

UNIVERZA V LJUBLJANI  
FAKULTETA ZA FARMACIJO

KATJA TROBEC

DIPLOMSKA NALOGA

UNIVERZITETNI ŠTUDIJ FARMACIJE

Ljubljana, 2010

UNIVERZA V LJUBLJANI  
FAKULTETA ZA FARMACIJO

KATJA TROBEC

**PREUČEVANJE VPLIVA POLIMORFIZMA *UGT1A1\*28* NA  
METABOLIZEM RALOKSIFENA Z GENOTIPIZIRANIMI  
MIKROSOMI**

**INVESTIGATION OF *UGT1A1\*28* GENOTYPE IMPACT ON  
RALOXIFENE METABOLISM IN GENOTYPED HUMAN  
MICROSOMES**

Ljubljana, 2010

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

Zahvalila bi se družini, ki mi je s svojo podporo omogočila študij in vsem prijateljem, ki so mi v času študija stali ob strani. Posebna zahvala ob diplomi gre asist. Tini Trdan, mag. farm., ki je s svojo pomočjo veliko prispevala k izdelavi te diplomske naloge.

### **Izjava**

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

Katja Trobec

Predsednik diplomske komisije: prof. dr. Marija Sollner Dolenc, mag. farm.

Članica diplomske komisije: prof. dr. Janja Marc, mag. farm., spec. med. biokem.

Ljubljana, junij 2010

## VSEBINA

<b>VSEBINA</b> .....	<b>1</b>
<b>POVZETEK</b> .....	<b>2</b>
<b>ABECEDNI SEZNAM OKRAJŠAV</b> .....	<b>4</b>
<b>1. UVOD</b> .....	<b>6</b>
1.1. OSTEOPOROZA .....	6
1.1.1. Zdravljenje osteoporoze .....	6
1.2. RALOKSIFEN .....	7
1.2.1. Metabolizem raloksifena .....	8
1.3. ENCIMI URIDIN DIFOSFAT GLUKURONOZILTRANSFERAZE (UGT) .....	10
1.3.1. Klasifikacija.....	11
1.3.2. Ekspresija UGT encimov .....	11
1.3.3. Podružina UGT1A .....	12
1.3.3.1. UGT1A1 in njegove izoforme.....	13
Crigler-Najjarov sindrom .....	13
Gilbertov sindrom (GS).....	13
1.4. BILIRUBIN .....	14
1.5. FARMAKOKINETIKA IN ENCIMSKA KINETIKA .....	15
1.5.1. Kinetika enosubstratne encimsko katalizirane reakcije.....	15
1.5.1.1. Substratna inhibicija .....	18
1.5.2. Določevanje navideznih encimskih parametrov.....	19
1.5.3. Napovedovanje metaboličnega očistka .....	22
1.5.3.1. Farmakokinetični modeli.....	22
Intrinzični očistek .....	23
Jetni očistek .....	23
Računanje očistka na osnovi enoprostornega modela večkratne ekstravaskularne aplikacije.....	24
1.6. IN VITRO METODE .....	26
1.6.1. Mikrosomi .....	26
<b>2. NAMEN DELA</b> .....	<b>28</b>
<b>3. MATERIALI IN METODE</b> .....	<b>29</b>
3.1. MATERIALI .....	29
3.2. METODE .....	32
3.2.1 Splošna shema priprave in inkubacije mikrosomov ter priprave zmesi za analitiko....	32
3.2.2. Analitika .....	34
3.2.3. Obdelava podatkov .....	34
3.2.4. Aparature .....	36
3.3. EKSPERIMENTALNI DEL .....	36
<b>4. REZULTATI IN RAZPRAVA</b> .....	<b>38</b>
4.1. REZULTATI INKUBACIJ RALOKSIFENA Z GENOTIPIZIRANIMI MIKROSOMI..	38
4.2. VPLIV BILIRUBINA NA KINETIKO GLUKURONIDIRANJA RALOKSIFENA.....	43
4.3. REZULTATI MERJENJA PLAZEMSKIH KONCENTRACIJ RALOKSIFENA IN NJEGOVIH METABOLITOV .....	47
<b>5. SKLEP</b> .....	<b>52</b>
<b>6. LITERATURA</b> .....	<b>53</b>

## POVZETEK

Raloksifen je učinkovina iz skupine selektivnih modulatorjev estrogenskih receptorjev (SERM), ki se uporablja za zdravljenje in preprečevanje osteoporoze. Pri terapiji 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 smo iskali v polimorfizmu \*28 v genu za UGT1A1, ki je eden od glavnih encimov odgovornih za metabolično odstranjevanje raloksifena. Polimorfizem *UGT1A1*\*28 je povezan z zmanjšano ekspresijo tega encima in v homozigotnem stanju vodi do povišanih plazemskih koncentracij bilirubina oz. do pojava Gilbertovega sindroma. Na ta polimorfizem so nas napeljali podatki o plazemskih koncentracijah raloksifena pri genotipiziranih preiskovankah, ki so raloksifen prejemale 6 mesecev. *In vivo* peroralni očistek raloksifena pri preiskovankah z genotipom *UGT1A1* \*1/\*1 je znašal 0,5311 L/min, pri heterozigotnih preiskovankah 0,3423 L/min, pri preiskovankah z *UGT1A1* \*28/\*28 pa je bila ta vrednost samo 0,2426 L/min.

Raloksifen smo inkubirali z genotipiziranimi mikrosomi za omenjen polimorfizem in opazovali nastajanje metabolita raloksifen-6-glukuronida in raloksifen-4'-glukuronida s časom. Tako smo določili intrinzični očistek raloksifena za vse tri kombinacije genov. Pri homozigotih za gen *UGT1A1*\*1 je bil intrinzični očistek najvišji (113,06 mL min<sup>-1</sup> mg<sup>-1</sup>), pri homozigotih za gen *UGT1A1*\*28 najnižji (85,55 mL min<sup>-1</sup> mg<sup>-1</sup>), pri heterozigotih pa je dosegal vmesne vrednosti (96,91 mL min<sup>-1</sup> mg<sup>-1</sup>).

Dobljen intrinzični očistek smo nato ekstrapolirali na celotna jetra in izračunali jetrni očistek po modelu dobrega mešanja. Tokrat se vrednosti očistkov, preračunane na 70 kg telesne teže, med sabo niso veliko razlikovale: jetrni očistek za genotip *UGT1A1* \*1/\*1 je znašal 1,443 L/min, za genotip *UGT1A1* \*28/\*28 je ta vrednost 1,442 L/min, za *UGT1A1* \*1/\*28 pa 1,440 L/min. Sposobnost jeter za odstranjevanje učinkovine je torej tako visoka, da je tudi v primeru zmanjšane ekspresije gena za UGT1A1 očistek še vedno omejen le s pretokom krvi skozi jetra. Izkazalo se je tudi, da model dobrega mešanja ni najboljši za učinkovine, ki so podvržene entrohepatičnemu kroženju.

V naslednjem koraku smo preučili še vpliv bilirubina, ki je substrat za UGT1A1, na metabolizem raloksifena, saj je znano, da imajo ljudje s polimorfizmom *UGT1A1*\*28 povišane koncentracije bilirubina v krvi. Dobljene podatke smo vnesli v graf hitrosti nastajanja metabolitov v odvisnosti od časa in vizualno primerjali rezultate inkubacij brez

bilirubina in z bilirubinom. Razlike sicer so prisotne, vendar niso statistično značilne, kar kaže na to, da ne prihaja do pomembne inhibicije encima s strani bilirubina.

Povezava med polimorfizmom *UGT1A1\*28* in sposobnostjo organizma za odstranjevanje raloksifena obstaja, na kar kažejo tako *in vivo* podatki kot tudi dobljen intrinzični očistek. Ob ekstrapolaciji dobljenih *in vitro* rezultatov v fiziološke pogoje, t.j. ob izračunu jetrnega očistka, postane razlika med posameznimi genotipi nezaznavna. Glede na dejstvo, da je raloksifen izpostavljen enterohepatičnemu kroženju, se v metabolizmu vključujejo tudi drugi organi, zato bo potrebno nadaljnje raziskovanje presnove raloksifena.

**ABECEDNI SEZNAM OKRAJŠAV**

AcCN	acetonitril
BLR	bilirubin
BMD	mineralna kostna gostota (ang. »bone mineral density«)
$\bar{c}_{ss}$	povprečna plazemska koncentracija v stacionarnem stanju
CMCNa	natrij karboksimetil celuloza
CYP450	družina citokromov P450
D	odmerek
DMSO	dimetilsulfoksid
E	encim
$E_0$	začetna koncentracija encima
ER $\alpha$ , ER $\beta$	estrogenski receptor alfa, estrogenski receptor beta
ES	kompleks encima in substrata
F	frakcija absorbirane učinkovine
$f_{u,b}$	frakcija nevezane učinkovine na proteine plazme
FA	mravljična kislina (ang. »formic acid«)
GS	Gilbertov sindrom
HDL	lipoproteini visoke gostote (ang. »high density cholesterol«)
HNZ	hormonsko nadomestno zdravljenje
HPLC	tekočinska kromatografija visoke ločljivosti (ang. »high pressure liquid chromatography«)
$K_d$	konstanta disociacije
$k_e$	konstanta izločanja
$K_m$	Michaelis-Mentenova konstanta
LDL	lipoproteini nizke gostote (ang. »low density cholesterol«)
M1, R-6-G	metabolit raloksifena: raloksifen-6-glukuronid
M2, R-4'-G	metabolit raloksifena: raloksifen-4'-glukuronid
$Q_h$	pretok krvi skozi jetra
S	substrat
$S_0$	začetna koncentracija substrata

SERM	selektivni modulator estrogenskih receptorjev
$\tau$	odmerni interval
$T_m$	največja hitrost prenosa učinkovine
TRIS	tris(hidroksimetil)aminometan
TT	telesna teža
UDP	uridindifosfat
UGT	UDP- glukuronoziltransferaza
UGT1A1	UDP- glukuronoziltransferaza iz družine 1, poddružine A, encim 1
$V_D$	volumen porazdeljevanja
$V_{max}$	maksimalna hitrost encimske reakcije

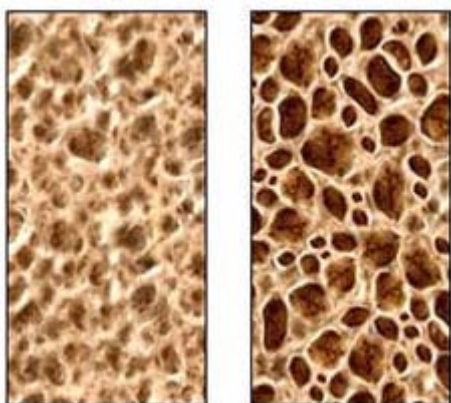


## 1. UVOD

### 1.1. OSTEOPOROZA

Osteoporoza je sistemska bolezen skeleta, za katero sta značilni nizka mineralna kostna gostota (angl. bone mineral density - BMD) in mikroarhitekturne spremembe kostnega tkiva, kar vodi do večje krhkosti kosti in pogostnosti zlomov (Slika 1.1.). Zaradi daljše življenjske dobe postaja osteoporoza vse večji zdravstveni problem, saj tekom življenja kar 40 do 50 % žensk in 13 do 22 % moških doživi zlom kot posledico osteoporoze [1].

Osteoporozo lahko ločimo na primarno, za katero vzrok še ni poznan, ter sekundarno, ki je posledica pridruženih bolezni ali uporabe nekaterih zdravil (npr. kortikosteroidov, varfarina, heparina). Primarno osteoporozo lahko delimo še naprej na postmenopavzalno, ki se pojavi skupaj z nastopom menopavze in je pogostejša pri ženskah, ter na senilno, ki je posledica staranja in je značilna tako za moške kot tudi za ženske [2].



Slika 1.1: Zdrava (levo) in osteoporozna kost (desno)

#### 1.1.1. Zdravljenje osteoporoze

Cilj zdravljenja osteoporoze je preprečevanje zlomov. Za doseganje tega cilja imamo poleg splošnih ukrepov (zdrava prehrana, redna telesna vadba, varovanje pred padci) na voljo različne skupine zdravil:

- *zaviralci kostne resorpcije*: hormonsko nadomestno zdravljenje (HNZ), difosfonati, raloksifen, kalcitonin;
- kalcij, vitamin D, analogi vitamina D (kalcitriol, alfakalcidiol)

Terapija je različna glede na to, ali se je zlom že pojavil in osteoporozo zdravimo ali zaradi prisotnih dejavnikov tveganja (zgodnja menopavza, dedna nagnjenost, uporaba

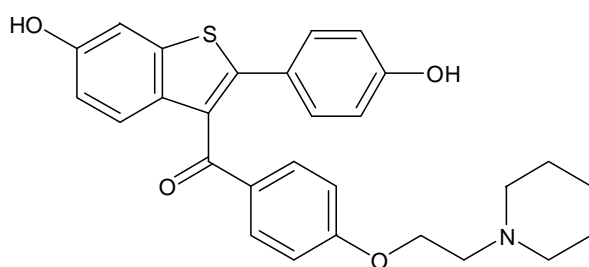
glukokortikoidov itd.) izvajamo le preventivno terapijo. V tabeli 1.1 so učinkovine razdeljene glede na terapevtske cilje.

*Tabela 1.1: Zdravila, ki se uporabljajo pri zdravljenju in preprečevanju osteoporoze po slovenskih smernicah [3]*

zdravila za zdravljenje osteoporoze	zdravila za preprečevanje osteoporoze
difosfonati, raloksifen, HNZ, vitamin D, kalcij, izjemoma kalcitonin	raloksifen, HNZ, vitamin D, kalcij

Raloksifen se uporablja tako v preventivi kot tudi v zdravljenju osteoporoze pri ženskah, ki so že vsaj tri leta v menopavzi [3].

## 1.2. RALOKSIFEN



*Slika 1.2: Strukturna formula raloksifena*

Raloksifen spada med t.i. SERM oz. selektivne modulatorje estrogenskih receptorjev. Njegova strukturna formula je predstavljena na sliki 1.2. Klinično pomembni učinki raloksifena se izražajo v naslednjih tkivih:

- *v kosteh (agonist estrogenskih receptorjev):* zmanjša število in aktivnost osteoklastov in poveča kostno gostoto. Klinično pomembno poveča kostno gostoto hrbtenice in kolka, zmanjša tveganje za vretenčne zlome (do 55 %), ne vpliva pa na incidenco nevretenčnih zlomov [5];

- v *jetrih (agonist estrogenskih receptorjev)*: niža nivo LDL in celokupnega holesterola, ob tem pa nivo HDL ostane enak [2];
- v *maternici (antagonist estrogenskih receptorjev)*: pomembna prednost pred drugimi SERM, npr. tamoksifenom, saj tako ne privede do hipertrofije endometrija [2];
- v *dojkah (antagonist estrogenskih receptorjev)*: zmanjša obolevnost za rakom dojke, ki ima prisotne estrogenske receptorje, ne vpliva pa na invazivni rak dojke brez estrogenskih receptorjev [2].

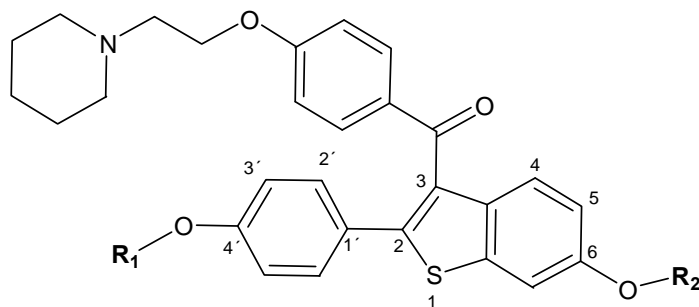
Točen mehanizem delovanja raloksifena in razlog, zakaj v nekaterih tkivih deluje kot agonist, v nekaterih pa kot antagonist estrogena, še ni popolnoma znan. Na učinek raloksifena v posameznem tkivu naj bi vplivala prisotnost podtipov estrogenskih receptorjev (ER $\alpha$  in ER $\beta$ ), različne koncentracije t.i. »koaktivatorjev« in »kosupresorjev«, različne koformacije encima itd.

Med pomembnejše neželene učinke raloksifena pa spada med drugim zvečanje pojavnosti vročinskih oblivov in tvorbe krvnih strdkov [2, 6].

### 1.2.1. Metabolizem raloksifena

Raloksifen je izpostavljen obsežnemu predsistemskemu metabolizmu, zato je njegova biološka uporabnost ob peroralni aplikaciji zelo nizka, in sicer samo 2% [7]. Pri tem se tvorijo predvsem glukuronidi raloksifena, oksidacija s citokromi skupine CYP450 pa je zanemarljiva [2, 8].

Glukuronidi se tvorijo na mestu 4' in na mestu 6 molekule raloksifena, kot je predstavljeno na sliki 1.3.



	<b>R<sub>1</sub></b>	<b>R<sub>2</sub></b>
<b>M1</b>		
<b>M2</b>		
<b>raloksifen</b>	H	H

Slika 1.3: Raloksifen in njegova metabolita

V kliničnih študijah in v večini *in vitro* raziskav se je pokazalo, da nastane največ raloksifen-4'-glukuronida (M2), 6-glukuronida (M1) pa približno osemkrat manj [9]. Plazemski razpolovni čas raloksifena je 28 ur, obenem pa po enkratnem peroralnem odmerku v časovnem poteku plazemskih koncentracij opazimo več vrhov. Vse to kaže na sistemsko interkonverzijo in enterohepatično kroženje raloksifena in njegovih glukuronidov [10].

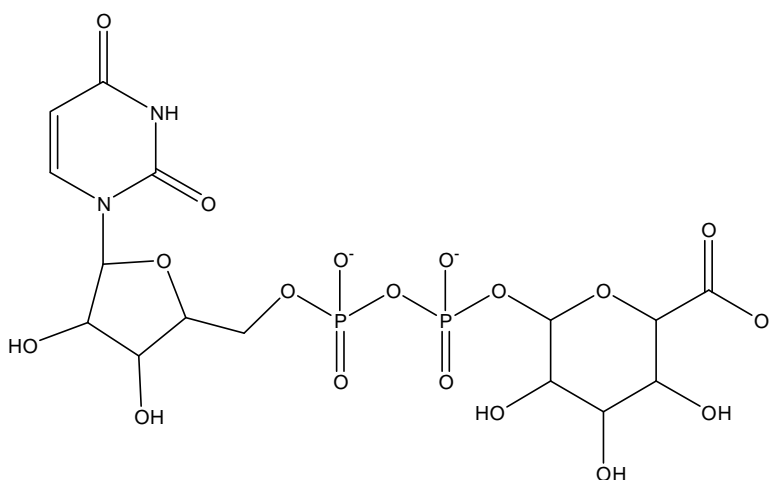
Raloksifenovih konjugatov ne moremo gledati kot neaktivno in izločeno učinkovino, temveč kot transportno obliko, iz katere nastaja nazaj raloksifen, deloma že v centralnem krvnem obtoku, deloma pa kasneje po izločanju z žolčem. Od tam se lahko ponovno absorbira v centralni krvni obtok in tako zaključi enterohepatični cikel. Predvideva se, da poteka metabolizem raloksifena tako v steni tankega črevesa [10] kot tudi v jetih [11].

Konverzija glukuronidov raloksifena v prosti raloksifen poteka prek  $\beta$ -glukuronidaz, ki so prisotne tako v tarčnih organih, kot tudi v jetih in serumu. Poleg tega se v črevesju nahajajo bakterijske  $\beta$ -glukuronidaze, ki s hidrolizo v črevo izločenih glukuronidov omogočajo enterohepatično recirkulacijo raloksifena.

Raloksifen je kot učinkovina zanimiv tudi s stališča velike interindividualne variabilnosti v plazemskih koncentracijah. Ob določanju njegovih farmakokinetičnih parametrov so namreč prihajali do visokih koeficientov variacije [11]. Razlog bi lahko iskali v prepletanju metaboličnih poti v različnih organih, kar nudi veliko možnosti za izražanje interindividualnih razlik v presnovi te učinkovine.

### 1.3. ENCIMI URIDIN DIFOSFAT GLUKURONOZILTRANSFERAZE (UGT)

Tvorba glukuronidov je najverjetneje glavna in najpogostejša pot druge faze metabolizma ksenobiotikov do vodotopnih spojin, ki se v končni fazi izločajo v žolč in urin. Poleg povečane sposobnosti za izločanje se zaradi spremembe kemične strukture spremeni tudi njihova biološka aktivnost – v glavnem se njihova afiniteta za vezavo na receptor zmanjša. Zaradi velikih zalog glukuronske kisline v jetrih in velikega števila funkcionalnih skupin, ki lahko tvorijo glukuronide (fenoli, alkoholi, karboksilne kisline in amini), je ta pot metabolizma bistvenega pomena. V reakciji pride do kondenzacije ksenobiotika, v našem primeru raloksifena, z aktivirano obliko glukuronske kisline: uridin difosfat glukuronsko kislino (UDPGA, na sliki 1.4), kar katalizirajo encimi iz družine UDP-glukuronoziltransferaz (UGT). Pri tem nastajajo O-glukuronidi, N-glukuronidi ali glukuronati. [12].



Slika 1.4: Strukturna formula uridin difosfat glukuronske kisline (UDPGA)

Zaradi naštetega so UGT zelo pomembne za detoksifikacijo tujih snovi (npr. paracetamol, morfin, kloramfenikol,...) in za preprečevanje akumulacije oz. uravnavanje koncentracije nekaterih endogenih snovi, kot so bilirubin, žolčne kisline, estradiol, tiroksin itd [8, 12].

### **1.3.1. Klasifikacija**

Nad-družina UGT ima po mednarodni encimski klasifikaciji oznako UGT (E.C. 2.4.1.17). Včasih so sesalske glukuronoziltransferaze glede na homologijo v sekvenci delili na dve veliki družini: UGT1 in UGT2. Po novejših podatkih pa so naddružino razširili na štiri družine in sicer: UGT1, UGT2, UGT3 in UGT8 [13, 14].

Glukuronoziltransferaze označujemo z oznako UGT skupaj s številko družine, kateri sledi črka, npr. A ali B, ki označuje poddružino. Za omenjeno črko stoji še ena številka, ki označuje točno določeno obliko encima iz poddružine (npr. UGT1A4). Omenjene encime uvrščamo v družine in poddružine glede na aminokislinsko zaporedje: znotraj družine imajo encimi 50 % enakega zaporedja aminokislin, v poddružini pa homologija zavzema okoli 60 % strukture proteinov. Družini UGT1 in UGT2 najbolj učinkovito uporabljata UDPGA kot substrat, zato sta tudi najpomembnejši pri metabolizmu učinkovin [15].

### **1.3.2. Ekspresija UGT encimov**

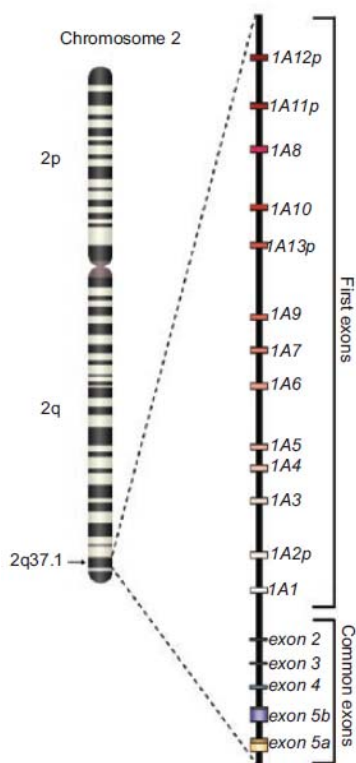
V organizmu so encimi UGT eksprimirani v enterocitih (epitelij tankega in debelega črevesa), v hepatocitih, ledvicah in možganih. V jetrih so potrdili prisotnost naslednjih izoform iz poddružine 1A: UGT1A1, UGT1A3, UGT1A4, UGT1A6, UGT1A9. V tankem črevesju pa UGT1A1, UGT1A4, UGT1A8, UGT1A10. Zadnja dva izmed naštetih se nahajata le izven jeter [16].

Tako kot CYP, se tudi UGT v celici v največji meri nahajajo v endoplazemskem retikulumu (ER). Toda za razliko od CYP, UGT niso obrnjene na citosolno, temveč na luminalno stran. Tak položaj encima je posledica kotranslacijske translokacije polipeptidne verige čez membrano endoplazemskega retikuluma (ER); ta membrana predstavlja difuzijsko bariero tako za substrate in kosubstrat, UDP-glukuronsko kislino (UDPGA), kot tudi za produkte.

### 1.3.3. Podružina UGT1A

Podružino UGT1A kodira gen na kromosomu 2 (lokus 2q37.1), ki je shematsko predstavljen na sliki 1.5. Sestavljen je iz petih t.i. »skupnih eksonov« (ekson 2, 3, 4, 5a in 5b), ki kodirajo vsem UGT1A encimom skupne C-terminalne sekvence. Vendar pa prihaja pri zorenju mRNA do različne cepitve na eksonih 5a in 5b, kar vodi do nastanka več izoform encima.

Skupnim eksonom sledijo kasete s trinajstimi eksoni, ki kodirajo celotne N- terminalne dele posameznega predstavnika podružine in najverjetneje kodirajo vezavno mesto za substrat. Od trinajstih možnih mRNA izoform jih 9 kodira funkcionalno aktivne polipeptide (UGT1A1, 1A3, 1A4, 1A5, 1A6, 1A7, 1A8, 1A9 in 1A10), ostali štiri pa so pseudogeni (*UGT1A2p*, *UGT1A11p*, *UGT1A12p* in *UGT1A13p*) [17].



Slika 1.5: Shematski prikaz gena, ki kodira encime iz podružine UGT1A

V podružini UGT1A so za glukuronidacijo raloksifena odgovorni encimi UGT1A1, UGT1A8, UGT1A9 in UGT1A10. UGT1A8 in UGT1A10 nista eksprimirana v jetrih, prispevek izoforme UGT1A9 h glukuronidiranju pa je nizek, tako da je v jetrih glavni encim odgovoren za glukuronidacijo raloksifena prav UGT1A1. Omenjeni encim proizvaja več M1 kot M2 [10].

### 1.3.3.1. UGT1A1 in njegove izoforme

UGT1A1 je eksprimirana predvsem v jetrih; njena glavna naloga je odstranjevanje bilirubina in drugih hidrofobnih substratov. UGT1A1 je pri ljudeh edini fiziološko pomemben encim za konjugacijo BLR [18]. Tipično referenčno območje za celokupni in direktni bilirubin je 0,3 do 1,2 mg/dL. [23]

Polimorfizmi v UGT1A1 se kažejo kot dedne nekonjugirane hiperbilirubinemije: Crigler-Najjarov sindrom tipa I in II ter Gilbertov sindrom. Crigler-Najjarov sindrom se pojavlja relativno redko, Gilbertov sindrom pa je precej pogost, v celotni človeški populaciji ima frekvenco 3-10 % [19].

#### *Crigler-Najjarov sindrom*

Pacienti s Crigler-Najjarovim sindromom tipa I imajo izredno povečane koncentracije bilirubina v serumu (20-45 mg/dL), ki lahko povzroči smrt zaradi bilirubinske encefalopatije (kernikterus). Gre za skoraj popolno odpoved delovanja encima UGT1A1. Pacienti s tipom II pa imajo zmernejšo obliko hiperbilirubinemije, ki se jim vleče od neonatalnega obdobja in s koncentracijami bilirubina 6-25 mg/dL navadno nimajo težav z zdravjem. Encim UGT1A1 v tem primeru ostaja aktiven, vendar je njegova aktivnost zmanjšana (pod 10 % normalne) [20, 21].

#### *Gilbertov sindrom (GS)*

Gilbertov sindrom je dedna motnja, za katero je značilna blaga nekonjugirana hiperbilirubinemija v odsotnosti hemolize in jetrnih bolezni. Prvič sta ga leta 1901 opisala Gilbert in Lereboullet. Najpogostejši je med Afričani, kjer nastopa s frekvenco 36 %, precej pogost je tudi pri Zahodnih Evropejcih z 10-13 %, redkejši pa pri Azijcih, kjer je povprečna pojavnost sindroma 3 % [22]. Moški pogostejše posegajo v območje povišanih koncentracij BLR, značilnih za Gilbertov sindrom (12,4 %), kot ženske (4,8 %). Serumske koncentracije BLR so 1- 3,5 mg/dL [23]. Značilno je, da vrednosti nihajo in narastejo ob metaboličnem stresu kot je stradanje ali prisotnost druge bolezni.

Vzroki za GS še niso povsem razjasnjeni. Najpomembnejšo vlogo igra znižana konjugacija BLR, ki je pri bolnikih z GS znižana na 30 % normalne. K povišanim koncentracijam nekonjugiranega BLR v plazmi pa prispeva tudi njegov zmanjšan privzem v hepatocite. Za prvo je odgovoren polimorfizem gena za UGT1A1, za drugo pa polimorfizem gena za organski anionski prenašalec 1B1 (SLCO1B1) [18].



Pri polimorfizmu gena, ki kodira encim UGT1A1, gre za dinukleotidni polimorfizem v TATA predelu promotorja. Normalni gen ima sekvenco A(TA)<sub>6</sub>TAA (tak gen označujemo kot *UGT1A1\*1*), polimorfna oblika pa ima eno ponovitev TA več, torej dvobazno insercijsko mutacijo v promotorju: A(TA)<sub>7</sub>TAA. Dinukleotid TA je lahko pri Afričanih ponovljen tudi 5-krat ali 8-krat; v prvem primeru ostane transkripcija enaka, v drugem pa se zmanjša [24]. Homozigotno stanje za (TA)<sub>7</sub> in za (TA)<sub>8</sub> predstavlja polimorfizem *UGT1A1\*28/\*28* in vodi v pojav Gilbertovega sindroma.

Diagnostika Gilbertovega sindroma je včasih težavna, ker je krvni nekonjugirani bilirubin lahko prehodno znižan zaradi indukcije jetrne glukuronidacije npr. z alkoholom. Gilbertov sindrom ima lahko za posledico dolgotrajno zlatenico pri doječih se dojenčkih, kasneje pa lahko pozvroči zlatenico pri drugih sočasnih motnjah v presnovi hemoglobina. Lahko tudi vodi do počasnejšega glukuronidiranja nekaterih učinkovin in posledično do morebitnih neželenih učinkov [19]. Osnovni cilj te diplomske naloge bo ugotoviti, ali se med temi učinkovinami nahaja tudi raloksifen.

#### **1.4. BILIRUBIN**

Bilirubin je končni presnovni produkt hema, ki nastaja v celicah retikuloendotelnega sistema, predvsem v vranici. V nizkih koncentracijah sicer deluje kot antioksidant, v višjih koncentracijah pa deluje nevrotoksično, zato ga mora telo čimprej izločiti. Dnevno nastane 250 do 400 mg BLR. Nativni BLR zaradi tvorbe intramolekularnih vezi ni vodotopen. V serumu se veže na albumin in se tako prenese do jeter. To obliko imenujemo nekonjugiran BLR. Le 0,1% BLR v serumu predstavlja nativni prosti BLR, ki lahko prehaja hematoencefalno pregrado in je nevrotoksičen. V jetrih se BLR odcepi od albumina in preko anionskih prenašalnih proteinov ali s procesom difuzije vstopa v hepatocite, kjer ga prevzame citoplazemski protein ligandin in ga prenese do endoplazmatskega retikuluma (ER). Na ER poteče reakcija esterifikacije z glukuronsko kislino, ki jo katalizira UDP-glukuronil transferaza 1A1 (UGT1A1). Nastaneta vodotopna BLR monoglukuronid in BLR diglukuronid s skupnim imenom konjugirani BLR. Konjugiran BLR se z aktivnim transportom izloča v žolčni mehur od tam pa v tanko črevo.  $\beta$ -glukuronidaza hidrolizira konjugiran BLR do nekonjugiranega BLR, ki se nato pod vplivom anaerobnih bakterij reducira do urobilinogenov. Del nekonjugiranega BLR in do 20 % dnevno nastalih urobilinogenov se reabsorbira iz črevesja in vstopi v enterohepatično cirkulacijo, kjer se

ponovno skozi jetra izločijo v žolč oz. preko ledvic v urin. Ostalih 80 % urobilinogenov se v spodnjem delu prebavnega trakta spontano oksidira v urobiline, ki dajejo barvo blatu, s katerim se tudi izločijo [18].

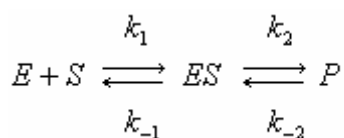
Encim UGT1A1 je torej glavni encim pri človeku, odgovoren za konjugacijo bilirubina z glukuronsko kislino. Na tem mestu se metabolične poti raloksifena in bilirubina stikajo. Naša naloga bo med drugim tudi razjasniti interakcijo bilirubina z raloksifenom na nivoju tega encima.

## 1.5. FARMAKOKINETIKA IN ENCIMSKA KINETIKA

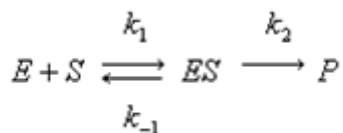
Farmakokinetika je veda, ki se ukvarja s časovnim potekom absorpcije, distribucije, metabolizma in eliminacije učinkovine iz telesa [25]. S pomočjo farmakokinetičnih modelov poskuša razložiti obnašanje učinkovine v telesu, predvideti koncentracije učinkovine v plazmi in s tem napovedati farmakološki učinek oz. neželene učinke zdravila. Predvsem na nivoju metabolizma se pojem farmakokinetike sreča z encimsko kinetiko. Slednja se osredotoča na časovno odvisne encimske reakcije, ki težijo k temu, da bi dosegle neko stacionarno stanje in predstavlja temelj metaboličnih sprememb v organizmu. V okviru te diplome bomo preučevali glukuronidiranje raloksifena z encimom UGT1A1. Gre za enosubstratno encimsko katalizirano reakcijo z značilnostmi substratne inhibicije. V tem poglavju bomo predstavili teoretične osnove omenjene encimske kinetike. Sledi predstavitev farmakokinetičnega modela, ki ga bomo uporabili za prenos *in vitro* dobljenih podatkov na *in vivo* situacijo, naknadno pa so opisane še *in vitro* metode, ki nam bodo pomagale pri praktičnem raziskovanju poteka omenjene metabolične transformacije.

### 1.5.1. Kinetika enosubstratne encimsko katalizirane reakcije

Encimsko katalizirana enosubstratna in enoproduktna reakcija, kjer obstaja le eno vezavno mesto za substrat, poteka po shemi:



Če se omejimo na začetno obdobje reakcije, je koncentracija produkta zanemarljivo majhna in pretvorba produkta v ES kompleks je zanemarljiva- torej lahko zgornjo shemo poenostavimo:



Zapisano shemo lahko pretvorimo v enačbo na različne načine, t.j. ob upoštevanju različnih predpostavk. V nadaljevanu izpeljana enačba nam omogoča izračun koncentracije substrata v različnih časovnih točkah, določanje maksimalne hitrosti reakcije in afinitete encima do substrata. Izpeljavo enačbe lahko izvedemo na dva načina, ki temeljita na različnih izhodiščih:

a) Michaelis-Mentenova kinetika temelji na predpostavki, da se takoj vzpostavi in nato tudi vzdržuje ravnotežje med encimom, substratom in kompleksom encim-substrat, medtem ko je razpad kompleksa ES v produkt prepočasen, da bi zmotil to ravnotežje. Če želimo uporabiti Michaelis-Mentenovo enačbo, moramo upoštevati naslednje predpostavke:

- Koncentracija encima je zelo majhna v primerjavi s koncentracijo substrata, tako da se  $[S]$  med reakcijo ne spreminja.
- Produkta nastane zanemarljivo malo. To je res samo v začetnih pogojih, ko hitrost reakcije že lahko izmerimo, produkta pa je še tako malo, da praktično ne prehaja nazaj v ES.
- Nastanek produkta je sicer hiter, vendar veliko počasnejši od razpada kompleksa ES na E in S ( $k_2 \ll k_{-1}$ ), velja torej izraz:

$$k_1 [E] [S] = k_{-1} [ES]$$

Hitrost nastajanja ES kompleksa ob kateremkoli času  $t$  (v okviru začetnega obdobja reakcije) je enaka  $k_1 [E] [S]$ , kjer je  $[E]$  koncentracija prostega encima,  $[S]$  pa koncentracija prostega substrata ob času  $t$ . Podobno velja za razpad kompleksa ES. Ob času  $t$  je hitrost razpada kompleksa ES enaka  $k_{-1} [ES]$ , kjer je  $[ES]$  koncentracija kompleksa med encimom in substratom ob času  $t$ .

b) Briggs-Haldane-ova modifikacija Michaelis-Mentenove enačbe pa temelji na nastanku t.i. »steady-state« oz. stacionarnega stanja. To pomeni, da koncentracija kompleksa ES ostaja konstantna - kolikor kompleksa nastane iz E in S, toliko ga tudi razpade na E, S in P. Od Michaelis-Mentenove enačbe se razlikuje v zadnji predpostavki - hitrost nastajanja produkta  $k_2$  ni nujno zelo počasna v primerjavi s  $k_{-1}$ , velja torej:

$$k_1 [E] [S] = k_{-1} [ES] + k_2 [ES] = ES (k_{-1} + k_2)$$

V obeh primerih lahko izpeljemo temeljno enačbo, ki opisuje kinetiko enosubstratne encimske reakcije:

**Napaka! Zaznamek ni definiran.** 
$$v_o = \frac{k_2 [E_0] [S_0]}{[S_0] + K_m}$$
; kjer je:

*Enačba 1.1*

$v_o$  ..... začetna hitrost

**Napaka! Zaznamek ni definiran.**  $E_0$  ..... (začetna) koncentracija encima

$S_0$  ..... začetna koncentracija substrata

$K_m$  ..... Michaelis- Mentenova konstanta

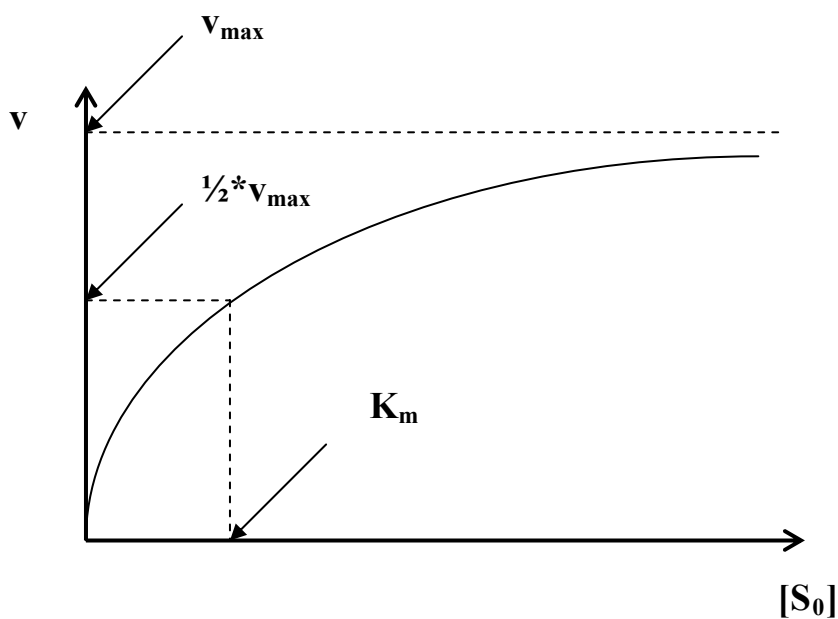
$k_2$  ..... konstanta hitrosti razpada kompleksa ES v produkt P

V primeru, da je koncentracija  $E_0$  konstantna, lahko enačbo poenostavimo:

$$v_o = \frac{v_{\max} [S_0]}{K_m + [S_0]}$$

*Enačba 1.2*

Graf odvisnosti hitrosti reakcije od koncentracije substrata pa bo v tem primeru izgledal tako, kot je prikazano na sliki 1.6.



*Slika 1.6: Odvisnost hitrosti reakcije od koncentracije substrata glede na enačbo 1.2*

### 1.5.1.1. Substratna inhibicija

Za tipično encimsko katalizirano reakcijo je značilno, da z večanjem koncentracije substrata narašča tudi začetna hitrost, ki se bliža asimptotični vrednosti  $v_{\max}$ . V primeru substratne inhibicije pa se zgodi, da začne pri visokih koncentracijah substrata hitrost upadati, namesto da bi se približevala  $v_{\max}$ . Takšno inhibicijo povzroči sekundarna molekula substrata, ki se veže na aktivni EA kompleks in inhibira reakcijo. To lahko kaže na dve vezavni mesti za substrat na encimu: prvo, z veliko afiniteto do substrata se zasede že pri nižjih koncentracijah in omogoča normalen potek reakcije. Drugo mesto pa ima manjšo afiniteto, zato se zasede šele pri visokih koncentracijah substrata in ob tem ovira nadaljnjo reakcijo [26].

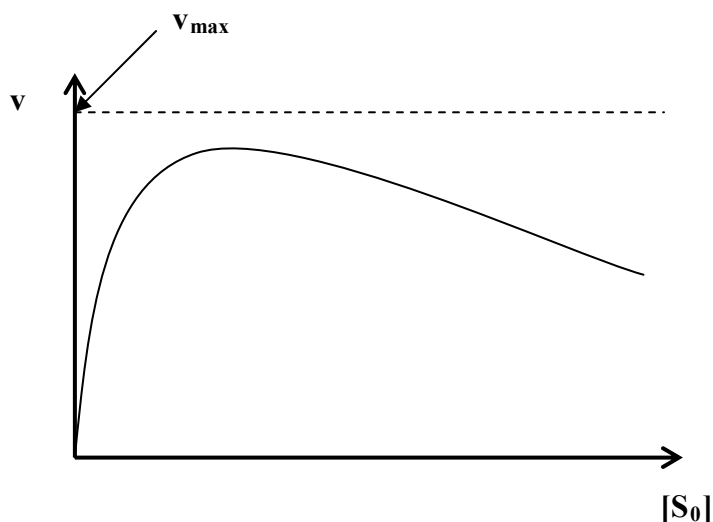
Iz Michaelis-Mentenove enačbe lahko izpeljemo enačbo za substratno inhibicijo in sicer s predpostavko, da gre za nekompetitivno inhibicijo, kjer je inhibitor neka dodatna, sekundarna molekula substrata. Dobimo enačbo 1.3:

$$v_0 = \frac{v_{\max} [S_0]}{[S_0] \left( 1 + \frac{[S_0]}{K_i} \right) + K_m} \quad \text{Enačba 1.3}$$

Pri zelo nizkih  $S_0$  je člen  $S_0/K_i$  zanemarljivo majhen in izraz se poenostavi v normalno Michaelis-Mentenovo enačbo. Pri visokih  $S_0$  pa zgleda poenostavljen izraz takole (enačba 1.4):

$$v_0 = \frac{v_{\max}}{\left( 1 + \frac{[S_0]}{K_i} \right)} \quad \text{Enačba 1.4}$$

Na sliki 1.7, ki prikazuje odvisnost hitrosti reakcije od koncentracije substrata, vidimo pojav substratne inhibicije kot odklon krivulje od asimptotične vrednosti  $v_{\max}$ .



Slika 1.7: Odvisnost hitrosti encimske reakcije od količine substrata ob prisotnosti substratne inhibicije

### 1.5.2. Določevanje navideznih encimskih parametrov

Navidezni encimski parametri so osnova za izračun intrinzičnega očistka, zato jih je potrebno pridobiti iz eksperimentalnih podatkov. Slednje lahko obdelamo na več različnih načinov, vendar se moramo ob tem zavedati, da lahko različne metode obdelave podatkov vodijo do različnih rezultatov, saj vsaka metoda v sebi nosi določeno napako. Zato je potrebno dobljene rezultate tudi ustrezno interpretirati [27]. Cilj obdelave eksperimentalnih podatkov je pridobitev podatkov o maksimalni hitrosti ( $v_{\max}$ ) in Michaelis-Mentenovi konstanti ( $K_m$ ), ki ju bomo v nadaljevanju uporabili za izračun intrinzičnega očistka.

V okviru te diplomske naloge smo z uporabo mikrosomov kot *in vitro* modela ugotavljali hitrost nastajanja metabolitov raloksifena pri različnih koncentracijah raloksifena. Naši rezultati so torej izmerjena koncentracija metabolita M1 in M2 po določenem časovnem intervalu, ko smo reakcijo zaustavili. Če količino nastalih metabolitov delimo s časovno enoto, dobimo hitrost nastajanja metabolita M1 in M2. Te hitrosti nato povežemo s koncentracijo substrata v sistemu. To lahko storimo na sledeče načine:

- a) Za lažjo obdelavo podatkov izvedemo linearizacijo, kar pomeni, da podatke pretvorimo v obliko  $y = mx + c$ , kar nam bo omogočilo izračun  $K_m$  in  $v_{\max}$ . Poznamo več različnih načinov linearizacije:
  - Lineweaver-Burk-ova enačba
  - Eadie-Hofstee-jeva enačba

- Hanes-ova enačba
- Haldane-ovo razmerje itd.

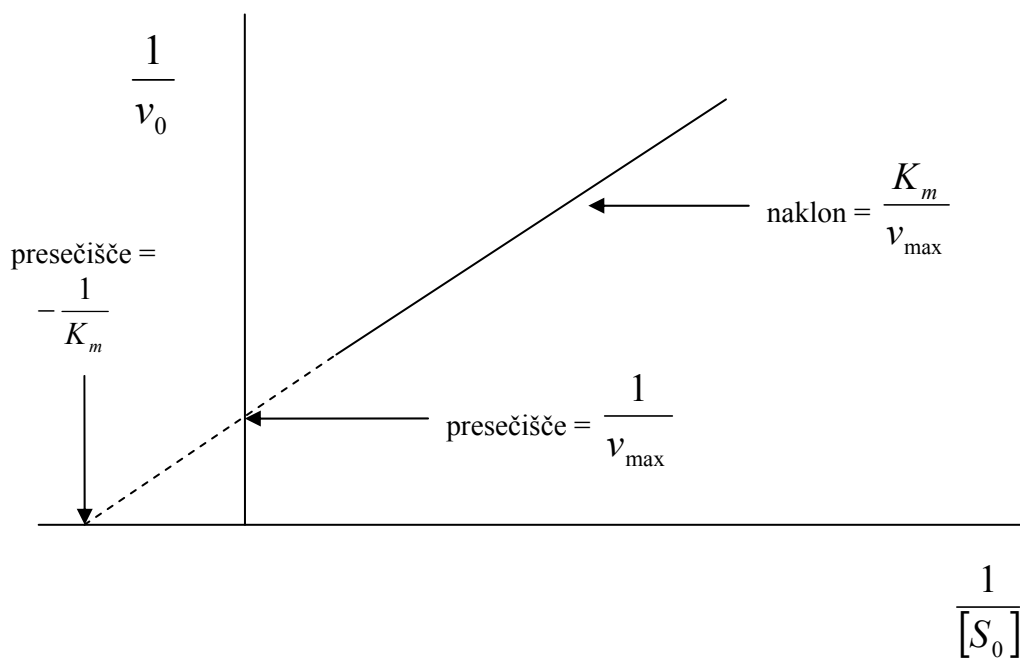
Pri obdelavi podatkov z linearizacijo smo uporabili Lineweaver-Burkov model, ki je predstavljen v nadaljevanju.

### Lineweaver Burk

Za sisteme, ki sledijo Michaelis-Mentenovi kinetiki, lahko narišemo graf  $1/v_0$  v odvisnosti od  $1/S_0$ , kot je to predstavljeno na sliki 1.8, in ob tem dobimo premico. Dobljeno premico ekstrapoliramo čez os  $y$ , tako da dobimo dve presečišči. Presečišče z osjo  $y$  je enako vrednosti  $1/v_{\max}$ , presečišče z osjo  $x$  pa  $-1/K_m$ . Premica sledi enačbi 1.5.

$$\frac{1}{v_0} = \frac{K_m}{v_{\max}} \cdot \frac{1}{S_0} + \frac{1}{v_{\max}}$$

Enačba 1.5

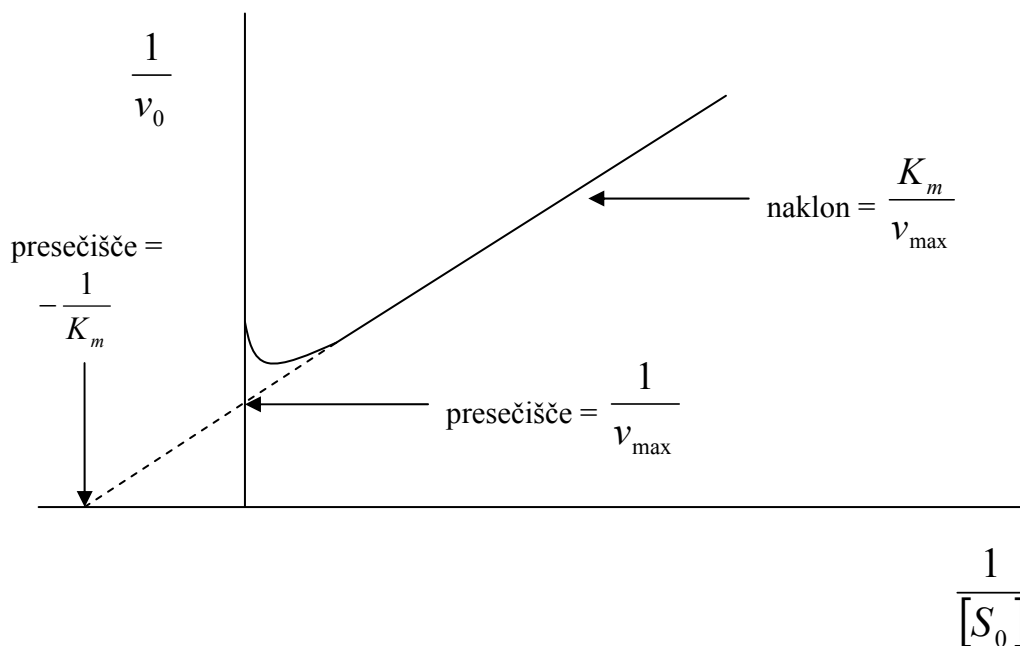


Slika 1.8: Grafični prikaz Lineweaver-Burk-ove enačbe

Enačba 1.6 predstavlja modifikacijo Lineweaver-Burk-ove enačbe za substratno inhibicijo:

$$\frac{1}{v_0} = \frac{1 + \frac{[S_0]}{K_i}}{v_{\max}} + \frac{K_m}{v_{\max} [S_0]}$$

Enačba 1.6



Slika 1.9: Grafični prikaz Lineweaver-Burk-ove enačbe s substratno inhibicijo

Kot je iz slike 1.9 razvidno, se pri višjih koncentracijah substrata premica odkloni in oblikuje krivuljo, ki se asimptotično približuje osi  $y$ . Za izračun parametrov tako upoštevamo le podatke pri nižjih koncentracijah substrata, kjer z linearno regresijo izračunamo enačbo premice in s tem njeno presečišče  $x$  in  $y$  osi.

Z neupoštevanjem dela podatkov, ki se nanaša na dogajanje pri višjih koncentracijah raloksifena, izgubimo določeno informacijo, kar moramo upoštevati pri vrednotenju dobljenih rezultatov.

- b) Drug pristop k obdelavi podatkov, ki smo ga uporabili, je nelinearna regresija z uporabo najmanjše vsote kvadratov odklonov. Podatke smo obdelali v okolju programa Excel z orodjem »Reševalec«. Tako smo skozi eksperimentalno izmerjene točke potegnili krivuljo z enačbo substratne inhibicije, program pa nam je izračunal tudi  $K_m$ ,  $K_i$  in  $v_{\max}$ .



Danes se največ uporablja slednji način obdelave podatkov, se pa priporoča vsaj vizualni pregled katere od metod linearizacije. Bistveni odstop od premice namreč pomeni, da opazovana encimska reakcija ni sledila Michaelis-Mentenovim predpostavkam oziroma da gre za netipično kinetiko [8].

### 1.5.3. Napovedovanje metaboličnega očistka

Za napovedovanje metaboličnega očistka moramo poznati vrsto metabolične reakcije, odgovoren encim, produkt reakcije in encimske kinetične parametre. S pomočjo encimskih kinetičnih parametrov, kot so npr.  $K_m$ ,  $V_{max}$ ,  $K_i$ , lahko uporabimo katerega od matematičnih modelov za napovedovanje *in vivo* metaboličnega očistka. Ob tem pa moramo poznati tudi nekatere *in vivo* parametre npr. vezavo učinkovine na plazemske proteine in njen porazdelitveni volumen [28].

#### 1.5.3.1. Farmakokinetični modeli

Pri ekstrapolaciji rezultatov z *in vitro* modela na *in vivo* situacijo potrebujemo čim boljše farmakokinetične modele, ki se delijo na prostorne in fiziološke. Prostorni modeli vsebujejo prostore, ki nimajo definirane anatomske sestave, v katerih snovi ne nastajajo ali izginjajo, hitrosti procesov pa so največkrat 1. reda. Za fiziološke modele je značilno, da imajo prostori definirano anatomsko sestavo, snovi v teh prostorih lahko nastajajo in izginjajo, hitrosti procesov pa so odvisne od hitrosti pretoka krvi skozi organ.

Med farmakokinetičnimi koncepti je očistek najuporabnejši z vidika klinične prakse. Način izračuna njegove vrednosti se razlikuje glede na model, ki ga uporabimo. Po prostornem farmakokinetičnem modelu ga izračunamo z enačbo 1.7:

$$Cl = k_e \times V_D, \text{ kjer je} \quad \text{Enačba 1.7}$$

$k_e$  ..... hitrostna konstanta izločanja [ $h^{-1}$ ]

$V_D$ ..... volumen porazdelitve [L];

izračun očistka s pomočjo fiziološkega modela pa temelji na enačbi 1.8:

$$Cl = Q \times E, \text{ kjer je} \quad \text{Enačba 1.8}$$

$Q$  .... pretok skozi organ [L/h]

$E$  .... ekstrakcijsko razmerje (razmerje med hitrostjo izločanja in hitrostjo vstopanja učinkovine v organ);

napisano enačbo nadalje razširimo glede na izbrani organ in fiziološki model.

### ***Intrinzični očištek***

Intrinzični očištek izraža sposobnost organa za metabolično odstranjevanje nevezane učinkovine. Je proporcionalna konstanta med hitrostjo odstranjevanja in koncentracijo nevezane učinkovine. Odraža dogajanja znotraj celice in zato poda vrednost, ki bi jo dobili, če ne bi bilo prisotne vezave na proteine ali omejitve s pretokom. Prav zaradi tega so vrednosti tega očiščka ponavadi več redov velikosti večje od pretoka krvi skozi jetra.

Intrinzični očištek je rezultat metabolizma in izločanja učinkovine, zato ga v pogojih nenasičenosti encimov lahko izračunamo po enačbi 1.9:

$$Cl_{int} = \sum \frac{v_{max}}{K_m} + \sum \frac{T_m}{K_d}, \text{ kjer je} \quad \text{Enačba 1.9}$$

- $T_m$  .... največja hitrost prenosa učinkovine
- $K_d$  .... konstanta disociacije vsakega prenašalca, vpletenega v izločanje učinkovine [29]

### ***Jetrni očištek***

Jetra so najpomembnejši organ za odstranjevanje učinkovin iz telesa. So dobro prekrvavljena in imajo strukturo, ki omogoča direkten stik med krvjo in jetrnimi celicami, ki vsebujejo vrsto presnovnih encimov. Za izračun jetrnega očiščka učinkovine lahko uporabimo različne fiziološke modele:

- model dobrega mešanja (ang. »well-stirred model«)
- model vzporednih cevi (ang. »parallel-tube model«)
- disperzijski model (ang. »dispersion model«)

Za izračun jetrnega očiščka raloksifena smo izbrali model dobrega mešanja. Ta model predpostavlja, da so molekule učinkovine homogeno razporejene po celih jetrih, torej je koncentracija učinkovine po celem organu enaka. Jetra obravnava kot enoten prostor, v katerem se kri popolnoma premeša. Pomembne predpostavke tega modela so:

- iz krvi se eliminira (z metabolizmom ali prek žolča) le nevezana učinkovina
- prehod membran ne predstavlja ovire
- v jetrih ne obstaja koncentracijski gradient učinkovine
- koncentracija učinkovine v jetrih je enaka kot v krvi, ki prihaja iz jeter
- linearna kinetika

Enačba, ki opisuje model dobrega mešanja:

$$Cl_h = \frac{Q_h * f_{u,b} * Cl_{i,h}}{Q_h + f_{u,b} * Cl_{i,h}} ; \quad \text{Enačba 1.10}$$

$Cl_h$  ..... jetrni očistek

$Q_h$  ..... pretok krvi skozi jetra

$f_{u,b}$  ..... frakcija nevezane učinkovine v krvi

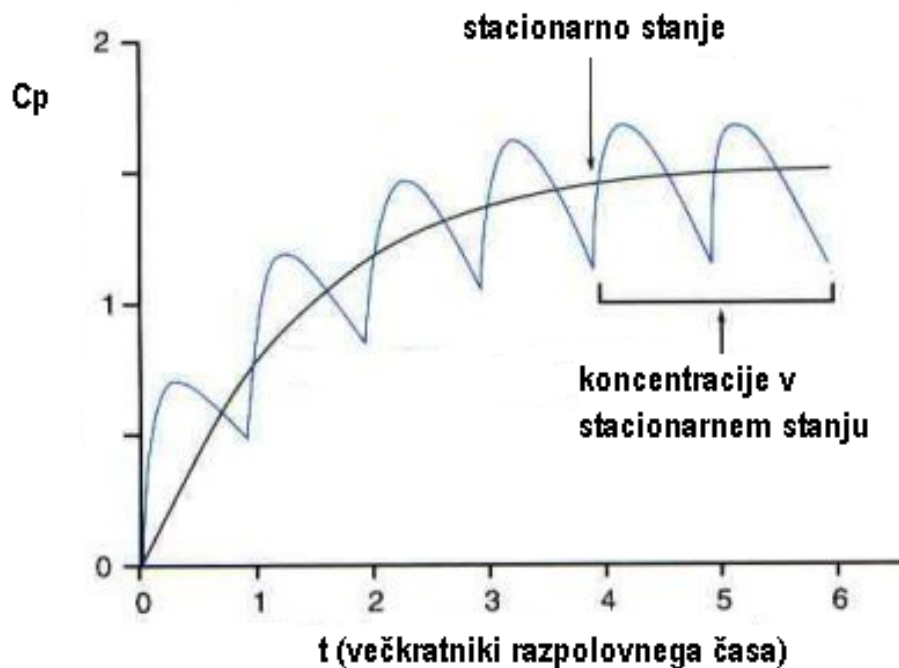
$Cl_{i,h}$  ..... intrinzični jetrni očistek [30]

Raloksifen se metabolizira prek več encimov (UGT1A1, UGT1A8, UGT1A9, UGT1A10) v več organih (jetra, črevo,...). Za ekstrapolacijo intrinzičnega očistka na celoten organizem bomo zanemarili metabolizem raloksifena v drugih organskih sistemih in prek drugih encimov ter privzeli, da se presnavlja le v jetrih, kjer je eden od glavnih encimov za njegov metabolizem UGT1A1. S tem bo izračunan jetrni očistek najbrž nekoliko nižji kot je realno [47], prav tako bo primerjava jetrnega očistka s celokupnim očistkom, izračunanem iz *in vivo* podatkov, samo relativna.

### ***Računanje očistka na osnovi enoprostornega modela večkratne ekstravaskularne aplikacije***

Najzanesljivejša metoda ocenjevanja metaboličnega očistka temelji na merjenju koncentracij učinkovine v plazmi človeških preiskovancev, ki prejemajo zdravilo v točno določenih časovnih intervalih. Takšen pristop zajema vse metabolične poti učinkovine v vseh organih, zato je tako pridobljen podatek o očistku najbolj uporaben v praksi, čeprav ne osvetljuje metaboličnih mehanizmov. Še več, na osnovi plazemskih koncentracij učinkovine je možno pridobiti podatek o celokupnem očistku, ki poleg metabolizma vključuje še druge poti eliminacije učinkovine.

V naši skupini preiskovank smo raloksifen aplicirali peroralno v konstantnih časovnih intervalih. Terapevtsko obdobje je bilo dovolj dolgo, da se je v plazmi preiskovank vzpostavilo stacionarno stanje. Na podlagi teh dejstev smo se odločili za uporabo farmakokinetičnega enoprostornega modela večkratne ekstravaskularne aplikacije, ki je predstavljen na sliki 1.10.



Slika 1.10: Shematski prikaz plazemskih koncentracij učinkovine v odvisnosti od časa v primeru večkratne ekstravaskularne aplikacije

Povprečna plazemska koncentracija učinkovine v stacionarnem stanju se v omenjenem modelu izračuna po enačbi 1.13.

$$\bar{c}_{ss} = \frac{F \times D}{V_D \times k_e \times \tau}; \text{ kjer je} \quad \text{Enačba 1.13}$$

- F .... frakcija absorbirane učinkovine
- D .... enkratni odmerek
- $V_D$  .... volumen porazdelitve
- $\tau$  .... odmerni interval
- $\bar{c}_{ss}$  .... povprečna plazemska koncentracija v stacionarnem stanju
- $k_e$  .... konstanta izločanja

Ob kombinaciji enačbe 1.7 in enačbe 1.13, dobimo izraz za izračun *in vivo* celokupnega očistka (enačba 1.14).

$$Cl = \frac{F \times D}{\bar{c}_{ss} \times \tau} \quad \text{Enačba 1.14}$$

## **1.6. IN VITRO METODE**

Pri raziskovanju metabolizma učinkovin si pomagamo z *in vitro* metodami, ki so cenejše in dostopnejše kot *in vivo* metode. Nudijo nam prve podatke o zadevni kinetiki, hkrati pa predstavljajo sistem z omejenim številom spremenljivk. Ti modeli, ki poenostavljeno posnemajo pogoje v organizmu, so lahko celični (tkivne rezine, izolirani in kultivirani hepatociti, jetrne celične linije), kot tudi subcelični (od najbolj kompleksnega k najenostavnejšemu: jetrni homogenat, S9 frakcija, citosol, mikrosomi, peroksisomi in mitohondriji). Za raziskovanje naše substance, raloksifena, smo si kot modelni sistem izbrali mikrosome.

### **1.6.1. Mikrosomi**

Mikrosomi spadajo med subcelične frakcije. So majhni membranski vezikli, veliki 20-200 nm. Nastanejo iz gladkega endoplazmatskega retikuluma pri homogenizaciji tkiva in ultracentrifugiranju. Mikrosomi so najenostavnejši *in vitro* model pridobljen iz jeter. V njih so prisotni encimi prve in tudi nekateri encimi druge faze metabolizma zdravil. Tako vsebujejo encime CYP P450, flavinske monooksigenaze (FMO), epoksidne hidrolaze, glukuronoziltransferaze, esteraze, amidaze, mikrosomalne glutation-S-transferaze in metiltransferaze [34, 35, 36]. Njihova prednost je ta, da dajejo sorazmerno dobro ponovljive rezultate, da imajo visoko vsebnost metaboličnih encimov in da izkazujejo relativno majhno nespecifično vezavo učinkovin. Da se jih dobro shranjevati (krioprezervacija) in tudi po večkratnem zamrzovanju ter odtajevanju dajejo ponovljive rezultate. Vse to so razlogi, da so mikrosomi še danes najpogosteje uporabljan *in vitro* sistem za preučevanje metabolizma [31, 32, 33]. Z njimi lahko napovedujemo poti razgradnje učinkovine in identificiramo ter pridobivamo standarde metabolitov. Uporabni so tako za določanje parametrov encimske kinetike kot tudi za napovedovanje intrinzičnega očistka.

Pridobivanje mikrosomov je relativno enostavno. Izolacijo subceličnih frakcij izvedemo z razbitjem celic s homogenizacijo v ustreznem pufru, kateri sledi diferencialno centrifugiranje (uporaba razlik v gostoti in velikosti delcev) in resuspenzija usedline v primernem pufru za shranjevanje ali izolacija topne frakcije.

Pri napovedovanju *in vivo* metaboličnega očistka iz mikrosomskih kinetičnih podatkov je treba biti previden, ker mnogokrat ne vemo, kakšna je koncentracija učinkovine v hepatocitih (približno v taki koncentraciji moramo inkubirati mikrosome). Podobno težavo

imamo s koncentracijo kofaktorjev – te moramo običajno dodati v prebitku, kar pa lahko vpliva na rezultate.

Uporaba jetrnih mikrosomov za določitev  $Cl_{int}$ , lahko v primeru, ko prevladuje metabolizem druge faze (konjugacija) in/ali mehanizem aktivnega privzema, pripelje do napovedi netočne vrednosti  $Cl_{int}$  *in vivo* [37]. Pomanjkljivost uporabe mikrosomov je tudi nezmožnost kvantitativne ocene biotransformacije *in vivo*, saj je v mikrosomu povečana količina CYP in UGT encimov, odsotno pa je tekmovanje z drugimi encimi [38]. Naslednji problem predstavlja dostopnost aktivnega mesta mikrosomalnih encimov, ki je v nekaterih primerih, kot na primer pri UDP-glukuronoziltransferazi (UGT), obrnjeno v notranjost mikrosoma. Difuzijsko bariero, ki jo predstavlja njegova membrana, lahko prekinemo s pomočjo močnega ultrazvoka, površinsko aktivnih snovi (npr. Brij 58) ali pa s posebnim proteinom, ki naluknja membrano (alameticin) [39]. V primeru, da tega ne storimo, lahko določimo nižji jetrni očistek, kot je v resnici. Vzrok za prenizko oceno  $Cl_h$  je lahko tudi vrsta pufra, njegov pH in ionska moč.

Tudi v primeru glukuronidacije na oceno jetrnega očiska vpliva obseg vezave na plazemske proteine in mikrosome. Za netočnost je delno zaslužna tudi UGT iz drugih delov telesa, ne le jeter. Ker je vpliv različnih celičnih in strukturnih faktorjev na delovanje UGT še neznan, je interpretacija mehanizma glukuronidacije *in vitro* precej težka [40].

## 2. NAMEN DELA

Pri terapiji 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 polimorfizmih določenih genov, ki kodirajo encime za metabolizem raloksifena. Izbrali smo si polimorfizem \*28 v genu za UGT1A1, ki je eden od glavnih encimov odgovornih za metabolično odstranjevanje raloksifena.

Namen diplomske naloge je torej razložiti opažene interindividualne razlike v koncentraciji metabolitov raloksifena. Vpliv genotipa na farmakokinetiko raloksifena bomo eksperimentalno preučevali z genotipiziranimi mikrosomi kot *in vitro* modelom, s katerimi bomo poskušali razložiti opaženo situacijo *in vivo*. S tem modelom bomo poskušali ugotoviti tudi, ali so opažene znižane koncentracije metabolitov raloksifena pri osebah z alelom *UGT1A1*\*28 direktna posledica manjše aktivnosti UGT1A1 ali pa so morda posledica sočasno povišanih nivojev bilirubina, ki je znan kot inhibitor UGT1A1.

V zadnjem koraku bomo izvedli še primerjavo rezultatov, ki smo jih dobili s pomočjo mikrosomov, s podatki o celokupnem očistku raloksifena *in vivo*. S pomočjo *in vitro* metode pridobljen očistek bomo primerjali z očistkom, ki ga bomo izračunali iz plazemskih koncentracij genotipiziranih pacientk po 6 mesecih rednega jemanja raloksifena. To nam bo omogočilo končno potrditev ali opustitev naše predpostavke o polimorfizmu, odgovornem za interindividualne razlike v plazemskih koncentracijah raloksifena in njegovih metabolitov.

### 3. MATERIALI IN METODE

#### 3.1. MATERIALI

UPORABLJENE SNOVI:

A) STANDARDI:

- raloksifenjev klorid, Sigma, stopnja čistosti > 99,8 %, 510,1 g/mol, raztopljen v etanolu, s končno koncentracijo 600 µM,
- raloksifen-6-glukuronid (M1) ter raloksifen-4'-glukuronid (M2) sta bila sintetizirana in karakterizirana v našem laboratoriju.

B) DRUGE SNOVI:

- raloksifen, ekstrahiran z metanolom iz tablet Evista ® (Lilly & Co.), stopnja čistosti: > 98,5 %,
- natrijeva karboksimetilceluloza (CMC-Na), nizka viskoznost, Fluka,
- bilirubin, Merck,
- mravljična kislina, extra pure %, Merck, M= 46,03 g/mol,
- acetonitril Chromasolv za HPLC, čistost »gradient grade« (99,9% čistost), Sigma-Aldrich, Nemčija,
- raztopina A (UGT Reaction Mix solution A, BD biosciences),
- raztopina B (UGT Reaction Mix solution B, BD biosciences),
- 4-nitrofenol – čistost »spectrophotometric grade«, Sigma-Aldrich, Nemčija,
- Voda – milli-Q voda pridobljena z aparatom Milli-Q Advantage A10 Ultrapure Water Purification System (Millipore, Bedford, ZDA).

MIKROSOMI

- človeški jetrni mikrosomi, Sigma (Microsomes from liver, Pooled); gre za združene mikrosome več različnih dajalcev z različnimi genotipi (v nadaljevanju »združeni mikrosomi«)
- človeški jetrni mikrosomi, genotipizirani glede na polimorfizem gena za UGT1A1:
  - o homozigoti *UGT1A1*\*1 / *UGT1A1*\*1,
  - o heterozigoti *UGT1A1*\*1 / *UGT1A1*\*28,
  - o homozigoti *UGT1A1*\*28 / *UGT1A1*\*28.



## PRIPRAVA OSNOVNE RAZTOPINE RALOKSIFENA

a) Priprava prečiščene vode s 400 ppm CMC-Na

100 mg CMC-Na nizke viskoznosti smo suspendirali v 250 mL prečiščene vode in pustili mešati čez noč na magnetnem mešalu. Pripravljeni raztopini smo naslednji dan izmerili pH in ga s HCl ustrezno uravnali tako, da je bil pH v inkubacijski zmesi po dodatku raztopine TRIS približno 7,4.

b) Priprava etanolne raztopine z 2,4 % očetne kisline

V 100 mL bučko smo vlili 2,4 mL očetne kisline in dopolnili z etanolom do oznake.

Zatehtali smo 140 mg raloksifena, ekstrahiranega iz tablet, in ga raztopili 3000  $\mu\text{L}$  vročega (segretega na vodni kopeli, približno 50 °C) etanola z 2,4 % očetne kisline. 1300  $\mu\text{L}$  dobljene raztopine smo takoj vlili v 25 mL prečiščene vode s 400 ppm CMC-Na ob hkratnem mešanju z magnetnim mešalom. Dobljeno raztopino smo filtrirali skozi 45  $\mu\text{m}$  filter. Končna koncentracija raloksifena v tej raztopini je bila po analizi s HPLC in uporabi eksterne standarda 1884  $\mu\text{M}$ .

## PRIPRAVA RAZLIČNO KONCENTRIRANIH RAZTOPIN RALOKSIFENA

Osnovno raztopino raloksifena smo redčili s prečiščeno vodo, tako da smo dobili 14 različnih koncentracij raloksifena v območju od 15  $\mu\text{M}$  do 1600  $\mu\text{M}$ . Dejanske koncentracije razredčenih raztopin smo določili s HPLC s pomočjo umeritvene premice. V tabeli 3.1 so navedene točne vrednosti koncentracij posameznih raztopin raloksifena.

Tabela 3.1: Končne koncentracije raloksifena v pripravljenih raztopinah

RAZTOPINA	KONCENTRACIJA ( $\mu\text{M}$ )	RAZTOPINA	KONCENTRACIJA ( $\mu\text{M}$ )
C <sub>1</sub>	21,09	C <sub>8</sub>	236,30
C <sub>2</sub>	23,76	C <sub>9</sub>	321,94
C <sub>3</sub>	43,62	C <sub>10</sub>	405,30
C <sub>4</sub>	53,92	C <sub>11</sub>	453,14
C <sub>5</sub>	86,28	C <sub>12</sub>	541,15
C <sub>6</sub>	117,21	C <sub>13</sub>	746,97
C <sub>7</sub>	177,40	C <sub>14</sub>	840,96

### PRIPRAVA RAZTOPIN BILIRUBINA

Pripravili smo tri različno koncentrirane raztopine bilirubina:

- I. Priprava raztopine 10,71 mg/dL bilirubina: v 10 mL bučko smo natehtali 1,07 mg bilirubina in ga raztopili v 5 mL DMSO ter 5 mL TRIS-a. Bučko smo postavili za 10 minut v ultrazvočno kadičko. Bučko smo ovili v aluminijasto folijo in shranili v hladilnik (4°C).
- II. Priprava raztopine 12,75 mg/dL bilirubina: enak postopek kot je naveden zgoraj, le da je natehta bilirubina 1,28 mg.
- III. Priprava raztopine 19,38 mg/dL bilirubina: enak postopek, kot je naveden zgoraj, le da je natehta bilirubina 1,94 mg.

### INKUBACIJSKA ZMES ZA DELO Z MIKROSOMI

a) zmes mikrosomov

K 100  $\mu$ L mikrosomov smo dodali 1000  $\mu$ L raztopine B in 300  $\mu$ L prečiščene vode. Zmes smo vorteksirali nekaj sekund.

b) raztopina A (UGT Reaction Mix solution A, BD biosciences)

Komercialno dostopna raztopina vsebuje 25 mM uridin 5'-difosfoglukuronske kisline (UDPGA) v vodi.

c) raztopina B (UGT Reaction Mix solution B, BD biosciences)

Komercialno dostopna raztopina vsebuje 250 mM TRIS-HCl, 40 mM MgCl<sub>2</sub> in 0,125 mg/mL alameticina v vodi.

Končna inkubacijska zmes je vsebovala: 46,7  $\mu$ L zmesi mikrosomov, 110  $\mu$ L raztopine raloksifena ustrezne koncentracije ter 13,35  $\mu$ L raztopine A.

### PRIPRAVA MOBILNE FAZE

Pri analitiki na HPLC smo uporabljali dve mobilni fazi:

- 0,1 % mravljična kislina v vodi : 1 mL mravljične kisline smo s prečiščeno vodo razredčili na 1L
- 0,1 % mravljična kislina v 98 % acetonitrilu: v 1 L bučo smo odpipetirali 20 mL prečiščene vode, dodali 1 mL mravljične kisline in z acetonitrilom razredčili do oznake.

## PRIPRAVA INTERNEGA STANDARDA

1 mL 15 mM 4- nitrofenola v 50 % EtOH smo razredčili s prečiščeno vodo na 1 L, da smo dobili končno koncentracijo 4- nitrofenola 15 $\mu$ M.

## PRIPRAVA UMERITVENE PREMICE

Izhajali smo iz standardne raztopine raloksifena s koncentracijo 600  $\mu$ M. Začetno raztopino smo redčili po shemi, navedeni v tabeli 3.2. Na ta način smo dobili raztopine s koncentracijami, katerih vrednosti so navedene v tabeli 3.3. Dodatno smo k umeritveni premici priključili še raztopino (\*) s koncentracijo 300  $\mu$ M, ki smo jo pripravili tako, da smo 500  $\mu$ L osnovne raztopine standarda redčili s 500  $\mu$ L vode.

Tabela 3.2: Redčenje standardne raztopine raloksifena za pripravo umeritvene premice

številka raztopine	1	2	3	4	5	6	7	8
volumen RAL* ( $\mu$ L)	200	500	200	100	500	200	100	500
volumen vode ( $\mu$ L)	800	500	800	900	500	800	900	500
PARALELKE:								
volumen RAL* ( $\mu$ L)	200			100			100	
volumen vode ( $\mu$ L)	800			900			900	

\*RAL= raztopina raloksifena

Tabela 3.3: Koncentracije raztopin za umeritveno premico

številka raztopine	*	1	2	3	4	5	6	7	8
koncentracija ( $\mu$ M)	300	120	60	24	12	6	2,4	1,2	0,6

## 3.2. METODE

### 3.2.1 Splošna shema priprave in inkubacije mikrosomov ter priprave zmesi za analitiko

Sledeč poskus je bil izveden v treh ali štirih ponovitvah. Mikrosome smo tik pred poskusom vzeli iz zamrzovalnika, kjer smo jih hranili pri -80 °C. Odtalili smo jih pod tekočo vodo in takoj postavili na led. Sledila je priprava zmesi: k 100  $\mu$ L mikrosomov smo dodali 1000  $\mu$ L raztopine B ter 300  $\mu$ L vode. Zmes smo vorteksirali nekaj sekund ter razpipetirali po 46,7  $\mu$ L zmesi v 14 epic, ki smo jih nato pustili 15 minut na ledu. Sledil je dodatek 110  $\mu$ L ustrezne raztopine raloksifena. V vsako epico smo odpipetirali drugo

koncentracijo raloksifena, tako da smo dobili štirinajst epic z različnimi koncentracijami raloksifena. Epice smo postavili v inkubator za 3 minute. V inkubatorju je bila temperatura nastavljena na 38°C, hitrost mešanja na 65 obratov/ minuto, pospešek na 1, čas pa na »hld«.

Po 3 minutah smo epice vzeli iz inkubatorja, ter v vsako dodali po 13,35 µL raztopine A. Vse smo vorteksirali in postavili nazaj v inkubator. V tistem trenutku smo začeli meriti čas. Po 40 minutah smo epice vzeli iz inkubatorja ter jih postavili na led. Odpipetirali smo po 100 µL inkubata iz vsake epice in ga dodali k 25 µL hladnega acetonitrila, že pripravljenega v novih epicah in hlajenega na ledu. Tudi te epice smo nato vorteksirali in pustili 10 minut na ledu. Po tem času smo epice postavili v centrifugo in zmes centrifugirali 5 minut pri 15.000 g in 24 °C. Supernatant smo 10-krat redčili z 15 µM internim standardom in ga pripravili za analizo tako, da smo ga odpipetirali v vialo za HPLC.

#### ***Modifikacije splošne sheme***

- Pri izvedbi poskusov z bilirubinom je shema drugačna glede na začetno pripravo zmesi, in sicer: k 50 µL mikrosomov smo dodali 500 µL raztopine B, vorteksirali ter razpipetirali po 36,7 µL zmesi v 14 epic. Le-te smo pustili 15 minut na ledu in nato v vsako epico dodali 10 µL raztopine bilirubina ustrezne koncentracije:
  - za serijo z »nizko« koncentracijo BLR v končni zmesi (t.j. 0,63 mg/mL) smo dodali raztopino z 10,71 mg/dL BLR,
  - za serijo s »srednjo« koncentracijo BLR v končni zmesi (t.j. 0,75 mg/mL) smo dodali raztopino z 12,75 mg/dL BLR,
  - za serijo z visoko koncentracijo BLR v končni zmesi (t.j. 1,14 mg/mL) smo dodali raztopino z 19,38 mg/dL BLR.Sledil je dodatek 110 µL raztopine raloksifena ustrezne koncentracije, nato pa smo nadaljevali po prejšnji shemi.
  
- Od poskusa do poskusa se razlikujejo tudi vrste uporabljenih mikrosomov (glej poglavje 3.3. Eksperimentalni del).

### 3.2.2. Analitika

Raloksifen in njegove metabolite smo določali s HPLC, za kar je bilo potrebno razviti ustrežno metodo. S časovnim spreminjanjem razmerja mobilne faze A (0,1 % mravljične kisline v vodi) in mobilne faze B (0,1 % mravljične kisline v 98 % acetonitrilu) smo iskali najboljšo ločitev štirih signalov: vrh raloksifena, internega standarda, metabolita M1 ter metabolita M2. Najboljšo ločitev signalov smo dobili po metodi, katere gradient je naveden v tabeli 3.4.

Tabela 3.4: Program gradientnega izpiranja na HPLC koloni po injiciranju vzorca

čas od začetka injiciranja (min)	% mobilne faze B
0	90
0,06	90
2,7	69
3,33	37
3,5	37
3,6	90
5,55	90

Ostali pogoji:

- Pretok: 0,9 mL/min
- Celokupni čas analize: 6,70 min
- Temperatura: 50 °C
- Valovna dolžina detekcije: 288 nm

### 3.2.3. Obdelava podatkov

#### a) IZRAČUN JETRNEGA OČISTKA IZ *IN VITRO* PODATKOV

Za obdelavo podatkov smo uporabili program Microsoft Excel, v okviru katerega smo za prilaganje krivulje z metodo najmanjših odklonov uporabili orodje »Reševalec«. Tako smo dobili podatke o  $v_{\max}$ ,  $K_m$  in  $K_i$ . Obdelava podatkov z linearno Lineweaver-Burk-ovo metodo je prav tako potekala v okolju programa Excel.

S pomočjo mikrosomov in ustrezne obdelave podatkov smo določili vrednosti  $v_{\max}$  in  $K_m$ , ki nam omogočata izračun intrinzičnega očistka po formuli:

$$Cl_{\text{int}} = v_{\max} / K_m$$

*Enačba 3.1*

Ta očistek smo izračunali tako za metabolit M1 kot tudi za M2. Ker je očistek učinkovine enak vsoti očistkov obeh metabolitov, smo ju sešteli. Sledila je ekstrapolacija dobljene vrednosti na celotna jetra po enačbi 3.2, ki poda intrinzični jetrni očistek:

$$Cl_{\text{int, h}} = Cl_{\text{int}} (\text{mikrosomski}) \times \frac{\text{mg mikrosomov}}{\text{g jeter}} \times \frac{\text{g jeter}}{\text{kg telesne teže}} \quad \text{Enačba 3.2}$$

Upoštevane vrednosti:

- mikrosomalni proteini na gram mokre mase jeter (40 mg proteinov/ g jeter) [41]
- masa jeter: 21,4 g jeter/ kg telesne teže [41]

Tako smo dobili vrednost intrinzičnega očistka za celotna jetra. V naslednjem koraku smo za izračun jetrnega očistka uporabili model dobrega mešanja (glej poglavje 1.5.3.).

$$Cl_{\text{h}} = \frac{Q_{\text{h}} * f_{\text{u,b}} * Cl_{\text{i,h}}}{Q_{\text{h}} + f_{\text{u,b}} * Cl_{\text{i,h}}} \quad \text{Enačba}$$

3.3

Pri izračunu upoštevamo naslednje vrednosti:

- $Q_{\text{h}}$  ..... pretok krvi skozi jetra ( $Q_{\text{h}} = 20,7 \text{ mL/min/kg}$ ) [41],
- $f_{\text{u,b}}$  ..... razmerje med nevezano in celokupno (nevezano in vezano na plazemske proteine) učinkovino ( $f_{\text{u,b}}$  za raloksifen znaša 5 %) [7].

#### b) IZRAČUN CELOKUPNEGA OČISTKA IZ PLAZEMSKIH KONCENTRACIJ

*In vivo* celokupni očistek smo izračunali s pomočjo podatka o koncentraciji raloksifena v plazmi preiskovank po šestmesečni terapiji. Uporabili smo farmakokinetični enoprostorni model večkratne ekstravaskularne aplikacije (ponavljajoča se peroralna aplikacija). Glede na to, da je razpolovni čas raloksifena 32,5 ure [42], lahko trdimo, da je po šestih mesecih jemanja raloksifena že doseženo stacionarno stanje (stacionarno stanje dosežemo v času petih razpolovnih dob, t.j. 162,5 ur). Začeli smo z izračunom povprečja plazemskih koncentracij raloksifena znotraj posamezne skupine in ga enačili s povprečno koncentracijo raloksifena v plazmi v stacionarnem stanju ( $\bar{c}_{\text{ss}}$ ). Povezava  $\bar{c}_{\text{ss}}$  in očistka je podana v enačbi 3.4.

**Napaka! Zaznamek ni definiran.**  $\bar{c}_{ss} = \frac{F \times D}{Cl \times \tau}$ , kjer je

*Enačba 3.4*

- F .... frakcija absorbirane učinkovine (F = 0,02) [42],
- D ... enkratni odmerek (D = 60 mg),
- $\tau$  ..... odmerni interval ( $\tau = 24$  ur),
- $\bar{c}_{ss}$  ..... povprečna plazemska koncentracija v stacionarnem stanju (izmerjeno iz plazemskih vzorcev).

Ker smo se želeli pri izračunu vrednosti *in vivo* celokupnega očistka izogniti uporabi literarnih podatkov (v tem primeru je to frakcija absorbirane učinkovine), smo kot rezultat podali tudi razmerje očistka in frakcije absorbirane učinkovine (enačba 3.5).

$$\frac{Cl_{in vivo}}{F} = \frac{D}{c_{ss} \times \tau}$$

Enačba 3.5

### 3.2.4. Aparature

- HPLC sistem (tekočinski kromatograf visoke ločljivosti): Hewlett Packard 1100 Series, Waldbron, Nemčija (črpalka, avtomatski vzorčevalnik, razplinjevalec, UV detektor),
- Termični stresalnik Vortemp 56EVC,
- centrifuga Sigma 3K30,
- pH meter Iskra-MA 5750,
- mešalec Lab dancer, IKA,
- tehtnica Mettler toledo AB54-S,
- pipete.

### 3.3. EKSPERIMENTALNI DEL

Sledeče poizkuse smo izvedli s tremi ali štirimi paralelkami. Poskuse bi lahko razdelili v več sklopov:

#### I. sklop

- inkubacija raloksifena z mikrosomi genotipa *UGT1A1\*1 / UGT1A1\*1*,
- inkubacija raloksifena z mikrosomi genotipa *UGT1A1\*1 / UGT1A1\*28*,
- inkubacija raloksifena z mikrosomi genotipa *UGT1A1\*28 / UGT1A1\*28*.

## II. sklop

- inkubacija raloksifena z združenimi mikrosomi + »nizka« koncentracija BLR,
- inkubacija raloksifena z združenimi mikrosomi + »srednja« koncentracija BLR,
- inkubacija raloksifena z združenimi mikrosomi + »visoka« koncentracija BLR,
- inkubacija raloksifena z mikrosomi genotipa *UGT1A1\*1 / UGT1A1\*1* + »nizka« koncentracija BLR,
- inkubacija raloksifena z mikrosomi genotipa *UGT1A1\*1 / UGT1A1\*28* + »srednja« koncentracija BLR,
- inkubacija raloksifena z mikrosomi genotipa *UGT1A1\*28 / UGT1A1\*28* + »visoka« koncentracija BLR.

***Oprelitev in določanje koncentracij BLR***

Pri določanju koncentracij BLR pri katerih smo izvajali poskuse smo se oprli na podatke v strokovnem članku [45]. Pri osebah z genotipom *UGT1A1\*1/\*1* so koncentracije bilirubina v plazmi najnižje, zato smo tudi poskus izvajali pri najnižji koncentraciji bilirubina. Obratno velja za genotip *UGT1A1\*28/\*28*, pri heterozigotih pa smo uporabili srednjo koncentracijo bilirubina. Točne vrednosti BLR so naslednje:

- »nizka« koncentracija BLR: 0,63 mg/mL,
- »srednja« koncentracija BLR: 0,75 mg/mL,
- »visoka« koncentracija BLR: 1,14 mg/mL.

IV. Zadnji sklop raziskav je potekal v UKC Maribor, kjer so bili pridobljeni serumski vzorci 57 pacientk na terapiji z raloksifenom, ki so bile genotipizirane za *UGT1A1*. Metodo odvzema in obdelave vzorcev z LC-MS-MS navaja J. Trontelj s sodelavci v članku »Development and validation of a liquid chromatography-tandem mass spectrometry assay for determination of raloxifene and its metabolites in human plasma« [43]. V tem diplomskem delu so navedeni še neobjavljeni podatki o serumskih koncentracijah raloksifena in njegovih metabolitov M1 in M2 v plazmi genotipiziranih žensk po 6 mesecih terapije z raloksifenom. Na ta način smo pridobili informacije o *in vivo* kinetiki metabolizma raloksifena, kar nam je omogočilo primerjanje z rezultati iz *in vitro* modelov.



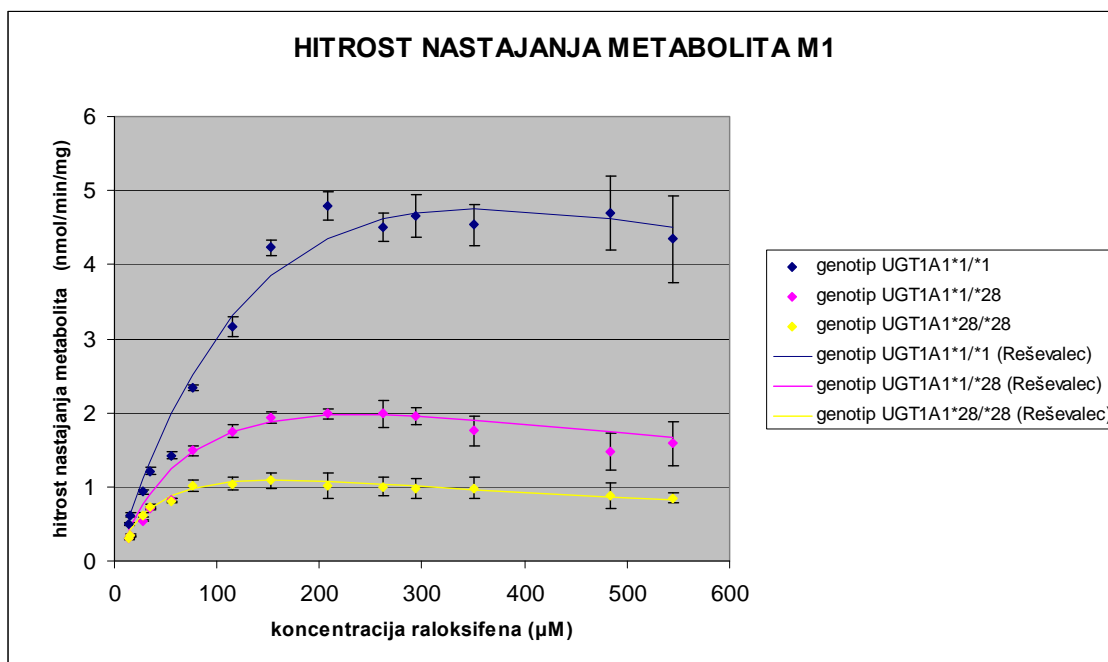


## 4. REZULTATI IN RAZPRAVA

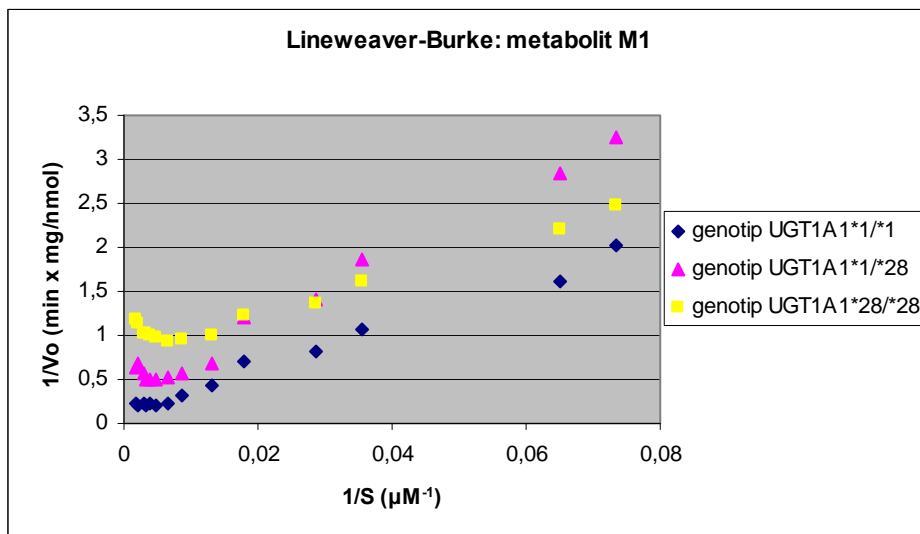
### 4.1. REZULTATI INKUBACIJ RALOKSIFENA Z GENOTIPIZIRANIMI MIKROSOMI

Na koncu vsakega poskusa smo na HPLC merili odzive metabolitov M1 in M2 in s pomočjo umeritvene premice za raloksifen preračunali njune koncentracije v inkubacijski zmesi. Na sledečih grafih je prikazana kinetika nastajanja metabolitov raloksifena v odvisnosti od koncentracije raloksifena v inkubacijski zmesi pri različnih genotipih:

- Slika I predstavlja izmerjene koncentracije metabolita M1 v inkubacijski zmesi po 40 minutah inkubacije pri različnih začetnih koncentracijah raloksifena. Posamezna točka je povprečna koncentracija metabolita izmerjena v štirih paralelkah, označene pa so tudi standardne deviacije meritev. Do največjih nihanj prihaja pri višjih koncentracijah raloksifena, kjer postane problematična topnost samega substrata. Isti podatki so obdelani tudi z metodo najmanjših kvadratov odklonov. S pomočjo orodja »Reševalec« smo ob upoštevanju racionalnih omejitev vrednosti  $v_{max}$ ,  $K_m$  in  $K_i$ , skozi posamezne točke speljali krivuljo, ki sledi enačbi za substratno inhibicijo.
- Slika II pa predstavlja iste podatke obdelane z eno od metod linearizacije in sicer z Lineweaver- Burkovo metodo.

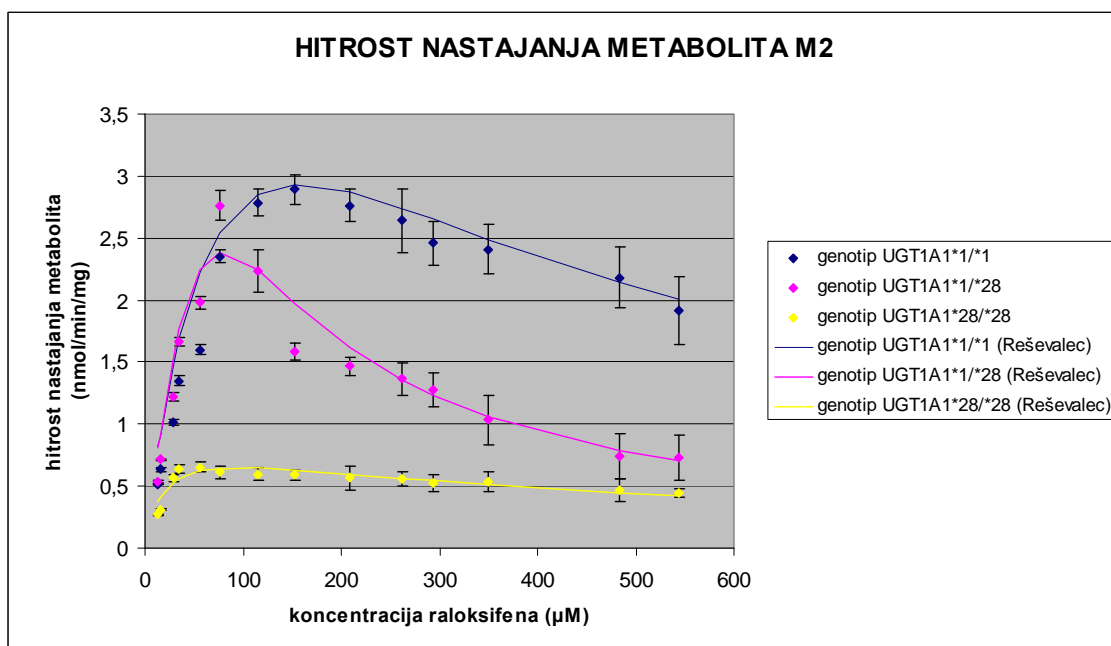


Slika I: Povprečna koncentracija metabolita M1 v zmesi po 40 minutah inkubacije skupaj s standardnimi deviacijami meritev in krivuljo, dobljeno po metodi najmanjših kvadratov

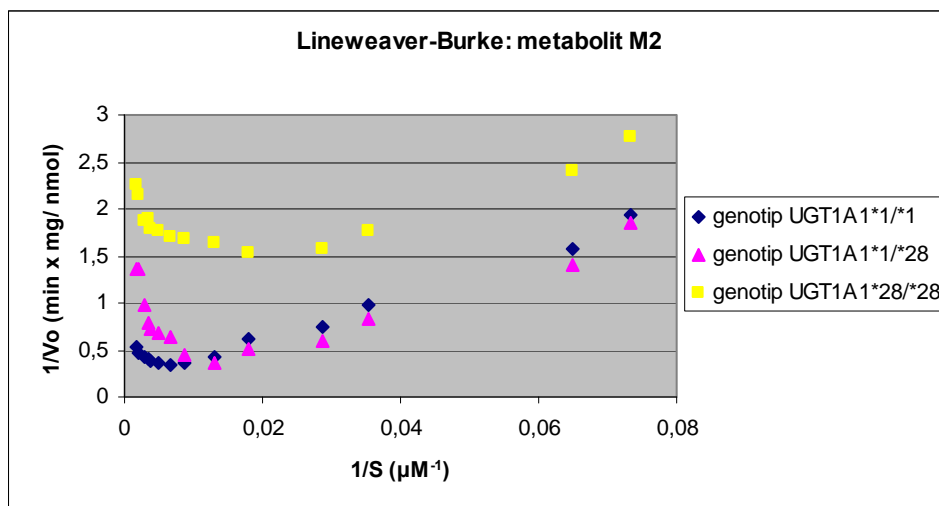


Slika II: Linearizacija podatkov o hitrosti nastajanja metabolita M1 po Lineweaver-Burkovi metodi

V enakem zaporedju sta v nadaljevanju predstavljena še grafa za metabolit M2.



Slika Ia: Povprečna koncentracija metabolita M1 v zmesi po 40 minutah inkubacije skupaj s standardnimi deviacijami meritev in krivuljo, dobljeno po metodi najmanjših kvadratov



Slika IIa: Linearizacija podatkov o hitrosti nastajanja metabolita M2 po Lineweaver-Burkovi metodi

Iz oblike grafov je razvidno, da gre za netipično Mihaelis-Mentenovo kinetiko. Glede na odklone grafov proti nižji hitrosti pri višjih koncentracijah raloksifena lahko sklepamo, da gre za substratno inhibicijo. Obliki krivulj se za posamezen metabolit nekoliko razlikujeta, vendar je pri obeh krivuljah značilen spust krivulje pri višjih koncentracijah raloksifena, kar nakazuje substratno inhibicijo encima. Tudi oblika Lineweaver-Burk-ove krivulje je značilna za substratno inhibicijo, saj prihaja do odklona krivulje od linearnosti pri višjih koncentracijah raloksifena (levi del krivulje).

Že iz samih grafov je razvidno, da obstajajo očitne razlike v kinetiki konjugiranja raloksifena med mikrosomi različnih genotipov. Najpočasnejši presnavljalci so homozigoti z genotipom *UGT1A1* \*28/\*28, sledijo jim heterozigoti, najvišje koncentracije metabolitov in s tem najhitrejšo presnovo raloksifena pa dosegajo homozigoti z genotipom *UGT1A1* \*1/\*1. V tabeli 4.1 in 4.2 so podane izračunane numerične vrednosti intrinzičnega očistka in ostalih parametrov, pomembnih za primerjavo presnove med nosilci različnih genotipov. Vrednosti za  $v_{\max}$ ,  $K_M$  in  $K_i$  smo izračunali s pomočjo programa »Reševalec«, intrinzični očistek pa po formuli navedenih v uvodu (glej poglavje 3.2.3.).

Tabela 4.1: Izračunani parametri Michaelis Mentenove encimske kinetike za metabolit M1

M1	<i>UGT1A1</i> *1 / *1	<i>UGT1A1</i> *1 / *28	<i>UGT1A1</i> *28 / *28
$v_{\max}$ (nmol/min/mg)	12,23	3,823	1,784
$K_M$ ( $\mu\text{M}$ )	280	110	50
$K_i$ ( $\mu\text{M}$ )	451	500	500
$Cl_{\text{int}}$ (mL/min/kg)	43,69	34,75	35,68

Tabela 4.2: Izračunani parametri Michaelis Mentenove encimske kinetike za metabolit M2

M2	<i>UGT1A1</i> *1 / *1	<i>UGT1A1</i> *1 / *28	<i>UGT1A1</i> *28 / *28
$v_{\max}$ (nmol/min/mg)	6,243	56,879	0,892
$K_M$ ( $\mu\text{M}$ )	90	915	17,89
$K_i$ ( $\mu\text{M}$ )	280	7,00	503
$Cl_{\text{int}}$ (mL/min/kg)	69,37	62,16	49,87

Pri genotipu *UGT1A1* \*1/\*1 smo dokazali najvišji očistek tako za metabolit M1 kot tudi za M2. Torej prihaja pri teh homozigotih do najhitrejšega konjugiranja raloksifena z glukuronsko kislino, kar pomeni hitrejše pretvarjanje raloksifena v bolj polarno obliko in s tem hitrejše izločanje iz telesa. Ravno obraten pojav zasledimo pri genotipu *UGT1A1* \*28/\*28; ti so torej najpočasnejši presnavljalci, saj glukuronidirajo raloksifen najpočasneje. Heterozigoti pa dosegajo vrednosti očistka ravno vmes med obema vrednostima homozigotnih presnavljalcev. Edino izjemo najdemo pri očistku metabolita M1, kjer je razlika med očistkom heterozigotov in homozigotov za gen *UGT1A1*\*28 minimalna oz. imajo heterozigoti celo nižji očistek kljub očitni razliki v  $v_{\max}$ .

Vizualni pregled grafov sprva nakazuje večje razlike v hitrosti presnavljanja raloksifena, kot jih pokaže primerjava izračunanih očistkov. Razloge bi lahko iskali v sami obliki grafov, ki se med seboj nekoliko razlikujejo, kar bi lahko pomenilo, da vsi genotipi ne sledijo popolnoma enakemu tipu kinetike. Tudi sicer je uporabljena enačba Michaelis-Mentenove kinetike s substratno inhibicijo le en od možnih modelov, ki se ne nujno najbolje prilega kinetiki glukuronidiranja raloksifena. Na tem področju ni bilo narejene študije, ki bi dovolj dobro preučila glukuronidiranje raloksifena preko encima *UGT1A1* in podala model, ki natančno opredeljuje kinetiko. Zato smo v tej diplomski nalogi uporabili model, ki se po vizualni oceni najbolje prilega prikazani kinetiki. To je razlog, da na tem mestu lahko prihaja do manjših odstopanj v izračunu parametrov.

Primerjava očistkov obeh metabolitov pokaže, da je vrednost le-tega večja za metabolit M2, kar v praksi pomeni, da tega metabolita nastaja več kot M1, kar se sklada z že znanimi odkritji tako na *in vitro* nivoju, kot tudi z izmerjenimi *in vivo* serumskimi koncentracijami metabolitov [9, 44].

c) Za primerjavo si pogledjmo še vrednosti parametrov, ki bi jih dobili s pomočjo Lineweaver-Burkove metode. Le-ti so navedeni v tabeli 4.3 in 4.4. Omeniti je treba, da smo pri tem upoštevali samo podatke, ki so še padli v linearno območje, kar pomeni, da smo upoštevali samo podatke o hitrosti pri nizkih koncentracijah raloksifena.

Tabela 4.3: Parametri encimske kinetike za metabolit M1 dobljeni z Lineweaver-Burk-ovo metodo

M1	UGT1A1 *1 / *1	UGT1A1 *1 / *28	UGT1A1 *28 / *28
$v_{\max}$ (nmol/min/mg)	8,26	3,58	1,33
$K_M$ ( $\mu$ M)	205,9	144,6	30,7
$Cl_{\text{int}}$ (mL/min/kg)	40,1	24,7	43,3

Tabela 4.4: Parametri encimske kinetike za metabolit M2 dobljeni z Lineweaver-Burk-ovo metodo

M2	UGT1A1 *1 / *1	UGT1A1 *1 / *28	UGT1A1 *28 / *28
$v_{\max}$ (nmol/min/mg)	6,38	39,2	0,99
$K_M$ ( $\mu$ M)	147	904	22,4
$Cl_{\text{int}}$ (mL/min/kg)	43,4	43,4	44,3

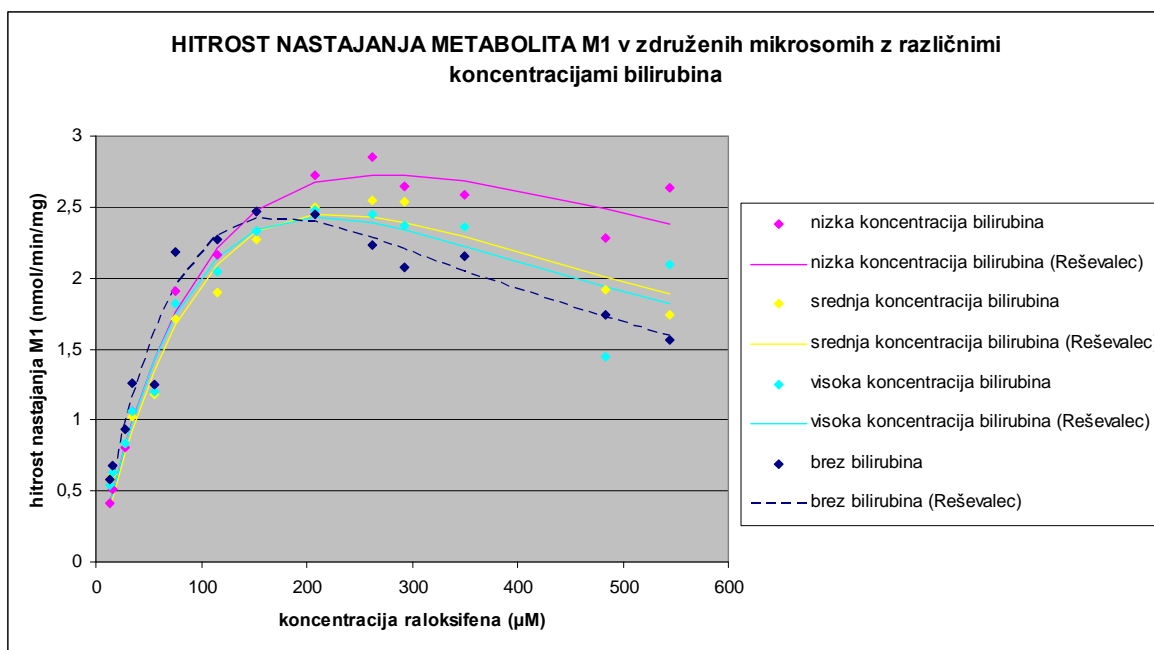
Obdelava rezultatov z linearno metodo nas pripelje do intrinzičnih očistkov, ki se med sabo praktično ne razlikujejo. Kot vidimo, so pri  $v_{\max}$  in  $K_M$  očitne razlike, vendar je razmerje med njima ( $Cl = v_{\max}/K_M$ ) pri večini genotipov podobno. S tem lahko prikažemo pomanjkljivosti v linearnih metodah obdelave podatkov, še posebej v primeru substratne inhibicije. Prav zaradi te inhibicije prihaja namreč pri višjih koncentracijah substrata do odklona od premice. Če želimo kljub temu izračunati parametre, moramo upoštevati le tiste vrednosti, ki še sledijo premici (t.j. pri nizkih koncentracijah substrata). Na ta način veliko število točk zanemarimo in s tem izgubimo del informacije. Substratna inhibicija je prisotna namreč v vsem koncentracijskem območju substrata- pri višjih [S] je njen učinek samo bolj viden.

## 4.2. VPLIV BILIRUBINA NA KINETIKO GLUKURONIDIRANJA RALOKSIFENA

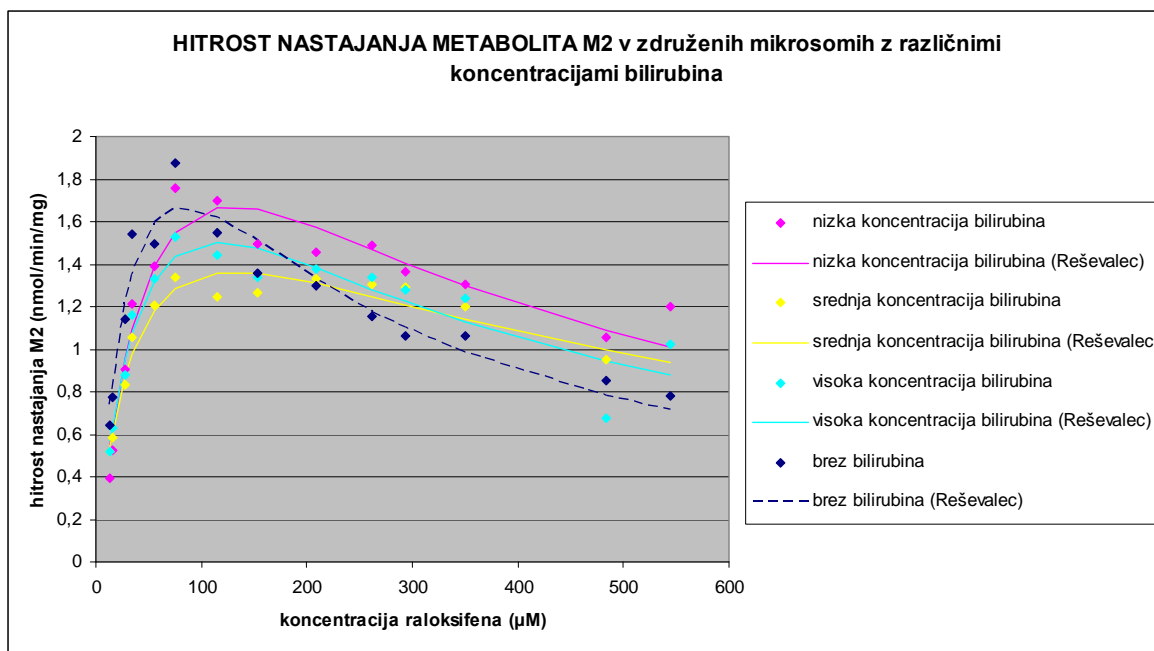
V drugem delu smo se posvetili vplivu bilirubina na kinetiko presnavljanja raloksifena. Z enako metodo kot v prvem delu smo bilirubinu najprej izpostavili združene mikrosome, nato pa še posamezne skupine genotipiziranih mikrosomov.

### Rezultati inkubacije združenih mikrosomov z različnimi koncentracijami bilirubina

Združene mikrosome, ki predstavljajo povprečno stanje populacije, smo inkubirali z različnimi koncentracijami bilirubina, kot so navedene v poglavju 3.3. Merili smo hitrost nastajanja obeh metabolitov v odvisnosti od koncentracije raloksifena, podatke vnesli v graf na sliki 4.1 in 4.2 in krivulje vizualno primerjali.



Slika 4.1: Kinetika nastajanja metabolita M1 v združenih mikrosomih brez dodatka bilirubina in z dodatkom različnih koncentracij bilirubina



Slika 4.2: Kinetika nastajanja metabolita M2 v združenih mikrosomih brez dodatka bilirubina in z dodatkom različnih koncentracij bilirubina

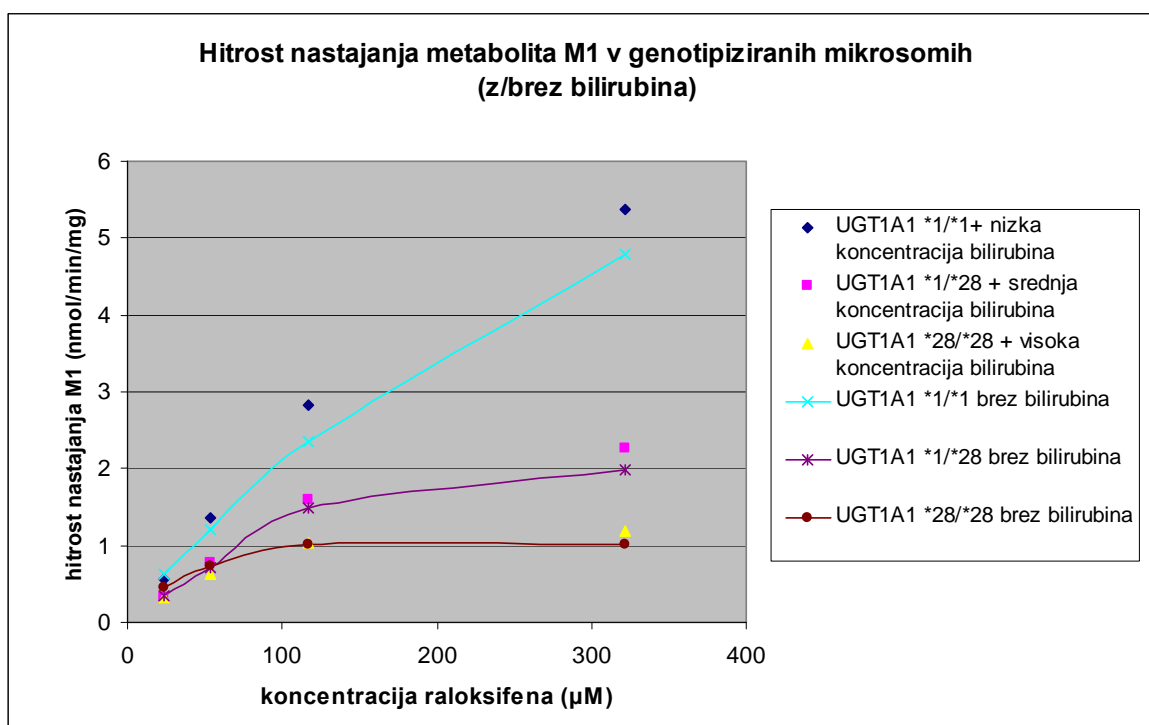
Kot je razvidno iz slike 4.1 in 4.2 minimalne razlike v hitrosti nastajanja metabolitov pri različnih koncentracijah bilirubina sicer so, vendar so zanemarljive. Bilirubin bi lahko deloval kot kompetitivni inhibitor encima, saj se glukuronidira prek UGT1A1, prav tako kot raloksifen. Glede na oblike krivulj pa se najverjetneje zgodi naslednje: pri nižjih koncentracijah raloksifena pride do rahle inhibicije encima s strani bilirubina (naklon krivulje se zmanjša), pri višjih koncentracijah raloksifena pa bilirubin zmanjša inhibicijo encima s strani substrata. Ena od možnih razlag je, da se bilirubin veže na isto alosterično mesto na encimu kot raloksifen, vendar v nasprotju z njim ne povzroči tako močne inhibicije.

Koncentracije bilirubina, ki smo jih uporabljali v inkubacijah, temeljijo na osnovi članka avtorja Jing-Ping L. [45], ki podaja koncentracijo bilirubina v človeški plazmi v odvisnosti od genotipa, ne pa tudi njegove koncentracije v hepatocitih, ki bi bila na tem mestu primernejša. Podatki o koncentraciji bilirubina v hepatocitih pri različnih genotipih namreč niso na voljo, zato smo se poslužili najboljšega približka, to je njegova koncentracija v plazmi. Iz tega razloga je na tem mestu raziskav možno odstopanje od realnega stanja.

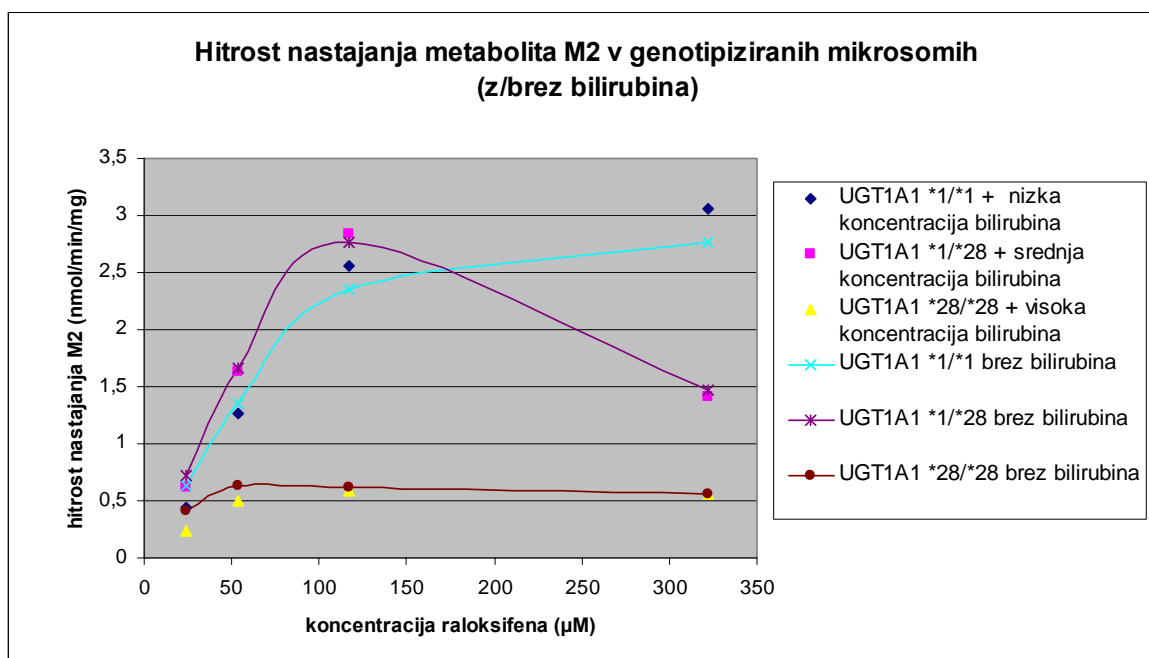


### Rezultati inkubacije genotipiziranih mikrosomov z različnimi koncentracijami bilirubina

Na sliki 4.3 in 4.4 so predstavljeni rezultati inkubacije genotipiziranih mikrosomov brez bilirubina in z različnimi koncentracijami bilirubina. Mikrosome smo izpostavili tisti koncentraciji bilirubina, ki jo najdemo v plazmi ljudi s posameznim genotipom. Tako smo mikrosome s polimorfizmom *UGT1A1* \*1/\*1 izpostavili nizki koncentraciji bilirubina (0,63 mg/mL), tiste z *UGT1A1* \*1/\*28 srednji koncentraciji bilirubina (0,75 mg/mL) in tiste z *UGT1A1* \*28/\*28 visoki koncentraciji bilirubina (1,14 mg/mL).



Slika 4.3: Primerjava hitrosti nastajanja metabolita M1 v genotipiziranih mikrosomih glede na prisotnost ali odsotnost ustrezne koncentracije bilirubina

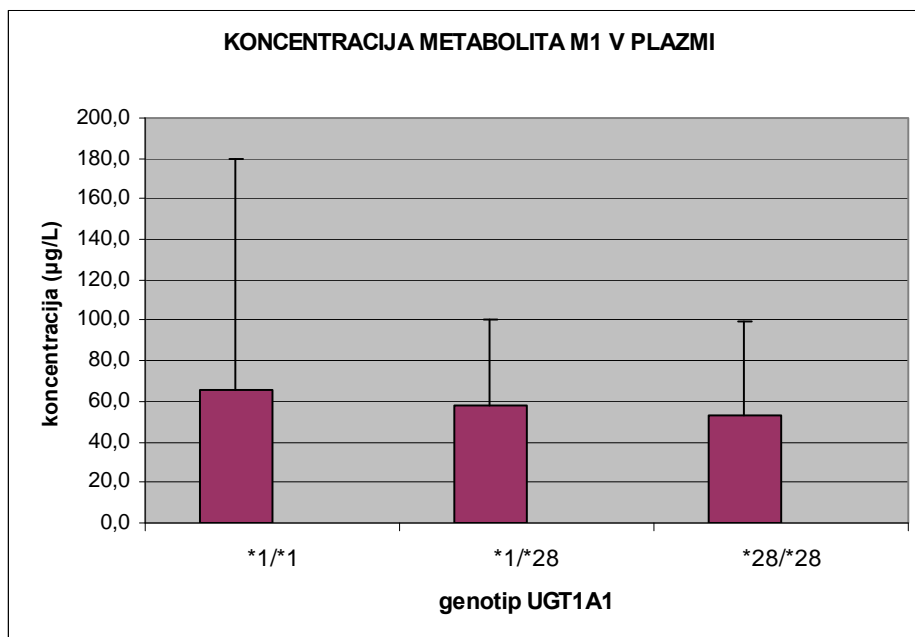


Slika 4.4: Primerjava hitrosti nastajanja metabolita M1 v genotipiziranih mikrosomih glede na prisotnost ali odsotnost ustrezne koncentracije bilirubina

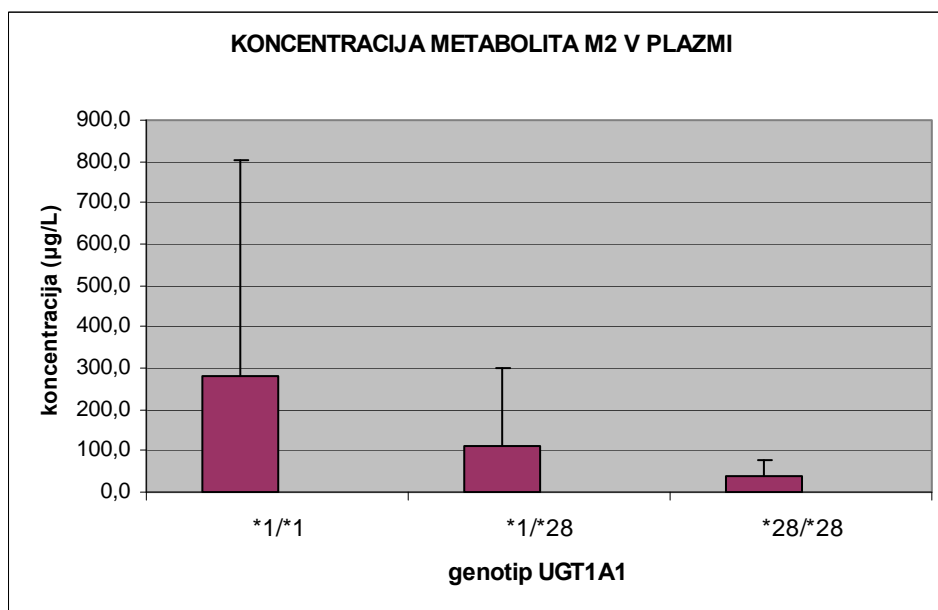
Tudi primerjava posameznih genotipiziranih mikrosomov izpostavljenih ustreznim koncentracijam bilirubina ne pokaže bistvenih razlik v hitrosti presnove raloksifena zaradi prisotnosti dodatnega substrata oz. inhibitorja. Torej lahko vpliv bilirubina na kinetiko glukuronidiranja raloksifena zanemarimo. S tem smo dokazali, da pri ljudeh z Gilbertovim sindromom (genotip *UGT1A1* \*28/\*28) povišane koncentracije bilirubina niso glavni vzrok za znižano hitrost glukuronidiranja raloksifena, ampak je glavni vzrok v sami mutaciji gena za *UGT1A1*, ki privede do nižje ekspresije encima.

### 4.3. REZULTATI MERJENJA PLAZEMSKIH KONCENTRACIJ RALOKSIFENA IN NJEGOVIH METABOLITOV

Rezultati merjenja plazemskih koncentracij raloksifena in njegovih metabolitov po šestih mesecih terapije so predstavljeni na slikah 4.5, 4.6 in 4.7. Prikazana je povprečna plazemska koncentracija metabolita M1 in M2 in nekonjugiranega raloksifena. Označene so tudi standardne deviacije rezultatov.



Slika 4.5: Koncentracija metabolita M1 v plazmi glede na genotip preiskovank



Slika 4.6: Koncentracija metabolita M2 v plazmi glede na genotip preiskovank

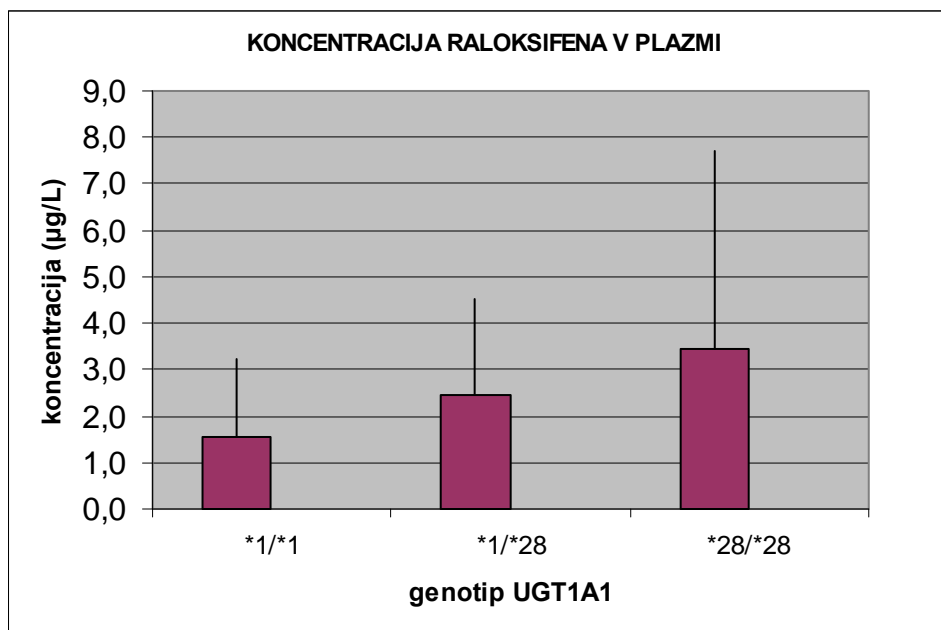
Koncentracije obeh metabolitov so najvišje v plazmi preiskovank z genotipom *UGT1A1* \*1/\*1, najnižje pri tistih z genotipom *UGT1A1* \*28/\*28, vmesne koncentracije pa so dosežene pri preiskovankah s heterozigotnim genotipom. V tabeli 4.5 so podane tudi numerične vrednosti povprečnih koncentracij v primerjavi z izračunanim intrinzičnim očistkom iz *in vitro* preiskav.

Tabela 4.5: Primerjava plazemskih koncentracij in intrinzičnih očistkov posameznih metabolitov glede na genotip *UGT1A1*

	plazemska koncentracija M1 (µg/L)	intrinzični očistek M1 (mL/min/kg)	plazemska koncentracija M2 (µg/L)	intrinzični očistek M2 (mL/min/kg)
<i>UGT1A1</i> *1/*1	65,6	43,69	282,1	69,37
<i>UGT1A1</i> *1/*28	57,8	34,75	111,0	62,16
<i>UGT1A1</i> *28/*28	53,2	35,68	37,9	49,87

Numeričnih vrednosti očistkov in koncentracij metabolitov v plazmi seveda ne moremo neposredno primerjati, lahko pa primerjamo trend. Kot vidimo, prikazani rezultati korelirajo s podatki, ki smo jih dobili v *in vitro* sistemu. Na mikrosomih donorjev *UGT1A1* \*1/\*1 smo namreč z *in vitro* metodo dokazali najvišji očistek tako za metabolit M1 kot tudi za metabolit M2, kar se ujema z izmerjenimi plazemskimi koncentracijami metabolitov. Ravno obraten pojav zasledimo pri preiskovankah z genotipom *UGT1A1* \*28/\*28, ki imajo najnižji očistek za oba metabolita v primerjavi s preiskovankami z genotipom *UGT1A1* \*1/\*1. Genotip *UGT1A1* \*1/\*28 pa skladno z vrednostmi očistkov, ki so med očistki homozigotov *UGT1A1* \*1/\*1 in \*28/\*28, dosega tudi vmesne vrednosti koncentracij metabolitov v plazmi.

Na sliki 4.7 so prikazane še koncentracije prostega raloksifena v plazmi. Le-te so najnižje prav pri preiskovankah z genotipom *UGT1A1* \*1/\*1, najvišje pa pri genotipu *UGT1A1* \*28/\*28. Te ugotovitve se skladajo s predhodnimi: preiskovanke z najvišjim intrinzičnim očistkom raloksifena in najvišjimi koncentracijami metabolitov v plazmi imajo tudi najnižje koncentracije prostega raloksifena v krvi. Torej so pacientke z genotipom *UGT1A1* \*1/\*1 najhitrejše presnavljalke raloksifena in bi potrebovale za isti učinek višje odmerke raloksifena kot ženske z Gilbertovim sindromom (t.j. z genotipom *UGT1A1* \*28/\*28).



Slika 4.7: Koncentracija prostega raloksifena v plazmi glede na genotip preiskovank

#### **Statistična obdelava *in vivo* podatkov**

Podatke smo tudi statistično obdelali z metodo po Mann-Whitney-u, ker se vsi podatki niso normalno porazdeljevali. Mejo tveganja smo postavili pri  $\alpha=0,05$ . Rezultati so podani v tabeli 4.6.

Tabela 4.6: Statistična primerjava plazemskih koncentracij metabolitov in raloksifena pri različnih genotipih: *p*- vrednosti pridobljene z Mann-Whitney-ovo metodo

	plazemska koncentracija M1			plazemska koncentracija M2			plazemska koncentracija raloksifena		
	p(1,2)	p(1,3)	p(2,3)	p(1,2)	p(1,3)	p(2,3)	p(1,2)	p(1,3)	p(2,3)
primerjava genotipov									
p-vrednosti	0,167	0,774	0,473	<b>0,046</b>	<b>0,008</b>	0,533	0,067	0,313	0,839

\*genotipi so zaradi boljše preglednosti označeni po sledeči legendi: *UGT1A1* \*1/\*1 = 1; *UGT1A1* \*1/\*28 = 2; *UGT1A1* \*28/\*28 = 3

Statistično značilne razlike (pri tveganju  $\alpha=0,05$ ) smo dokazali le pri metabolitu M2 in sicer ob primerjavi genotipa *UGT1A1* \*1/\*1 in *UGT1A1* \*1/\*28 ( $p=0,046$ ) ter pri primerjavi genotipa *UGT1A1* \*1/\*1 in *UGT1A1*\*28/\*28 ( $p= 0,008$ ).

Razlog za to statistično neznačilnost je v veliki variabilnosti podatkov, ki je običajna pri bioloških vzorcih in tudi sicer zelo visoka pri raloksifenu [44]. V tem primeru bi bilo v raziskavo potrebno vključiti večje število preiskovank.

**Izračun jetrnega ter *in vivo* očistka in njuna primerjava**

V zadnjem koraku smo želeli izvesti neposredno primerjavo očiščkov pridobljenih po dveh različnih poteh: *in vitro* in *in vivo*. Izračun obeh parametrov je potekal kot sledi:

- Na podlagi intrinzičnega očistka, ki smo ga izmerili s pomočjo mikrosomov, smo prek modela dobrega mešanja izračunali še jetrni očistek (glej poglavje 3.2.3). Tako smo ugotovljeno sposobnost jeter za metabolizem raloksifena prenesli v realne fiziološke pogoje.
- Na osnovi podatkov o plazemski koncentraciji raloksifena po šestih mesecih terapije smo prek farmakokinetičnega enoprostornega modela večkratne ekstravaskularne aplikacije (glej poglavje 3.2.3) izračunali t.i. *in vivo* celokupni očistek. Le-ta nam je pokazal, kakšna je dejanska hitrost odstranjevanja učinkovine iz telesa, upoštevajoč vsoto vseh faktorjev, ki na to vplivajo.

Rezultati obeh izračunov so predstavljeni v tabeli 4.7.

Tabela 4.7: Primerjava intrinzičnega očistka, jetrnega očistka, izračunanega po modelu dobrega mešanja in peroralnega očistka, izračunanega iz plazemskih koncentracij raloksifena (podan v razmerju s frakcijo absorpcije ter brez nje)

	intrinzični očistek; $Cl_{int}$ (mL/min/kg)	<i>in vitro</i> jetrni očistek; $Cl_{hep}$ (L/min)*	<i>in vivo</i> očistek/ frakcija absorpcije; $Cl_{in vivo}/F$ (L/min)	<i>in vivo</i> očistek** $Cl_{in vivo}$ (L/min)
<i>UGT1A1</i> *1/*1	113,1	1,443	26,56	0,5311
<i>UGT1A1</i> *1/*28	96,91	1,442	17,12	0,3423
<i>UGT1A1</i> *28/*28	85,55	1,440	12,13	0,2426

\*Preračunano na 70 kg težko osebo.

\*\*Ob upoštevanju  $F=0,02$  [7, 42].

Ob izračunu jetrnega očistka s pomočjo modela dobrega mešanja se razlike med posameznimi genotipi izgubijo. Dobljeni *in vitro* jetrni očistki so dejansko enaki pretoku krvi skozi jetra, ki v povprečju za 70 kg težkega človeka znaša 1,449 L/min [41]. Kot kaže, je sposobnost jeter za odstranjevanje raloksifena iz krvi tako velika, da je kljub zmanjšani aktivnosti encima *UGT1A1* pri homozigotih *UGT1A1*\*28/\*28 očistek navzgor še vedno omejen le s pretokom krvi skozi jetra. Opazne so tudi velike razlike med samimi vrednostmi *in vitro* jetrnih očiščkov ter *in vivo* celokupnih očiščkov - slednji so namreč manjši. To razliko lahko pojasnimo z dejstvom, da je raloksifen v zelo veliki meri

podvržen enterohepatični cirkulaciji, ki učinkovito zmanjša sicer velik jetrni očistek. Očitno je torej, da uporabljeni model (dobrega mešanja) ne more zadovoljivo opisati dogajanja v *in vivo* sistemu, ker ne upošteva enterohepatičnega kroženja. Fiziološki modeli, ki upoštevajo enterohepatično cirkulacijo, sicer obstajajo, vendar jih pri našem delu nismo mogli uporabiti, ker ne poznamo vseh potrebnih parametrov. Kljub vsemu pa bi bil model dobrega mešanja uporaben za intravensko aplikacijo. Ugotovili so namreč, da je plazemski očistek raloksifena po intravenski aplikaciji mnogo višji kot po peroralni in je v začetnem obdobju, ko še ni enterohepatične cirkulacije, po velikosti približno enak pretoku skozi jetra [7,48]. Na tem mestu moramo še dodati, da kljub velikemu intrinzičnemu očistku jetra niso edini organ, kjer poteka konjugacija raloksifena. Velike intrinzične očistke so namreč izmerili tudi z intestinalnimi mikrosomi, torej lahko tanko črevo tudi znatno prispeva k nizki biološki uporabnosti raloksifena, ki je po peroralni aplikaciji le 2 % in tudi k njegovi eliminaciji [9,46]. Poglavitno vlogo pri eliminaciji raloksifena pa imajo najverjetneje le jetra, ker so opazili pri osebah z zmanjšano jetrno funkcijo (Child-Pugh razred A) celo do 2,5 krat višje koncentracije raloksifena v primerjavi z zdravimi osebami [7].

Ta dejstva kažejo na to, da je doprinos enterohepatičnega kroženja raloksifena na dejanski očistek te učinkovine zelo pomemben. Čeprav so ob enkratnem prehodu skozi jetra razlike med izračunanimi očistki posameznih genotipov minimalne, se te razlike lahko potencirajo ob vsakokratnem prehodu skozi jetra.

Drug faktor, ki bi lahko razložil, zakaj se minimalne razlike v jetrnem očistku kljub vsemu izražajo na nivoju celotnega organizma, je prisotnost encima UGT1A1 tudi v tankem črevesju. Če se polimorfizem *UGT1A1\*28* izraža tako v jetrih kot v tankem črevesju, je raloksifen ob svojem enterohepatičnem kroženju dvakrat izpostavljen variantni ekspresiji encimov ob vsakem ciklu, teh ciklov pa je vsaj 7 [8].

Ob vsem tem ne smemo pozabiti, da je metabolizem in transport raloksifena zapleten proces, ki se ga ne da opisati z enostavno enačbo. Gre namreč za kombinacijo nastajanja glukuronidov v več različnih organih, konverzije že nastalih metabolitov nazaj v aktivno učinkovino in enterohepatičnega kroženja. Nekje na tej poti se v presnovo in izločanje pomembno vpleta polimorfizem *UGT1A1\*28*, kar smo tudi dokazali z našimi raziskavami. Nadaljnje raziskave bodo pokazale, kje na tej poti in na kakšen način pride do izražanja teh razlik med genotipi.

## 5. SKLEP

- Polimorfizem *UGT1A1\*28* vodi v povišane koncentracije raloksifena v plazmi in znižane plazemske koncentracije metabolitov raloksifen-4'-glukuronida ter raloksifen-6-glukuronida, čeprav razlike niso povsod statistično značilne. *In vivo* očistek je tako najnižji pri homozigotih za gen *UGT1A1\*28*, najvišji pa pri homozigotih za gen *UGT1A1\*1*.
- Polimorfizem *UGT1A1\*28* pomembno vpliva na hitrost glukuronidiranja raloksifena z encimom UGT1A1 v jetrih: nosilci genotipa *UGT1A1\*28/\*28* imajo najnižji intrinzični očistek raloksifena, nosilci genotipa *UGT1A1\*1/\*1* najvišji, heterozigoti pa dosegajo vmesne vrednosti intrinzičnega očistka.
- Kljub razlikam v intrinzičnih očistkih so na njihovih osnovah izračunani jetrni očistki enaki ne glede na polimorfizem *UGT1A1\*28*.
- Povišane koncentracije bilirubina v krvi ljudi z Gilbertovim sindromom ne vplivajo pomembno na glukuronidiranje raloksifena z encimom UGT1A1.
- Raziskave metabolizma raloksifena bi bilo potrebno razširiti še na ostale organske sisteme, kjer poteka njegova presnova in enterohepatično kroženje, ter tako razjasniti, kje na tej poti pride do dejanskega izražanja vpliva polimorfizma *UGT1A1\*28* na kinetiko presnove raloksifena
- Dobro definirana in kvantitativno ovrednotena povezava med polimorfizmom *UGT1A1\*28* in koncentracijami raloksifena v krvi bi omogočila individualno prilagajanje odmerkov in doseganje boljših rezultatov zdravljenja.



## 6. LITERATURA

1. Johnell O, Kanis J. Epidemiology of osteoporotic fractures. *Osteoporos. Int.* 2005; 16 Suppl 2: S3-S7.
2. Williams DA, Lemke LT. Foye's Principles of Medicinal Chemistry, Fifth Edition, Lippincott Williams & Wilkins, 2002; 694: 1059-1065.
3. Kocijančič A. Smernice za odkrivanje in zdravljenje osteoporoze v Sloveniji. *Zdrav. Vestn.* 2002; 71: 571-573.
4. Lippman ME, Cummings SR, Disch DP, Mershon JL, Dowsett SA, Cauley JA, Martino S. Effect of raloxifene on the incidence of invasive breast cancer in postmenopausal women with osteoporosis categorised by breast cancer risk; *Clin. Cancer Res.* 2006; 12(17): 5010-3.
5. Ettinger B, Black DM, Mitlak BH et al. Reduction of vertebral fracture risk in postmenopausal women with osteoporosis treated with raloxifene: results from a 3-year randomized clinical trial. *JAMA* 1999; 282: 637-45.
6. Nelson HD, Fu R, Griffin JC, Nygren P, Smith BME, Humphrey L. Systematic Review: Comparative Effectiveness of Medications to Reduce Risk for Primary Breast Cancer. *Ann. Intern. Med.*, 2010.
7. Dosje NDA-020-815, vložen pri U.S. Food and Drug Administration, 5600 Fishers Lane, Rockville MD 20857-0001, 1999. Dostop prek spleta: [http://www.fda.gov/cder/foi/nda/99/20815S3\\_Evista.htm](http://www.fda.gov/cder/foi/nda/99/20815S3_Evista.htm) (maj 2007).
8. Trontelj J. Raziskave metabolizma raloksifena z eksperimentalnimi modeli naraščajoče kompleksnosti, doktorska disertacija. Fakulteta za farmacijo, Univerza v Ljubljani, 2007.
9. Jeong EJ, Liu Y, Lin H, Hu M. Species- and disposition model-dependent metabolism of raloxifene in gut and liver: role of UGT1A10. *Drug Metab. Disp.* 2005; 33(6): 785-94.
10. Kemp DC, Fan PW, Stevens JC. Characterisation of raloxifene glucuronidation in vitro: contribution of intestinal metabolism to presystemic clearance. *Drug metab. disp.* 2002; 30 (6): 694-700.
11. Hochner-Celnikier D. Pharmacokinetics of raloxifene and its clinical application. *Eur. J. Obstet. Gynecol. Reprod. Biol.* 1999; 85(1): 23-9.
12. Gibson GG, Skett P. Introduction to drug metabolism, Nelson Thornes, Cheltenham, Velika Britanija, 2001: 68-70.

13. Pearson PG, Wienkers LC. Handbook of Drug Metabolism, Drugs and pharmaceutical sciences, letnik 186, Informa Health Care, New York, 2009: 307-308.
14. Mackenzie PI, Bock KW, Burchell B, Guillemette C, Ikushiro S, Iyanagi T, Miners JO, Owens IS, Nebert DW. Nomenclature update for the mammalian UDP glycosyltransferase (UGT) gene superfamily. *Pharmacogenet. Genomics.* 2005; 15(10): 677-85.
15. Buckley DB, Klaassen CD. Tissue- and Gender-Specific mRNA expression of UDP-Glucuronosyltransferases (UGTs) in Mice. *Drug Metab. Dispos.* 2007; 35: 121-127.
16. Tukey RH, Strassburg CP. Genetic multiplicity of the human UDP-glucuronosyltransferases and regulation in the gastrointestinal tract. *Mol. Pharmacol.* 2001; 59(3): 405-14.
17. Guillemette C, Lévesque E, Harvey M, Bellemare J, Menard V. UGT genomic diversity: beyond gene duplication. *Drug Metab. Rev.*, 2009; 1-21.
18. Ostanek B. Genetika in farmakogenetika Gilbertovega sindroma. *Farm. Vestn.* 2009; 60: 3-7.
19. Maruo Y, Iwai M, Mori A, Sato H, Takeuchi Y. Polymorphism of UDPglucuronosyltransferase and drug metabolism. *Curr. Drug Metab.* 2005; 6(2):91-9.
20. Schiff ER, Sorrell MF, Maddrey WC. Schiff's diseases of the liver, Tenth edition, Volume 1, Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, ZDA, 2006: 228.
21. Huang CS, Tan N, Yang S, Sung YC, Huang MJ. Crigler-Najjar Syndrome Type 2. *J Formos Med Assoc* 2006; 105(11): 950-953
22. Burchel B, McGurk K, Brierley CH, Clarke DJ. UDP-glucuronosyltransferases, *Comprehensive toxicology* (urednik Mulder GJ), Pergamon Elsevier Science, New York 1996; 401-435.
23. McClatchey KD. *Clinical Laboratory Medicine*, second edition, Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, ZDA, 2002; 415.
24. Beutler E, Gelbart T, Demina A. Racial variability in the UDP-glucuronosyltransferase 1 (UGT1A1) promoter: a balanced polymorphism for regulation of bilirubin metabolism? *Proc.Natl. Acad. Sci. ZDA* 1998; 95(14): 8170-4.
25. The Merck Manuals: online medicinal library. Dostop prek spleta: <http://www.merck.com/mmpe/sec20/ch303/ch303a.html> (december 2009).
26. Dixon M, Webb EC, Thorne CJR., Tipton KF. *Enzymes*. 3<sup>RD</sup> ed. London: Longman, 1979; 126.

27. Schnell S, Maini PK. A century of enzyme kinetics: Reliability of the  $K_m$  and  $v_{max}$  estimates., 8: 169-187, 2003.
28. Taavitsainen P, Cytochrome P450 isoform-specific in vitro methods to predict drug metabolism and interactions, Desertation, Department of Pharmacology and Toxicology, University of Oulu, 2001.
29. Rodrigues AD. Drug-drug interactions. First edition, Marcel Dekker, Inc., New York, 2002: 10.
30. Kwon Y. Handbook of essential pharmacokinetics, pharmacodynamics and drug metabolism for industrial scientists, Kluwer Academic/Plenum Publishers, New York, 2001: 90-91.
31. Hariparsad N, Sane RS, Strom SC, Desai PB. In vitro methods in human drug biotransformation research: implications for cancer chemotherapy. *Toxicol. In Vitro.* 2006; 20(2): 135-53.
32. Baranczewski P, Stanczak A, Kautiainen A, Sandin P, Edlund PO. Introduction to early in vitro identification of metabolites of new chemical entities in drug discovery and development. *Pharmacol. Rep.* 2006; 58(3): 341-52.
33. Brandon EF, Raap CD, Meijerman I, Beijnen JH, Schellens JH. An update on in vitro test methods in human hepatic drug biotransformation research: pros and cons. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 2003; 189(3): 233-46.
34. Gomez-Lechon MJ, Castell JV, Donato MT: Hepatocytes-the choice to investigate drug metabolism and toxicity in man: In vitro variability as a reflection of in vivo. *Chem. Biol. Interact.* 2007; 168(1):30-50.
35. Woolf TF. Handbook of Drug Metabolism. Marcel Dekker, New York, Basel 1999
36. Hariparsad N, Sane RS, Strom SC, Desai PB. In vitro methods in human drug biotransformation research: implications for cancer chemotherapy. *Toxicol. In Vitro.* 2006; 20(2): 135-53.
37. Soars MG, McGinnity DF, Grime K et al. The pivotal role of hepatocytes in drug discovery. Review. *Chem. Biol. Interact.* 2007; 168(1): 2-15.
38. Skaggs SM, Foti RS, Fisher MB. A streamlined method to predict hepatic clearance using human liver microsomes in the presence of human plasma. *J. Pharmacol. Toxicol. Methods.* 2006; 53: 284-290.

39. Narayanan R, LeDuc B, Williams DA. Glucuronidation of haloperidol by rat liver microsomes: involvement of family 2 UDP-glucuronosyltransferases. *Life Sci.* 2004; 74(20):2527-39.
40. Miners JO, Knights KM, Houston JB, Mackenzie PI. In vitro-in vivo correlation for drugs and other compounds eliminated by glucuronidation in humans: pitfalls and promises. *Biochem. Pharmacol.* 2006; 71(11):1531-9.
41. Kliford PJ, Stringer R, Sohal B, Houston JB, Galetin A. Prediction of drug clearance by glucuronidation from in vitro data: use of combined cytochrome P450 and UDP-glucuronosyltransferase cofactors in alamethicin-activated human liver microsomes. *Drug metab. disp.* 2009; 37: 82-89.
42. Snyder KR, Sparano N, Malinowski JM. Raloxifene hydrochloride. *Am. J. Health. Syst. Pharm.* 2000; 57:1669–75.
43. Trontelj J, Bogataj M, Marc J, Mrhar A. Development and validation of a liquid chromatography-tandem mass spectrometry assay for determination of raloxifene and its metabolites in human plasma. *Journal of chromatography. B, J. Chromatogr. B Analyt. Technol. Biomed. Life Sci.* 2007; 855 (2): 220-227.
44. Trontelj J, Marc J, Zavratnik A, Bogataj M, Mrhar A. Effects of *UGT1A1\*28* polymorphism on raloxifene pharmacokinetics and pharmacodynamics. *British Journal of Clinical Pharmacy.* 2009; 67(4): 437-444(8).
45. Lin JP, O'Donnell CJ, Schwaiger JP, Cupples LA, Lingenhel A, Hunt SC, Yang S, and Kronenberg F. Association Between the *UGT1A1\*28* Allele, Bilirubin Levels, and Coronary Heart Disease in the Framingham Heart Study. *Circulation*, Oct 2006. 114: 1476 - 1481.
46. Mizuma T. Intestinal glucuronidation metabolism may have a greater impact on oral bioavailability than hepatic glucuronidation metabolism in humans: A study with raloxifene, substrate for *UGT1A1, 1A8, 1A9* in *1A10*. *Int. J. Pharm.* 2009.
47. Chiba M, Ishii Y, and Sugiyama Y. Prediction of Hepatic Clearance in Human From In Vitro Data for Successful Drug Development. *The AAPS Drug Journal*, Vol. 11, No. 2, June 2009.
48. Clemett D, Spencer CM. Raloxifene: a review of its use in postmenopausal osteoporosis. *Drugs* 2000; 60(2): 379-411.