dedni dejavniki, fizična neaktivnost, prehranjevalne navade (premajhno vnašanje kalcija in pomanjkanje vitamina D), kajenje, prekomerno uživanje alkohola ter zdravljenje z nekaterimi zdravili (glukokortikoidi, tiroksin). Dejavniki tveganja za nastanek osteoporoze so našteti v tabeli številka 1.1. Ker se je signifikantno povečala življenska doba v razvitem svetu, postaja osteoporoza zelo pomemben zdravstveni problem. Število obolelih ocenjujejo kar na petinsedemdeset milijonov. Prav tako

ocenjujejo tudi, da ima do 80. leta starosti osteoporozo vsaka tretja ženska oziroma vsak šesti moški [1,2,3].

Tabela 1.1: Dejavniki tveganja za nastanek osteoporoze [1]

Starost	- dvakratno tveganje za vsako dekado
Endokrini	- prezgodnja menopavza (naravna ali kirurška) - obdobje amenoreje (daljše od 6 mesecev)
Genetski	- zlomi kosti ob manjših poškodbah pri najožjih sorodnikih - bela ali azijska rasa - ženski spol
Življenske navade	- telesna neaktivnost - malo kalcija v prehrani ($< 0,5$ g/dan) - pitje alkohola (> 14 enot/teden) - kajenje
Drugo	- nizka telesna teža (< 59 kg) - kronične bolezni jeter, ledvic, revmatoidni artritis - hipertiroza - zdravila: prednizolon, heparin, antiepileptiki

Osteoporozu je bolezen, ki dolgo poteka brez izrazitih bolezenskih znakov in bolečin. Bolezenska znamenja so predvsem posledica sesedanja vretenc in se najpogosteje kažejo kot bolečine v križu, spremenjena drža telesa in manjša telesna višina. Pri hujših oblikah lahko pride že ob majhnih obremenitvah ali padcih do zlomov kolka ali zapestja [4]. Število zlomov strmo narašča po 75. letu in so razporejeni glede na starost. Zlomi zapestja se običajno pojavljajo med 50. in 60. letom, zlomi vretenc med 60. in 70. letom ter zlomi kolka po 70. letu starosti. Največ je zlomov vretenc, medtem ko so zlomi zapestja in kolka približno enako zastopani. Število osteoporotičnih zlomov je v vseh starostnih obdobjih vsaj enkrat večje pri ženskah kakor pri moških, vendar k temu doprinese tudi to, da je starostna doba žensk daljša. Prav tako pa je pričakovana življenska doba tistih, ki so utrpeli osteoporotični zlom vretenca ali kolka, krajša kakor pri ostalih. Smrtnost po zlomu kolka je 10 – 20 %. Pomembno je tudi, da osteoporozu z zlomi spremeni življenje starejših oseb, ga zaznamuje z izgubo samostojnosti in naredi manj kvalitetnega [1].

1.1.1 Oblike osteoporoze

Osteoporozo ločimo na dve veliki skupini, in sicer na primarno ter sekundarno. Primarna je sicer pogostejsa in nastane po menopavzi oziroma v starosti, vendar pa se zelo redko pojavi pri otrocih, adolescentih, mladih odraslih ter izredno redko v nosečnosti.

Med primarne osteoporoze spadajo naslednje oblike: pomenopavzalna, senilna, juvenilna in nosečnostna osteoporoza. Pomenopavzalna se pojavi pri ženskah med 50. in 70. letom starosti. Za to obliko so značilni kompresijski zlomi vretenc, zlomi reber, medenice, najbolj distalnega dela radiusa in ulne, se pravi tistih kosti, kjer prevladuje trabekularna komponenta. Vzrok za njen nastanek je pomanjkanje estrogena, zaradi česar pride do povečane resorpcije in zmanjšanje tvorbe kosti.

Senilna osteoporoza se pojavlja v visoki starosti nad 70 let, saj je v tem obdobju prenova kosti počasnejša. Zmanjšana je količina trabekularne in tudi kortikalne kosti. Poleg zlomov vretenc in ploščatih kosti se pojavijo tudi zlomi dolgih kosti, predvsem kolka. Zanj je značilno tudi, da se pojavi v večjem številu tudi pri moških. Vzrok te oblike je manjša resorpcija kalcija iz črevesa s posledično zvišano koncentracijo parathormona. Do zmanjšanja resorpcije pride zaradi sprememb na črevesni sluznici in zmanjšane tvorbe aktivne oblike kalcitriola v ledvicah, ki so spremenjene zaradi starosti.

Juvenilna osteoporoza je zelo redka bolezen, pojavi se v dobi odraščanja, v času pubertete. Po dveh do štiri letih spontano izgine, kosti pa se nato v nekaj letih izdatno mineralizirajo in dobijo normalno ali skoraj normalno strukturo. V času bolezni je povečana razgradnja kosti, zardi česar se pojavijo številni zlomi vretenc in lahko tudi zlomi metafize dolgih kosti, kar povzroča težave pri hoji in bolečine. Vzroka bolezni še ne poznamo.

Nosečnostna osteoporoza je verjetno posledica slabše prilagoditve kalciotropnih hormonov (PTH, kalcitonin, kalcitriol), ki običajno zaščitijo materino okostje v času nosečnosti, po koncu nosečnosti pa začne mineralna kostna gostota spontano naraščati.

Med znake spadajo zlomi vretenc, ki povzročajo bolečine in deformacijo hrbtenice.

Sekundarne oblike osteoporoze se pojavljajo manj pogosto in so posledica bolezenskih stanj in zdravil, ki so našteti v tabeli 1.2.

Tabela 1.2: Dejavniki, ki povzročajo sekundarno osteoporozo [1]

Endokrine bolezni	<ul style="list-style-type: none"> ❖ hipogonadizem ❖ hipertiroza ❖ hiperparatiroidizem ❖ hiperkorticizem
Bolezni prebavil	<ul style="list-style-type: none"> ❖ subtotalna gastrektomija ❖ malabsorpcijski sindrom ❖ kronični obstruktivni ikterus ❖ huda malnutracija ❖ primarna biliarna ciroza ❖ alaktazija
Bolezni kostnega mozga	<ul style="list-style-type: none"> ❖ multipli mielom ❖ sistemska mastocitoza ❖ diseminirani karcinom
Drugi vzroki	<ul style="list-style-type: none"> ❖ imobilizacija ❖ kronična obstruktivna pljučna bolezen ❖ kronični alkoholizem ❖ transplatacije notranjih organov ❖ dolgotrajno zdravljenje z glukokortikoidi, heparinom ali ciklosporinom ❖ revmatoidni artritis ❖ antikonvulzivna zdravila

1.1.2 Diagnoza

Za postavitev diagnoze osteoporoze naredimo meritev mineralne kostne gostote s pomočjo dvoenergetske rentgenske absorpciometrije (DXA, ang. dual energy X-ray absorptiometry). Meritev je natančna in ponovljiva ter omogoča spremljanje sprememb med zdravljenjem, vendar pa ne zazna sprememb manjših od 1%. Kot presejalno metodo pa uporabljamo ultrazvočno preiskavo petnice in ob nizkih vrednostih ultrazvočnih kazalcev moramo napotiti bolnika na DXA, prav tako pa so te vrednosti dober kazalec pojavljanja zlomov. Napredoovalo osteoporozo lahko diagnosticiramo tudi z rentgenskim slikanjem hrbtnice, vendar le ob zmanjšanju kostne gostote za več kot 30 % ali pa ko je že prišlo do zlomov vretenc. Vse klinične in laboratorijske preiskave moramo narediti, da izključimo druge bolezni, ki jih osteoporoza sprembla ali posnema.

Vsem bolnikom pa moramo določiti serumski kalcij, fosfat, alkalno fosfatazo, sečnino, kreatinin, aspartat aminotransferaza (AST), alanin aminotransferaza (ALT) in napraviti proteinogram, hemogram, izmeriti tiroidni stimulirajoči hormon (TSH) in celokupni testosteron (moški), da ne bi spregledali spremljajočih bolezni. Pri primarni osteoporosi so vsi našteti kazalci v referenčnih vrednostih [1].

1.1.3 Zdravljenje

Zdravila lahko delujejo tako, da preprečujejo razgradnjo kosti (bifosfonati, raloksifen) ali pa stimulirajo njihovo izgradnjo (PTH), nekatere novejše učinkovine kot je stroncijev renalat pa delujejo na oba načina [2,4]. Pospeševalci izgradnje kosti lahko povečajo kostno maso za 5 do 30 % letno, zaviralci resorpcije pa preprečujejo nadaljnjo izgubo kostnega tkiva ter povečajo kostno gostoto za 5 do 10 % letno, ker poteka izgradnja kosti nekaj let nemoteno. Učinkovitost zdravil za osteoporozo ocenujemo glede na njihovo sposobnost preprečevanja oziroma zmanjšanja števila zlomov [1]. Za zdravljenje osteoporoze se uporabljam: hormonsko nadomestno zdravljenje (HNZ), selektivni modulatorji estrogenskih receptorjev (SERM), bifosfonati, kalcitonin, parathormon (PTH), anabolni steroidi ter nadomeščanje kalcija in vitamina D [1,2,4].

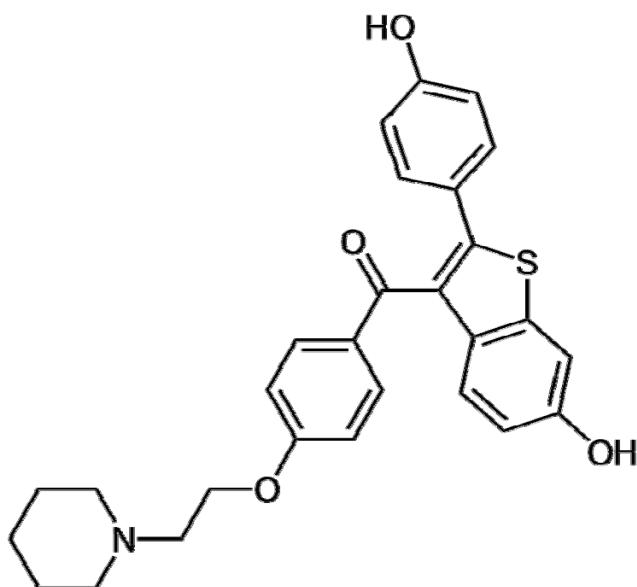
1.2 SERM – selektivni modulatorji estrogenskih receptorjev

Skupina zdravil, ki jo imenujemo SERM, je bila razvita z namenom, da nadomesti zdravljenje osteoporoze s hormonsko nadomestno terapijo, saj ta zdravila povečajo tveganje za nastanek raka na dojkah in maternici [4,5].

SERM so spojine, ki delujejo kot estrogeni agonisti v nekaterih tkivih ter kot estrogeni antagonisti v drugih tkivih. Po kemični zgradbi se razlikujejo in nimajo steroidne zgradbe kot estrogen, ampak se vseeno vežejo tako na α kot na β estrogenске receptorje. V uporabi sta dva razreda strukturno različnih spojin, in sicer trifeniletilni derivati, med katere spadata tamoksifen in toremifen, ter benzotiofenski derivati, med katere spada raloksifen. Sedaj so razvili tudi bazedoksifen, ki pa ima v svoji zgradbi indolni obroč in se razlikuje tako od raloksifena kot od tamoksifena [9].

1.2.1 Raloksifen

Raloksifen spada v farmakološko skupino selektivnih modulatorjev estrogenih receptorjev (SERM). Leta 1997 ga je FDA odobrila (ang., »Food and Drug Administration«) za preprečevanje in zdravljenje pomenopavzalne osteoporoze, v Evropi pa je bil odobren za uporabo leta 1998 [7,14]. Poleg tega pa ga FDA priznava tudi za uporabo kot kemoterapeutik za preprečevanje raka dojk, saj naj bi preprečeval njegov nastanek enako dobro kot tamoksifen, le da raloksifen nima neželenega stimulatornega učinka na endometrij [5, 6]. Na sliki 1.1 je predstavljena struktura raloksifena.



Slika 1.1: Struktura raloksifena

Farmakodinamika

Raloksifen se veže na receptorje za estrogen in deluje na kostno tkivo, metabolizem lipidov ter faktorjev strjevanja krvi kot estrogenki agonist, na reproduktivna tkiva kot so dojke in maternica pa kot estrogenki antagonist [4,5]. Veže se tako na α kot β estrogeneske receptorje, učinek na tkiva pa je odvisen od nastanka kompleksa med receptorjem in SERM, saj je od njegove zmožnosti vezave na določen tip receptorja odvisna aktivacija transkripcije genov [7,10]. Vemo tudi, da sta α in β estrogenki receptor različno razporejena po tkivih in da je koncentracija koaktivatorjev v celicah različna, vse to pa vpliva na različno delovanje v posameznih tkivih. Disociacijska konstanta raloksifena znaša za α estrogenki receptor 0,52 nM, za β estrogenki receptor pa 20,2 nM [11]. Konformacija estrogenskega receptorja je drugačna ob zasedbi z 17- β -estradiolom kot pa ob zasedbi z raloksifenom, zato imata tudi drugačne učinke na nekatera tkiva [10].

Raloksifen prepreči razgradnjo kostnega tkiva in s tem zmanjša izgubo kostne gostote tako pri ženskah z osteoporozo kot pri tistih, ki je nimajo. V kosteh njegova vezava vpliva na proliferacijo in aktivnost osteoblastov in osteoklastov ter s tem zmanjša nivoje kazalcev tako izgradnje kot razgradnje kostnega tkiva, kot so specifična alkalna fosfataza, osteokalcin in urinski C-telopeptid [7]. Vendar pa raloksifen poleg zmanjšanja razgradnje kostnega tkiva poveča ali vzdržuje BMD ter mikroarhitekturo kostnega tkiva pri ženskah v pomenopavzi [11].

Velika dvojno slepa študija MORE (Multiple Outcomes of Raloxifene Evaluation), kjer je sodelovalo 7705 žensk v menopavzi in z osteoporozo, je pokazala, da raloksifen poveča kostno gostoto v hrbtenici in vratu stegnenice ter signifikantno zmanjša tveganje za zlom vretenc, vendar pa ne zmanjša tveganja za zlom kolka. Prav tako je študija tudi pokazala, da se ne poveča tveganje za hiperplazijo ali raka endometrija, kar se zgodi pri tamoksifenu. Potrdilo se je tudi, da raloksifen tako kot tamoksifen zmanjša tveganje za nastanek invazivnega raka dojk, vendar pa poveča tveganje za nastanek tromboemboličnih zapletov, kot sta globoka venska tromboza in srčna kap. Vsi ti neželeni učinki so izredno redki, bolj pogosto pa se pojavljajo krči v nogah, vročinski oblivi, periferni edemi in bolezni žolčnika. Čeprav vemo, da raloksifen zniža serumski nivo na LDL vezanega holesterola in s tem poveča razmerje HDL/LDL, ne moremo trditi, da zmanjša tveganje za nastanek koronarnih bolezni srca, saj tudi študija MORE ni pokazala nobenega vpliva. Ugotovili pa so tudi, da se je znižal nivo apolipoproteina B, ki je poleg serumskih koncentracij holesterola in trigliceridov tudi eden od pokazateljev tveganja za razvoj kardiovaskularnih obolenj [8,10]. Prav tako pa je bila izvedena tudi študija, kjer so preučevali, če ima polimorfizem v genu za alfa estrogenski receptor vpliv na serumskie koncentracije lipidov. V tej študiji so poleg vpliva polimorfizma v genu za α estrogenski receptor dodatno potrdili, da raloksifen nima nobenega vpliva na nivo serumskih koncentracij na HDL vezanega holesterola in trigliceridov [12]. V študiji, kjer so poleg raloksifena (60 mg/dan) ženske v postmenopavzi prejemale še simvastatin (10 mg/dan), so opazili signifikantno znižanje koncentracije na LDL vezanega holesterola in to znižanje je bilo večje kot pa znižanje, ki ga povzroči samo ena izmed teh dveh učinkovin [11].

Študija MORE je pokazala, da je med 5129-imi ženskami, ki so prejemale raloksifen, 13 žensk dobilo raka na dojkah, medtem ko so med 2576-imi, ki so prejemale placebo, potrdili raka pri 27-ih. Raloksifen je za 90 % znižal tveganje za raka dojk, ki je posledica aktivacije estrogenskega receptorja. Tveganje se je znižalo pri tistih ženskah, ki so imele

večje tveganje ter pri katerih se je rak že pojavil v ožjem družinskem krogu. Če poleg rezultatov MORE študije upoštevamo še rezultate CORE, RUTH in STAR študij, raloksifen v primerjavi s placeboom v povprečju zmanjša tveganje za nastanek invazivnega raka dojk za 44 – 76 % .

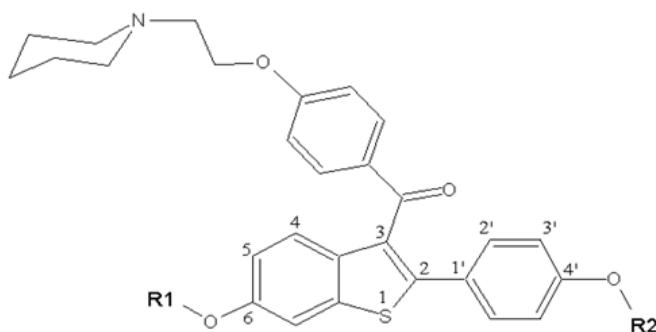
Kot smo že omenili pred tem, ima raloksifen zelo malo neželenih učinkov oziroma se ti pojavljajo z zelo majhno verjetnostjo. Raloksifen poveča verjetnost za tromboembolične zaplete za 1,5 do 3 krat, vendar se ti pojavljajo le v manj kot 1 %. Med neželenimi učinki so najbolj pogosti vročinski oblivi, ki se povečajo za 7 % v pomenopavzalnem obdobju. V študijah preprečevanja raka dojk so ugotovili, da se krči v nogah pojavijo v 5,5 % pri raloksifenu, medtem ko se pri placebou v 1,9 %. V študijah zdravljenja osteoporoze pa so se krči v nogah pojavili v 9,2 % pri raloksifenu, pri placebou pa v 6,0 % [13].

Farmakokinetika

Za raloksifen je značilno, da njegovi farmakokinetični parametri interindividualno zelo variirajo (30 – 50 %) in razloga za to še vedno ne poznamo. Po peroralni aplikaciji se zelo hitro absorbira ter nato podleže predsistemske glukuronidaciji in enterohepatični cirkulaciji. Obseg absorpcije znaša približno 60 %, absolutna biološka uporabnost pa je le 2,0 %, verjetno zaradi intenzivnega metabolizma prvega prehoda [14,15]. Maksimalna plazemska koncentracija nastopi približno 6 h po peroralni aplikaciji, maksimalna koncentracija metabolitov je dosežena že po eni uri [16]. Na obseg absorpcije lahko vplivamo, če raloksifen zaužijemo z obrokom, ki vsebuje veliko maščob. Maksimalna koncentracija se poveča za 28 % in AUC pa za 16 %, vendar to ne vpliva na njegov učinek in zato odmerjanje ni odvisno od obrokov [17].

Raloksifen se v veliki meri porazdeli po telesu. Navidezni volumen distribucije je neodvisen od apliciranega odmerka v intervalu od 30 do 150 mg in znaša 2348 L/kg. Tako raloksifen kot njegova monoglukuronida se v veliki meri vežejo na plazemske proteine (>95 %), in sicer na albumin in α -1 kisli glikoprotein. Čeprav se na globulin vežejo spolni hormoni, le-ta ne veže raloksifena [17]. Prav zaradi njegove vezave na proteine je pomembna previdnost pri aplikaciji učinkovin, ki se prav tako vežejo na proteine, kot na primer diazepam, diozoksid, lidokain. Tudi v primeru uporabe varfarina in njegovih derivatov je potrebna previdnost, saj se ob aplikacijah obeh učinkovin protrombinski čas zniža za 10 % [11].

Za raloksifen je značilno, da ni podvržen metabolizmu z encimi družine citokromov P450, saj je njegova glavna pot metabolizma glukuronidacija z družino encimov uridindifosfat glukuronožil transferaze (UGT). Njegovi metaboliti so raloksifen-4'-glukuronid (M2), raloksifen-6-glukuronid (M1) in raloksifen-6,4'-diglukuronid (M3), manj kot 1% pa ga ostane v plazmi nespremenjenega [11]. Strukturo metabolitov lahko vidimo na sliki 1.2, kjer je predstavljena struktura raloksifena ter označeni mesti, na kateri se veže glukuronid.



	R1	R2
raloxifene	H	H
M1		H
M2	H	
M3		

Slika 1.2: Struktura raloksifena in njegovih metabolitov

Glavne izoforme encima, ki sodelujejo v procesu metabolizma, so UGT1A1, UGT1A8, UGT1A9 in UGT1A10. Razporeditev UGT izoform po organih je predstavljena v tabeli 1.4 [18]. Za predsistemske metabolizem in nizko biološko uporabnost sta najbolj pomembni izoformi UGT1A8 in UGT1A10, ki se v glavnem nahajata v črevesju. V

študijah je bilo ugotovljeno, da izoforma UGT1A8 lahko tvori glukuronid na mestu 6 in 4', medtem ko UGT1A10 pa samo na mestu 4'. V kliničnih študijah je bilo tudi dokazano, da glukuronidacija lažje poteče na mestu 4', kar potrjuje tudi dejstvo, da nastane 4'-glukuronid v osemkrat večji koncentraciji kot pa 6-glukuronid. Prav tako pa so dokazali tudi, da glukuronidacija v črevesju poteče v večjem obsegu in je bolj pomembna za predsistemske metabolizem kot pa glukuronidacija, ki poteče v jetrih. V jetrih pa izoforma UGT1A1 tvori glukuronid na mestu 6 [19].

Tabela 1.3: Izraženost UGT - izoform v telesu [18]

UGT - izoforma	tkivo
UGT1A1	jetra, žolčevod, želodec, kolon
UGT1A8	požiralnik, jejunum, ileum, kolon
UGT1A9	jetra, kolon, ledvica
UGT1A10	požiralnik, želodec, žolčevod, črevesje, kolon

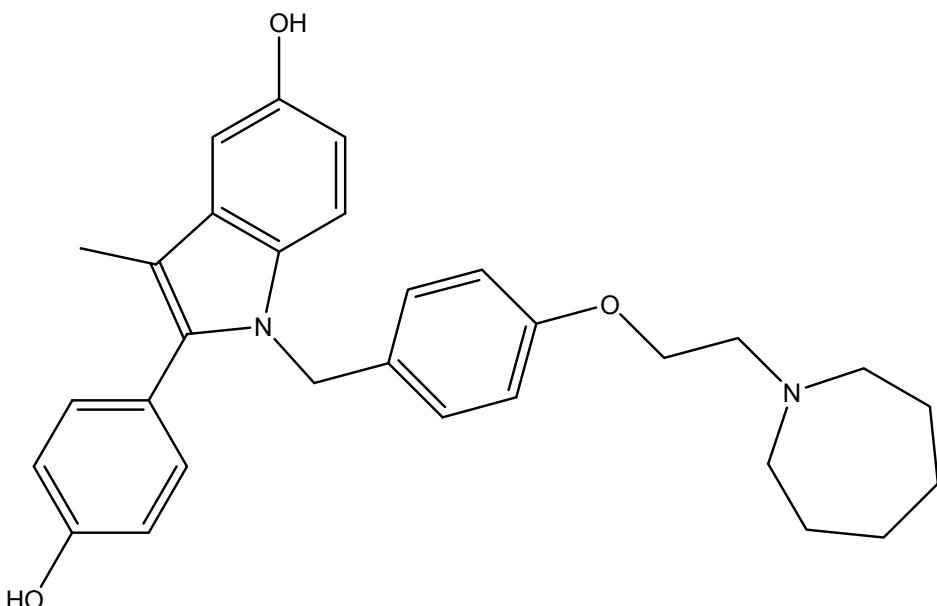
Očistek raloksifena znaša 44,1 L/h kg, razpolovni čas pa je 27,7 h. Pri bolnikih, ki so imeli lažjo jetrno okvaro, je prišlo do zmanjšanja očistka za 56 % ter do povečanja plazemske koncentracije za 150 %, zato je potrebno pri teh bolnikih raloksifen uporabljati previdno. Prav tako je tudi okvara ledvic vplivala na plazemske koncentracije raloksifena, zato je tudi pri teh bolnikih potrebna previdnost [11].

Eliminacija raloksifena iz centralnega krvnega obtoka poteka predvsem preko jeter, kjer poteče glukuronidacija. Večina raloksifena se odstrani z blatom, 0,2 % pa se ga odstrani nespremenjenega z urinom. V urinu pa se pojavi tudi do 6 % apliciranega odmerka v obliki glukuronidov [17].

1.2.2 Bazedoksifen

Farmakodinamika

Učinkovina je bila razvita na podlagi raloksifena z namenom, da bi izboljšali njegove lastnosti. Bazedoksifen ima zelo dobro estrogenско in antiestrogenско delovanje tako *in vivo* kot *in vitro*. Deluje v vseh tkivih, ki imajo estrogenске receptorje, in sicer v kosteh, maternici, dojkah, krvnih žilah in v jetrih. Veže se na α in β estrogenске receptorje, vendar pa ima malo večjo afiniteto do α receptorjev, ki je pa desetkrat nižja od afinitete 17 β -estradiola [9]. Na sliki 1.3 je predstavljena struktura bazedoksifena.



Slika 1.3: Struktura bazedoksifena

Disociacijska konstanta za bazedoksifen znaša 0,1 nM za α receptor in 0,3 nM za β receptor. Na podlagi predkliničnih študij lahko rečemo, da je primeren za zdravljenje osteoporoze in rezultati kažejo tudi, da naj bi imel manjši vpliv na maternico in vazomotorne učinke kot SERM, ki so trenutno v uporabi.

Prva faza kliničnih študij, kjer so preučevali metabolizem in farmakokinetiko, je bila izvedena na zdravih ženskah v pomenopavzi in pri teh niso zabeležili resnih neželenih učinkov. Prav tako pa se je v eni izmed predkliničnih študij izkazalo, da so se markerji kostne razgradnje signifikantno znižali (za 21%) [9].

V drugi fazi kliničnih študij, kjer so preučevali učinkovitost in varnost, so na zdravih ženskah v pomenopavzi s povečano izgubo kostne mase izvedli monocentrično, dvojno slepo, randomizirano študijo z aktivno in placebo kontrolo, ki je trajala šest mesecev. Študija je bila izvedena v dveh delih, v prvem so preučevali štiri dnevne odmerke (2,5 mg, 5 mg, 10 mg in 20 mg) v primerjavi s placebom ali konjugiranim estrogenom z medroksiprogesteron acetatom (0,625/2,5 mg). Zaradi dobrih rezultatov je bila študija podaljšana in so preučil še tri dnevne odmerke (20 mg, 30 mg in 40 mg) v primerjavi s placebom. V prvem delu je sodelovalo 360 žensk, v drugem pa 240, vse pa so prejemale tudi 600 mg kalcijevega karbonata dnevno. Rezultati prvega dela so pokazali, da se debelina endometrija in bolečina v dojkah pri ženskah, ki so prejemale bazedoksifen, nista signifikantno razlikovali v primerjavi z rezultati pri tistih ženskah, ki so prejemale placebo. Pri skupini, ki je prejemala konjugirani estrogen z medroksiprogesteron acetatom, je prišlo do majhnega ampak signifikantnega povečanja debeline endometrija in bolečine v dojkah. Ti rezultati so bili potrjeni tudi v drugem delu te študije. Pri odmerkih 30 in 40 mg so ugotovili, da se je debelina endometrija v primerjavi s placebom še dodatno znižala, kar naj bi pokazalo močnejše antagonistično delovanje bazedoksifena na endometrij. Pri 40 mg odmerku je prišlo tudi do signifikantnega znižanja bolečin v dojkah v primerjavi s placebom. Ugotovili so tudi, da je vpliv bazedoksifena odvisen od odmerka, in sicer pri 20 mg se je razgradnja kostnega tkiva zmanjšala za 20 %, pri 40 mg pa za 26 %.

V tretji fazi kliničnih študij je bila izvedena multicentrična, dvojno slepa, randomizirana študija, kjer so primerjali učinkovitost treh odmerkov bazedoksifena (10 mg, 20 mg in 40 mg) s placebom in raloksifenum (60 mg) pri 1434 ženskah v pomenopavzi, ki so imele osteopenijo ali klinično tveganje za osteoporozo. Primerjali so spremembe BMD v ledvenem delu hrbtnice, spremembe BMD kolka, spremembe kostnih markerjev razgradnje (serumski osteokalcin, tip 1 kolagenski C-telopeptid) in spremembe v koncentraciji lipidov. Vsi odmerki bazedoksifena in raloksifena so v primerjavi s placebom zmanjšali izgubo kostnega tkiva po 24. mesecih. Glavna razlika v BMD ledvenega dela hrbtnice po 24. mesecih v primerjavi s placebom je znašala za bazedoksifen 1,08 % za 10 mg odmerek, 1,41 % za 20 mg in 1,49 % za 40 mg ter za raloksifen (60 mg) 1,49 %. Razlike v odzivu med njima niso bile statistično pomembne, prav tako tudi ne razlike na stegnenici. Že po treh mesecih se je znižala serumska vrednost osteokalcina in tip 1 kolagenskega C-telopeptida ter ostala taka do konca študije (24 mesecev). Opazili so tudi

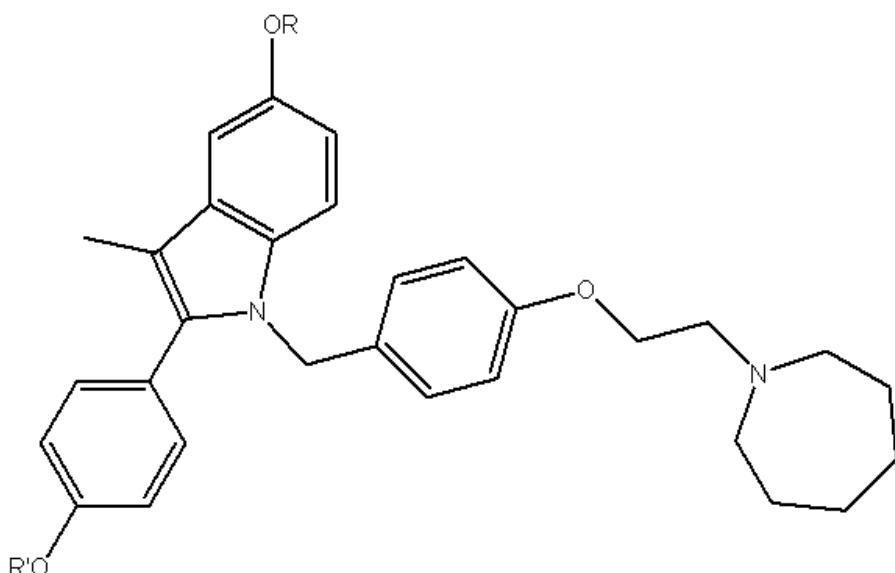
znižanje celotnega in na LDL vezanega holesterola pri obeh učinkovinah v primerjavi s placeboom.

V tretji fazi kliničnih študij je bila tudi izvedena multicentrična, dvojno slepa, randomizirana s placeboom kontrolirana študija, ki je bila zasnovana tako, da preuči učinkovitost bazedoksifena pri preprečevanju zlomov. V študijo je bilo vključenih 7492 zdravih žensk v postmenopavzi, ki so imele osteoporozo z ali brez vretenčnih zlomov. Prejemale so bazedoksifen (20 ali 40 mg dnevno), raloksifen (60 mg dnevno) ali placebo, vse so prejemale tudi 1200 mg kalcija in 400 i.e. vitamina D. Tudi v tej študiji imata bazedoksifen in raloksifen enako učinkovitost v preprečevanju vretenčnih zlomov, in sicer pri bazedoksifenu je prišlo do zmanjšanja tveganja v primerjavi s placeboom za 42 % pri 20 mg odmerku, za 37 % pri 40 mg ter pri raloksifenu za 42 %. V skupini žensk, ki so imele večje tveganje za zlome, se je pri 20 mg pokazalo, da le-ta zmanjša tveganje za nevretenčne zlome za 50 % v primerjavi s placeboom. Pri 40 mg je še dodatno prišlo do zmanjšanja tveganja, vendar ne tako pomembnega.

V kliničnih študijah se je izkazalo, da ženske učinkovino dobro prenašajo in le nekaj jih je imelo neželene učinke. Bazedoksifen ne povzroča toksičnih učinkov do 80 mg, kar je signifikantno večje kot odmerki, ki se uporabljajo v kliničnih študijah. V drugi fazi pri uporabi 20, 30 in 40 mg so bili najbolj pogosti neželeni učinki trebušna bolečina, glavoboli in gripi podobni znaki. Pojavil so se tudi vročinski oblici, in sicer pri 20 mg odmerku v 19,9 %, pri 40 mg v 22,6 %, pri placebo pa v 13,2 %, kar je podobno kot pri raloksifenu (18,3 %). Tudi v tretji fazi je bil odstotek žensk, ki so imele vročinske oblike višji v primerjavi s placeboom, vendar pa podoben tisti skupini, ki je prejemala raloksifen. Pojavljanje trombotičnih zapletov je bilo nizko in podobno kot pri raloksifenu in placebou v dvoletni študiji, v triletni študiji pa je bilo malo večje kot pri placebou. Bazedoksifen ni povečal tveganja za nastanek raka na dojkah in tudi ni vplival na debelino endometrija [9]. V kliničnem razvoju je tudi kombinacija bazedoksifena s konjugiranim estrogenom, kot prva TSEC (ang. »Tissue – Selective Estrogen Complexes«) terapija. S to kombinacijo izkoristimo vse dobre lastnosti zdravljenja pomenopavzalnih težav s hormoni, hkrati pa ne delujemo stimulatorno na dojke in endometrij ter se tako ne poveča verjetnost za nastanek raka na teh dveh tkivih. V drugi fazi kliničnih študij na 412 zdravih ženskah v pomenopavzi so ugotovili, da se je pri uporabi te kombinirane terapije zmanjšala debelina endometrija, signifikantno zmanjšalo število vročinskih oblikov in resorpcija kostnega tkiva, kar se je potrdilo tudi v obsežni klinični študiji tretje faze [31].

Farmakokinetika

Bazedoksifen se hitro absorbira in doseže maksimalno plazemska koncentracijo v 1 – 2 h po peroralni aplikaciji. Njegova biološka uporabnost je 6,2 % in je kar trikrat večja kot pri raloksifenu [20]. Biološka uporabnost se je povečala pri peroralni aplikaciji med obrokom, vendar pa ta sprememba ni bila klinično pomembna, zato ga lahko apliciramo ne glede na obroke. Po intravenski aplikaciji 3 mg odmerka je njegov volumen porazdelitve $14,7 \pm 3,9$ L/kg. Značilno je tudi, da se *in vitro* v veliki meri (95,8 – 99,3 %) veže na plazemske proteine [21]. Struktura metabolitov bazedoksifena je razvidna iz slike 1.4.



	R	R'
bazedoksifen	H	H
bazedoksifen-5-glukuronid		H
bazedoksifen-4'-glukuronid	H	
bazedoksifen-5,4'-diglukuronid		

Silka 1.4: Bazedoksifen in njegovi metaboliti

Glavna pot metabolizma je glukuronidacija, zelo malo ali nič pa se ga metabolizira preko citokroma P450. Študije so pokazale, da so za metabolizem pomembne UGT1A1, UGT1A8 in UGT1A10 izoforme, ostale pa imajo na glukuronidacijo bazedoksifena zelo malo vpliva. Največ nastaja bazedoksifen-5-glukuronida, in sicer kar 40 – 95 %. Kot metabolit se pojavlja tudi bazedoksifen-4'-glukuronid (0 – 20 %), identificirali pa so tudi bazedoksifen-5,4'-diglukoronid, vendar se ta pojavlja v zelo majhni količini. Bazedoksifen skoraj ves podleže glukuronidaciji, kar kaže na velik vpliv metabolizma prvega prehoda na njegovo nizko absolutno biološko uporabnost [22].

Razpolovni čas bazedoksifena znaša približno 30 ur, navidezni peroralni očistek je približno 4 do 5 L/h/kg. Z uporabo radioaktivno označenega bazedoksifena so ugotovili, da je poglavitna pot odstranjevanja iz telesa z blatom, z urinom pa se odstrani manj kot 1% odmerka [21].

Dolg razpolovni čas in sekundarni vrh v profilu odvisnosti koncentracije od časa nam nakazujeta, da bazedoksifen, tako kot raloksifen, verjetno podleže enterohepatični cirkulaciji [22].

1.3 Prenašalni proteini

V zadnjem času se raziskovalci vse bolj zavedajo pomena prenašalnih proteinov pri eliminaciji učinkovin. Zdaj se ve, da so ti lahko odločilnega pomena za farmakokinetiko, ker v številnih tkivih privzemajo ali aktivno izločajo učinkovine. Posebej veliko vlogo imajo v tankem črevesu, jetrih, ledvicah in v hematoencefalni barieri. V splošnem prenašalne proteine delimo na primarne, sekundarne in terciarne aktivne prenašalne proteine. Primarni potrebujemo za svoje delovanje ATP, taki so npr. MDR1 (ang. »multi drug resistance protein«) ali P-gp (P-glikoprotein, ang. »P-glycoprotein«), MRP (družina proteinov povezanih z resistenco na več spojin, ang. »multidrug resistance-associated protein«) ter BCRP (resistentni protein izoliran pri raku na dojki, ang. »breast cancer resistance protein«). Sekundarni in terciarni aktivni prenašalni proteini za svoje delovanje direktno ne potrebujemo ATP, pač pa črpajo molekule substrata skupaj z izmenjavo ali kotransportom znotraj ali zunajceličnih ionov v smeri njihovega koncentracijskega gradiента. Med te štejemo OAT (prenašalec organskih anionov, ang. »organic anion transporter«), OATP (proteinski prenašalec organskih anionov, ang. »organic anion transporting polypeptides«), NTCP (ko-prenašalec natrija in tauroholata, ang. »sodium taurocholate co-transporting peptide«), OCT (prenašalec organskih kationov, ang. »organic cation transporter«) in OCTN (novejši prenašalec organskih kationov, ang. »novel organic cation transporter«) ter PEPT (oligopeptidni prenašalec, ang. »oligopeptide transporters«) [23].

Izražanje različnih transporterjev je regulirano s strani citokinov, soli žolčnih kislin, endogenih metabolitov, pa tudi učinkovin, ki delujejo prek jedrnih hormonskih receptorjev. Spremembe v ekspresiji zaznamo pri stanjih, kot so ontogeneza, karcinogeneza, holestaza, celični stres in po zdravljenju z različnimi hormoni in ksenobiotiki [24].

1.3.1 ABC prenašalni proteini

ABC (ang. »ATP binding cassette«) prenašalni proteini predstavljajo družino membranskih proteinov, ki se nahajajo v različnih organih človeškega telesa in za svoje delovanje potrebujemo ATP. Do danes jih je poznanih 48, od tega naj bi jih 11 prenašalo učinkovine preko celične membrane iz celice [25, 26, 27]. Prenašalni proteini te družine imajo zelo velik vpliv na farmakološko delovanje večine učinkovin, ki se danes uporabljam. Vplivajo

na biološko uporabnost po peroralni aplikaciji, enterohepatično in enteroenterično cirkulacijo ter na direktno izločanje učinkovine, njenih metabolitov in konjugatov skozi črevesje in z urinom. Prav tako pa vplivajo tudi na prehajanje učinkovine v pomembne dele telesa, kot so možgani, cerebrospinalna tekočina, testisi, fetus ter še druge specifične celice in tkiva. Glede na interakcije učinkovine s prenašalnimi proteini lahko v veliki meri napovemo klinično uporabnost, neželene učinke ter toksičnost in na podlagi tega lahko že v zgodnji fazi razvoja zdravila izberemo učinkovino z visoko učinkovitostjo in nizkim toksičnim potencialom. S poznavanjem in možnostjo vpliva na njih *in vivo* bi lahko imeli velik vpliv na farmakokinetiko učinkovin ter bi lahko tudi bolje razložili interakcije med različnimi učinkovinami.

V družino ABC prenašalnih proteinov spadajo P-gp, BCRP in MRP. Kot smo že povedali, je za njihovo delovanje potrebna energija, ki jo pridobijo s hidrolizo ATP in zato lahko prenašajo spojine proti visokemu koncentracijskemu gradientu [28]. V nadaljevanju bodo podrobnejše predstavljeni tisti membranski prenašalni proteini, na katerih je bila izvedena naša raziskava.

1.3.1.1 MDR1 ali P-gp prenašalni protein

P-gp je bil odkrit med prvimi in je najbolj preučevan ABC prenašalni protein. Zanj je značilno, da ima zelo širok spekter različnih substratov, ki jih lahko prenaša, vendar pa ima večjo afiniteto do lipofilnih in pozitivno nabitih spojin. Število spojin, ki so njegovi substrati ali inhibitorji, stalno narašča in mednje spadajo protitumorne učinkovine, antibiotiki, protivirusne učinkovine, inhibitorji kalcijevih kanalov in imunosupresivi. Prav tako pa prenaša biološko aktivne snovi, ki so prisotne v normalni prehrani, saj sodeluje pri razstrupljevanju in izločanju snovi iz telesa [29]. Prav zaradi izločanja protitumornih učinkovin iz rakavih celic je bil odkrit, saj je za rakave celice značilno, da ga imajo izraženega v velikih količinah. Seveda pa je izražen tudi v normalnih tkivih, in sicer v velikih količinah v ledvicah in nadledvični žlezi, v srednjih količinah je izražen v jetrih, tankem črevesu, kolonu in pljučih, v majhnih količinah pa se nahaja v prostatni, koži, srcu, skeletnih mišicah, trebušni votlini in v jajčnikih. Izražen je tudi v možganih, horioidnem pletežu in placenti, kjer ima zaščitno ali izločevalno vlogo ksenobiotikov in toksinov v lumen črevesja, žolč, urin in kri [29]. Zelo pomembna je njegova vloga v hematoencefalni barieri, saj se lahko koncentracija učinkovin v možganih poveča za 10 - do 1000 - krat, če ni prenosa učinkovine nazaj v kri s P-gp, kar pa ima lahko resne posledice na učinkovitost

in toksičnost učinkovin. Pomanjkanje prenosa s P-gp pa lahko vpliva tudi na kopičenje ostalih snovi v možganih, ki so prisotne v telesu. Zelo pomembno je tudi, da lahko omeji absorpcijo snovi iz črevesnega lumna v krvni obtok in s tem zmanjša biološko uporabnost peroralno zaužitih učinkovin, saj so zaradi zmanjšane absorpcije plazemske koncentracije lahko celo nižje od terapevtskih [28]. Pri študijah na človeških črevesnih epitelnih celicah Caco-2, HT29 in T84 so dobili prve dokaze, ki so kazali na to, da P-gp deluje kot izločevalni detoksifikacijski sistem. Prav tako obstaja še veliko dokazov, ki podpirajo trditev, da P-gp vpliva na biološko uporabnost učinkovin po peroralni aplikaciji [29].

Veliko domnevnih inhibitorjev, kot sta blokator kalcijevih kanalčkov verapamil ali imunosupresiv ciklosporin A, je tudi substratov za P-gp, kar nam pove, da delujejo kot kompetitivni inhibitorji. Vendar pa lahko nekatere spojine prehajajo membrano s pasivno difuzijo tudi tako hitro, da prenosa s P-gp ne zaznamo, predvidevamo pa, da je prišlo do inhibicije prenašalnega proteina [28].

1.3.1.2 MRP1 prenašalni protein

MRP1 se v veliki količini nahaja v črevesju, možganih, ledvicah, pljučih in testisih, v manjših količinah pa ga najdemo v jetrih [29]. V primerjavi s P-gp je MRP1 prenašalni protein samo za amfifilne organske anione. Lahko prenaša hidrofobne snovi, ki so kompleksi ali konjugati z glutationom, glukuronsko kislino ali sulfatom. Transport nekaterih protitumornih učinkovin z MRP1 je odvisen od celične zaloge glutationa, medtem ko prenos nekaterih poteka celo kot kotransport z reduciranim glutationom. Njegovi substrati so različni konjugirani metaboliti kot na primer konjugati glutationa z levkotrienom C₄, glukuronidi bilirubina, estradiol-17-β-glukoronidi in dvojno negativno nabite soli žolča, kar nakazuje, da je njegova vloga detoksifikacija celic. Z izločanjem svojih substratov sodeluje v zaščiti celic pred endogenimi metaboliti tako, da jih izloča v krvni obtok [29]. V študiji na miših, ki nimajo izraženega MRP1, je bilo dokazano, da se le-ta nahaja tudi na bazolateralni strani epitelija horioidnega pleteža in pripomore pri njegovi zaščiti. Prav tako so dokazali tudi, da se je toksičnost vinkristina v kostnem mozgu in sluznici gastrointestinalnega trakta povečala pri miših, ki niso imele izraženega MRP1 in P-gp. Zato lahko predvidevamo, da oba sodelujeta pri zaščiti teh dveh tkiv.

Ker so anionske spojine tako substrati kot inhibitorji MRP1, le-te zelo malo prehajajo v celico, zato je zelo težko obdržati ustrezno intracelularno koncentracijo inhibitorja. Med

inhibitorje spadajo analog LTC₄, LTC₄, S-decylglutation, sulfonpirazon, benzobromaron in probenecid, ki pa niso primerni za *in vivo* inhibicijo [28].

1.3.1.3 MRP2 prenašalni protein

MRP2 se nahaja v glavnem v jetrih, črevesju in ledvičnih tubulih in je tako kot P-gp na apikalni strani membrane teh tkiv. Študije na hepatocitih so pokazale, da je udeležen pri izločanju tako konjugiranih kot nekonjugiranih anionskih spojin v žolč. In glede na to lahko sklepamo, da detoksifikacija preko MRP2 poteka z izločanjem metabolitov v žolč. MRP2 ima afiniteto do podobnih substratov kot MRP1. Poleg metabolitov prenaša še nekatere učinkovine, in sicer HIV proteazne inhibitorje, nukleozid fosfonate, p-aminohipurno kislino, nekatere protitumorne učinkovine in fluorokinolone, ter tudi nekatere snovi prisotne v prehrani [29].

Njegovo delovanje *in vivo* je bilo dobro raziskano na dveh vrstah podgan in pri bolnikih z Dubin-Johnsonovim sindromom, saj ti nimajo izraženega gena za MRP2. Posledice pomanjkanja se kažejo kot recesivna podedovana konjugirana hiperbilirubinemija, zaradi česar se lahko pojavi zlatenica, drugače pa so bolezenski znaki relativno mili. Ker ni izraženega MRP2 na membrani hepatocitov, se mono- in diglukuronidi bilirubina ne morejo izločiti v žolč, kar vodi do zlatenice [28].

Nekatere študije so pokazale, da MRP2 in P-gp skupaj omejujeta prehajanje snovi iz krvi v možgane in fetus in ju tako ščitita. Kljub delnemu prekrivanju imata afiniteto do različnih substratov in se s tem dopolnjujeta.

Inhibitorji na izoliranih celicah so ciklosporin A, sulfonpirazon, benzobromaron, probenacid in še nekateri, vendar pa je težko najti inhibitorje, ki bi delovali selektivno *in vivo*, saj večina inhibira tudi MRP1 in P-gp [28].

1.3.1.4 MRP3 prenašalni protein

MRP3 je prenašalni protein organskih anionskih spojin in ima afiniteto do podobnih spojin kot MRP1 in MRP2, prav tako so podobni tudi njihovi inhibitorji. MRP3 se nahaja v jetrih, tankem in debelem črevesju ter v nadledvični žlezi, v manjši meri pa tudi v trebušni slinavki in ledvicah. Glede na specifičnost substratov in porazdelitev po tkivih so sklepali, da ima vlogo pri enterohepatični in enteroenterični cirkulaciji žolčnih soli. Če upoštevamo podobnost z MRP1, pa lahko sklepamo tudi, da pripomore pri izločanju toksičnih organskih anionov iz epitelnih celic [28].

1.3.1.5 BCRP prenašalni protein

Čeprav je bil odkrit med zadnjimi iz družine ABC prenašalnih proteinov, je bilo dokazano, da je podoben P-gp in MRP2 ter da bi lahko imel zelo velik vpliv na delovanje zdravil. Prav tako pa lahko z inhibitorji uspešno vplivamo na njegovo delovanje *in vivo* in s tem na biološko uporabnost zdravil.

Najprej je bil izoliran iz rakavih celic dojk in od tod je tudi dobil ime, kar pa ne pomeni, da se nahaja samo v rakavih celicah dojk ali pa da je pomemben pri razvoju rezistence teh celic na protitumorna zdravila. BCRP se nahaja tudi v človeški placenti, medtem ko je pri miših v največji meri izražen v ledvicah, ki ga pa imajo pri človeku izraženega zelo malo. S protitelesi so določili, da se poleg placente nahaja tudi v jetrnih celicah, epitelnih celicah vilusov, tankem in debelem črevesju, dojkah ter v endoteliju ven in kapilar.

Zelo dober inhibitor BCRP je GF120918, ki je hkrati tudi zelo dober inhibitor P-gp prenašalnega proteina, iz česar je razvidno, da sta si podobna. Inhibicija ni specifična, vendar pa ima to prednost, ko ju želimo inhibirati istočasno. Njegova uporaba je varna tako pri živalih kot pri človeku.

Pri uporabi radioaktivno označenega topotekana na miši z zarodkom, ki ni imela izraženega P-gp, so ob uporabi inhibitorja GF120918 dokazali, da ima BCRP pomembno vlogo pri zaščiti fetusa pred prehajanjem in kopičenjem snovi iz matere, ki bi mu lahko škodovali. Iz tega so sklepali, da je njegova normalna funkcija izločanje ksenobiotikov.

Na podlagi vseh dosedanjih ugotovitev naj bi imel BCRP pomembno vlogo pri učinkovanju zdravil, saj naj bi vplival na njihovo biološko uporabnost, plazemski očistek ter na hepatobiliarno in intestinalno eliminacijo [28].

1.3.2 *In vitro* modeli za preučevanje prenašalnih proteinov

1.3.2.1 Membrane celic transfecirane z geni za prenašalne proteine (ABC vezikli in membrane)

Analiza transporta z uporabo ABC prenašalnih veziklov in membran je enostavno in učinkovito orodje za *in vitro* rešetanje substratov in inhibitorjev ABC prenašalnih proteinov. Membrane in vezikli, ki se pri tem uporablja, so pridobljeni iz celic insektov (Sf9 insektne celice transfecirane z bakulovirusom, ki kodira določen ABC transporter), ki prekomerno izražajo ABC prenašalne proteine [26,27]. Pri postopku izdelave membran gre za transfekcijo Sf9 insektnih celic z rekombinantnim bakulovirusom, ki vsebuje gen za želeni prenašalni protein. Inficirane celice se z ustreznim medijem goji na plošči in po določenem času se jih pobere ter lizira in homogenizira s tkivnim homogenizatorjem. Nerazbite celice in ostanke jeder se odcentrifugira (500g, 10 min), supernatant pa se ponovno centrifugira (100000g, 60 min). Usedlina po drugem centrifugiranju so ABC membrane, ki jih je potrebno še resuspendirati v ustremnem pufru [26,27].

ABC membrane (ang. ABC Transporter Membranes) uporabljamo za določanje možnih interakcij med prenašalnim proteinom in testirano substanco. Ob sočasni hidrolizi ATP pride do izločanja testne substance iz celice s pomočjo ABC prenašalnega proteina, sočasna uporaba drugih substratov teh prenašalnih proteinov pa nam omogoča pridobivanje informacije o tem, ali je preiskovana snov substrat ali inhibitor le-teh [26,27].

ABC vezikli (ang. ABC Transporter Vesicles) so navzven obrnjene strukture, ki so pridobljene iz ABC membran. Medtem ko ABC prenašalni proteini tipično prenašajo substrate iz celice, tisti, ki so izraženi na površini ABC veziklov prenašajo substrate v notranjost teh membranskih struktur. Na ta način lahko z določanjem količine snovi vključene v vezikel kvantitativno ocenimo aktivnost transporta proučevane učinkovine.

Pri ABC membranah gre za posredno oceno transporta (merjenje ATPazne aktivnosti) preko določenega prenašalnega proteina, saj se substanca prenaša iz notranjosti membrane v medij, pri tem pa porablja ATP. Nasprotno pa gre pri ABC veziklih za obrnjene membrane, zato se tudi preiskovana substanca prenaša iz medija v vezikel [27].

1.3.2.2 Ostali *in vitro* modeli za preučevanje prenašalnih proteinov

In vitro modeli, s katerimi lahko še preučujemo prenašalne proteine, so Caco-2 celice, črevesne rezine, obrnjene črevesne vrečke, difuzijske celice.

Caco-2 celična linija je bila pridobljena v 70-ih letih prejšnjega stoletja iz celic humanega kolorektalnega karcinoma. Gre za eno najbolje opisanih črevesnih celičnih linij, ki v normalnih pogojih gojenja spontano diferenciira v celice s funkcionalnimi in morfološkimi značilnostmi zrelih enterocitov. Caco-2 celice izražajo encime ščetkastega obrobka kot tudi metabolične encime I. in II. faze, prav tako pa imajo izražene tudi prenašalne proteine, in sicer P-gp, MRP1, MRP2, BCRP ter Papt 1. Ker imajo izražene tako metabolne encime kot prenašalne proteine, so Caco-2 celice primerne za preučevanje transcelularnega transporta in metabolizma preučevanih snovi [30, 32]. V mnogih ozirih enoplastna kultura dobro posnema človeški epitelij in predstavlja odličen model za študije pasivnega transcelularnega transporta, ki je najpogostejsa pot prehoda učinkovih skozi intestinalni epitelij [32].

Črevesne rezine predstavljajo enega izmed intaktnih sistemov. Z učinkovito in hitro tehniko rezanja, lahko iz majhnega vzorca tankega črevesa pridobimo veliko rezin, ki imajo ohranjeno aktivnost metabolnih encimov, prenašalnih proteinov in vsebujejo kofaktorje. So model za študij privzema učinkovine v sluznico, katerega največja prednost je njegova preprostost. Določamo privzem učinkovine v tkivo, vendar pa ta difundira v tkivo iz vseh smeri, tako da ne moremo ločevati apikalnih in bazolateralnih procesov [32].

Obrnjene črevesne vrečke dobimo tako, da črevo obrnemo, da mukozna stran gleda navzven ter ga nareženo na 2 do 4 cm dolge kose, ki jih napolnimo z akceptorsko raztopino in zatesnimo na obe koncih. To je dokaj preprosta in poceni metoda, ki omogoča merjenje transporta učinkovine skozi steno črevesja ter tudi ločevanje med transcelularnim in paracelularnim prehodom.

Difuzijske celice so za opazovanje transporta spojin skozi živo tkivo uporabljali že od petdesetih let prejšnjega stoletja. Na njih lahko določamo permeabilnost učinkovin in transportne mehanizme. Lahko uporabljamo celotno črevo ali pa črevo z odstranjeno muskulaturo. Poleg intestinalnega tkiva različnih laboratorijskih živali in celo človeka je možno poskuse izvajati tudi s celičnimi kulturami [30].

2 NAMEN DELA

Pri terapiji z raloksifenom so opazili pomembne interindividualne razlike v plazemskih koncentracijah raloksifena in njegovih metabolitov, kar je bilo povezano tudi z različno učinkovitostjo terapije pri pacientkah. Vzrok za to bi lahko iskali v prisotnosti in variabilnosti prenašalnih proteinov in metabolnih encimov v kompleksni presnovi raloksifena. Ker bazedoksifen prav tako spada v skupino SERM in je strukturno zelo podoben raloksifenu predvidevamo, da bi tudi pri bazedoksifenu preiskovani prenašalni proteini imeli podoben vpliv.

Namen diplomske naloge je ugotoviti, kateri ekskretorni prenašalni proteini vplivajo na farmakokinetiko raloksifena in njegovih metabolitov ter bazedoksifena. V raziskavi bomo uporabili membranske pripravke iz insektnih celic transficiranih z bakulovirusi. Te celice so transfecirane z genom za enega od transmembranskih proteinov, ki so bili že predstavljeni v uvodu, in sicer so to P-gp, BCRP, MRP1, MRP2 in MRP3. Ti vplivajo na izločanje učinkovin in njihovih metabolitov iz organizma in posledično na njihove farmakokinetične lastnosti. Prav ti prenašalni proteini naj bi bili po eni strani odgovorni za zelo majhno biološko uporabnost, po drugi strani pa za velik obseg enterohepatične in enteroterične cirkulacije.

3 MATERIALI IN METODA

3.1 Materiali

Substance:

- raloksifen; ekstrahiran iz tablet Evista[®] (Lilly & Co.), stopnja čistosti > 98,5%
- raloksifenijev klorid, Sigma, stopnja čistosti > 99,8 %, 510,1 g/mol, raztopljen v etanolu, s končno koncentracijo 600 µM
- metaboliti raloksifena M1, M2 in M3; sintetizirani (mikrobiološki postopek pridobivanja [33]) in karakterizirani na Fakulteti za farmacijo, Ljubljana
- bazedoksifen; sintetiziran in karakteriziran na Fakulteti za farmacijo, Ljubljana.

Tabela 3.1: Vsebina testnega kompleta, proizvajalec SOLVO[®] BIOTECHNOLOGY

viala	substanca	shranjevanje	pogoji pri izvedbi postopka
A	suspenzija membrane (5 mg/ml)	- 80 °C	na ledu
B	medij	- 80 °C	na ledu
C	raztopina fosfata (0,4 mM) - KH ₂ PO ₄	≤ - 20 °C	na ledu
D	raztopina fosfata (0,8 mM) - KH ₂ PO ₄	≤ - 20 °C	na ledu
E	raztopina Na-ortovanadata (600 mM)	≤ - 20 °C	na ledu
F	aktivator: P-gp - verapamil (20 mM v DMSO) BCRP - sulfasalazin (5 mM v DMSO) MRP1 - NEM-GS raztopina (150 mM v H ₂ O) MRP2 - sulfasalazin (50 mM v DMSO) MRP3 - benzboromaron (25 mM v DMSO)	≤ - 20 °C ≤ - 20 °C - 80 °C ≤ - 20 °C - 80 °C	sobna temperatura sobna temperatura na ledu sobna temperatura sobna temperatura
G	razvijalec	≤ - 20 °C	sobna temperatura
H	blokator	≤ - 20 °C	sobna temperatura
I	inhibitor: P-gp, MRP3 - ciklosporin A (2 mM raztopina) BCRP - hoechst 33342 (5 mM raztopina) MRP1, MRP2 - benzboromaron (5 mM razt.)	≤ - 20 °C -80 °C -80 °C	sobna temperatura sobna temperatura sobna temperatura
J	raztopina MgATP (0,2M)	≤ - 20 °C	na ledu
K	glutation (300 mM) - pri MRP1, MRP2 in MRP3	- 80 °C	na ledu

Topila:

- bdestilirana voda – mili-Q voda, pridobljena z aparatom Milli-Q Advantage A10 Ultrapure Water Purification System (Millipore, Bedford, ZDA), na Fakulteti za farmacijo, Ljubljana
- DMSO – dimetil sulfoksid; 99%, Kemika, M = 78,13 g/mol, ρ = 1,099 - 1,101

Aparature:

- grelec, Tehnica, VORTEMP 56EVC
- mešalo, Tehnica, VIBROMIX 114
- hladilno-grelna plošča, Cole-Parmer® Chilling/Heating Block
- spektrofotometer, Tecan, safire²
- multipeta, eppendorf Multipette® plus
- pipete, eppendorf Research:
 - 0,5 – 10 µl
 - 2 – 20 µl
 - 20 – 200 µl
 - 100 – 1000 µl
 - 1 – 10 ml

Vse teste smo izvedli v mikrotiterskih ploščah (96 luknjic), TPP.

3.2 Metoda

Obstaja veliko načinov, po katerih lahko določimo ATPazno aktivnost ABC prenašalnih proteinov. Ta postopek smo izvedli na očiščenih membranah, ki so bile pridobljene iz insektnih celic in imajo izražene velike količine človeških ABC prenašalnih proteinov.

Ti za prenos substrata iz celice potrebujejo energijo, ki jo pridobijo z ATP hidrolizo. Pri tem procesu se sprosti anorganski fosfat (Pi), ki ga lahko določimo s preprosto kolorimetrično reakcijo. Količina sproščenega Pi je sorazmerna z aktivnostjo prenašalnega proteina. Ker pa so v membranah prisotne tudi druge ATPaze, je treba ločiti njihovo aktivnost od aktivnosti prenašalnih proteinov. Zato le-te inhibiramo z natrijevim

vanadatom in aktivnost prenašalnih proteinov merimo kot tisto aktivnost, ki je občutljiva na natrijev vanadat. Med postopkom smo istočasno na mikrotitrski plošči (96 lukenj) izvedli dva testa, in sicer aktivacijski ter inhibicijski test. Pri aktivacijskemu testu smo merili porast osnovne na vanadat občutljive ATPazne aktivnosti. Inhibicijski test pa je potekal v prisotnosti aktivatorja in zato smo izmerili zmanjšanje maksimalne na vanadat občutljive ATPazne aktivnosti, ki smo jo dobili z dodatkom že znanega aktivatorja. Do zmanjšanja pride pri inhibitorjih, lahko tudi pri substancah, ki se zelo počasi prenašajo preko membrane, v nekaterih primerih pa lahko pride celo do zmanjšanja osnovne na vanadat občutljive ATPazne aktivnosti, ki pa ni posledica aktivacije prenašalnih proteinov. Če zaznamo stimulacijo, nam to pove, da je naša učinkovina ali njen metabolit substrat za prenašalni protein. V primeru inhibicije zaznamo zmanjšanje aktivnosti, vendar pa ne izvemo, do kakšne interakcije je prišlo.

3.3 Eksperimentalni del

Da smo lahko začeli z izvedbo postopka, smo najprej pripravili osnovne raztopine raloksifena, njegovih metabolitov ter bazedoksifena. Pripravili smo jih tako, da smo zatehtali ustrezne količine substanc in jih raztopili v DMSO-ju, nato pa smo iz njih pripravili še razredčitve, na koncu smo imeli pripravljene raztopine v osmih različnih koncentracijah, ki so predstavljene v naslednji tabeli.

Tabela 3.2: Testirane koncentracije raloksifena, njegovih metabolitov in bazedoksifena v μM

raloksifen	M1	M2	M3	bazedoksifen
50,00	41,40	31,40	8,00	47,80
25,00	20,70	15,70	4,00	23,90
12,50	10,35	7,85	2,00	11,95
6,25	5,18	3,93	1,00	5,98
3,13	2,59	1,96	0,50	2,99
1,56	1,29	0,98	0,25	1,49
0,78	0,65	0,49	0,13	0,75
0,39	0,32	0,25	0,06	0,37

S pomočjo kontrol smo se prepričali, če je izvedba potekala pravilno, in sicer uporabili smo naslednje kontrole:

- Ktrl 1; **osnovna ATPazna aktivnost**; količina sproščenega Pi je osnovna količina, ki se sprosti ob prisotnosti membrane, prenašalnega proteina in topila, v katerem je raztopljena učinkovina. Se pravi sproščen Pi je posledica kontaminacije, ATPazne aktivnosti, ki ni nastala zaradi prenašalnega proteina, ter osnovna ATPazna na vanadat občutljiva aktivnost.
- Ktrl 2; **na vanadat neobčutljiva ATPaza aktivnost**; sproščen Pi je posledica kontaminacije in ATPazne aktivnosti, ki ni nastala zaradi prenašalnega proteina
- Ktrl 3; **ATPazna aktivnost maksimalno aktiviranih membran**; predstavlja pozitivno kontrolo za aktivacijski test. Sproščen Pi je posledica kontaminacije, ATPazne aktivnosti, ki ni nastala zaradi prenašalnega proteina, ter maksimalne aktivacije membran.
- Ktrl 4; **na vanadat neobčutljiva ATPazna aktivnost maksimalno aktiviranih membran**; se uporablja pri preračunavanju pri inhibicijskemu testu. Sproščen Pi je posledica kontaminacije, ATPazne aktivnosti, ki ni nastala zaradi prenašalnega proteina, v prisotnosti močnega aktivatorja in vanadata.
- Ktrl 5; **inhibirana ATPazna aktivnost pri maksimalno aktiviranih membranah**; predstavlja pozitivno kontrolo pri inhibicijskemu testu. S to kontrolo preverimo, če znani inhibitor prenašalnega proteina inhibira ATPazno aktivnost maksimalno aktiviranih membran.

3.3.1 Postopek

1. Najprej smo morali pripraviti ustrezne razredčitve raloksifena in njegovih metabolitov (M1, M2 in M3) ter bazedoksifena. Pri tem smo morali upoštevati dejstvo, da se koncentracija razredči za petdesetkrat med izvedbo, in zato začetne koncentracije niso smeles biti prenizke. Na koncu postopka je na sliki 3.1 predstavljena shema za lažjo izvedbo.
2. Pripravili smo raztopini razvijalca in blokatorja.
 - razredčili smo **1,2 ml** blokatorja (viala H) z **10,8 ml** bidestilirane vode

- razredčili smo **4 ml** razvijalca (viala **G**) z **8 ml** bdestilirane vode; (razvijalec moramo pred uporabo dobro pretesti)

Raztopini sta stali na **sobni temperaturi** do uporabe.

3. Testno raztopino smo pripravili iz medija (viala B) in bdestilirane vode. Pri membrani P-gp, BCRP smo razredčili **870 µl** medija (viala **B**) z **7830 µl** bdestilirane vode, pri membranah MRP1, MRP2 in MRP3 pa smo **870 µl** medija (viala **B**) razredčili z **7770 µl** bdestilirane vode in nato dodali še **60 µl** glutationa (viala **K**). Testno raztopino smo dobro premešali in jo postavili na led.
4. MgATP raztopino smo pripravili tako, da smo razredčili **50 µl** 0.2 M MgATP raztopine (viala **J**) z **950 µl** testne raztopine (dobro premešali ter postavili na led).
5. Nato smo pripravili suspenzijo membrane v testni raztopini, pred uporabo smo morali najprej suspenzijo membrane odtaliti na sobni temperaturi ter jo rahlo premešati (vortexiranje **1 – 2 s** ali rahlo pipetiranje **4 – 5 krat**). Pri P-gp in BCRP membranah smo odpipetirali **120 µl** suspenzije membrane v **5880 µl** testne raztopine, pri MRP1, MRP2 in MRP3 membranah pa **240 µl** suspenzije membrane v **5760 µl** testne raztopine, le v primeru MRP1 membran pa v **5260 µl** testne raztopine. Tudi tu smo na koncu premešali, vendar zelo rahlo, da ne bi prišlo do lize membran.

Iz suspenzije membrane v testni raztopini smo pripravili aktivirano in osnovno suspenzijo. V primeru osnovne suspenzije smo k **2600 µl** suspenzije membrane v testni raztopini dodali **6,5 µl** DMSO-ja, razen v primeru membrane MRP1, kjer pa smo k **2500 µl** dodali **227 µl** bdestilirane vode. Aktivno suspenzijo smo pripravili tako, da smo k **3000 µl** suspenzije membrane v testni raztopini dodali **7,5 µl** ustreznega aktivatorja, pri membrani MRP1 pa smo k **2750 µl** dodali **250 µl** njenega aktivatorja.

Iz osnovne suspenzije smo pripravili kontroli 1 in 2, iz aktivirane pa kontrole 3, 4 in 5. Ktrl1 je bila sestavljena iz **1200 µl** osnovne suspenzije in **3 µl** bdestilirane vode, Ktrl2 pa iz **1200 µl** in **3 µl** vanadata (viala **E**). Za Ktrl3 in Ktrl5 skupaj smo odpipetirali **1600 µl** aktivirane suspenzije in dodali **4 µl** bdestilirane vode. Pri Ktrl4 pa smo odpipetirali **1200 µl** aktivirane suspenzije in **3 µl** vanadata (viala **E**). Vse pripravljeni suspenzioni smo morali hraniti na ledu.

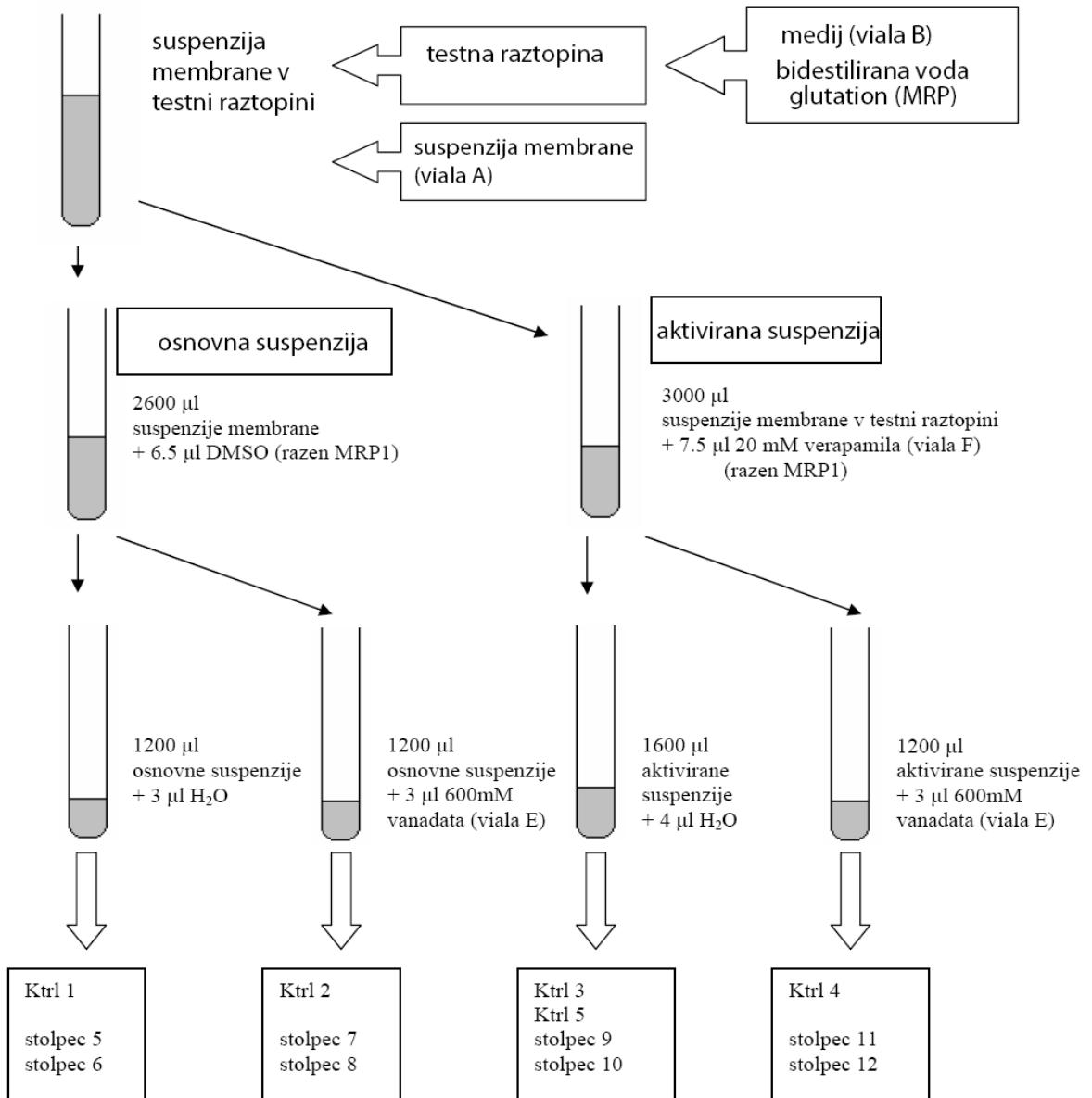
6. Po pripravi suspenzij smo morali položili mikrotitersko ploščo na hladilno-grelno ploščo, ki je bila nastavljena na **1 °C**.

Tabela 3.3: Princip nanašanja komponent na mikrotitersko ploščo

	Kontrole				testirana substanca (μM)		test. sub. (μM) + vanadat		test. sub. (μM) + aktivator		test. sub. (μM) + aktivator + vanadat	
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	kontrola bdestilirane vode				300.00	300.00	300.00	300.00	300.00	300.00	300.00	300.00
B	4 nmol Pi				100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00
C	8 nmol Pi				33.33	33.33	33.33	33.33	33.33	33.33	33.33	33.33
D	Ktrl 1				11.11	11.11	11.11	11.11	11.11	11.11	11.11	11.11
E	Ktrl 2				3.70	3.70	3.70	3.70	3.70	3.70	3.70	3.70
F	Ktrl 3				1.23	1.23	1.23	1.23	1.23	1.23	1.23	1.23
G	Ktrl 4				0.41	0.41	0.41	0.41	0.41	0.41	0.41	0.41
H	Ktrl 5				0.14	0.14	0.14	0.14	0.14	0.14	0.14	0.14

7. V luknjice namenjene za umeritveno krivuljo fosfatov, smo dali po **40 μl** testne raztopine.
8. Po razporeditvi iz tabele 3.3 smo nanesli po **40 μl** ustreznje suspenzije membrane. Za nanašanje na mikrotitersko ploščo smo uporabili multifunkcijsko pipeto, s čimer smo skrajšali čas nanašanja. Tako je bilo v vsaki luknjici 4 μg membran (vseh proteinov) pri membranah P-gp in BCRP, pri membranah MRP1, MRP2 in MRP3 pa po 8 μg .
9. V luknjice namenjene za umeritveno krivuljo fosfatov, smo nanesli **10 μl** bdestilirane vode, **10 μl 0,4 nM** in **10 μl 0,8 nM** raztopine fosfatov.
10. V luknjice namenjene kontroli (Ktrl1, Ktrl2, Ktrl3 in Ktrl4), smo nanesli po **1 μl** DMSO-ja.
11. V luknjice Ktrl5 pa smo nanesli **1 μl** ustreznega inhibitorja.
12. Nato smo na mikrotitersko ploščo nanašali po **1 μl** ustreznje razredčitve raloksifena ali njegovih metabolitov ali bazedoksifena, uporabili smo multifunkcijsko (lahko tudi 8-kanalno pipeto), da smo skrajšali čas nanašanja.
13. Mikrotitersko ploščo in MgATP raztopino smo inkubirali **15 min pri 37 °C**.
14. Reakcijo smo začeli z dodatkom **10 μl** MgATP raztopine v vse luknjice razen luknjic, ki so bile namenjene umeritveni krivulji fosfatov.
15. Sledila je **10 min** inkubacija pri **37 °C**. V tem času je potekla reakcija.
16. Reakcijo smo ustavili, ko smo dodali **100 μl** razvijalca pri sobni temperaturi, katerega naloga je bila ustaviti reakcijo ter razvoj barve.
17. Po točno **2 min**, ko smo dodali razvijalec, smo dodali še blokator, ki je ustavil nadaljnji razvoj barve.

18. Na koncu smo inkubirali še **30 min pri 37 °C**, po končani inkubaciji pa izmerili absorbanco pri 630 nm (barva ostane stabilna 3 ure).



Slika 3.1: Prikaz izvedbe postopka na membranah z izraženimi prenašalnimi proteini

Ker pa bi lahko med testiranimi substancami (ral., M1, M2, M3, baz.) in membranami prišlo do interakcije že v odsotnosti prenašalnih proteinov, smo izvedli tudi kontrolni postopek na membranah, ki so transfecirane s praznim vektorjem in ga nimajo izraženega .

3.3.2 Kontrolni postopek

1. Uporabili smo iste razredčitve raloksifena in njegovih metabolitov (M1, M2 in M3) ter bazedoksifena kot pri prejšnjem poskusu. Na koncu postopka je na sliki 3.2 predstavljena shema za lažjo izvedbo.
2. Pripravili smo raztopini razvijjalca in blokatorja.
 - razredčili smo **0,9 ml** blokatorja (viala **H**) z **8,1 ml** bidestilirane vode
 - razredčili smo **3 ml** razvijjalca (viala **G**) z **6 ml** bidestilirane vode; (razvijalec moramo pred uporabo dobro pretresti).

Raztopini sta stali na **sobni temperaturi** do uporabe.

3. Testno raztopino smo pripravili iz medija (viala **B**) in bidestilirane vode. Pri membrani P-gp, BCRP smo razredčili **700 µl** medija (viala **B**) z **6300 µl** bidestilirane vode, pri membranah MRP1, MRP2 in MRP3 pa smo **700 µl** medija (viala **B**) razredčili z **6253 µl** bidestilirane vode in nato dodali še **47 µl** glutationa (viala **K**). Testno raztopino smo dobro premešali in jo postavili na led.
4. MgATP raztopino smo pripravili tako, da smo razredčili **50 µl** 0.2 M MgATP raztopine (viala **J**) z **950 µl** testne raztopine. Dobro smo premešali ter postavili na led.
5. Nato smo pripravili suspenzijo membrane v testni raztopini. Pred uporabo smo morali najprej suspenzijo membrane odtaliti na sobni temperaturi ter jo rahlo premešati (vortexiranje **1 – 2 s** ali rahlo pipetiranje **4 – 5 krat**). Pri P-gp in BCRP membranah smo odpipetirali **80 µl** suspenzije membrane v **3920 µl** testne raztopine, pri MRP1, MRP2 in MRP3 membranah pa **160 µl** suspenzije membrane v **3840 µl** testne raztopine, le v primeru MRP1 membran pa v **3615 µl** testne raztopine. Tudi tu smo na koncu premešali, vendar zelo rahlo, da ne bi prišlo do lize membran.

Iz suspenzije membrane v testni raztopini smo pripravili aktivirano in osnovno suspenzijo. V primeru osnovne suspenzije smo k **2600 µl** suspenzije membrane v testni raztopini dodali **6,5 µl** DMSO-ja, razen v primeru membrane MRP1, kjer pa smo k **2500 µl** dodali **227 µl** bidestilirane vode. Aktivno suspenzijo smo pripravili tako, da smo k **1000 µl** suspenzije membrane v testni raztopini dodali **2,5 µl** ustreznega aktivatorja ter pri membrani MRP1 k **1100 µl** dodali **100 µl** njenega aktivatorja.

Iz osnovne suspenzije smo pripravili kontroli 1 in 2, iz aktivirane pa kontrole 3 in 4. Ktrl1 je bila sestavljena iz **1200 µl** osnovne suspenzije in **3 µl** bidestilirane vode, Ktrl2 pa iz **1200 µl** in **3 µl** vanadata (viala E). Za Ktrl3 smo odpipetirali **400 µl** aktivirane suspenzije in dodali **1 µl** bidestilirane vode. Pri Ktrl4 pa smo odpipetirali **400 µl** aktivirane suspenzije in **1 µl** vanadata (viala E). Vse pripravljeni suspenzioni smo morali hraniti na ledu.

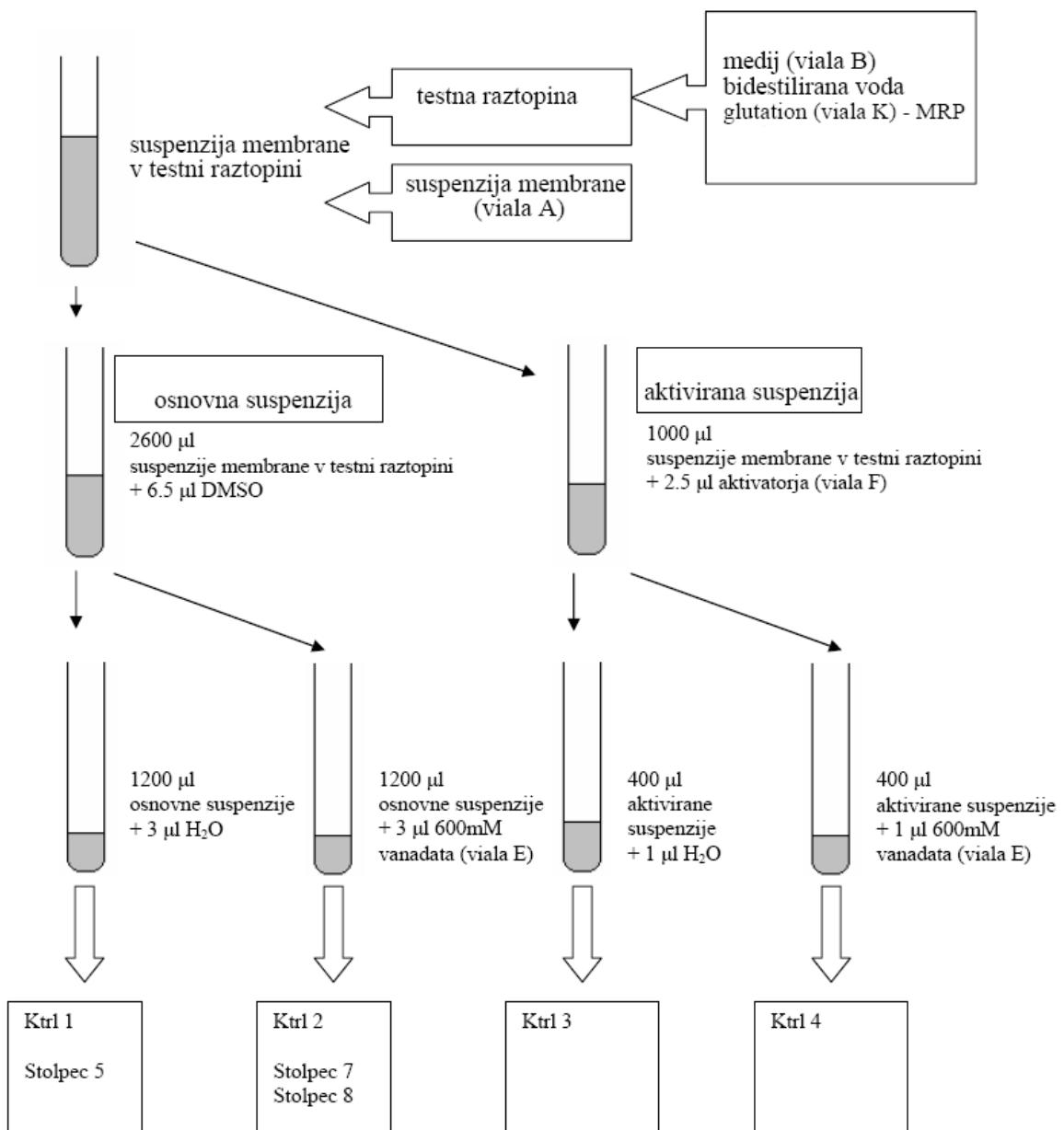
6. Po pripravi suspenzij smo položili mikrotitersko ploščo na hladilno-grelno ploščo, ki je bila nastavljena na **1 °C**.

Tabela 3.4: Princip nanašanja komponent na mikrotitersko ploščo

	Kontrole				testirana substanca (µM)		test. sub. (µM) + vanadat	
	1	2	3	4	5	6	7	8
A	kontrola bidestilirane vode				300.00	300.00	300.00	300.00
B	4 nmol Pi				100.00	100.00	100.00	100.00
C	8 nmol Pi				33.33	33.33	33.33	33.33
D	Ktrl 1				11.11	11.11	11.11	11.11
E	Ktrl 2				3.70	3.70	3.70	3.70
F	Ktrl 3				1.23	1.23	1.23	1.23
G	Ktrl 4				0.41	0.41	0.41	0.41
H					0.14	0.14	0.14	0.14

7. V luknjice namenjene za umeritveno krivuljo fosfatov, smo dali po **40 µl** testne raztopine.
8. Po razporeditvi iz tabele 3.4 smo nanesli po **40 µl** ustrezne suspenzije membrane. Za nanašanje na mikrotitersko ploščo smo uporabili multifunkcijsko pipeto, s čimer smo skrajšali čas nanašanja. Tako je bilo v vsaki luknjici 4 µg membran (vseh proteinov) pri membranah P-gp in BCRP, pri membranah MRP1, MRP2 in MRP3 pa po 8 µg.
9. V luknjice namenjene za umeritveno krivuljo fosfatov, smo nanesli **10 µl** bidestilirane vode, **10 µl** 0,4 nM in **10 µl** 0,8 nM raztopine fosfatov.
10. V luknjice namenjene kontroli (Ktrl1, Ktrl2, Ktrl3 in Ktrl4), smo nanesli po **1 µl** DMSO-ja.
11. Nato smo na mikrotitersko ploščo nanašali po **1 µl** ustrezne razredčitve raloksifena ali njegovih metabolitov ali bazedoksifena, uporabili smo pa multifunkcijsko, da smo skrajšali čas nanašanja.

12. Mikrotitersko ploščo in MgATP raztopino smo inkubirali **15 min pri 37 °C**.
13. Reakcijo smo začeli z dodatkom **10 µl** MgATP raztopine v vse luknjice razen luknjic, ki so namenjene umeritveni krivulji fosfatov.
14. Sledila je **10 min** inkubacija pri **37 °C**. V tem času je potekla reakcija.
15. Reakcijo smo ustavili, ko smo dodali **100 µl** razvijalca pri sobni temperaturi, katerega naloga je ustaviti reakcijo terobarvanje.
16. Po točno **2 min**, ko smo dodali razvijalec, smo dodali še blokator, ki je ustavil nadaljnji razvoj barve.
17. Na koncu smo inkubirali še **30 min pri 37 °C**, po končani inkubaciji pa izmerili absorbanco pri 630 nm (barva ostane stabilna 3 ure).



Slika 3.2: Prikaz izvedbe postopka na membranah brez izraženega prenašalnega proteina

3.4 Analiza podatkov

Specifična na vanadat občutljiva ATPazna aktivnost

1. Iz podatkov za 0,4 in 0,8 mM KH₂PO₄ smo določili umeritveno krivuljo fosfatov, na podlagi katere smo lahko izračunali količino sproščenega Pi v posamezni luknjici mikrotiterske plošče.
2. Nato smo izračunali povprečje štirih meritev absorbance za kontrole Ktrl1, Ktrl2, Ktrl3, Ktrl4 in Ktrl5 in s pomočjo umeritvene krivulje izračunali količino sproščenega Pi.
3. Ko smo od količine sproščenega Pi v Ktrl1 odšteli sproščen Pi v Ktrl2, smo dobili vrednost osnovne na vanadat občutljive ATPazne aktivnosti.
4. Ko smo odšteli sproščen Pi v Ktrl4 od Ktrl3, pa smo dobili vrednost maksimalne na vanadat občutljive ATPazne aktivnosti.
5. Inhibirano na vanadat občutljivo ATPazno aktivnost smo dobili, ko smo odšteli sproščen Pi v Ktrl5 od Pi v Ktrl4.
6. Nato smo pri aktivacijskem in inhibicijskem testu vrednosti sproščenega Pi pri meritvah, kjer je bil prisoten vanadat, odšteli od meritev, kjer vanadat ni bil prisoten. Tako smo izračunali vrednosti na vanadat občutljive ATPazne aktivnosti.
7. Relativno vrednost smo izrazili kot količino sproščenega Pi/mg membrane/min časa inkubacije.

ATPazna aktivnost izražena v odstotkih

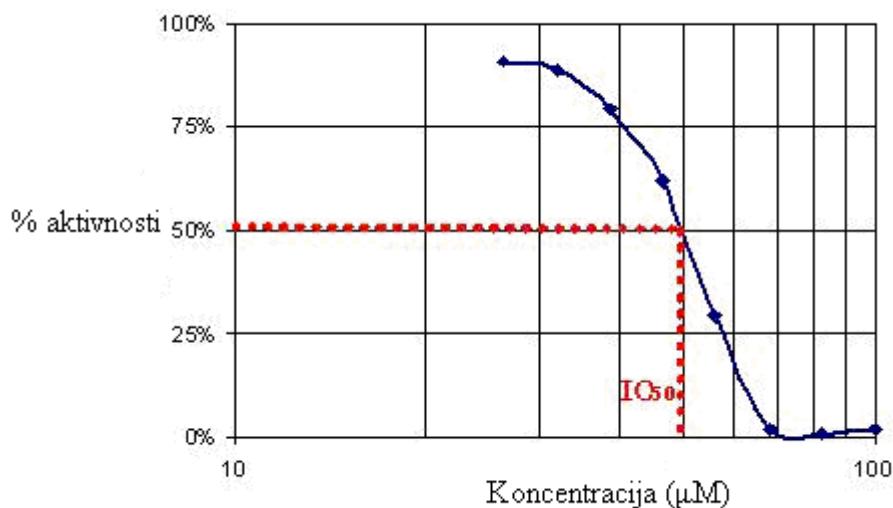
1. Ko smo hoteli izračunati maksimalno na vanadat občutljivo ATPazno aktivnost, smo od vrednosti absorbanc (Ktrl3 - Ktrl4) odšteli (Ktrl1 - Ktrl2).
2. Ko smo odšteli Ktrl2 od Ktrl1 (absorbance), pa smo dobili osnovno na vanadat občutljivo ATPazno aktivnost.
3. Nato smo pri aktivacijskem in inhibicijskem testu vrednosti absorbanc pri meritvah, kjer je bil prisoten vanadat, odšteli od meritev, kjer vanadat ni bil prisoten, in nato odšteli še vrednost osnovne na vanadat občutljive ATPazne aktivnosti (rezultat točke 2). Tako smo dobili rezultate (vrednosti absorbanc), ki so podajale aktivacijo

ATPazne aktivnosti za vse učinkovine in vse njihove koncentracije, ki smo jih uporabili v postopku.

4. Odstotke ATPazne aktivnosti pa smo dobili, ko smo delili vrednost pod točko 3 z vrednostjo pod točko 1 in pomnožili s 100.

Določanje IC₅₀

IC₅₀ je koncentracija inhibitorja, ki v našem primeru zmanjša odstotek relativne ATPazne aktivnosti na polovico (50 %) [34]. Ocenili smo jo samo približno iz grafa, zato nam predstavlja samo neko okvirno vrednost. Na sliki 3.3 je predstavljen modelni graf, na katerem vidimo, kako se določa IC₅₀ vrednost.



Slika 3.3: Modelni graf, ki prikazuje določanje IC₅₀ [35]

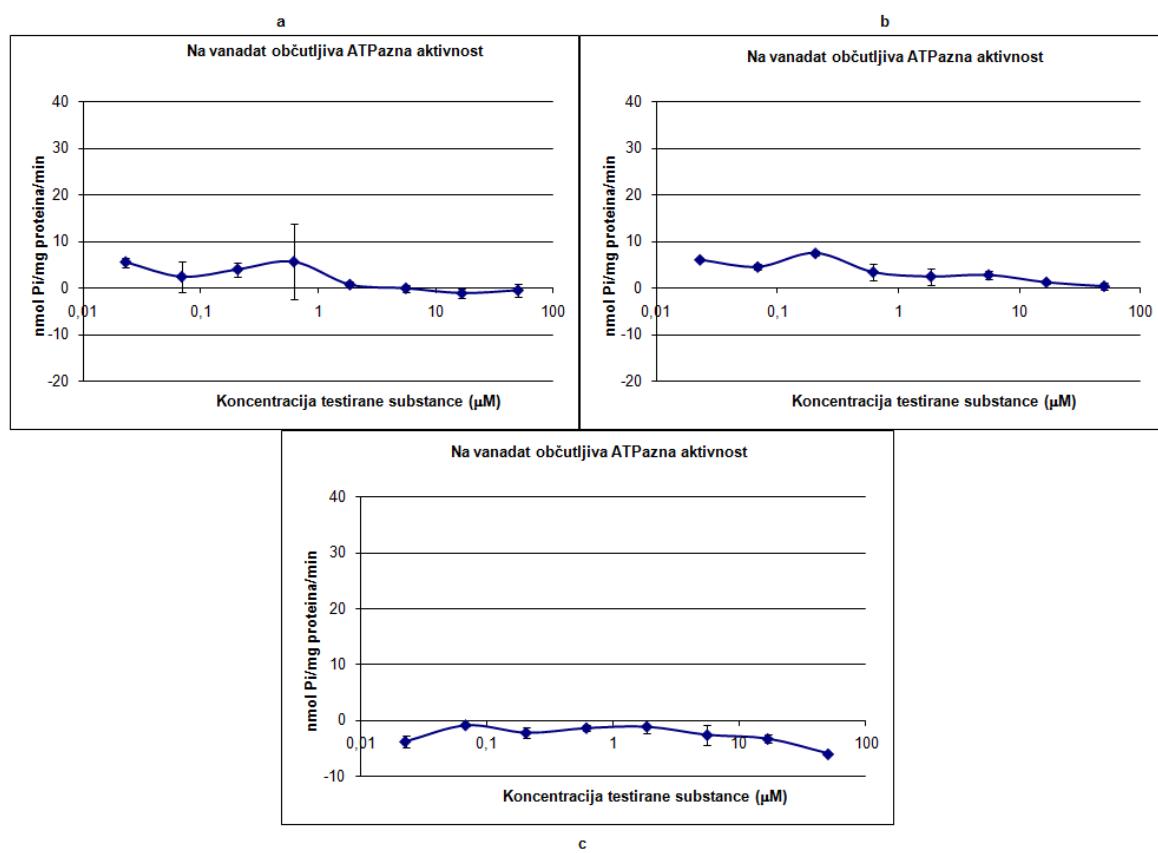
4 REZULTATI IN RAZPRAVA

4.1 Poskusi na kontrolnih membranah

Za vse prenašalne proteine in vse testirane substance smo izvedli kontrolni postopek na membranah, ki ga niso imele izraženega. Nikjer nismo opazili, da bi prišlo do interakcij med membranami in raloksifensom, njegovimi metaboliti in bazedoksifensom.

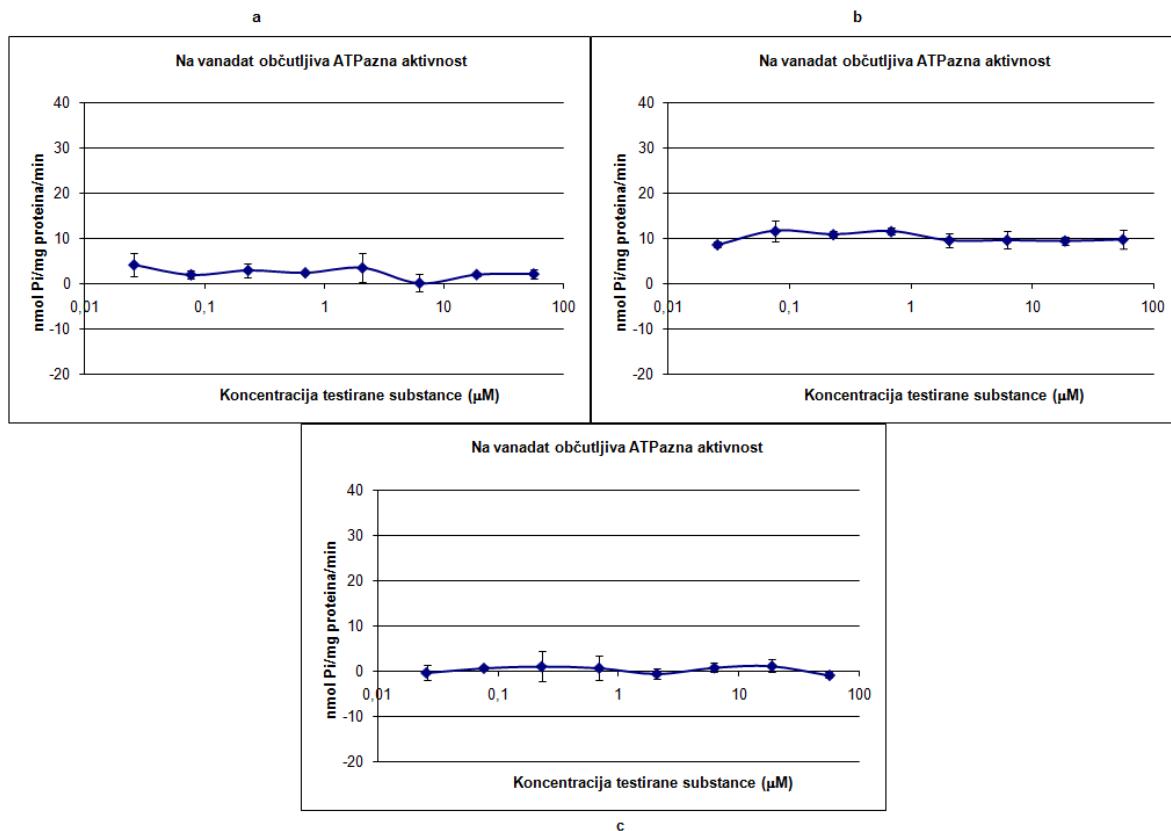
Na naslednjih grafih je prikazana relativna ATPazna aktivnost v odvisnosti od koncentracije testirane substance.

4.1.1 Raloksifen



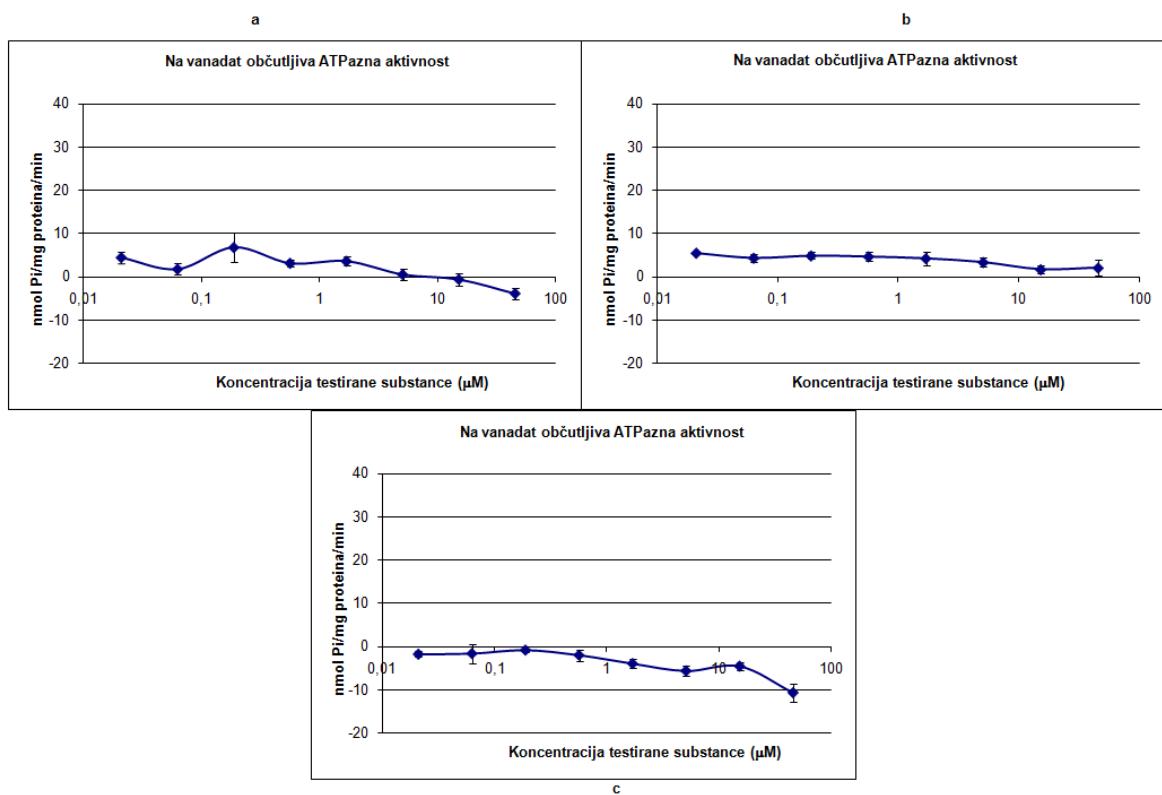
Slika 4.1: Odvisnost specifične na vanadat občutljive ATPazne aktivnosti (izražena v nmol Pi/mg proteina/min) od koncentracije raloksifena na: a - defP-gp membrani, b - defMRP membrani, c - defBCRP membrani

4.1.2 M1



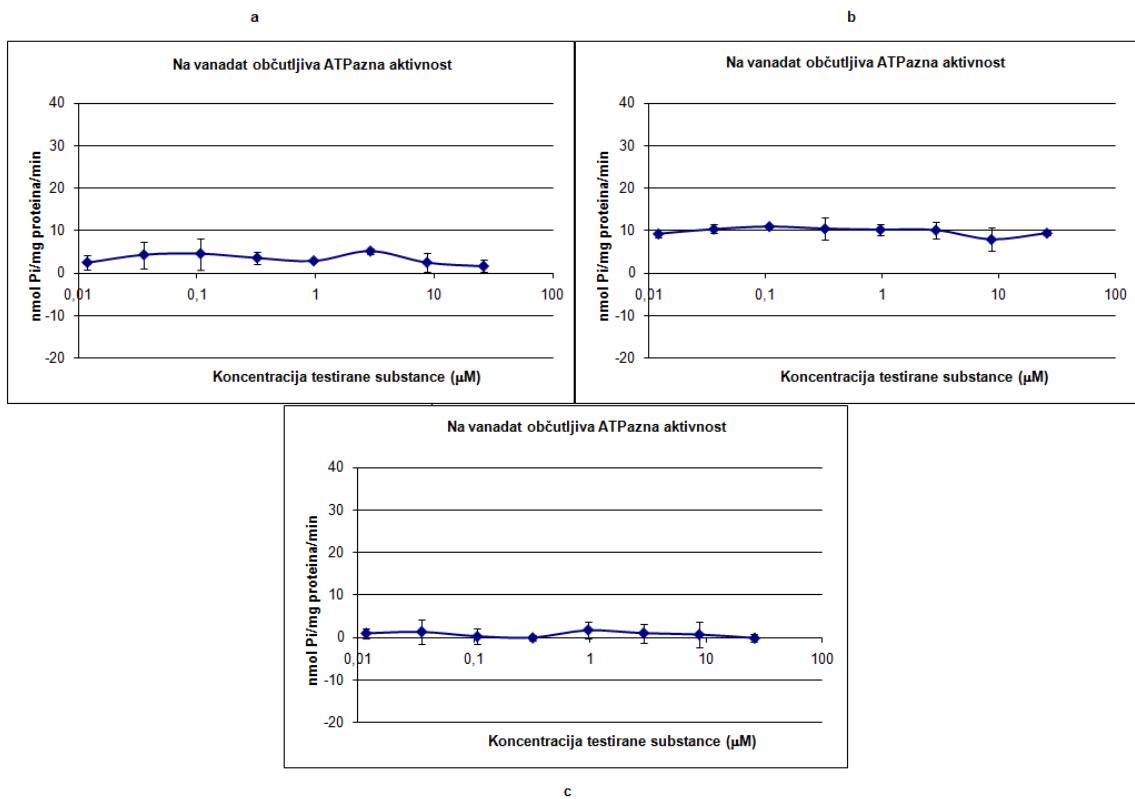
Slika 4.2: Odvisnost specifične na vanadat občutljive ATPazne aktivnosti (izražena v nmol Pi/mg proteina/min) od koncentracije M1 na: a - *defP-gp* membrani, b - *defMRP* membrani, c - *defBCRP* membrani

4.1.3 M2



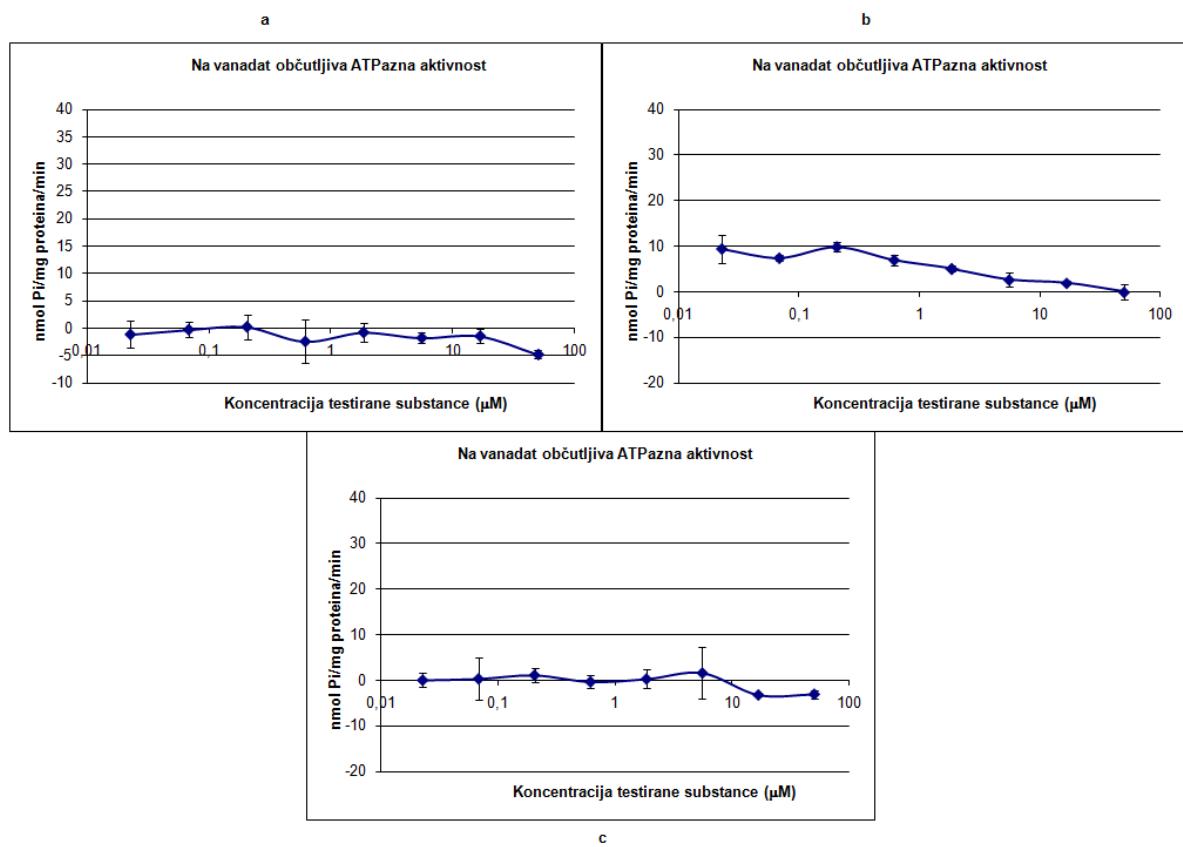
Slika 4.3: Odvisnost specifične na vanadat občutljive ATPazne aktivnosti (izražena v nmol Pi/mg proteina/min) od koncentracije M2 na: a - *defP-gp* membrani, b - *defMRP* membrani, c - *defBCRP* membrani

4.1.4 M3



Slika 4.4: Odvisnost specifične na vanadat občutljive ATPazne aktivnosti (izražena v nmol Pi/mg proteina/min) od koncentracije M3 na: a - *defP-gp* membrani, b - *defMRP* membrani, c - *defBCRP* membrani

4.1.5 Bazedoksifen



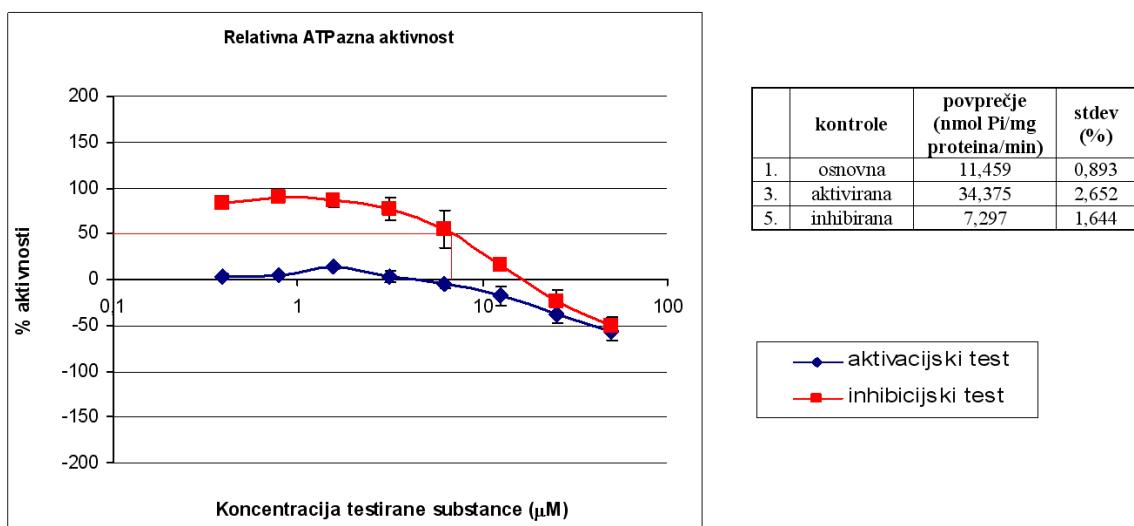
Slika 4.5: Odvisnost specifične na vanadat občutljive ATPazne aktivnosti (izražena v nmol Pi/mg proteina/min) od koncentracije bazedoksifena na: a - *defP-gp* membrani, b - *defMRP* membrani, c - *defBCRP* membrani

4.2 Poskusi na membranah z izraženim prenašalnim proteinom

Na grafih sta predstavljeni aktivacijska in inhibicijska krivulja, v tabelah pa so predstavljene vrednosti osnovne, aktivirane in inhibirane povprečne vrednosti ATPazne aktivnosti.

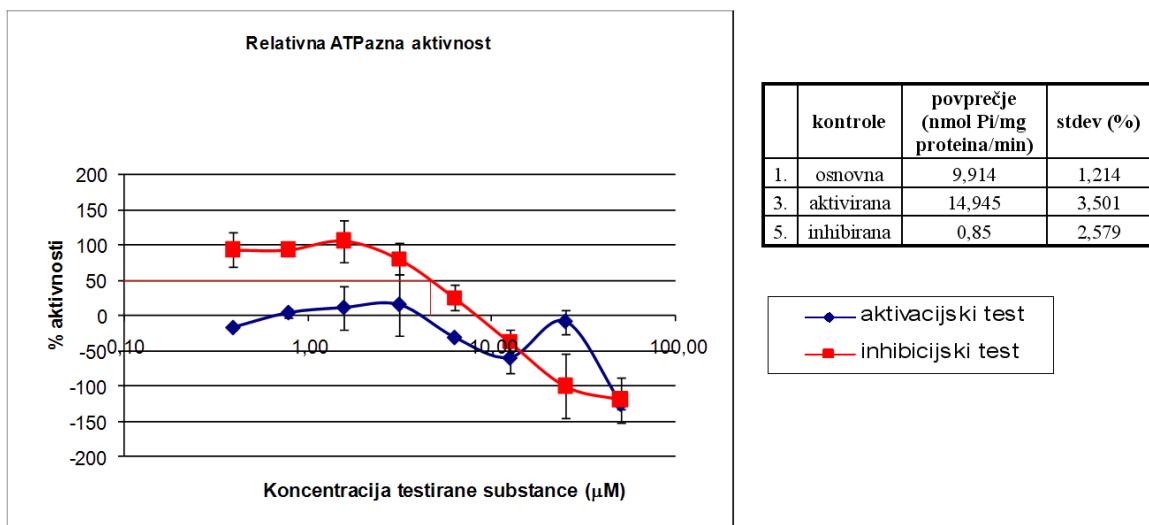
4.2.1 Raloksifen

a. P-gp



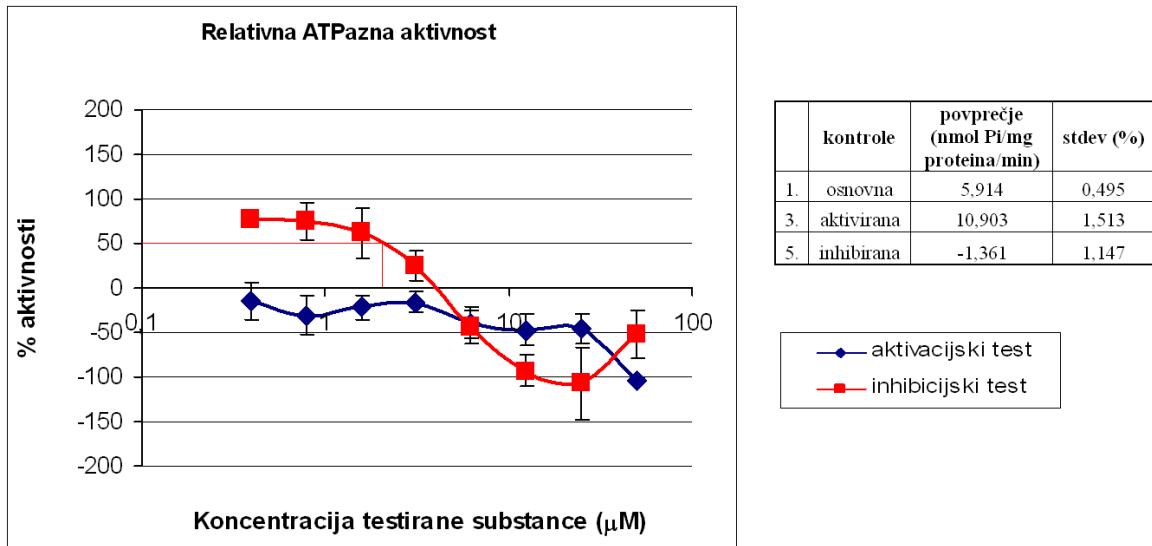
Slika 4.6: Odvisnost odstotka ATPazne aktivnosti P-gp od koncentracije raloksifena

b. MRP1



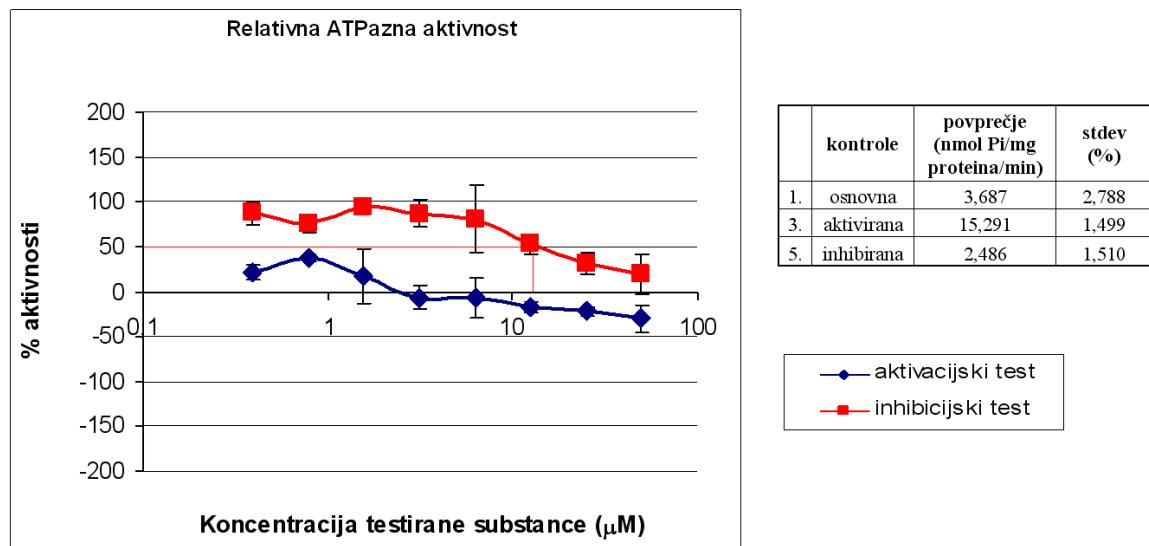
Slika 4.7: Odvisnost odstotka ATPazne aktivnosti MRP1 od koncentracije raloksifena

c. MRP2



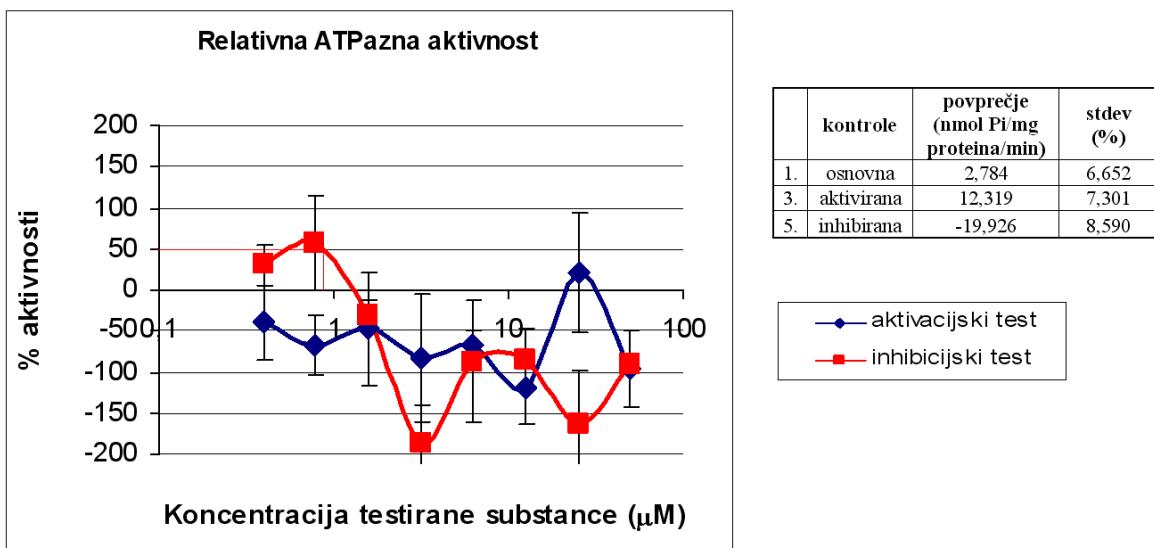
Slika 4.8: Odvisnost odstotka ATPazne aktivnosti MRP2 od koncentracije raloksifena

d. MRP3



Slika 4.9: Odvisnost odstotka ATPazne aktivnosti MRP3 od koncentracije raloksifena

e. BCRP



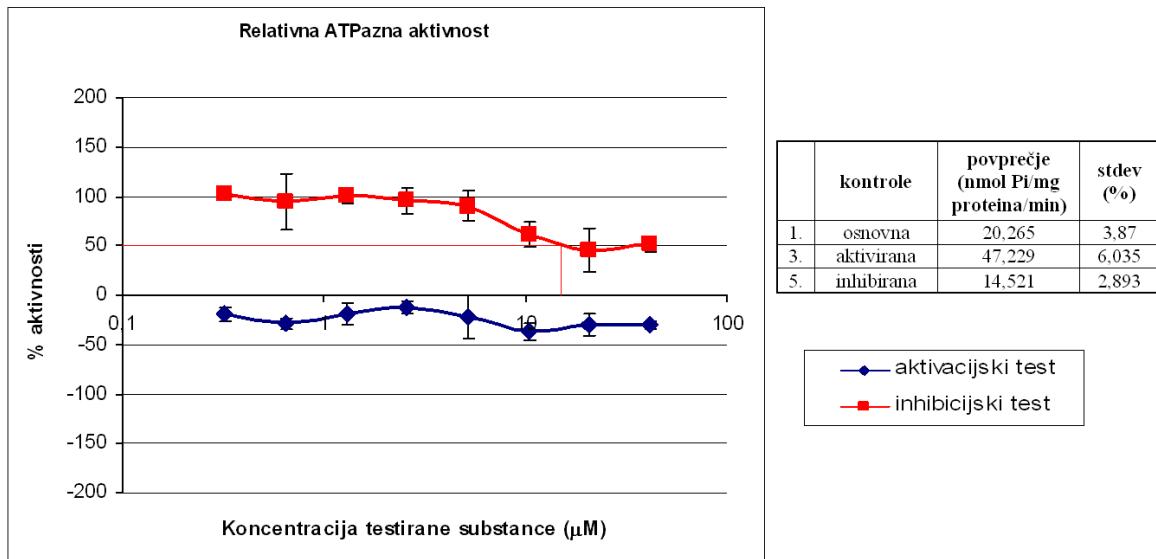
Slika 4.10: Odvisnost odstotka ATPazne aktivnosti BCRP od koncentracije raloksifena

Koncentracije razredčitev raloksifena, ki smo jih uporabili v testih, so bile: 0,39, 0,78, 1,56, 3,13, 6,25, 12,50, 25,00 in 50,00 μM . Pri P-gp in MRP3 membranah je prišlo do šibke aktivacije v območju nizkih koncentracij (P-gp od 0,78-3,13 μM , MRP3 od 0,39-1,56 μM), pri ostalih membranah pa ni prišlo do aktivacije, zato lahko predvidevamo, da raloksifen ni njihov substrat. Raloksifen je močno inhibiral vse membrane razen MRP3, kjer je tudi prišlo do inhibicije, vendar ne do tako močne kot pri ostalih membranah. In sicer približne IC₅₀, ki so bile ocenjene le na podlagi grafov pri vseh eksperimentih, so znašale za P-gp okoli 6 μM , za MRP1 5 μM , za MRP2 2 μM , za MRP3 12 μM in za BCRP 6 μM .

Glede na to, da vidimo inhibicijo ATPazne aktivnosti z zvišanjem koncentracije raloksifena, lahko to pomeni, da se raloksifen prenaša s prenosalcem in tako preko mehanizma kompetitivne inhibicije inhibira ATPazno aktivnost. Druga možnost pa je, da se raloksifen veže na drugo vezavno mesto in povzroči konformacijsko spremembo prenosalca ter posledično inhibicijo ATPazne aktivnosti. Še tretja možnost za inhibicijo pa je, da raloksifen pri tako visokih koncentracijah poruši strukturo membrane in prenosalcev ter posledično s tem spremeni njihovo aktivnost. V primeru raloksifena gre najverjetneje pri visokih koncentracijah za tretji mehanizem. V primeru P-gp in MRP3 lahko pri nizkih koncentracijah vidimo šibko aktivacijo, kar pomeni, da bi raloksifen lahko bil substrat za ta prenosalna proteina.

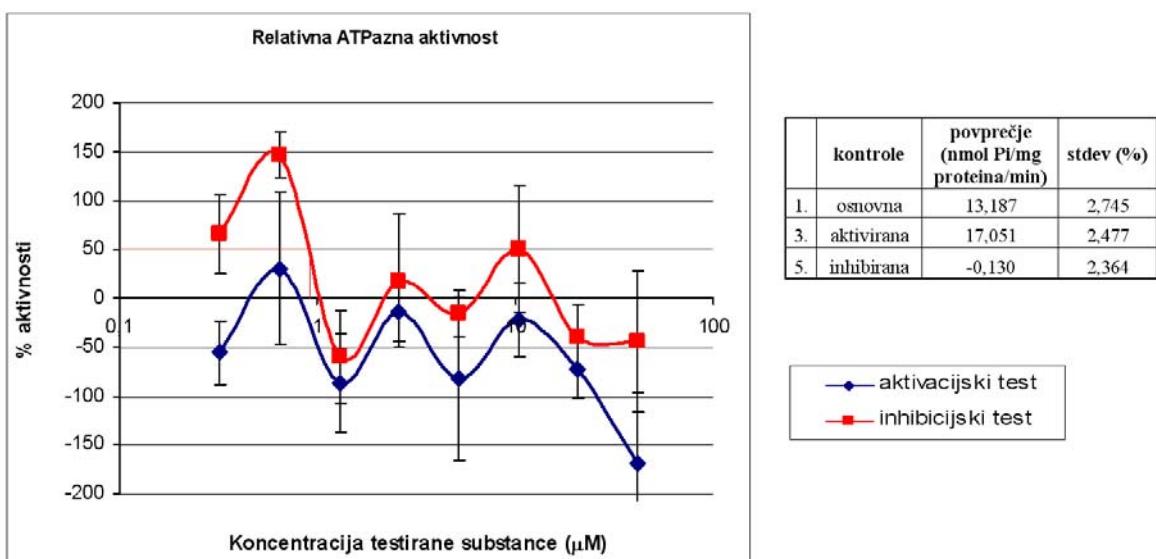
4.2.2 M1

a. P-gp



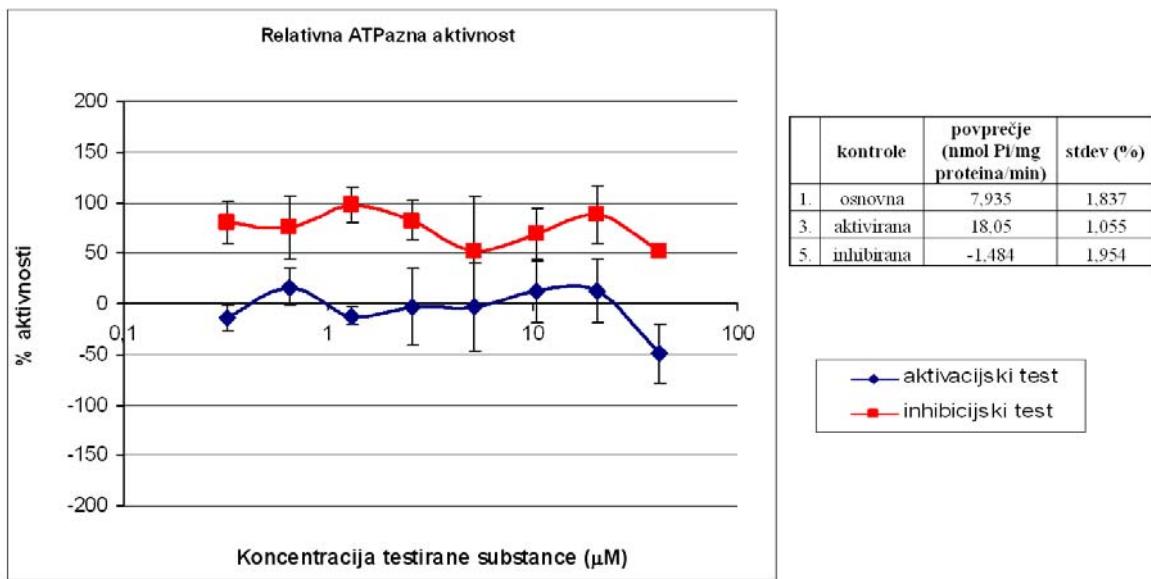
Slika 4.11: Odvisnost odstotka ATPazne aktivnosti P-gp od koncentracije M1

b. MRP1



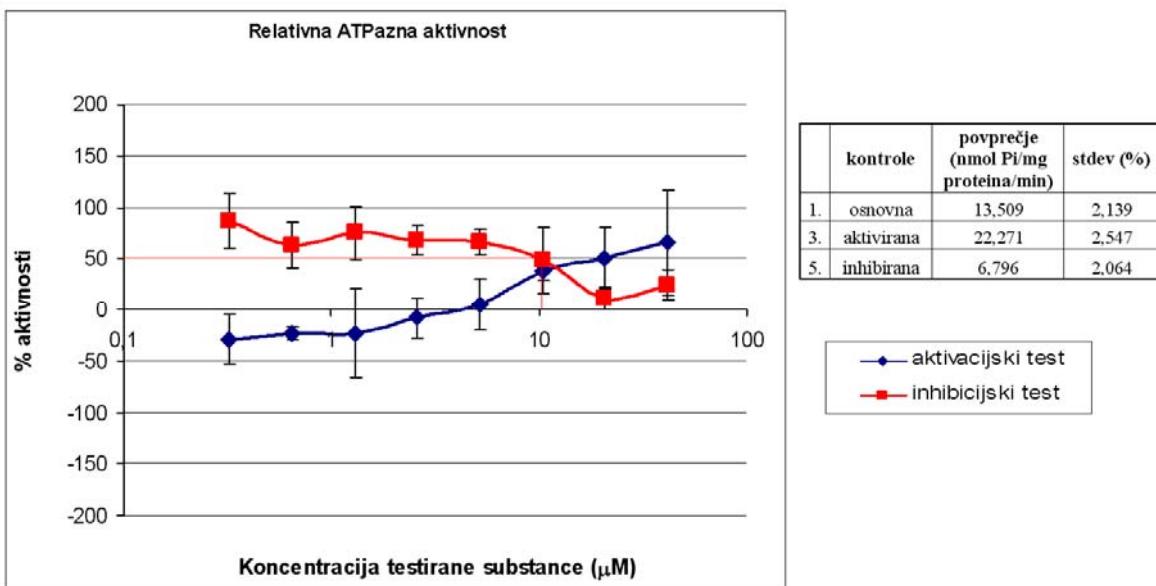
Slika 4.12: Odvisnost odstotka ATPazne aktivnosti MRP1 od koncentracije M1

c. MRP2



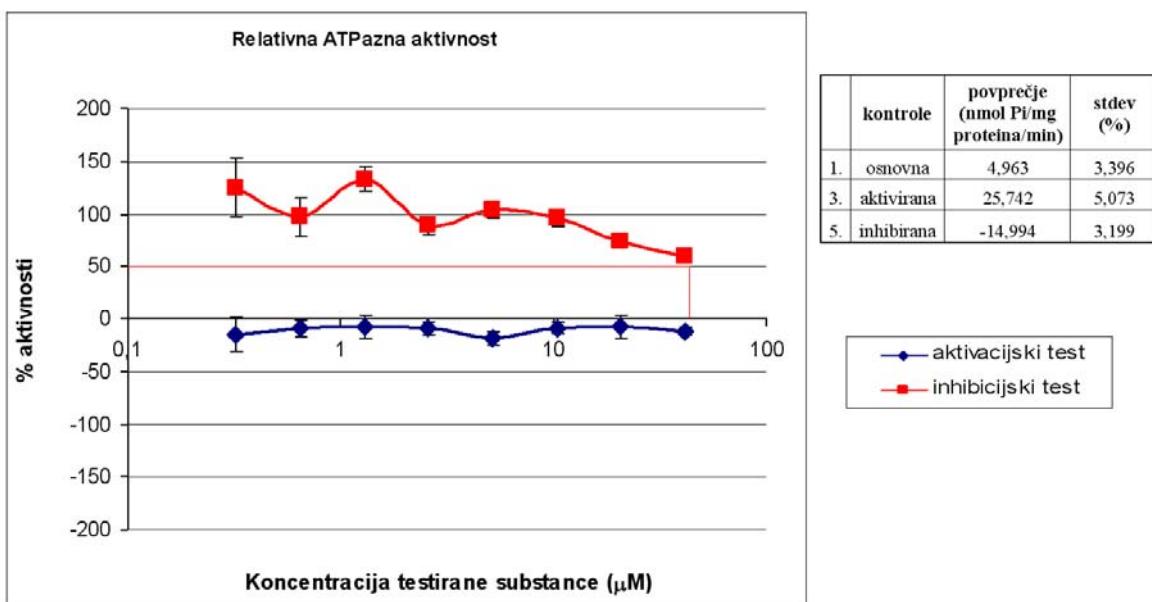
Slika 4.13: Odvisnost odstotka ATPazne aktivnosti MRP2 od koncentracije M1

d. MRP3



Slika 4.14: Odvisnost odstotka ATPazne aktivnosti MRP3 od koncentracije M1

e. BCRP

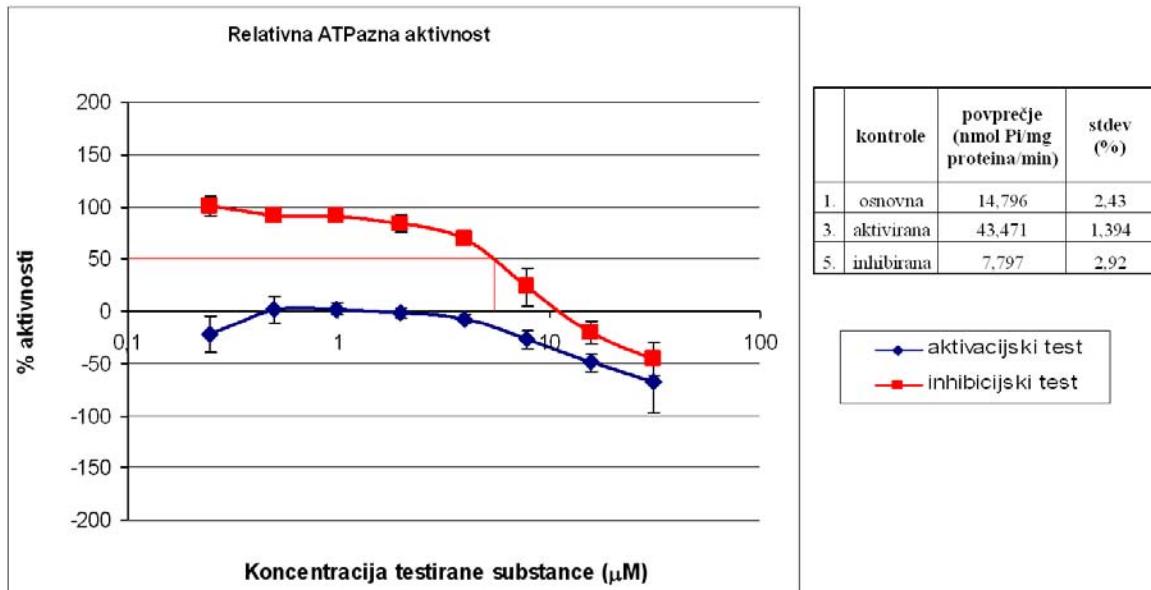


Slika 4.15: Odvisnost odstotka ATPazne aktivnosti BCRP od koncentracije M1

Koncentracije razredčitev M1, ki smo jih uporabili, so bile: 0,32, 0,65, 1,29, 2,59, 5,18, 10,35, 20,70 in 41,40 μM . Samo pri membrani MRP3 je prišlo do aktivacije pri merjenih koncentracijah, in sicer pri koncentracijah enakih ali večjih od 10 μM . V tem območju pa je pri membrani MRP3 prišlo tudi do inhibicije (IC₅₀ je okoli 10 μM), zato lahko predvidevamo, da gre tu za kompetitivno inhibicijo. Le pri membrani MRP2 ni prišlo do inhibicije, medtem ko je M1 šibko inhibiral MRP3 in P-gp membrani (IC₅₀ za obe membrani je znašal okoli 10 μM) in zelo šibko BCRP membrano (IC₅₀ okoli 40 μM). M1 je zelo močno inhibiral MRP1 membrano, vendar pa zaradi veliko variabilnosti podatkov pri tem poskusu, ne moremo oceniti IC₅₀ vrednosti.

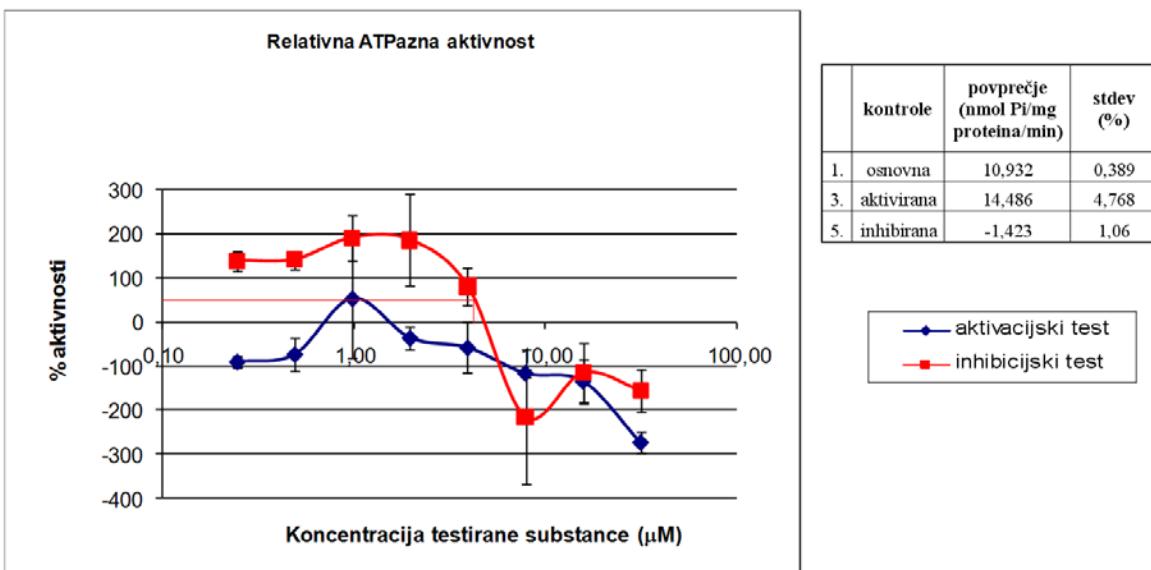
4.2.3 M2

a. P-gp



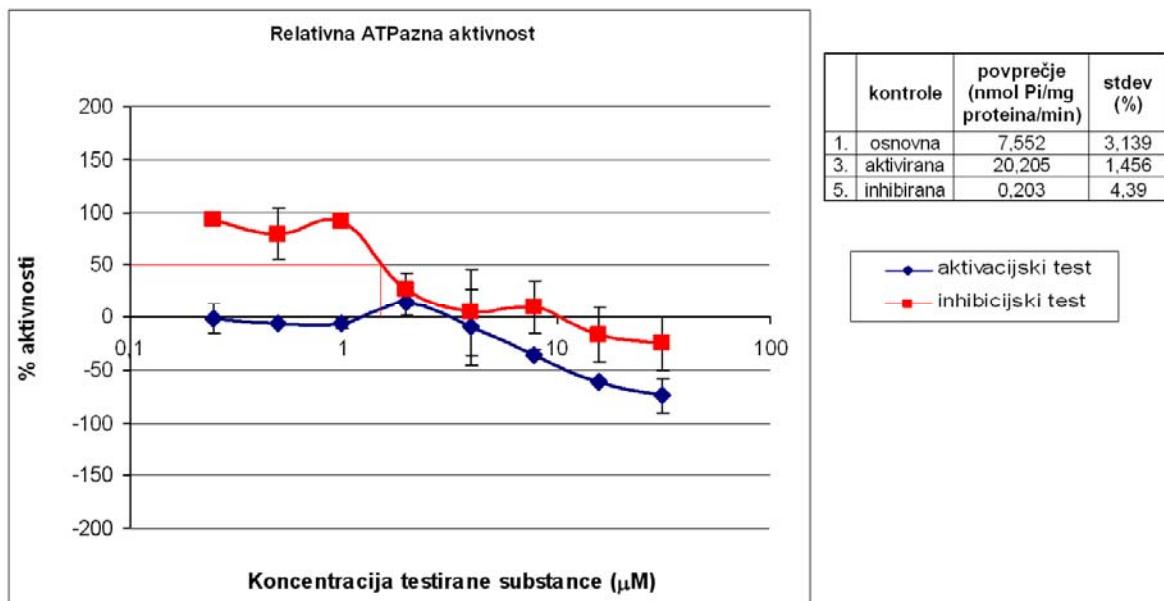
Slika 4.16: Odvisnost odstotka ATPazne aktivnosti P-gp od koncentracije M2

b. MRP1



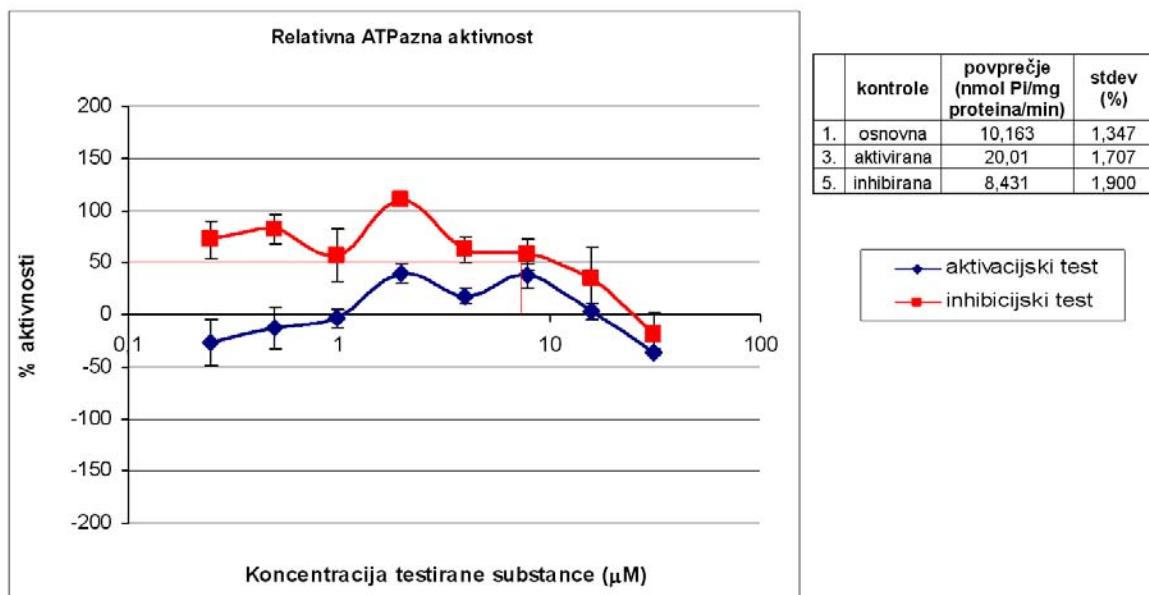
Slika 4.17: Odvisnost odstotka ATPazne aktivnosti MRP1 od koncentracije M2

c. MRP2



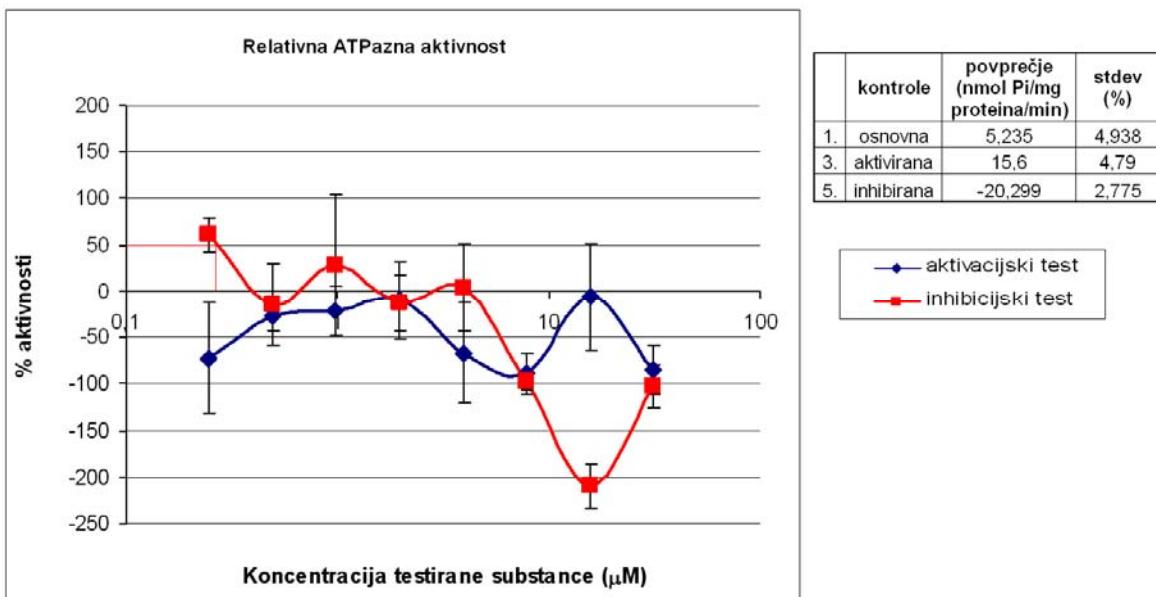
Slika 4.18: Odvisnost odstotka ATPazne aktivnosti MRP2 od koncentracije M2

d. MRP3



Slika 4.19: Odvisnost odstotka ATPazne aktivnosti MRP3 od koncentracije M2

e. BCRP

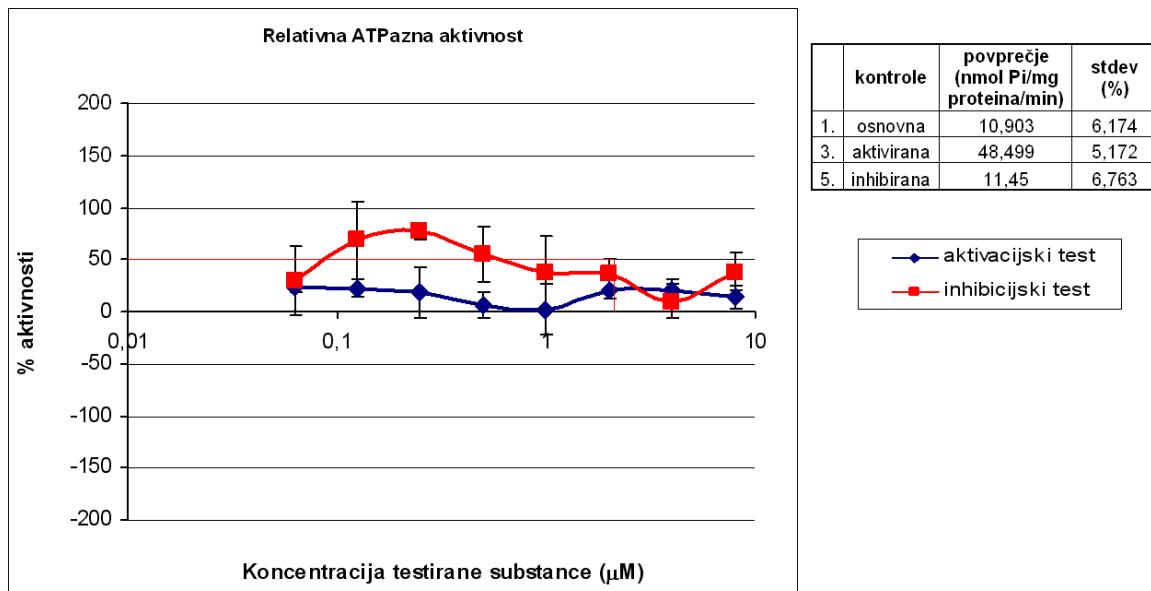


Slika 4.20: Odvisnost odstotka ATPazne aktivnosti BCRP od koncentracije M2

Koncentracije razredčitev M2, ki smo jih uporabili, so bile: 0,25, 0,49, 0,98, 1,96, 3,93, 7,85, 15,70 in 31,40 μM . Pri metabolitu M2 je pri membrani MRP3 prišlo do močnejše aktivacije, pri membrani MRP2 pa do šibke aktivacije. Pri MRP3 membrani je do aktivacije prišlo v koncentračkem območju od 1.96 do 15.7 μM . Pri vseh membranah pa je prišlo do interakcije pri inhibicijskem testu, in sicer pri membranah MRP2 in BCRP je M2 zelo močno inhibiral (IC₅₀ za MRP2 1.5 μM in za BCRP 0.25 μM). Močno pa je inhibiral tudi MRP1, MRP3 in P-gp membrane, in sicer pri vseh je IC₅₀ znašala okoli 6 μM .

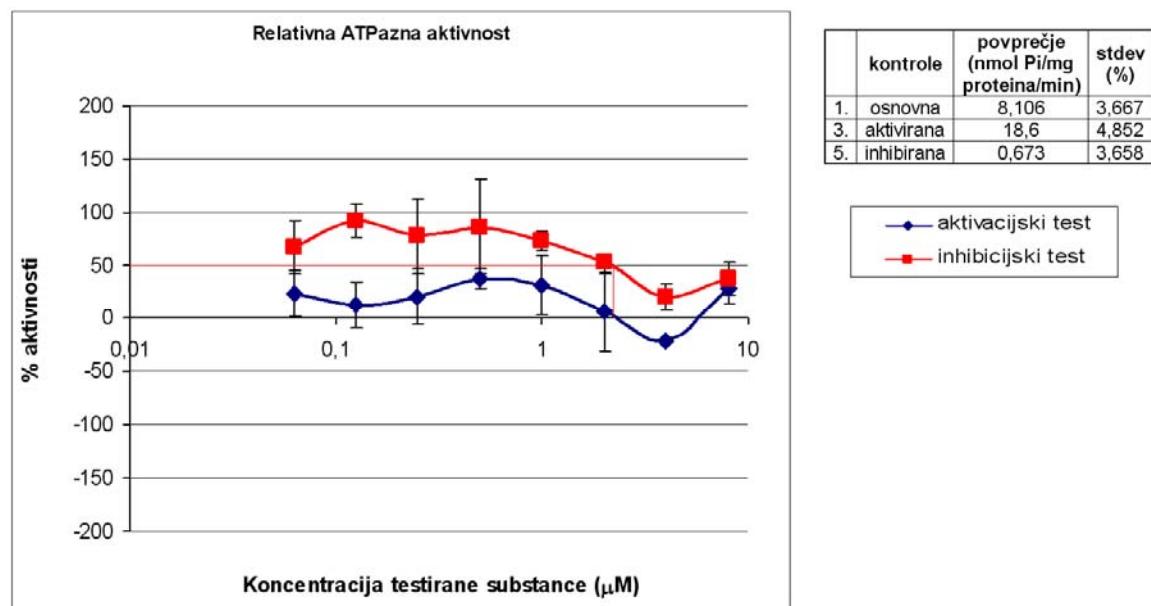
4.2.4 M3

a. P-gp



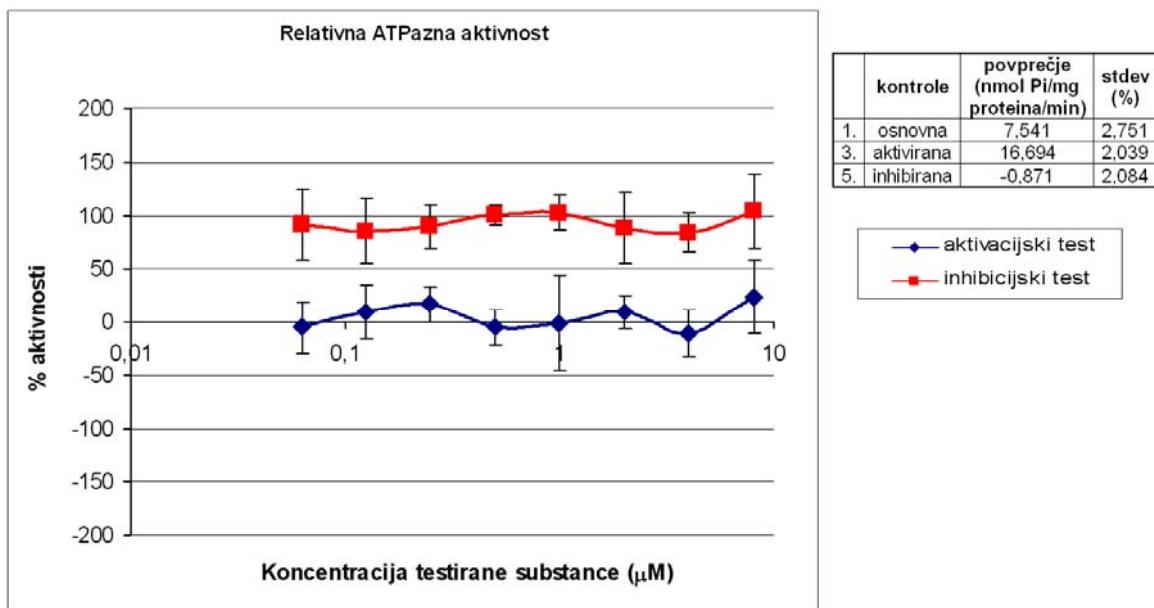
Slika 4.21: Odvisnost odstotka ATPazne aktivnosti P-gp od koncentracije M3

b. MRP1



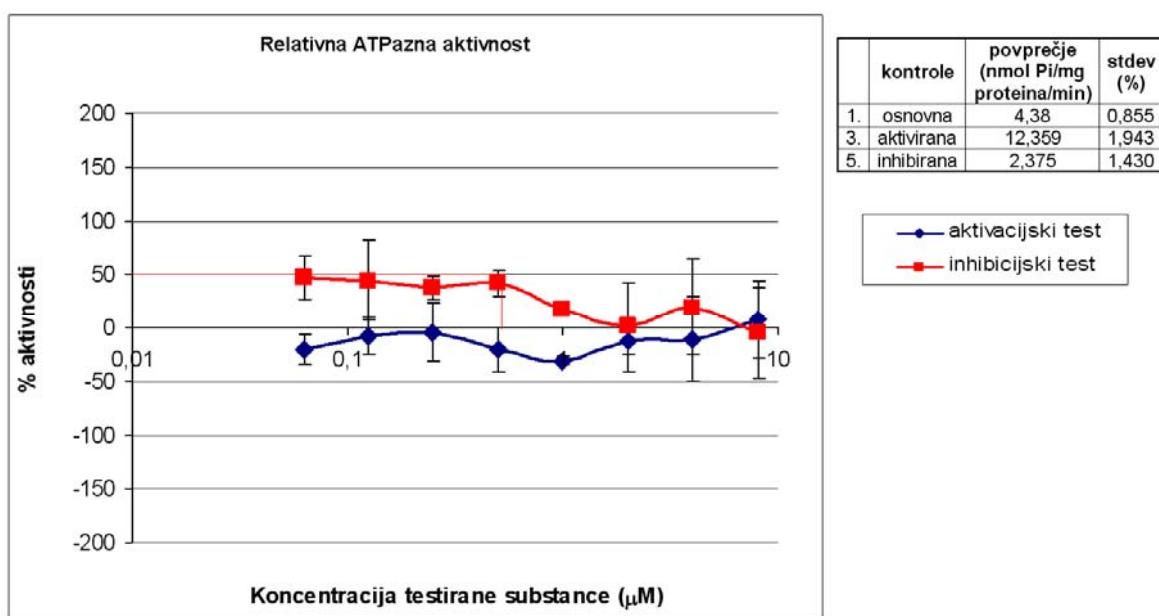
Slika 4.22: Odvisnost odstotka ATPazne aktivnosti MRP1 od koncentracije M3

c. MRP2



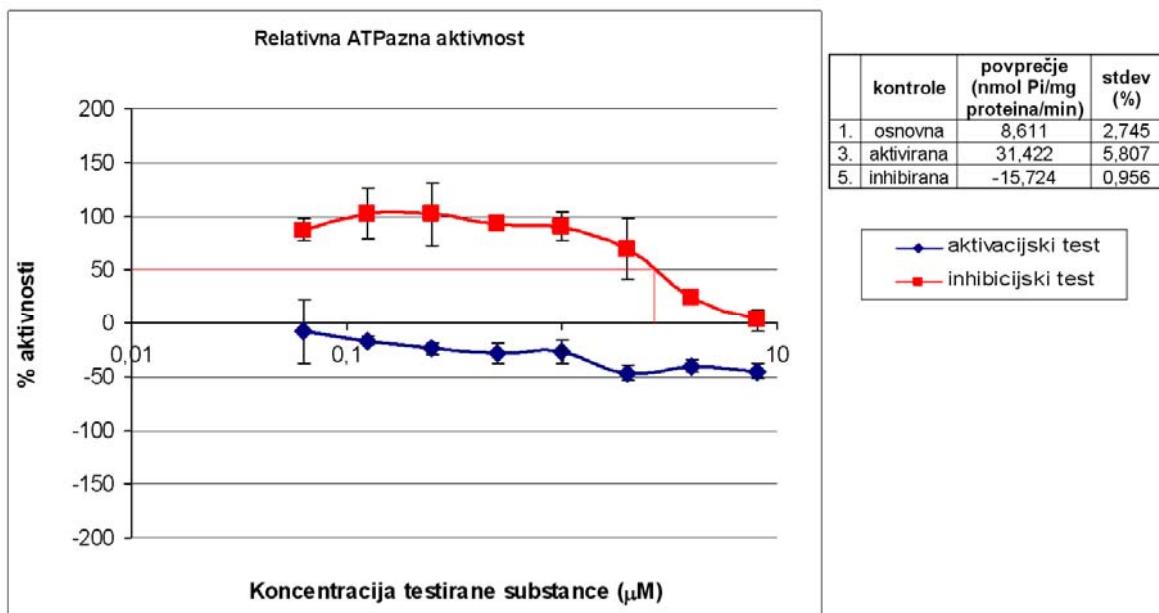
Slika 4.23: Odvisnost odstotka ATPazne aktivnosti MRP2 od koncentracije M3

d. MRP3



Slika 4.24: Odvisnost odstotka ATPazne aktivnosti MRP3 od koncentracije M3

e. BCRP

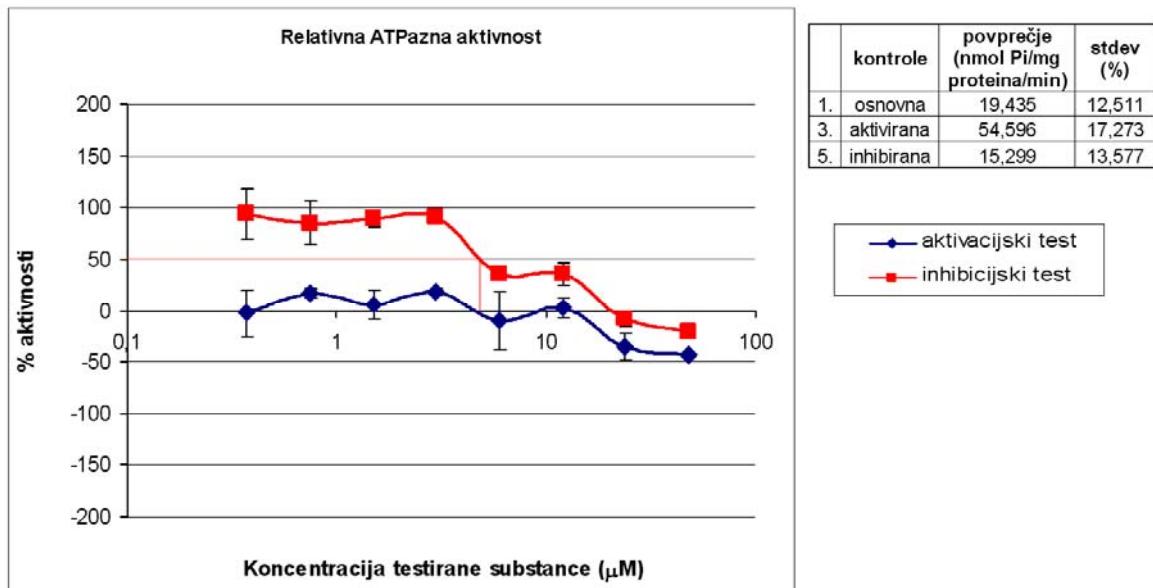


Slika 4.25: Odvisnost odstotka ATPazne aktivnosti BCRP od koncentracije M3

Koncentracije razredčitev M3, ki smo jih uporabili pri testiranju, so bile: 0,06, 0,13, 0,25, 0,50, 1,00, 2,00, 4,00 in 8,00 μM . Pri metabolitu M3 je prišlo do šibke aktivacije pri P-gp in MRP1 membrani, pri ostalih membranah pa aktivacija ni bila opažena. M3 je pa deloval kot šibek inhibitor pri vseh membranah razen pri MRP2, in sicer približne IC₅₀ so znašale za MRP1 in P-gp okoli 2 μM , za BCRP okoli 3 μM in za MRP3 okoli 0,5 μM .

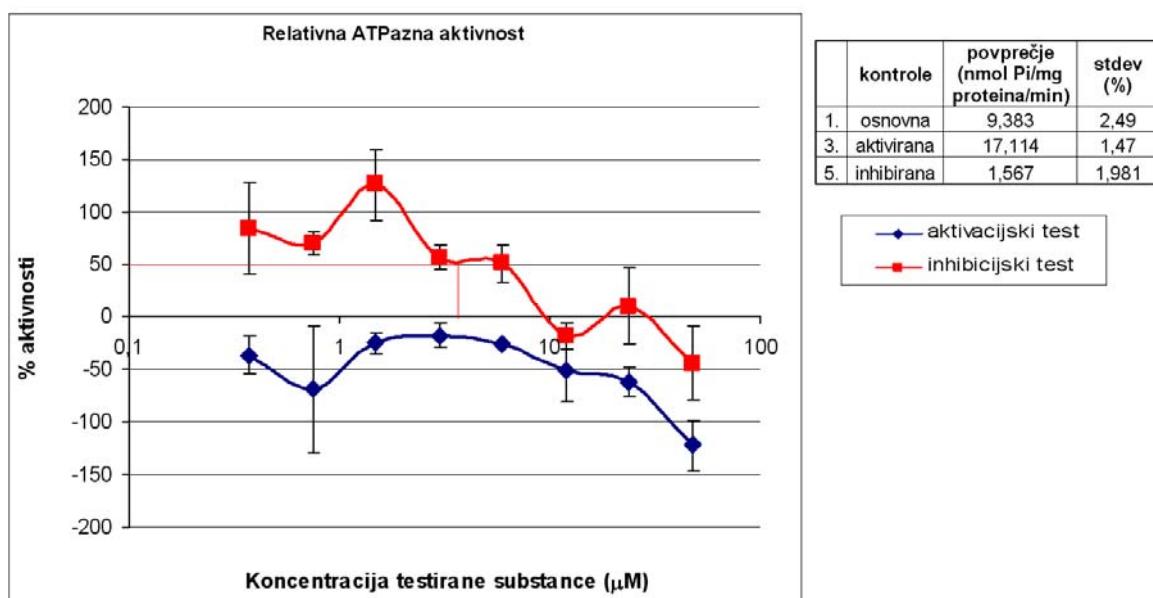
4.2.5 Bazedoksifen

a. P-gp



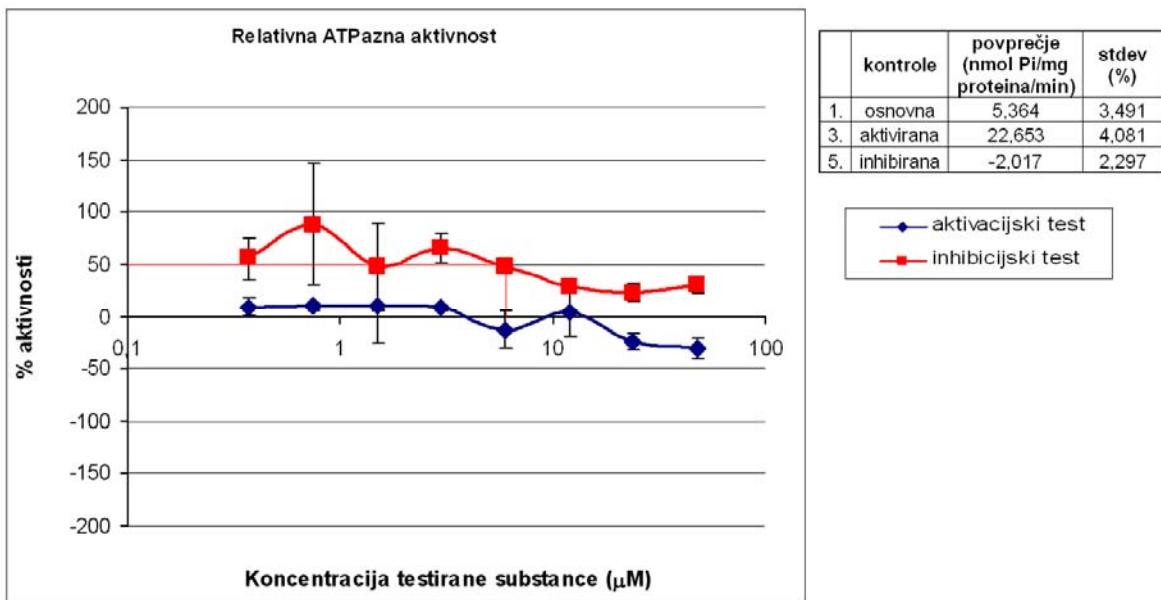
Slika 4.26: Odvisnost odstotka ATPazne aktivnosti P-gp od koncentracije bazedoksifena

b. MRP1



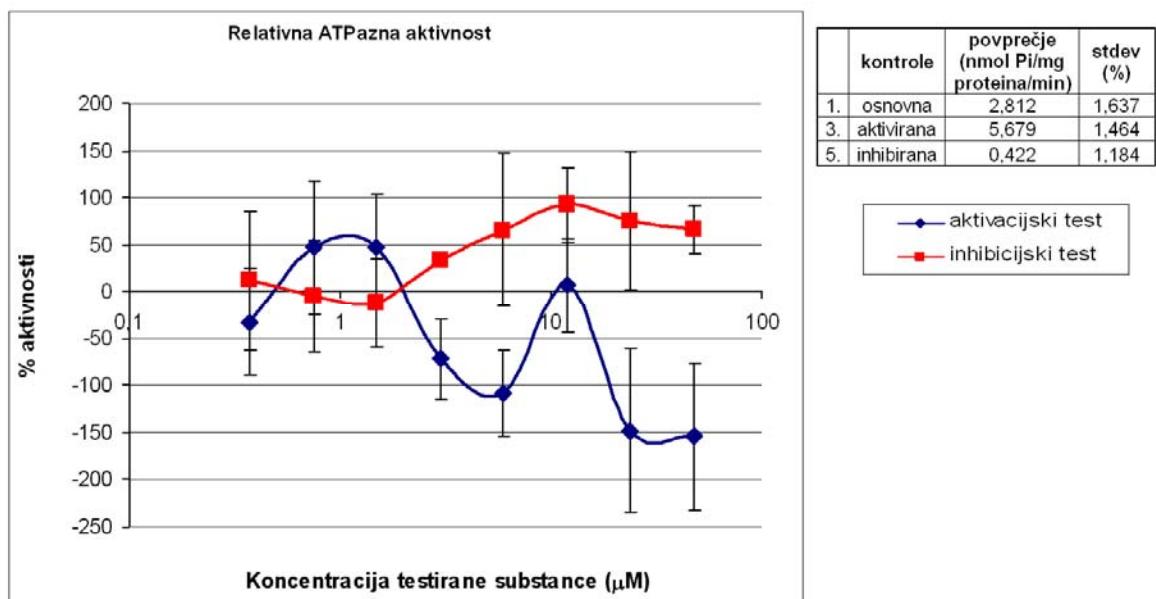
Slika 4.27: Odvisnost odstotka ATPazne aktivnosti MRP1 od koncentracije bazedoksifena

c. MRP2



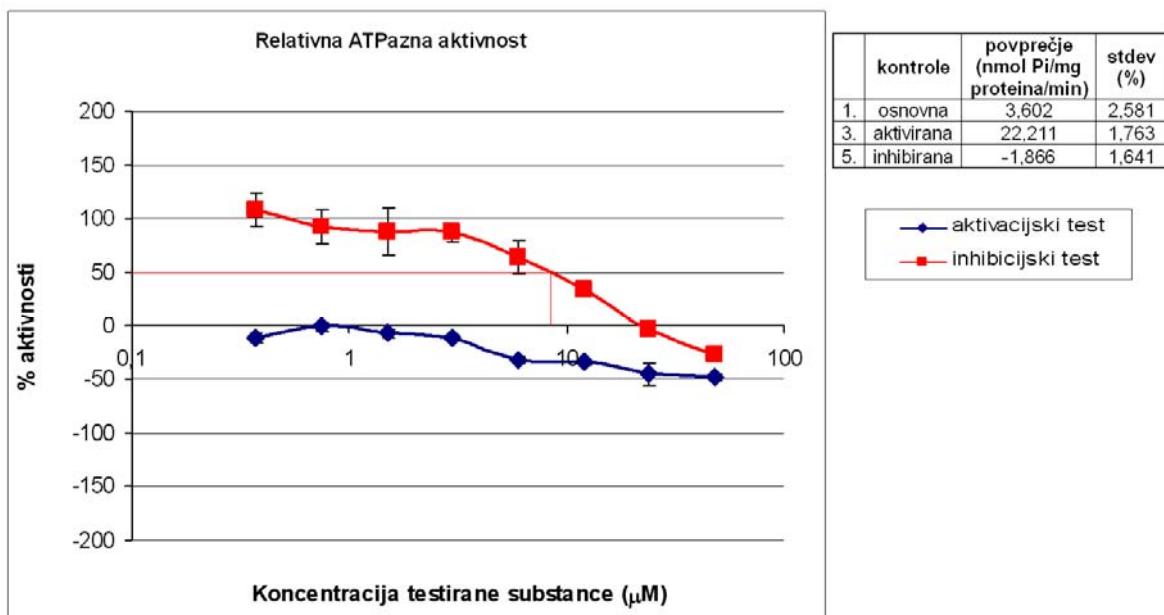
Slika 4.28: Odvisnost odstotka ATPazne aktivnosti MRP2 od koncentracije bazedoksifena

d. MRP3



Slika 4.29: Odvisnost odstotka ATPazne aktivnosti MRP3 od koncentracije bazedoksifena

e. BCRP



Slika 4.30: Odvisnost odstotka ATPazne aktivnosti BCRP od koncentracije bazedoksifena

Koncentracije razredčitev bazedoksifena, ki smo jih uporabili pri testiranju, so bile: 0,37, 0,75, 1,49, 2,99, 5,98, 11,95, 23,90 in 47,80 μM . Do šibke aktivacije je prišlo pri P-gp in MRP2 membrani. Pri MRP3 membrani bi bilo tudi možno, da je prišlo do aktivacije, vendar zaradi velike variabilnosti podatkov, težko predvidevamo, kaj se je zgodilo tako pri aktivacijskem kot pri inhibicijskem testu. Za variabilnost pri tem in vseh izvedenih poskusih lahko iščemo vzroke pri nenatančnem pipetiranju, biološki variabilnosti membran in tudi kje druge. Ker so membrane »živ« sistem in ker so bile transportirane iz podjetja Solvo iz Madžarske je lahko med transportom prišlo do delnega uničenja membran. To delno uničenje pa lahko potrdimo s slabim odzivom pozitivne kontrole (aktivirana ATPazna aktivnost). Za primer MRP3 vidimo, da je vrednost aktivirane ATPazne aktivnosti zelo nizka.

Bazedoksifen deluje kot močan inhibitor pri membranah P-gp, MRP1 in BCRP (IC₅₀ so znašale za P-gp okoli 5 μM , za Mrp1 okoli 4,5 μM in za BCRP 9 μM), na MRP2 membrano pa kot šibek inhibitor (IC₅₀ je znašala okoli 6 μM , vendar ni dosegel 0 % aktivacije v testiranem območju).

4.3 Povzetek vseh rezultatov

Tabela 4.1: Povzetek aktivacije ATPazne aktivnosti

	P-gp	MRP1	MRP2	MRP3	BCRP
raloksifen	šibka aktivacija	/	/	šibka aktivacija	/
M1	/	/	/	šibka aktivacija	/
M2	/	/	/	šibka aktivacija	/
M3	šibka aktivacija	možna aktivacija	/	/	/
bazedoksifen	šibka aktivacija	/	/	?	/

Tabela 4.2: Povzetek inhibicije ATPazne aktivnosti

	P-gp	MRP1	MRP2	MRP3	BCRP
raloksifen	močna inhibicija	močna inhibicija	močna inhibicija	šibka inhibicija	močna inhibicija
M1	šibka inhibicija	močna inhibicija	/	šibka inhibicija	zelo šibka inhibicija
M2	močna inhibicija	močna inhibicija	zelo močna inhibicija	močna inhibicija	zelo močna inhibicija
M3	šibka inhibicija	šibka inhibicija	/	šibka inhibicija	šibka inhibicija
bazedoksifen	močna inhibicija	močna inhibicija	šibka inhibicija	?	močna inhibicija

Na podlagi naših rezultatov lahko sklepamo, da sta raloksifen in bazedoksifen substrata za P-gp, ker pa se obe učinkovini večinoma izločita z blatom in glede na to, da se P-gp nahaja v jetrih, tankem črevesu in kolonu, bi lahko pomislili na to, da ima ta prenašalni protein poleg UGT encimov vlogo pri njuni nizki biološki uporabnosti. Po podatkih, ki so dostopni, je bilo na Caco-2 celicah ugotovljeno, da je bazedoksifen substrat za P-gp [36], kar se tudi ujema z našimi rezultati. Tudi raloksifen je substrat za P-gp, istočasno pa so spremljali tudi vpliv dodatka inhibitorjev P-gp na prenos metabolitov. Izkazalo se je, da dodatek inhibitorjev ni imel vpliva na prenos metabolitov. Vendar pa je bil v njihovem primeru na Caco-2 celicah glavni metabolit sulfat raloksifena [37], mi pa smo uporabili glavne metabolite, ki se pojavljajo *in vivo*, in jih vsakega posebej testirali. Na podlagi naših rezultatov bi bilo možno, da je poleg raloksifena in bazedoksifena substrat za P-gp tudi M3.

Možen substrat za MRP1 je M3, za MRP3 pa so možni substrati raloksifen, M1, M2 in tudi bazedoksifen, vendar ne moremo zagotovo trditi zaradi velike variabilnosti podatkov. Ker sta tako MRP1 kot MRP3 izražena v jetrih in črevesju, bi bilo možno, da bi imela vpliv na biološko uporabnost. V do sedaj znanih podatkih o raloksifenu, naj bi bil ta substrat za

MRP prenašalne proteine, prav tako pa tudi njegovi metaboliti [37]. Vendar pa nikjer še ni bila narejena študija na različnih MRP prenašalnih proteinih tako za raloksifen in njegove metabolite kot tudi za bazedoksifen.

V primeru inhibitornega delovanja pa ne vemo natanko, ali je ta posledica vezave na prenašalni protein ali pa posledica toksičnega delovanja spojin na membrane, saj tega ne moremo natanko določiti. Le pri M1 je v istem koncentracijskem območju prišlo tako do aktivacije kot tudi do inhibicije in zato lahko predvidevamo, da v tem primeru gre za vezavo na isto mesto na receptorju in s tem za kompetitivno inhibicijo.

Membrane transfeciranih sf9 celic s prenašalnimi proteini so orodje, ki se uporablja le za pridobivanje preliminarnih podatkov o tem, ali neka substanca stopa v interakcijo s prenašalnim proteinom ali ne, in približno intenzitetu te interakcije. Rezultati pa niso zanesljivi, zato jih je potrebno potrditi še z drugimi *in vitro* modeli.

5 SKLEP

Preiskovani prenašalni proteini imajo zelo velik vpliv na farmakološko delovanje večine učinkovin, ki se danes uporablja. Vplivajo na biološko uporabnost po peroralni aplikaciji, enterohepatično in enteroeterično cirkulacijo ter na direktno odstranjevanje učinkovine, njenih metabolitov in konjugatov skozi črevesje in preko urina. Na podlagi naših rezultatov lahko sklepamo, da je tako tudi pri raloksifenu, njegovih metabolitih in bazedoksifenu. P-gp prenašalni protein ima verjetno poleg UGT encimov vpliv na nizko biološko uporabnost tako raloksifena kot bazedoksifena. Prav tako pa lahko na osnovi naših rezultatov sklepamo, da imata pri biološki uporabnosti vpliv tudi MRP1 in MRP3 prenašalna proteina. Ker pa so rezulati teh testiranj bolj preliminarni, jih je treba potrditi še z drugimi metodami.

6 LITERATURA

- [1] Kocijančič A, Mrevlje F, Štajer D: Interna medicina, 3. izdaja, Littera picta, Ljubljana, 2005: 916-925.
- [2] Rang HP, Dale MM , Ritter JM, Flower RJ: Rang and Dale's Pharmacology, 6th Edition, Churchill, Livingstone, Edinburgh, 2007: 466-470 .
- [3] Osteoporozna. Dostop preko spletu dne 13.05.2010: <http://www.roche.si/default-94000.html>.
- [4] New medicines on the market, Raloxifene, United Kingdom Drug Information Pharmacists Group 1999.
- [5] Grady D, Herrington D, Bittner V, Blumenthal R, Davidson M, Hlatky M, Hsia J, Hulley S, Herd A, Khan S, Newby LK, Waters D, Vittinghoff E, Wenger N: Cardiovascular disease outcomes during 6.8 years of hormone therapy: Heart and Estrogen/progestin Replacement Study follow-up (HERS II). Journal of the American Medical Association 2002; 288 (1): 49-57.
- [6] Deepak D, Kang P, Zientek M, Xiang C, Zhou S, Obach RS: Effect of Intestinal Glucuronidation in Limiting Hepatic Exposure and Bioactivation of Raloxifene in Humans and Rats, Chemical Research in Toxicology 2008; 21 (12): 2260-2271.
- [7] Goldstein S, Siddhanti S, Ciaccia AV, Ploff L Jr: A pharmacological review of selective oestrogen receptor modulators. Human Reproduction Update 2000; 6: 212-224.
- [8] Marcia L. Stefanick: Risk–Benefit Profiles of Raloxifene for Women. The New England Journal of Medicine 2006; 355 (2): 190-192.
- [9] Gennari L, Merlotti D, De Paola V, Martini G, Nuti R: Bazedoxifene for the prevention of postmenopausal osteoporosis. Therapeutics and Clinical Risk Management 2008; 4 (6): 1229-1242.
- [10] V. G. Vogel: Raloxifene: a selective estrogen receptor modulator for reducing the risk of invasive breast cancer in postmenopausal women. Women's Health 2007; 3 (2): 139-153.
- [11] Moen MD, Keating GM: Raloxifene, A Review of its Use in the Prevention of Invasive Breast Cancer. Drugs 2008; 68 (14): 2059-2083.

- [12] Zavratnik A, Preželj J, Kocijančič A, Marc J: Exonic, but not intronic polymorphisms of ESR1 gene might influence the hypolipemic effect of raloxifene. *Journal of Steroid Biochemistry & Molecular Biology* 2007; 104: 22-26.
- [13] Caeiro Rey JR, Cervino EV, Rentero ML, Crespo EC, Alvaro AO, Casillas M: Raloxifene: Mechanism of Action, Effects on Bone Tissue, and Applicability in Clinical Traumatology Practice. *The Open Orthopaedics Journal* 2009; 3: 14-21.
- [14] Povzetek glavnih značilnosti zdravila Evista®. Dostop preko spletja dne 20.3.2010: <http://www.zdravila.net>.
- [15] Kima AR, Limb SJ, Leea BJ: Metabolic inhibition and kinetics of raloxifene by pharmaceutical excipients in human liver microsomes. *International Journal of Pharmaceutics* 2009; 368: 37-44.
- [16] Trontelj J: Raziskave metabolizma raloksifena z eksperimentalnimi modeli naraščajoče kompleksnosti, doktorska disertacija. Fakulteta za farmacijo, Univerza v Ljubljani, 2007.
- [17] Hochner-Celniker D: Pharmacokinetics of raloxifene and its clinical application. *European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology* 1999; 85: 23–29.
- [18] Mizuma T: Intestinal glucuronidation metabolism may have a greater impact on oral bioavailability than hepatic glucuronidationmetabolism in humans: A study with raloxifene, substrate for UGT1A1, 1A8, 1A9, and 1A10. *International Journal of Pharmaceutics* 2009; 05.044.
- [19] Kemp DC, Fan PW, Stevens JC: Characterization of raloxifene glucuronidation in vitro: contribution of intestinal metabolism to presystemic clearance. *Drug Metabolism and Disposition* 2002; 30 (6): 694-700.
- [20] Kung AWC, Chu EYW, Xu L: Bazedoxifene: a new selective estrogen receptor modulator for the treatment of postmenopausal osteoporosis. *Expert Opinion Pharmacotherapy* 2009; 10 (8): 1377-1385.
- [21] Povzetek glavnih značilnosti zdravila CONBRIZA®. Dostop preko spletja dne 07.06.2010: <http://www.zdravila.net>.
- [22] Chandrasekaran A, McKeand WE, Sullivan P, DeMario W, Stoltz R, Scatina J: Metabolic Disposition of [¹⁴C] Bazedoxifene in Healthy Postmenopausal Women. *Drug Metabolism & Disposition* 2009.
- [23] Yengi GL, Leung L, Kao J: The Evolving Role of Drug Metabolism in Drug Discovery and Developement. *Pharmaceutical Research* 2007; 24 (5): 842-58.

- [24] Faber KN, Muller M, Jansen PLM: Drug transporter proteins in the liver. Advanced Drug Delivery Review 2003; 55: 107-124.
- [25] Leslie EM, Deeley RG, Cole SPC: Multidrug resistance proteins: role of P-glycoprotein, MRP1, MRP2, and BCRP (ABCG2) in tissue defense. Toxicology and Applied Pharmacology 2005; 204: 216-237.
- [26] Transporter Products. Dostop preko spletu dne 11.06.2010: www.cellzdirect.com.
- [27] ABC Transporter Vesicles. Dostop preko spletu dne 11.06.2010: www.bdbiosciences.com.
- [28] Schinkel AH, Jonker JW: Mammalian drug efflux transporters of the ATP binding cassette (ABC) family: an overview. Advanced Drug DeliveryReviews 2003; 55: 3-29.
- [29] Chan LMS, Lowers S, Hirst BH: The ABCs of drug transport in intestine and liver: efflux proteins limiting drug absorption and bioavailability. European Journal of Pharmaceutical Sciences 2004; 21: 25-51.
- [30] Tukker JJ, Lennernäs H: In vitro methods for the assessment of permeability, Animal perfusion studies. Oral drug absorption 2000; 51-72.
- [31] Archer DF: Tissue-Selective Estrogen Complexes A Promising Option for the Comprehensive Management of Menopausal Symptoms. Drugs Aging 2010; 27 (7): 533-544.
- [32] Dostop preko spletu dne 15.06.2010: <http://www.apredica.com/caco2.php>.
- [33] Briggs BS, Baker PJ, BelvoMD, Black TD, Getman BG, Kemp CAJ, Muth WL, Perun TJ, Strobel JR, Paschal JW, Zmijewski MJ: Microbial process for preparation of glucuronides of raloxifene. Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology 1999; 23: 194-197.
- [34] Dostop preko spletu dne 22.09.2010:
<http://www.graphpad.com/faq/viewfaq.cfm?faq=1356>.
- [35] Dostop preko spletu dne 22.09.2010:
http://nmi.jrc.ec.europa.eu/project/Automated_testing_facility.htm.
- [36] Shen L, Ahmad S, Park S, DeMaio W, Oganesian A, Hultin T, Scatina J, Chandrasekaran A: In Vitro Metabolism, Permeability and Efflux of Bazedoxifene in Humans. Drug Metabolism & Disposition 2010.
- [37] Jeong EJ, Lin H, Hu M: Disposition Mechanisms of Raloxifene in the Human Intestinal Caco-2 Model. The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics 2004; 310: 376-385.

