

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO

ALJAŽ DEŽMAN

DIPLOMSKA NALOGA

UNIVERZITETNI ŠTUDIJ FARMACIJE

Ljubljana, 2011

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO

ALJAŽ DEŽMAN

***IN VITRO* RAZISKAVE VPLIVA PREHRANSKIH
DOPOLNIL NA METABOLIZEM BAZEDOKSIFENA IN
RALOKSIFENA Z MIKROSOMI**

***IN VITRO* INVESTIGATIONS OF DIETARY
SUPPLEMENTS' INFLUENCE ON BASEDOXIFENE AND
RALOXIFENE METABOLISM IN HUMAN MICROSOMES**

Ljubljana, 2011

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

Na tem mestu bi se najlepše zahvalil družini, ki mi je s svojo podporo omogočila študij in vsem prijateljem, ki so mi v času študija stali ob strani, še posebej Sari. Zahvalil bi se tudi doc. dr. Robertu Roškarju za pomoč pri standardizaciji rastlinskih ekstraktov. Posebna zahvala pa gre asist. Tini Trdan, ki je prispevala veliko znanja in časa k izdelavi moje diplomske naloge.

Izjava

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

Aljaž Dežman

Predsednik diplomske komisije: izr. prof. dr. Odon Planinšek, mag. farm.

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

Ljubljana, marec 2011

KAZALO VSEBINE

POVZETEK	VI
ABSTRACT	VII
ABECEDNI SEZNAM OKRAJŠAV	VIII
1. UVOD	1
1.1. PREHRANSKA DOPOLNILA IN ZDRAVILA BREZ RECEPTA	1
1.1.1. <i>Cimicifuga racemosa</i> (grozdnata svetlika, cimicifuga)	2
1.1.2. <i>Hypericum perforatum</i> (šentjanževka)	2
1.1.3. <i>Echinacea purpurea</i> (ameriški slamnik).....	3
1.1.4. <i>Panax ginseng</i> (ginseng).....	3
1.1.5. <i>Valeriana officinalis</i> (zdravilna špajka ali baldrijan).....	4
1.1.6. <i>Alium sativum</i> (česen).....	4
1.1.7. Glukozamin.....	5
1.1.8. Koencim Q10	6
1.1.9. <i>Ginkgo biloba</i> (dvokrpi ginkgo)	6
1.1.10. <i>Glycine max</i> (soja)	7
1.2. OSTEOPOROZA	7
1.2.1. Zdravljenje osteoporoze.....	8
1.3. RALOKSIFEN IN BAZEDOKSIFEN	9
1.3.1. Metabolizem raloksifena in bazedoksifena.....	10
1.4. ENCIMI URIDIN DIFOSFAT GLUKURONOZILTRANSFERAZE (UGT)	12
1.4.1. Klasifikacija	13
1.4.2. Izražanje UGT encimov	14
1.5. FARMAKOKINETIKA IN ENCIMSKA KINETIKA (44)	14
1.5.1. Kinetika enosubstratne encimsko katalizirane reakcije	15
1.5.1.1. Encimska inhibicija in aktivacija	17
1.5.1.2. Substratna inhibicija	17
1.5.2. Določevanje navideznih encimskih parametrov	19
1.5.3. Napovedovanje metaboličnega očistka.....	20
1.5.3.1. Farmakokinetični modeli	20
1.5.4. Intrinzični očistek	21
1.6. IN VITRO METODE	21
1.6.1. Mikrosomi.....	22
2. NAMEN DELA	24
3. MATERIALI IN METODE	25
3.1. MATERIALI	25
3.2. APARATURE	28
3.3. METODE	28
3.3.1. Priprava raztopin albumina	29
3.3.2. Priprava primarnih raztopin učinkovin za preučevanje vpliva različnih koncentracij prehranskih dopolnil na metabolizem.....	29
3.3.3. Priprava primarnih in sekundarnih raztopin učinkovin za določanje kinetike encimske reakcije (tabela III).....	30
3.3.4. Priprava raztopine metanola s haloperidolom	31
3.3.5. Priprava raztopin za umeritveno premico	31
3.3.6. Priprava inkubatov	32
3.3.7. Določanje vpliva različnih koncentracij prehranskih dopolnil na količino nastalih metabolitov raloksifena in bazedoksifena.....	33

3.3.8. Določanje kinetike nastajanja metabolitov raloksifena in bazedoksifena v črevesnih in jetrnih mikrosomih pod vplivom prehranskih dopolnil	35
3.3.9. Analitika	37
3.3.10. Urejanje in obdelava podatkov	38
4. REZULTATI IN RAZPRAVA	39
4.1 Standardizacija ekstraktov prehranskih dopolnil	39
4.2 Določanje vpliva različnih koncentracij prehranskih dopolnil na metabolizem raloksifena in bazedoksifena	39
4.2.1 Inkubacija raloksifena s črevesnimi mikrosomi	40
4.2.2 Inkubacija raloksifena z jetrnimi mikrosomi	42
4.2.3 Inkubacija bazedoksifena s črevesnimi mikrosomi	44
4.2.4 Inkubacija bazedoksifena z jetrnimi mikrosomi	45
4.3 Določanje kinetike nastajanja metabolitov raloksifena in bazedoksifena v prisotnosti in odsotnosti prehranskih dopolnil	48
4.3.1 Inkubacija raloksifena s črevesnimi mikrosomi	49
4.3.2 Inkubacija raloksifena z jetrnimi mikrosomi	51
4.3.3 Inkubacija bazedoksifena s črevesnimi mikrosomi	54
4.3.4 Inkubacija bazedoksifena z jetrnimi mikrosomi	55
5. ZAKLJUČEK	60
6. LITERATURA	62

POVZETEK

Uporaba prehranskih dopolnil in zdravil brez recepta v Sloveniji in v razvitih državah po svetu strmo narašča. Populacijska skupina, ki je največji porabnik prehranskih dopolnil in zdravil brez recepta, so starejše ženske. Ta skupina pa je hkrati tudi tista skupina pacientov, v kateri je največkrat predpisan raloksifen ali bazedoksifen. Na temo interakcij med posameznimi učinkovinami in prehranskimi dopolnili je bilo narejeno že veliko raziskav, vendar se jih je večina pri preučevanju metabolizma učinkovin z encimi osredotočala na encime iz naddužine citokromov CYP450. Ker se raloksifen in bazedoksifen praktično ne presnavljata s CYP450, ampak z uridindifosfat glukuronoziltransferazami, smo se odločili preučiti vpliv posameznih prehranskih dopolnil na glukuronidacijo z omenjenimi encimi.

V diplomski nalogi smo z uporabo človeških jetrnih in črevesnih mikrosomov kot *in vitro* modelom preučevali vpliv ekstraktov cimicifuge, ameriškega slamnika, šentjanževke, ginsenga, baldrijana, česna, glukozamina, ginkga, koencima Q10 in soje na količino in hitrost nastajanja glukuroniranih metabolitov raloksifena in bazedoksifena. V prvem delu raziskave smo opazovali vpliv treh različnih koncentracij prehranskih dopolnil na aktivnost UGT encimov v črevesnih in jetrnih mikrosomih. Začeli smo z najvišjo koncentracijo prehranskega dopolnila, ki je predstavljala koncentracijo odmerka zaužitega z 250 mL vode, nato pa smo ga deset- in stokrat redčili. Določili smo hitrost nastajanja metabolitov v prisotnosti in odsotnosti prehranskega dopolnila in ugotavljali razlike. Ugotovili smo, da večina uporabljenih prehranskih dopolnil statistično pomembno zmanjša aktivnost UGT encimov tudi pri najnižjih uporabljenih koncentracijah. V drugem delu naloge smo se osredotočili na preučevanje vpliva prehranskih dopolnil na encimsko kinetiko. Tu smo obdržali stalno koncentracijo prehranskih dopolnil in spreminjali koncentracije raloksifena oz. bazedoksifena. Opazovali smo spreminjanje parametrov encimske kinetike v_{max} , K_M , k_i in Cl_i , ter jih primerjali s kontrolnimi vzorci. Določili smo vrsto vpliva (kompetitivna, nekompetitivna ali mešana inhibicija, morebitna aktivacija encima) na encim.

V obeh delih preučevanja vpliva smo prišli do ugotovitve, da imata izmed izbranih prehranskih dopolnil najmočnejši zaviralni vpliv na glukuronidacijo šentjanževka in ameriški slamnik. Ker pa je področje, ki smo ga preučevali tako obširno, bodo dobljeni rezultati lahko služili le kot uvod v nadaljnje raziskave vpliva prehranskih dopolnil na glukuronidacijo z UGT encimi.

ABSTRACT

The use of dietary supplements in Slovenia and in other developed countries is rapidly increasing. The most numerous consumer group are elder women, which are at the same time the group of patients whom raloxifene or bazedoxifene are most often prescribed to. A large number of scientific studies have been performed on a subject of interactions between individual drug and dietary supplements and their effect on drug metabolism, but the majority of them have studied the influence on cytochromes P450. Since raloxifene and bazedoxifene are only metabolized by UGT enzymes, we decided to study the influence of individual dietary supplements on glucuronidation with UGT enzymes.

Human liver and intestinal microsomes represented an *in vitro* model used to study the influence of *Cimicifuga racemosa*, *Hypericum perforatum*, *Echinacea purpurea*, *Panax ginseng*, *Valeriana officinalis*, garlic, glucosamine, coenzyme Q10 and soybean on quantity and speed of raloxifene's and bazedoxifene's glucuronidation. In the first part of our study we focused our attention on the influence of three different concentrations of dietary supplements, beginning with the highest concentration, which represented the concentration of dietary supplement taken with 250 mL of water, and continuing with ten and hundred times more diluted solutions. We have then measured the percentage change of enzyme activity and compared it to control samples. The majority of used dietary supplements have presented a degree of statistically significant activity reductions even with the lowest concentrations used. In the second part of our research, we were studying the influence of dietary supplements on enzyme kinetics. We used 8 different concentrations of raloxifene and bazedoxifene at single concentration of dietary supplements and studied the influence on parameters of enzyme kinetics, such as v_{max} , K_M , k_i and Cl_i , and compared them with control samples. We determined the sort of influence (competitive, non-competitive or mixed inhibition, potential enzyme activation) and compared the change to values obtained from other samples.

In both parts of the study, the biggest influence on enzyme kinetics was shown by *Hypericum perforatum* and *Echinacea purpurea*. But since the field of investigation is very large, the results obtained from this study can only serve as introduction to new, more in-depth investigations of dietary supplements' influence on glucuronidation with UGT enzymes.

ABECEDNI SEZNAM OKRAJŠAV

BMD	mineralna kostna gostota (ang. »bone mineral density«)
CYP450	družina citokromov P450
DMSO	dimetilsulfoksid
E	encim
E_0	začetna koncentracija encima
ES	kompleks encima in substrata
HDL	lipoproteini visoke gostote (ang. »high density cholesterol«)
HMG-CoA	3-hidroksi-3-metil-glutaril-koencim A reduktaza
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
M5, R-5-G	metabolit bazedoksifena: bazedoksifen-5-glukuronid
M4, R-4'-G	metabolit bazedoksifena: bazedoksifen-4'-glukuronid
S	substrat
S_0	začetna koncentracija substrata
SERM	selektivni modulator estrogenskih receptorjev
TRIS	tris(hidroksimetil)aminometan
UDP	uridindifosfat
UGT	UDP- glukuronoziltransferaza
UGT1A1	UDP- glukuronoziltransferaza iz družine 1, poddružine A, encim 1
V_{max}	maksimalna hitrost encimske reakcije

1. UVOD

V lekarnah prodaja prehranskih dopolnil in zdravil brez recepta vztrajno narašča. Še posebej je uživanje prehranskih dopolnil in jemanje zdravil brez recepta v populaciji starejših žensk (menopavza, depresija, starostna demenca, povišan krvni tlak, pomanjkanje imunske odpornosti,...) pogostejše kot v ostalih populacijah. Dejstvo je tudi, da zaradi zgoraj naštetih težav veliko žensk redno jemlje zdravila, predpisana s strani osebnega zdravnika, za katera pa ob nakupu prehranskih dopolnil ali zdravil brez recepta farmacevti v lekarnah običajno ne vedo. Posledica vsega naštetega je velika možnost potencialnih in še neodkritih interakcij med zdravili ter prehranskimi dopolnili in zdravili brez recepta (1).

1.1. PREHRANSKA DOPOLNILA IN ZDRAVILA BREZ RECEPTA

Pravilnik o prehranskih dopolnilih opisuje prehranska dopolnila kot živila, katerih namen je dopolnjevati običajno prehrano. So koncentrirani viri posameznih ali kombiniranih hranil ali drugih snovi s hranilnim ali fiziološkim učinkom, ki se dajejo v promet v obliki kapsul, pastil, tablet in v drugih podobnih oblikah, v vrečkah s praškom, v ampulah s tekočino, v kapalnih stekleničkah in v drugih podobnih oblikah s tekočino in praškom, ki so oblikovane tako, da se jih lahko uživa v odmerjenih majhnih količinskih enotah. Prehranska dopolnila lahko vsebujejo tudi aminokislino, maščobne kisline, vlaknine, rastline in rastlinske izvlečke, mikroorganizme ter druge snovi s hranilnim ali fiziološkim učinkom, pod pogojem, da je njihova varnost v prehrani ljudi znanstveno utemeljena. Prehranska dopolnila, ki vsebujejo rastline in rastlinske izvlečke morajo biti v skladu s predpisom, ki ureja razvrstitev zdravilnih rastlin (2). Pripravki, ki vsebujejo enake sestavine kot nekatera prehranska dopolnila, so lahko registrirani tudi kot zdravila, vendar v tem primeru začne njihov pojav na trgu in uporabo regulirati Zakon o zdravilih (3).

Izbor predstavljenih prehranskih dopolnil, zdravil in zdravil brez recepta v nadaljevanju temelji predvsem na dejavniku pogostosti njihove uporabe pri bolnikih z osteoporozo. Torej tam, kjer bi bili možni vplivi na presnovo basedoksifena ali raloksifena. Osteoporozo običajno prizadene starejše ženske v menopavzi, pogosto pa to ni njihova edina zdravstvena težava. Med bolj pogostimi težavami se pojavljajo še sladkorna bolezen, težave s srcem in krvožilnim sistemom, povišana koncentracija lipidov v plazmi, revmatoidni artritis, depresija, slabšanje kognitivnih funkcij, povečana telesna teža ter slabšanje imunske odpornosti. Zaradi zgoraj naštetih zdravstvenih težav se jih veliko

bolnikov odloča za jemanje prehranskih dopolnil oziroma drugih zdravil, ki so na voljo brez recepta. Iz večih raziskav je znano tudi, da so starejše ženske nasploh najštevilčnejši uporabniki prehranskih dopolnil in zdravil brez recepta (1). Naš namen je bil iz množice vseh pripravkov izbrati deset tistih, po katerih bolniki z osteoporozo najpogosteje posegajo. Sledi kratek opis izbranih prehranskih dopolnil ter zdravil, ki se izdajajo z ali brez recepta. V nadaljevanju besedila izraz prehranska dopolnila zaradi lažjega opisovanja zajema tudi zdravila, ki vsebujejo enake učinkovine in se izdajajo z in brez recepta.

1.1.1. *Cimicifuga racemosa* (grozdnata svetlika, cimicifuga)

Prehranska dopolnila z ekstraktom korenike cimicifuge so pri ženskah ena izmed najpogosteje uporabljenih prehranskih dopolnil za lajšanje pomenopavzalnih težav. Predstavljajo alternativo nadomestni hormonski terapiji, ki je zaradi nekaterih neželenih učinkov (možganska kap, srčni infarkt, tromboembolija, rak dojke) nepriljubljena pri številnih ženskah (4). Korenika cimicifuge vsebuje estrogenom podobne spojine, kar naj bi bila naravna alternativa ob pomanjkanju estrogena v menopavzai. Spojine, ki so pomembne za učinek cimicifuge, so kavna kislina, triterpenski saponini in fenilpropanoidi. Simptomi pomanjkanja estrogena so vročični oblivi, povišan srčni utrip, migrena, suhost nožnice, osteoporozo, bolečine v sklepih, depresija in pomanjkanje libida (6, 7).

Navkljub široki uporabi in številnim kliničnim ter primerjalnim študijam pa učinek cimicifuge na lajšanje pomenopavzalnih težav pri ženskah še ni dokazan. Trenutno je na tržišču več prehranskih dopolnil, ki vsebujejo koreniko cimicifuge, med bolj znanimi v Sloveniji sta Remifemin[®] in Klimaktin[®] (8, 7).

1.1.2. *Hypericum perforatum* (šentjanževka)

Začetki uporabe šentjanževke v zdravilne namene segajo v čas antične Grčije, kjer so jo uporabljali za zdravljenje različnih bolezni, med drugim tudi v terapiji t.i. živčnih motenj. Danes vemo, da ima tudi antibakterijski, protivirusni in protivnetni učinek, posledica tega pa je topikalna uporaba pri opeklinah in ranah. Šentjanževka se največ uporablja za zdravljenje blage ali zmerne depresije. Na tem področju je bilo v zadnjem času narejenih mnogo kliničnih in nekliničnih raziskav, ki so ta učinek večinoma tudi potrdile. Za učinek sta odgovorni predvsem spojini hipericin in hiperforin. Več študij je pokazalo, da šentjanževka deluje podobno kot selektivni inhibitorji ponovnega privzema serotonina, brez najpomembnejšega stranskega učinka – izgube libida (8).

Kljub vsemu pa imajo med prehranskimi dopolnili tista, ki vsebujejo šentjanževko, veliko interakcij z drugimi zdravili. Prav hipericin in hiperforin namreč inducirata encime CYP3A4 in CYP2C19, kar poveča metabolizem učinkovin, ki se metabolizirajo preko teh encimov, kot tudi aktivacijo transportnega MDR1/P-glikoproteina v enterocitih, kar zmanjša absorpcijo učinkovin. Šentjanževka je zato kontraindicirana pri jemanju antikoagulantov, antidepresivov, triptanov, antihistaminikov, imunosupresivov, kontracepcijskih tablet ter številnih drugih zdravil. Primeri prehranskih dopolnil s šentjanževko, ki jih lahko kupimo v lekarnah, so tablete Deprim[®] ter čaji različnih proizvajalcev (9).

1.1.3. *Echinacea purpurea* (ameriški slamnik)

Prehranska dopolnila, ki vsebujejo ameriški slamnik so, trenutno verjetno najbolj prodajana prehranska dopolnila, njihiva uporaba pa običajno najbolj poskoči v času prehladnih obolenj (jesen, zima). Rastlino so za zdravljenje uporabljali že severnoameriški Indijanci, kot zdravilna rastlina pa se je spet pričela uporabljati v Nemčiji v 20. stoletju. Prav v Nemčiji je bilo do sedaj narejenih tudi največ raziskav njene učinkovitosti (10).

Danes se ameriški slamnik uporablja predvsem v preventivi prehladnih obolenj, pa tudi za hitrejše zdravljenje prehlada in gripe ter za lajšanje simptomov kot so boleče grlo, kašelj in povišana telesna temperatura. Pripravki ameriškega slamnika se priporočajo tudi pri infekcijah, saj naj bi delovali imunostimulativno. Delovali naj bi tudi antioksidativno, protivirusno, zmanjševali naj bi bolečino in zavirali vnetje. Za zdravilne učinke rastline naj bi bili odgovorni flavonoidi, glikoproteini in polisaharidi, za katere je znano, da sprožijo aktivnost imunskega sistema. Kontraindikacij je pri jemanju prehranskih dopolnil z ameriškim slamnikom malo oz. so redke. Še najbolj pogosta kontraindikacija je jemanje imunosupresivov (10).

V Sloveniji so med bolj znanimi izdelki z ameriškim slamnikom Immunol[®], Echinaforce[®] ter Now Echinacea[®] in Nutrilab Echinacea[®].

1.1.4. *Panax ginseng* (ginseng)

Zdravila rastlinskega izvora, ki vsebujejo ginseng, so pridobljena iz korenin več različnih rastlin – ameriški ginseng, sibirski ginseng ter korejski ginseng. Med njimi je najbolj znan in raziskan korejski ali *Panax ginseng*. Aktivne sestavine v pripravkih iz ginsenga so ginsenosidi (triterpenski saponini), za katere se je izkazalo, da imajo protivnetni,

antioksidativni in antikancerogeni učinek. Nekatere študije so pokazale tudi izboljšanje fiziološkega stanja pri sladkornih bolnikih, zniževanje koncentracije lipidov v krvi ter stimulacijo imunskega sistema. Mehanizem teh učinkov ni v celoti pojasnjen, predvideva pa se, da ginseng deluje na os hipotalamus – hipofiza – nadledvična žleza, kar bi lahko pojasnilo zgoraj naštete učinke. Študije na živalih so dokazale tudi, da ginseng stimulira fagocitozo in sintezo interferonov, izboljša kognitivne sposobnosti ter povzroči vazodilatacijo. Danes se tako uporablja predvsem pri sladkorni bolezni, za izboljšanje imunske odpornosti ter izboljšanje rezultatov pri fizični aktivnosti (11).

Primeri prehranskih dopolnil, ki vsebujejo ginseng, so Herbion ginseng[®], Lecitin ginseng[®], Dr. Böhm ginseng plus[®] in Doppelherz ginseng aktiv[®].

1.1.5. *Valeriana officinalis* (zdravilna špajka ali baldrijan)

Začetki uporabe baldrijana za zdravljenje nespečnosti in anksioznosti segajo v 2. stoletje, najbolj pa se je uživanje baldrijanovih pripravkov razmahnilo v Evropi v 17. stoletju. V te namene se uporablja tudi danes, poleg tega pa še za lajšanje trebušnih krčev ter kot diuretik. Z raziskavami potrjene dokaze o učinkovitosti baldrijana so v literaturi pričeli objavljati šele v zadnjih desetletjih. Kljub temu mehanizem delovanja še ni znan. Predvideva se, da prehranska dopolnila, ki vsebujejo baldrijan, povečujejo koncentracijo GABA-e (γ -aminobutirne kisline) v centralnem živčnem sistemu (12).

Primerjalne študije so pokazale, da jemanje pripravkov iz baldrijana zmanjša čas, ki je potreben, da zaspimo, in izboljša kakovost samega spanca. Ob tem pa se v nasprotju z močnejšimi zdravili za zdravljenje nespečnosti ne pojavljajo hujši neželeni učinki kot sta na primer jutranja vrtoglavica ali odtegnitveni sindrom. Do interakcij z baldrijanom lahko pride pri jemanju drugih sedativov (antikonvulzivi, benzodiazepini, triciklični antidepresivi, barbiturati in hipnotiki), alkohola, inhibitorjev HMG-CoA reduktaze, antihistaminikov ter določenih antimikotikov (12).

Med bolj poznanimi pripravki z baldrijanom v Sloveniji sta Persen[®] in Baldrijanove kapljice[®].

1.1.6. *Alium sativum* (česen)

Česen se v prehrani in kot zdravilna rastlina uporablja že tisočletja. Danes se prehranska dopolnila iz česna uporabljajo za zdravljenje in preprečevanje srčno-žilnih bolezni, vključno z aterosklerozo in povišanim krvnim tlakom, ter za večanje imunske odpornosti

organizma. Nekatere raziskave kažejo obetavne rezultate tudi pri preprečevanju nastanka tumorjev oz. rakavih obolenj, predvsem pri raku debelega črevesja in želodca (13). Glavno vlogo pri učinku česna kot preprečevalca različnih bolezni pripisujemo antioksidantom, ki se v česnu nahajajo v visokih koncentracijah. Antioksidanti v česnu preprečujejo razvoj ateroskleroze z zniževanjem koncentracije LDL holesterola, večanjem koncentracije HDL holesterola in z zmanjševanjem agregacije trombocitov. Nedavno je bilo dokazano, da česen znižuje koncentracijo dveh pomembnih označevalcev pri razvoju srčno-žilnih bolezni – homocisteina in C-reaktivnega proteina (13).

Vpliv česna na preprečevanje in lajšanje ter posledično hitrejše okrevanje pri prehladu je bil dokazan z dobro načrtovano študijo v času prehladnih obolenj. Prostovoljci so pri jemanju česna imeli bistveno manj okužb kot tudi hitrejše okrevanje kot prostovoljci, ki so prejeli placebo. Trenutno potekajo raziskave še na številnih drugih področjih, kjer se česnu pripisuje antimikotično, antibiotično, protivirusno ter antiparazitično delovanje in kot pomoč pri fizični izčrpanosti. Za delovanje česna sta v največjem obsegu pomembni dve spojini: alicin, ki česnu daje značilen vonj, vendar se slabo absorbira v prebavnem traktu, in S-alilcistein, ki se dobro absorbira v prebavilih, pridobi pa se s fermentacijo na zraku staranega česna. Hujših neželenih učinkov česna ne gre pričakovati, pri dolgotrajnejšem uživanju svežih pripravkov se pojavljata le neprijeten zadah in telesni vonj. V lekarnah so kot prehranskima dopolnila s česnom na voljo Herbion Allium[®], Nutrilab Česen[®], Pharma Nord Čisti česen[®] in FidiAlin[®] (13).

1.1.7. Glukozamin

Trenutno so prehranska dopolnila z glukozaminom ena izmed najbolj prodajanih prehranskih dopolnil. Glukozamin (2-amino-2-deoksi-β-D-glukopiranoza) je po molekularni strukturi aminoglikozid, ki je v organizmu prisoten v skoraj vseh tkivih. Pogost je v vezivnih tkivih, v največji koncentraciji pa je prisoten v hrustancu. Po peroralni aplikaciji se dobro absorbira ter vgradi v sklepni hrustanec. Primerjalne študije niso zaznale bistvenih razlik v biološki uporabnosti glukozaminijevega sulfata in glukozaminijevega klorida. Mehanizem delovanja glukozamina za zdaj še ni znan, obstaja pa več različnih hipotez – od vpliva na izražanje različnih genov, vgradnje žvepla v hrustanec, do neposredne stimulacije hondrocitov (14).

Glukozamin se trenutno najbolj uporablja v terapiji osteoartritisa. Za omenjeno uporabo je bilo narejenih tudi največ raziskav. Te so za zdaj pokazale nasprotujoče si rezultate,

običajno je bil izid klinične študije odraz želje naročnika oziroma sponzorja raziskave. Ne glede na to pa se uporaba glukozamina še vedno povečuje. V prid njegovi uporabi je tudi dejstvo, da nima hujših neželenih učinkov, izpostaviti gre le blažje gastrointestinalne težave. Na koncu je potrebno omeniti še, da je na izboljšanje zdravstvenega stanja ob jemanju glukozamina potrebno čakati vsaj 2 meseca, v tem obdobju pa večina bolnikov običajno preneha z jemanjem prehranskega dopolnila. V Sloveniji je glukozamin na voljo pod tržnimi imeni Voltaflex[®], Glukozamin Pharma Nord[®], FidiFlex[®], Dona[®] in drugi (14, 15).

1.1.8. Koencim Q10

Koencim Q10 je spojina, ki se v celicah nahaja v mitohondrijih, kjer predstavlja pomemben člen v dihalni verigi in sledeči tvorbi adenzin trifosfata (ATP). V organizmu deluje tudi kot antioksidant oziroma lovilec prostih radikalov. Ti so v organizmu vedno prisotni, njihovo nastajanje pa spodbudijo tudi vplivi okolja (UV svetloba, radioaktivno sevanje, cigaretni dim ter onesnažen zrak). Dokazano je, da prosti radikali prispevajo tako k procesu staranja kot tudi k nastanku različnih bolezni (16).

Klinične raziskave dokazujejo, da prehranska dopolnila s koencimom Q10 sama ali v kombinaciji z drugimi zdravili lahko preprečujejo ali zdravijo več bolezni: kronično in akutno srčno popuščanje, visok krvni tlak, aterosklerozo, sladkorno bolezen, poškodbe srca zaradi kemoterapije, raka dojke, parodontozo, migreno, Parkinsonovo bolezen, Alzheimerjevo bolezen, statinsko miopatijo, neplodnost moških in druge. Pri jemanju koencima Q10 ni bilo opaženih hujših neželenih učinkov, razen blažjih gastrointestinalnih težav. V Sloveniji je na voljo več različnih izdelkov, ki vsebujejo koencim Q10 (Supradyn Q10[®], Sensilab Q10[®], Now Ubiquinol[®], Fidimed Koencim Q10[®] ter številni drugi) (17).

1.1.9. *Ginkgo biloba* (dvokrpi ginkgo)

Ginkgo je ena najstarejših drevesnih vrst, njegovi listi pa so ena izmed najbolj preučevanih rastlinskih struktur v botaniki. Tako v tradicionalni kot v moderni medicini se uporablja za izboljšanje delovanja krvnega obtoka in kognitivnih procesov, njegove učinke pa so potrdili tudi s številnimi raziskavami in študijami. Ginkgo je učinkovit pri zdravljenju starostne demence, slabe cirkulacije krvi v nogah in cerebralne insuficience. Raziskave delovanja so pokazale, da ginkgo povzroča vazodilatacijo ter zmanjša agregacijo trombocitov. Preprečuje tudi diabetično retinopatijo, poveča toleranco do hipoksije v

možganskem tkivu in zavira nastanek edemov. V listih ginka najdemo dva tipa spojin – flavonoide (npr. flavoni, flavonoli, biflavonoidi), za katere domnevamo, da imajo antioksidativne lastnosti in katerih vsebnost naj bi botrovala tudi pri preprečevanju srčno-žilnih bolezni ter pri preventivi in terapiji Alzheimerjeve bolezni ter diterpenske in seskviterpenske laktone (npr. ginkgolidi, bilobalid), ki zmanjšujejo agregacijo trombocitov – antagonisti encima PAF (platelet activating factor), to pa je tudi razlog za zaščitno vlogo ginkgovega ekstrakta pred pomanjkanjem kisika v možganih (18).

V slovenskih lekarnah je morda najbolj poznan produkt z ekstraktom ginka Bilobil[®], ki je na voljo v treh različnih odmerkih – 40, 80 in 120 mg kapsulah.

1.1.10. *Glycine max* (soja)

Soja izvira iz vzhodne Azije, kjer njena uporaba sega tisočletja v preteklost, danes pa je široko uporabljana rastlina po vsem svetu. V prehrani predstavlja priljubljen nadomestek mesa pri vegetarijancih, sojino mleko pa lahko primerno nadomesti živalsko mleko. Zaradi visoke vsebnosti izoflavonov daidzeina in genisteina, ki sta po svoji molekularni strukturi mimetika estrogena (fitoestrogena), se soja kot prehransko dopolnilo uporablja za lajšanje težav v menopavzi. Soja vsebuje tudi večje koncentracije omega-3-maščobnih kislin, ki zavirajo razvoj kardiovaskularnih obolenj, vsebuje pa tudi fitinsko kislino, ki deluje antioksidativno in kelatno, zaradi česar se soji pripisuje še protitumorno in protivnetno delovanje. Zaradi zgoraj naštetih lastnosti ima soja ugoden učinek na preprečevanje ateroskleroze, ker znižuje koncentracijo LDL holesterola in povečuje koncentracijo HDL holesterola, ter na preprečevanje in izboljšanje simptomov pri osteoporozi zaradi vsebnosti fitoestrogenov. Vezava izoflavonov na estrogenske receptorje pa je pomembna za lajšanje menopavzalnih težav, kot so vročinski oblivi, depresija in drugi. Ugoden vpliv soje zaradi vsebnosti izoflavonov se kaže tudi v hitrejšem okrevanju po možganskih poškodbah, medtem ko protitumorni učinek zaradi nasprotno delovanja genisteina (oksidant) in fitinske kisline (antioksidant) še ni statistično potrjen (19, 20).

Lecitin Soja[®], Sarapis Soja[®], Menosoy[®] in Davafitto Menal – Fito soja[®] so le nekatera od prehranskih dopolnil s sojo, ki jih lahko kupimo v slovenskih lekarnah.

1.2. OSTEOPOROZA

Osteoporoza je sistemska bolezen skeleta, za katero sta značilni nizka mineralna kostna gostota (bone mineral density - BMD) in mikrostrukturne spremembe kostnega tkiva, kar

vodi do večje krhkosti kosti in pogostnosti zlomov. Tipični osteoporozni zlomi so zlomi zapestja, kolka in vretenc. Ti so posledica neravnovesja med resorpcijo kostnega tkiva, ki jo vršijo celice osteoklasti in izgradnjo, ki jo izvajajo celice osteoblasti. Povzeto po Svetovni zdravstveni organizaciji (WHO) je osteoporoza definirana kot zmanjšanje BMD za vsaj 2,5 standardni deviaciji. Zaradi daljšanja življenjske dobe je osteoporoza vse večji zdravstveni problem, saj kar 40 do 50 % žensk in 13 do 22 % moških doživi vsaj en zlom kot posledico osteoporoze. Osteoporozni zlomi so ne glede na starost vsaj dvakrat pogostejši pri ženskah, to pa je verjetno posledica manjše mišične mase, daljše življenjske dobe in odsotnosti naglega zmanjšanja endogenih spolnih hormonov pri moških (21).

Osteoporozo delimo na primarno, za katero vzrok še ni poznan, obstaja pa značilna korelacija med njo in pomanjkanjem kalcija, vitamina D in estrogena pri ženskah oziroma testosterona pri moških, ter sekundarno kot posledico druge bolezni ali uporabe nekaterih zdravil (npr. steroidnih antirevmatikov ali antikoagulantov). Primarno osteoporozo nadalje razdelimo na pomenopavzalno ter na juvenilno in senilno (22, 23).

1.2.1. Zdravljenje osteoporoze

Primarni namen zdravljenja osteoporoze je preprečevanje zlomov. V ta namen imamo poleg nefarmakoloških ukrepov (zdrav način prehranjevanja, redna fizična aktivnost, pazljivost pred padci) možnost uporabiti različne skupine zdravil:

- I. Zaviralci kostne resorpcije: hormonsko nadomestno zdravljenje (HNZ), bifosfonati, stroncijev ranelat (povečuje nastajanje osteoblastov), teriparatid (humani rekombinantni parathormon, ki ne zavira resorpcije, temveč povečuje izgradnjo kosti), hormon kalcitonin, selektivni modulatorji estrogenskih receptorjev (SERM; raloksifen, bazedoksifen, lasofoksifen, tamoksifen (ni indiciran pri osteoporozi)) in monoklonska protitelesa (denosumab; zavira osteoklastogenezo)
- II. kalcij, vitamin D in analogi vitamina D (kalcitriol, alfakalcidiol)

Farmakološka terapija je odvisna od stanja bolnika in se lahko izvaja na dva načina. Zdravljenje je potrebno, če je do zloma zaradi osteoporoze že prišlo. V kolikor pa so pri bolniku prisotni dejavniki tveganja (zgodnja menopavza, dedna nagnjenost, uporaba glukokortikoidov itd.) izvajamo le preventivno terapijo. V tabeli 1.1 so učinkovine razdeljene glede na terapevtski namen.

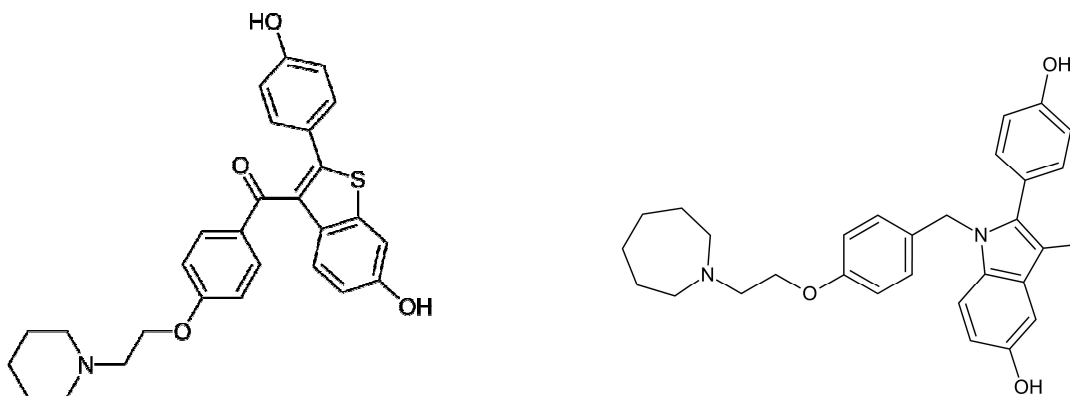
Tabela I: Učinkovine za zdravljenje in preprečevanje osteoporoze po slovenskih smernicah (25)

Zdravila za zdravljenje osteoporoze	Zdravila za preprečevanje osteoporoze
SERM, HNZ, bifosfonati, vitamin D, kalcij, izjemoma kalcitonin	SERM, 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. Aprila 2009 je EMEA odobrila promet z zdravilom Conbriza (Pfizer) z aktivno učinkovino bazedoksifen, na trg pa je zdravilo prišlo oktobra 2010 v Španiji in na Japonskem (24).

1.3. RALOKSIFEN IN BAZEDOKSIFEN

Raloksifen in bazedoksifen spadata med selektivne modulatorje estrogenskih receptorjev, katerih skupna značilnost je, da v nekaterih tkivih delujejo kot agonisti na estrogenskih receptorjih, v drugih pa kot antagonisti. Njuna strukturna formula je predstavljena na sliki 1.1, kjer je razvidno, da imata le manjše razlike v molekularni strukturi.



Slika 1.1: Strukturna formula raloksifena (levo) in bazedoksifena (desno)

Klinično pomembni učinki raloksifena in bazedoksifena se dokazani v naslednjih tkivih:

- I. V kosteh (agonista estrogenskih receptorjev) zmanjšata tako število kot tudi aktivnost osteoklastov ter povečujeta kostno gostoto (zmanjšana resorpcija kosti od 20 % do 25 %). Klinično pomembno povečata kostno gostoto hrbtenice in kolka ter zmanjšata tveganje za vretenčne zlome (do 55%), bazedoksifen pa zmanjšuje tudi incidenco nevretenčnih zlomov za 2 % (23, 26)

- II. V jetrih (agonista estrogenskih receptorjev) raloksifen in bazedoksifen znižata nivo LDL in celokupnega holesterola v plazmi, ob tem pa nivo HDL ostane enak (23, 26).
- III. V maternici (antagonista estrogenskih receptorjev) izkazuje bazedoksifen pomembno prednost pred drugimi SERM, npr. tamoksifenom in raloksifenom, saj ne privede do hiperplazije endometrija, medtem ko je ta pri raloksifenu v primerjavi z ostalimi SERM izražen v manjši meri (23, 27, 26).
- IV. V dojkah (antagonista estrogenskih receptorjev) zmanjšujeta obolevnost za hormonsko odvisnim rakom dojke (oba inhibirata proliferacijo inducirano s 17 β -estradiolom), ne vplivata pa na hormonsko neodvisnega raka dojke (23, 26).

Bazedoksifen in raloksifen se v organizmu vežeta na estrogenske receptorje. Na učinek bazedoksifena in raloksifena v posameznem tkivu naj bi vplivala prisotnost podtipov estrogenskih receptorjev (ER α in ER β), različne koncentracije t.i. »koaktivatorjev« in »kosupresorjev«, različne konformacije encima itd. Čeprav raloksifen in bazedoksifen težko neposredno primerjamo, je bilo ugotovljeno, da ima raloksifen večjo afiniteto do estrogenskih receptorjev (26). Med pomembnejše neželene učinke raloksifena in bazedoksifena lahko štejemo povečanje pojavnosti vročinskih oblivov, kjer je incidenca za oba 13% oziroma dvakrat več kot pri placebo, incidenca globoke venske tromboze pa je pri obeh 0,5%, kar je sicer petkrat več v primerjavi s placebo, vendar pa ta neželeni učinek ni izražen pri sočasnem HNZ (23,25, 26).

1.3.1. Metabolizem raloksifena in bazedoksifena

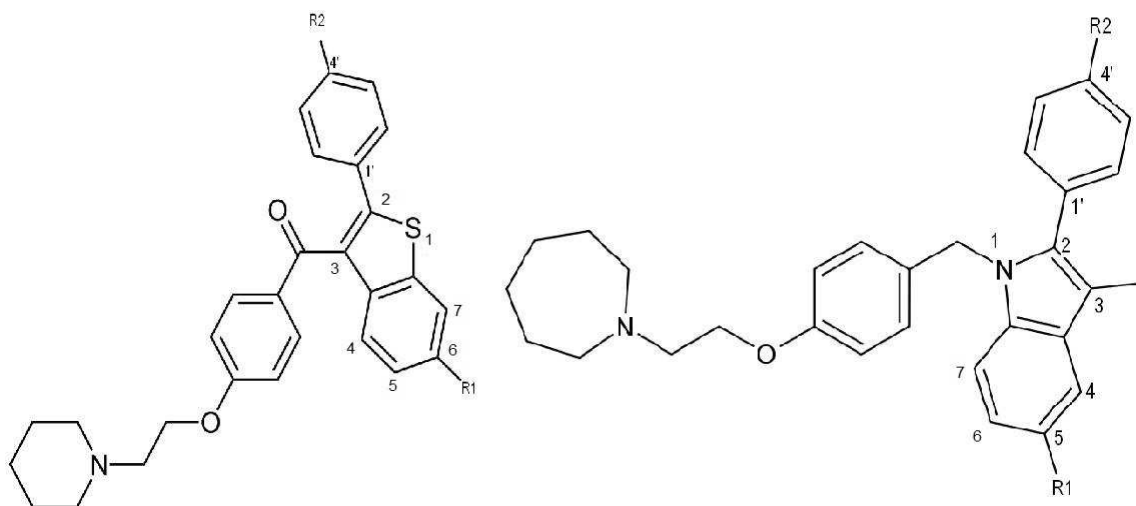
Raloksifen in bazedoksifen sta izpostavljena obsežnemu predsistemskemu metabolizmu, zato je njuna biološka uporabnost po peroralni aplikaciji zelo nizka, in sicer samo 2% pri raloksifenu in 6,2% pri bazedoksifenu. Pri tem se tvorijo predvsem glukuronidi obeh učinkovin, oksidacija s citokromi skupine CYP450 pa je zanemarljiva (27, 28, 31).

Obe učinkovini ter tudi njuni glukuronidi se v velikem obsegu vežejo na plazemske proteine (raloksifen do 95%, bazedoksifen pa celo do 99%), predvsem na albumin, nekaj pa tudi na α 1-kisli glikoprotein (33, 34, 35).

Glukuronidi se tvorijo na mestih 4' (M2) in 6 (M1) molekule raloksifena ter na mestih 4' (M4) in 5 (M5) molekule bazedoksifena, kot je predstavljeno na sliki 1.2.

Klinične študije in večina *in vitro* raziskav so pokazale, da pri metabolizmu raloksifena nastane največ metabolita M2, količina nastalega M1 pa je približno osemkrat manjša. *In vivo* je bilo za bazedoksifen ugotovljeno, da je prevladujoči metabolit bazedoksifen-5-

glukuronid (M5), ki ga v organizmu nastane med 40 in 95%. Bazedoksifen-4'-glukuronida (M4) nastane le med 0 in 20%. *In vitro* (jetrni mikrosomi) pa nastaja predvsem metabolit M4, metabolita M5 pa zelo malo. Plazemski razpolovni čas obeh učinkovin je 28 ur, hkrati pa po enkratnem peroralnem odmerku na časovnem izrisu plazemskih koncentracij obeh učinkovin opazimo več vrhov. To je posledica sistemske interkonverzije in enterohepatičnega kroženja učinkovin in njihovih glukuronidov (30, 31, 32).



	R ₁	R ₂
Raloksifen-6-glukuronid (M1), Bazedoksifen-5-glukuronid (M5)		/
Raloksifen-4'-glukuronid (M2), Bazedoksifen-4'-glukuronid (M4)	/	

Slika 1.2: Metaboliti raloksifena (levo zgoraj) in bazedoksifena (desno zgoraj)

Konjugati raloksifena in bazedoksifena ne predstavljajo neaktivne in izločene učinkovine, ampak transportno obliko, iz katere ponovno nastajata dekonjugirani učinkovini. Odcepitev glukuronske kisline lahko poteče že v centralnem krvnem obtoku, kjer se nahajajo β -glukuronidaze (prisotne so tudi v tarčnih tkivih in jetrih), deloma pa kasneje po izločanju z žolčem v tankem črevesju, kjer se nahajajo bakterijske β -glukuronidaze. Od

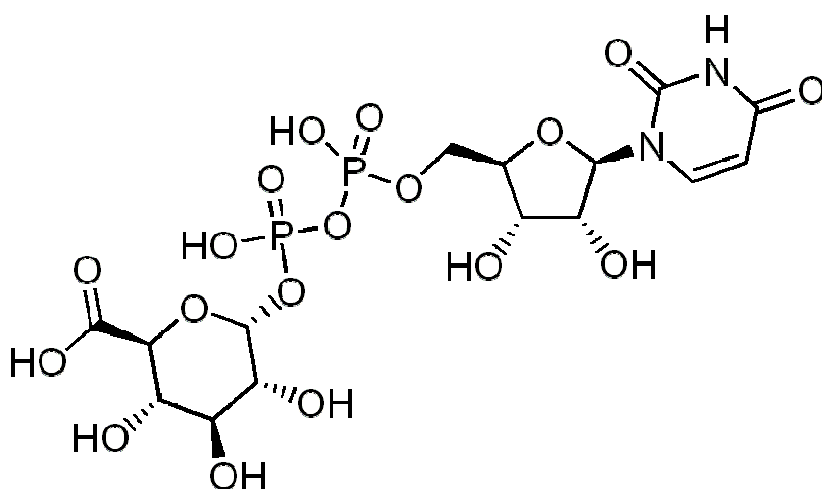
tam se lahko učinkovini ponovno absorbirata nazaj v centralni krvni obtok in tako skleneta enterohepatični cikel. Predvideva se, da poteka metabolizem raloksifena in bazedoksifena v glavnem v steni tankega črevesa in v jetrih, v manjšem obsegu pa tudi v drugih organih (36).

Obe učinkovini izkazujeta veliko variabilnost v plazemskih koncentracijah med posamezniki. Ob določanju farmakokinetičnih parametrov raloksifena so ugotovili visok koeficient variacije plazemskih koncentracij. To je verjetno posledica prepletenosti metaboličnih poti v različnih organih, pri čemer nastane veliko možnosti za izražanje interindividualnih razlik v metabolizmu teh učinkovin (32, 36).

1.4. ENCIMI URIDIN DIFOSFAT GLUKURONOZILTRANSFERAZE

(UGT)

Tvorba glukuronidov je običajno najpogostejša pot druge faze metabolizma ksenobiotikov do nastanka bolj hidrofilnih spojin, ki se v končni fazi metabolizma z urinom in žolčem izločajo iz organizma. Lažje prehajanje spojin v urin in žolč pa ni edina posledica spremembe kemične strukture. Spremeni se tudi biološka aktivnost učinkovin, ki se običajno kaže kot zmanjšana afiniteta za vezavo na receptor. Vzroki za pogostost glukuronidacije in njen velik pomen so velike zaloge glukuronske kisline v jetrih, veliko število funkcionalnih skupin, ki lahko tvorijo glukuronide (fenoli, alkoholi, tioli, karboksilne kisline in amini), in prisotnost UGT encimov po skoraj celotnem organizmu (jetra, črevesje, ledvica, možgani, vranica, nadledvična žleza in priželjce). V reakciji glukuronidiranja pride do kondenzacije ksenobiotika z glukuronsko kislino (UDPGA - uridin difosfat glukuronska kislina, slika 1.3). Reakcijo katalizirajo encimi iz družine UDP-glukuronoziltransferaz (UGT). Pri tem lahko nastanejo O-glukuronidi, N-glukuronidi, S-glukuronidi ali acil-glukuronidi (37).



Slika 1.3: Strukturna formula uridin difosfat glukuronske kisline (UDPGA)

UGT encimi so posledično zelo pomembni pri zmanjševanju toksičnosti določenih spojin (npr. paracetamol, morfin, kloramfenikol,...) in pri preprečevanju akumulacije oz. pri uravnavanju koncentracije določenih endogenih snovi (npr. estrogeni, androgeni, retinoidi, maščobne kisline, tiroksin, bilirubin, žolčne kisline,...) (29, 37).

Tako kot CYP encimi, se tudi UGT encimi v celici večinoma nahajajo v endoplazmatskem retikulumu (ER). Vendar pa v nasprotju s CYP, aktivno mesto na encima ni obrnjeno proti citosolu, temveč v lumen ER. Položaj aktivnega mesta encima je posledica kotranslacijske translokacije polipeptidne verige čez membrano ER. Ta membrana predstavlja difuzijsko bariero tako za substrate, kosubstrat ter UDPGA, kot tudi za nastale metabolite (37).

1.4.1. Klasifikacija

Oznaka naddružine UGT encimov po mednarodni klasifikacije je UGT (E.C. 2.4.1.17).

Stara delitev za sesalske glukuronoziltransferaze glede na homolognost sekvence je bila na dve družini: UGT1 in UGT2. Po novejših ugotovitvah pa so kasneje naddružino razširili na štiri družine (UGT1, UGT2, UGT3 in UGT8) (38, 39).

Glukuronoziltransferaze označujemo z oznako UGT, nato ji sledi številka družine, zatem pa črka, npr. A ali B, kot oznaka poddružine. Za to črko stoji še ena številka, ki označuje točno določeno obliko encima iz iste poddružine (npr. UGT1A4). UGT encime v družine in poddružine razvrščamo glede na zaporedje aminokislin. V družini je enakega vsaj 50 % aminokislinskega zaporedja, v poddružini pa je vsaj 60 %. UDPGA kot substrat najučinkoviteje uporabljata družini UGT1 in UGT2, ki sta zato tudi najpomembnejši pri metabolizmu učinkovin (40).

1.4.2. Izražanje UGT encimov

V organizmu se encimi UGT nahajajo v enterocitih (epitelij tankega in debelega črevesa), v hepatocitih, pljučih, ledvicah in možganih. Iz jeter lahko izoliramo naslednje izoforme iz poddružine UGT1A: UGT1A1, UGT1A3, UGT1A4, UGT1A6, UGT1A9 iz tankega črevesa pa UGT1A1, UGT1A4, UGT1A6, UGT1A7, UGT1A8 in UGT1A10. Zadnji trije izmed naštetih se nahajajo le izven jeter. Encimi družine UGT2 so ravno tako porazdeljeni po različnih tkivih, ob tem pa je največ predstavnikov izraženih le v jetrih: UGT2B4, UGT2B7, UGT2B10, UGT2B11 in UGT2B17. Samo UGT2B4 in UGT2B7 se nahajata tudi v črevesju, v ledvicah pa sta izražena še UGT2B7 in UGT2B11 (41).

Tabela II: Ekspresija UGT encimov v jetrih in tankem črevesju (42)

	Oblika UGT encima															
	UGT 1A1	UGT 1A3	UGT 1A4	UGT 1A5	UGT 1A6	UGT 1A7	UGT 1A8	UGT 1A9	UGT 1A10	UGT 2B4	UGT 2B7	UGT 2B10	UGT 2B11	UGT 2B15	UGT 2B17	UGT 2B28
jetra	✓	✓	✓	✓	✓	✗	✗	✓	✗	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
tanko črevo	✓	✓	✓	✓	✓	✗	✓	✗	✓	✓	✓	✓	✗	✓	✓	✓

V poddružini UGT1A so za glukuronidacijo raloksifena odgovorni encimi UGT1A1 (proizvaja več M1 kot M2), UGT1A8, UGT1A9 in UGT1A10, za glukuronidacijo bazedoksifena pa UGT1A1, UGT1A8 in UGT1A10. UGT1A8 in UGT1A10 nista izražena v jetrih, prispevek izoforme UGT1A9 h glukuronidiranju pa je nizek, tako da je glavni encim odgovoren za glukuronidacijo raloksifena in bazedoksifena UGT1A1 (31, 32).

1.5. FARMAKOKINETIKA IN ENCIMSKA KINETIKA (44)

Farmakokinetika je veda, ki preučuje mehanizme in kinetiko absorpcije, distribucije, metabolizma in eliminacije učinkovine iz telesa (43). S farmakokinetičnimi modeli preučujemo prehajanje in pretvorbo učinkovine v telesu, predvidimo koncentracije učinkovine v različnih tkivih in s tem napovedujemo želen farmakološki učinek in neželene učinke zdravila. V praksi se običajno uporablja za analizo obnašanja zdravilnih učinkovin v organizmu, vendar je princip uporabe splošen in se lahko uporablja tudi za druge snovi (npr. hranila ali toksične spojine).

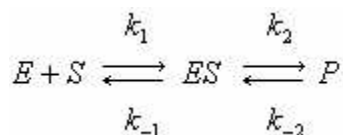
Encimska kinetika je v farmakokinetiki pomembna predvsem pri preučevanju metabolizma. Osredotoča se na časovno odvisne encimske reakcije, kjer preučujemo red

reakcije in vpliv, ki ga ima spreminjanje pogojev na encimsko katalizirano reakcijo. Preučevanje encimskih reakcij na takšen način nam omogoča ugotavljanje mehanizma encimske katalize, vloge encima v metabolizmu, preučevanje regulacije aktivnosti encima ter kar je v našem primeru najpomembnejše, vpliv drugih učinkovin ali spojin na aktivacijo ali inhibicijo encima.

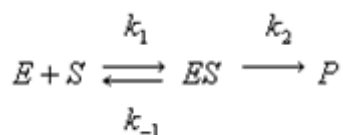
V okviru našega laboratorijskega dela bomo opazovali vpliv 10 različnih prehranskih dopolnil na glukuronidacijo raloksifena in bazedoksifena z encimi UGT. Gre za enosubstratno encimsko katalizirano reakcijo z značilnostmi substratne inhibicije.

1.5.1. Kinetika enosubstratne encimsko katalizirane reakcije

Potek encimsko katalizirane reakcije z enim reaktantom, enim produktom, in le enim vezavnim mestom za substrat je sledeč:



Če se omejimo na začetno obdobje reakcije, ko je koncentracija produkta zanemarljivo majhna in pretvorba produkta v kompleks encim-substrat (ES) zanemarljiva, lahko shemo zgoraj napišemo poenostavljeno:



Ob upoštevanju različnih predpostavk lahko zgornjo shemo pretvorimo v enačbo na več načinov. Tako izpeljana enačba omogoči izračun koncentracije substrata v različnih časovnih točkah, določitev maksimalne hitrosti reakcije (v_{\max}) ter afinitete encima do substrata (K_m). Enačbo je mogoče izpeljati na dva načina, ki temeljita na različnih izhodiščih:

1) Michaelis-Mentenova kinetika temelji na predpostavki, da se ravnotežje med encimom in substratom ter kompleksom encim-substrat (ES) vzpostavi takoj in se nato tudi vzdržuje, na drugi strani pa je razpad kompleksa ES in nastanek produkta prepočasen, da bi vplival na to ravnotežje. Predpostavke, ki jih moramo upoštevati pri uporabi Michaelis-Mentenove enačbe, so naslednje:

- V primerjavi s koncentracijo substrata je koncentracija encima zanemarljivo majhna, tako da se koncentracija substrata med reakcijo ne spreminja.

- Količina nastalega produkta je zanemarljivo majhna. To je sicer res samo v začetnih pogojih, ko hitrost reakcije že lahko izmerimo, količina nastalega produkta pa je še tako majhna, da ta praktično ne prehaja nazaj v kompleks ES.
- Produkt sicer nastaja hitro, vendar veliko počasneje kot razpada kompleks ES na encim in substrat ($k_2 \ll k_{-1}$), zato lahko velja izraz:

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

Hitrost nastajanja kompleksa ES v katerikoli časovni točki (v začetnem obdobju reakcije) je torej enaka $k_1 [E] [S]$, kjer $[E]$ predstavlja koncentracijo prostega encima, $[S]$ pa koncentracijo prostega substrata v tej časovni točki. Analogno 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 .

2) Modifikacija Michaelis-Mentenove enačbe, Briggs-Haldane-ova modifikacija, pa temelji na vzpostavitvi stacionarnega stanja oz. t.i. *steady-state*. Predpostavka je, da se koncentracija kompleksa ES skozi reakcijo ne spreminja in ostaja konstantna - količina kompleksa nastalega iz encima in substrata ter količina razpadlega kompleksa na encim, substrat in produkt je enaka. V primerjavi z Michaelis-Mentenovo enačbo se razlikuje le v zadnji predpostavki, ki pravi, da hitrost nastajanja produkta k_2 ni nujno zelo majhna v primerjavi s k_{-1} , zato velja:

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

V obeh primerih pa lahko izpeljemo temeljno enačbo za opisovanje kinetike enosubstratne encimske reakcije:

$$v_o = \frac{k_2 [E_0] [S_0]}{[S_0] + K_m}, \text{ kjer je:} \quad \text{Enačba 1.1}$$

V_o začetna hitrost reakcije

E_o (začetna) koncentracija encima

S_o začetna koncentracija substrata

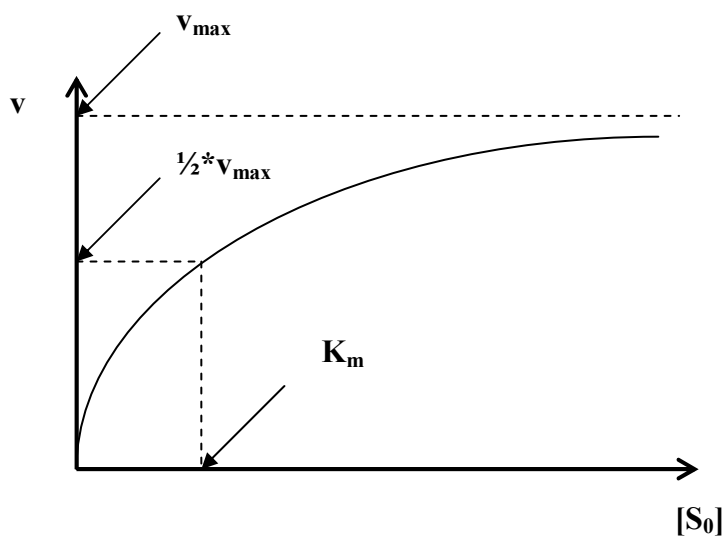
K_m Michaelis- Mentenova konstanta

k_2 konstanta hitrosti razpada kompleksa ES v produkt P

V primeru konstantne koncentracije E_o , lahko enačbo poenostavimo:

$$v_o = \frac{v_{\max} [S_0]}{K_m + [S_0]} \quad \text{Enačba 1.2}$$

Hitrost reakcije v odvisnosti od koncentracije substrata je za ta primer prikazana na sliki 1.4.



Slika 1.4: Hitrost reakcije v odvisnosti od koncentracije substrata glede na enačbo 1.2

1.5.1.1. Encimska inhibicija in aktivacija

Inhibitorji encimov zmanjšajo delovanje encima, aktivatorji pa njegovo delovanje povečujejo. Encimsko inhibicijo lahko razdelimo na reverzibilno (po odstranitvi inhibitorja se aktivnost encima vrne na normalno raven) in ireverzibilno (nepovratno zmanjšano delovanje encima, običajno s kovalentno vezavo inhibitorja). Reverzibilno inhibicijo naprej razdelimo na kompetitivno (poveča se K_M), nekompetitivno (zmanjša se v_{\max}), unkompetitivno (poveča se K_M in v_{\max}) in mešano (poveča se K_M in zmanjša v_{\max}). Aktivacija encima pa je lahko posledica povečane afinitete encima do substrata. Inhibicijo ali aktivacijo encima lahko povzroči tudi sprememba pH (45). Vse našete vplive (z izjemo ireverzibilne inhibicije) na encimsko kinetiko lahko povzročijo tudi prehranska dopolnila.

1.5.1.2. Substratna inhibicija

Za tipično encimsko katalizirano reakcijo je značilno, da se začetna hitrost reakcije z večanjem koncentracije substrata približuje asimptotični vrednosti v_{\max} . V primeru substratne inhibicije pa se začne hitrost pri visokih koncentracijah substrata zmanjševati, namesto nadaljnega približevanja v_{\max} . Povzročitelj te inhibicije je sekundarna molekula substrata, ki s svojo vezavo na aktivni ES kompleks inhibira reakcijo. To je verjetno posledica dveh vezavnih mest za substrat na encimu. Prvo, ki ima veliko afiniteto do

substrata, se zasede že pri nižjih koncentracijah substrata in omogoča normalen potek reakcije po kinetiki enosubstratne encimsko katalizirane reakcije. Drugo mesto, ki ima manjšo afiniteto, se zasede šele pri visokih koncentracijah substrata in ob tem ovira nadaljnji potek reakcije, posledica tega pa je zmanjšana aktivnost encima.

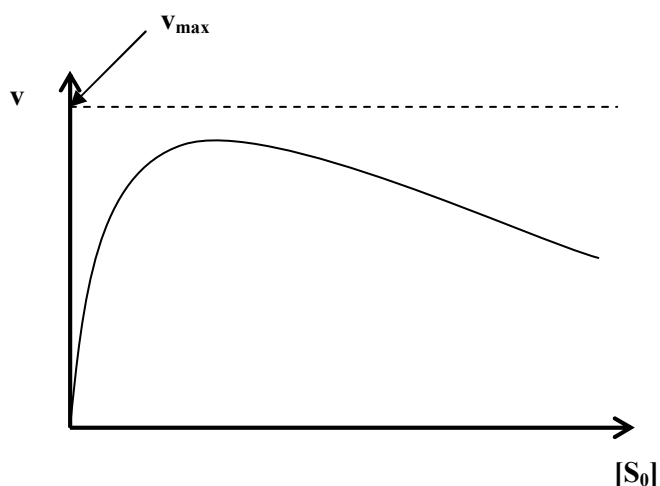
Enačbo za substratno inhibicijo lahko izpeljemo iz Michaelis-Mentenove enačbe ob predpostavki, da je inhibitor neka dodatna, sekundarna molekula substrata, ter da gre za nekompetitivno inhibicijo. Rezultat izpeljave je enačba 1.3:

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

Pri zelo nizkih S_0 je člen S_0/K_i zanemarljivo majhen in izraz lahko poenostavimo v normalno Michaelis-Mentenovo enačbo. Pri visokih S_0 pa nasprotno lahko zanemarimo člen K_m , poenostavljen izraz pa je naslednji (enačba 1.4):

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

Na sliki 1.5, ki prikazuje hitrost reakcije v odvisnosti od koncentracije substrata, je pojav substratne inhibicije viden kot odklon krivulje od asimptotične vrednosti v_{\max} pri višjih vrednostih S_0 .



Slika 1.5: Hitrosti encimske reakcije v odvisnosti od količine substrata ob prisotnosti substratne inhibicije

1.5.2. Določevanje navideznih encimskih parametrov

Navidezni encimski parametri so osnova za preučevanje vpliva drugih substanc na encim, zato jih moramo izračunati iz eksperimentalno pridobljenih podatkov. Obstaja več vrst obdelave teh podatkov, vendar je treba izpostaviti, da različni načini obdelave podatkov lahko pripeljejo do različnih rezultatov, kar je posledica specifičnih napak posamezne metode. Zato je pomembno, da dobljene rezultate tudi ustrezno interpretiramo (46). Končni cilj obdelave eksperimentalno pridobljenih podatkov je izračun parametrov - maksimalne hitrosti reakcije (v_{\max}), konstante substratne inhibicije (k_i), Michaelis-Mentenove konstante (K_m) in intrinzičnega očistka (Cl_i). Te parametre lahko izračunamo z nelinearno regresijo z uporabo najmanjše vsote kvadratov odklonov kot kriterija. Podatke obdelamo s programom Excel z orodjem *Reševalec*. Skozi eksperimentalno izmerjene točke nato program prilega krivuljo, ki sledi enačbi substratne inhibicije, in izračuna navidezne encimske parametre (K_m , K_i , v_{\max} in Cl_i). Intrinzični očistek izračunamo po enačbi 1.5:

$$Cl_{\text{int}} = \frac{v_{\max}}{K_m} \quad \text{Enačba 1.5}$$

Definiran je kot sorazmernostni koeficient med hitrostjo odstranjevanja in koncentracijo substrata v hepatocelularni tekočini (enačba 1.6) (29).

$$Cl_{\text{int}} = \frac{\text{hitrost odstranjevanja}}{[S]} = \frac{v_{\max}}{K_M + [S]} \quad \text{Enačba 1.6}$$

Pri pogojih linearne kinetike, ko je $[S] \ll K_M$, se imenovalec poenostavi in dobimo enačbo 1.7 (29):

$$Cl_{\text{int}} = \frac{v_{\max} * \frac{[mg] \text{ proteinov}}{[g] \text{ tkiva}} * \frac{[g] \text{ tkiva}}{[kg] \text{ telesne teže}}}{K_M} \quad \text{Enačba 1.7}$$

Za obdelavo meritev običajno uporabljamo samo ta način, kljub temu pa je priporočljivo narediti vsaj vizualni pregled ene linearizacijske metode (Lineweaver-Burke-ova enačba, Eadie-Hofstee-jeva enačba, Hanes-ova enačba, Haldane-ovo razmerje). Če namreč opazimo signifikanten odstop krivulje od premice, opazovana encimska reakcija verjetno ni potekala po Michaelis-Mentenovih predpostavkah oziroma imamo opravka z netipično kinetiko (29).

1.5.3. Napovedovanje metaboličnega očistka

Za napovedovanje vpliva prehranskih dopolnil na metabolični očistek 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 (47).

1.5.3.1. Farmakokinetični modeli

Pri ekstrapolaciji rezultatov iz *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 pa 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 1.8:

$$Cl = k_e \times V_D, \text{ kjer je} \quad \text{Enačba 1.8}$$

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

V_D volumen porazdelitve [L];

Izračun očistka s pomočjo fiziološkega modela pa temelji na enačbi 1.9:

$$Cl = Q \times E, \text{ kjer je} \quad \text{Enačba 1.9}$$

Q pretok skozi organ [L/h]

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

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

Za izračun jetrnega očistka učinkovine iz organa lahko uporabimo različne fiziološke modele:

- model dobrega mešanja (ang. »well-stirred model«)

- model vzporednih cevi (ang. »parallel-tube model«)
- disperzijski model (ang. »dispersion model«)

Model dobrega mešanja predpostavlja, da so molekule učinkovine homogeno razporejene po celotnem organu, torej je koncentracija učinkovine po celem organu enaka. Organ 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 organu ne obstaja koncentracijski gradient učinkovine
- koncentracija učinkovine v organu je enaka kot v krvi, ki prihaja iz organa
- linearna kinetika

1.5.4 Intrinzični očištek

Zmožnost organa za odstranjevanje učinkovine prek njenih metabolitov imenujemo intrinzični očištek. Definiran je kot proporcionalna konstanta med hitrostjo odstranjevanja in koncentracijo nevezane učinkovine. Nanaša se na dogajanje znotraj celice in posledično predstavlja vrednost, neodvisno od pretoka krvi skozi organ in vezave na proteine. Intrinzični očištek je rezultat metabolizma in izločanja učinkovine. V pogojih nenasičenosti encimov ga lahko izračunamo po enačbi 1.10:

$$Cl_{\text{int}} = \sum \frac{v_{\text{max}}}{K_m} + \sum \frac{T_m}{K_d}, \text{ kjer je} \quad \text{Enačba 1.10}$$

- T_m največja hitrost prenosa učinkovine
- K_d konstanta disociacije posameznega prenašalca, vpletenega v izločanje učinkovine (48)

1.6. IN VITRO METODE

In vitro metode, ki so cenejše in enostavnejše kot *in vivo* metode, so prva izbira pri raziskavah metabolizma učinkovin. Iz njih pridobivamo prve podatke o kinetiki, obenem pa predstavljajo zaprt sistem z določenim številom spremenljivk. Vendar pa se ravno ti kontrolirani pogoji pomembno razlikujejo od *in vivo* pogojev, kar lahko privede do napačnih rezultatov. Posledica tega je, da *in vitro* raziskavam običajno sledijo še *in vivo* študije. *In vitro* modeli torej poenostavljeno posnemajo pogoje v organizmu. Ločimo med

celičnimi (tkivne rezine, izolirani in kultivirani hepatociti, jetrne celične linije) ter subceličnimi modeli (od najbolj kompleksnega k najenostavnejšemu: jetrni homogenat, S9 frakcija, citosol, mikrosomi, peroksisomi in mitohondriji) (49). Za ugotavljanje vpliva na glukuronidacijo raloksifena in bazedoksifena, smo si kot modelni *in vitro* sistem izbrali človeške jetrne in črevesne mikrosome.

1.6.1. Mikrosomi

Mikrosomi spadajo med subcelične frakcije, ki pa se po definiciji naravno ne nahajajo v celici, temveč so umetno pridobljeni. So majhni membranski vezikli, veliki 20-200 nm. Pridobimo jih iz gladkega endoplazmatskega retikuluma s homogenizacijo tkiva in ultracentrifugiranjem. 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) in epoksidne hidrolaze, ki katalizirajo reakcije prve faze metabolizma, ter glukuronoziltransferaze, esteraze, amidaze, mikrosomalne glutation-S-transferaze (GST) in metiltransferaze, ki katalizirajo reakcije druge faze metabolizma (50, 51). Prednosti uporabe mikrosomov so relativno dobra ponovljivost rezultatov, visoka vsebnost metaboličnih encimov in sorazmerno majhna nespecifična vezava učinkovin. Mikrosomi sicer izkazujejo interindividualno variabilnost, vendar se temu izognemo z združevanjem mikrosomov različnih darovalcev. Njihovo shranjevanje ni problematično (krioprezervacija pri -80°C), tudi po večkratnem odtajanju ni opaziti vpliva na ponovljivost rezultatov. Iz teh razlogov so mikrosomi najpogostejši sistem za *in vitro* preučevanje metabolizma učinkovin (52, 53, 54). Omogočajo napovedovanje poti razgradnje učinkovine in identifikacijo ter pridobivanje standardov metabolitov. Uporabljajo se za določanje parametrov encimske kinetike, določanje fenotipa reakcije, primerjavo metabolizma med različnimi vrstami in za napovedovanje intrinzičnega očistka. Na drugi strani pa se je treba zavedati tudi pomanjkljivosti mikrosomov pri določanju metabolizma učinkovin. To je predvsem slaba *in vitro/in vivo* korelacija zaradi prisotnosti samo CYP in UGT encimov in odsotnosti kompeticije z drugimi encimi. V mikrosomih tudi ni prisotnih N-acetil transferaz (NAT), sulfonil transferaz (ST) in glutation-S-transferaz (GST) encimov ter citosolnih kofaktorjev, zaradi česar ne nastajajo metaboliti, ki bi jih dobili v intaktnih jetrnih in črevesnih celicah. Na izid raziskav lahko močno vplivajo tudi inkubacijski pogoji – ionska moč in pH inkubacijskega medija ter uporabljeno organsko topilo.

Pridobivanje mikrosomov je relativno enostavno. Izolacijo subceličnih frakcij se izvede z razbitjem celic s homogenizacijo v ustreznem puftru, ki ji sledi 20-30 min diferencialnega centrifugiranja od 9 do $20.000 \times g$ (uporaba razlik v gostoti in velikosti delcev). Precipitat se zavrže, supernatant pa ponovno centrifugira, tokrat 60 min na $100.000 \times g$. Tu se zavrže supernatant, precipitat pa resuspendira v fosfatnem puftru, homogenizira in spet centrifugira 60 min na $100.000 \times g$. Supernatant se nato zavrže, v precipitatu pa so izolirani mikrosomi (55).

Težavo pri inkubaciji z mikrosomi predstavlja koncentracija kofaktorjev (alameticin, UDPGA) v inkubatu, zato moramo te običajno dodati v prebitku, kar pa lahko vpliva na rezultate. Dostopnost aktivnega mesta encimov v mikrosomih je naslednja težava, saj je le-to lahko obrnjeno v notranjost mikrosoma, kot je to denimo v našem primeru pri UDP-glukuronoziltransferazi. Dostop do aktivnega mesta skozi difuzijsko bariero oz. membrano mikrosoma lahko prekinemo z močnim ultrazvokom, površinsko aktivnimi snovmi (npr. Brij 58) ali pa posebnim proteinom, ki naluknja membrano mikrosoma - alameticinom. Ta po molekularni strukturi sicer spada med peptide, po farmakološkem delovanju pa ga uvrščamo med antibiotike. Z agregacijo 4 do 6 posameznih molekul v celičnih membranah oblikuje napetostno odvisne ionske kanale, zaradi česar deluje kot antibiotik (zaradi neselektivne toksičnosti se v ta namen ne uporablja), v našem primeru pa bo omogočil dostop substratom in prehranskim dopolnilom do encima oz. njegovega aktivnega mesta (56, 57). V kolikor dostopa substratov in prehranskega dopolnila do aktivnega mesta ne omogočimo, lahko določimo drugačne parametre encimske kinetike od dejanskih. Vzrok za napačne rezultate je lahko tudi vrsta puftra, njegov pH in ionska moč.

Tudi v primeru glukuronidacije na rezultate vpliva obseg vezave na plazemske proteine in mikrosome. Zaradi vseh naštetih faktorjev in neznanega vpliva na delovanje UGT encimov je *in vitro* mehanizem glukuronidacije še posebej težko interpretirati (58).

2. NAMEN DELA

Namen diplomske naloge je preučiti vpliv nekaterih prehranskih dopolnil in zdravil brez recepta (cimicifuga, šentjanževka, ameriški slamnik, ginkgo, baldrijan, česen, glukozamin, koencim Q10, ginseng in soja) na metabolizem raloksifena in bazedoksifena z uporabo človeških jetrnih in črevesnih mikrosomov. Z *in vitro* modelom želimo ugotoviti, če izbrana prehranska dopolnila spremenijo potek glukuronidacije raloksifena in bazedoksifena z UGT encimi. Z merjenjem količine nastalih glukuronidov bomo določili vrednosti navideznih parametrov encimske kinetike v prisotnosti in odsotnosti prehranskih dopolnil. Določiti želimo vrsto (inhibicija ali aktivacija encima, sprememba encimske kinetike) in moč vpliva (določitev parametrov encimske kinetike) na glukuronidacijo z UGT encimi v mikrosomih. Morebitna ugotovljena sprememba v poteku glukuronidacije bi tako lahko dala prve predpostavke o interakcijah raloksifena in bazedoksifena v organizmu s prehranskimi dopolnili in zdravili brez recepta.

3. MATERIALI IN METODE

3.1. MATERIALI

Učinkovini:

- Bazedoksifen, sintetiziran in karakteriziran na Fakulteti za farmacijo, Univerza v Ljubljani; čistost: > 97,5 %.
- Raloksifenijev klorid, 12 tablet Evista[®] (Eli Lilly & Co.), ekstrahiran z metanolom, čistost: > 98,5 %.

Standardi:

- kavna kislina (Caffeic acid, Sigma Aldrich, ZDA)
- hipericin (Hypericin, HWI Analytik GMBH, Nemčija)
- kvercetin (Quercetin dihydrate, Molekula, Anglija)
- kikorna kislina (Chicoric acid, Sigma Aldrich, ZDA)
- valerenska kislina (Valerenic acid, HWI Analytik GMBH, Nemčija)
- S-alil cistein (S-allyl cysteine, Sigma Aldrich, ZDA)
- glukozaminijev hidroklorid (Glucosamine hydrochloride, Sigma Aldrich, ZDA)
- koencimom Q10 (Ubiquinone, Sigma Aldrich, ZDA)
- ginsenzid Rb1 (Ginsenoside Rb1, HWI Analytik GMBH, Nemčija)
- daidzin (Daidzin, Molekula, Anglija)

Prehranska dopolnila:

Uporabljena prehranska dopolnila in zdravila brez recepta so na voljo v prosti prodaji v lekarnah. Za boljše vrednotenje dobljenih rezultatov smo jim določili vsebnost učinkovin oz. jih standardizirali na vsebnost spojin, ki se v farmacevtski industriji uporabljajo za standardizacijo (določanje vsebnosti) ekstraktov. Vsebnost smo določali primarnim raztopinam prehranskih dopolnil, ki smo jih pripravili z raztapljanjem enkratnega odmerka prehranskega dopolnila v 12,5 mL 20% etanola v vodi. S takšnim raztapljanjem smo dosegli, da je bila koncentracija prehranskega dopolnila v končnem inkubatu z najvišjo koncentracijo po vseh redčitvah enaka koncentraciji enkratnega odmerka raztopljenega v 250 mL tekočine.

- Cimicifuga racemosa: Remifemin[®] (registriran kot OTC), Fidimed, deklarirana vsebnost 1 tablete: 0,018 – 0,026 mL tekočega ekstrakta korenine cimicifuge, kar

ustreza 20 mg suhega ekstrakta; odmerek: 1 tableta. Standardizirali smo kavno kislino (Caffeic acid, Sigma Aldrich).

- Šentjanževka: Deprim Forte[®] (reg. kot BRp/p+), Lek, deklarirana vsebnost 1 kapsule: 425 mg standardiziranega suhega izvlečka zeli šentjanževke z 0,75-1,3 mg skupnih hipericinov izraženih kot hipericin; odmerek: 1 kapsula. Standardizacijo smo izvedli s kavno kislino (Caffeic acid, Sigma Aldrich), hipericinom (Hypericin, HWI Analytik GMBH) in kvercetinom (Quercetin dihydrate, Molekula).
- Ameriški slamniki: Immunal Neo[®] (reg. kot OTC), Lek, deklarirana vsebnost: 1 mL peroralne raztopine vsebuje 46,5 mg suhega soka, iztisnjene iz sveže, cvetoče zeli; odmerek: 4mL raztopine. Standardizacijo smo izvedli s kavno kislino (Caffeic acid, Sigma Aldrich) in kikorno kislino (Chicoric acid, Sigma Aldrich).
- Panax ginseng: Herbion[®] Ginseng kapsula 350 mg (reg. kot OTC), Krka, deklarirana vsebnost je 350 mg suhega izvlečka korenine pravega ginsenga oz. najmanj 21 mg ginsenzoidov; odmerek 1 – kapsula. Standardizacijo smo izvedli z ginsenzoidom Rb1 (Ginsenoside Rb1, HWI Analytik GMBH).
- Baldrijan: Baldrimed[®] (reg. kot OTC), Fidimed, deklarirana vsebnost: 450 mg suhega ekstrakta korenine baldrijana; odmerek: 1 tableta. Standardizacijo smo izvedli z valerensko kislino (Valerenic acid, HWI Analytik GMBH).
- Česen: Kyolic[®] Aged Garlic Extract[™] (ni reg.), Wakunaga Nutritional Supplements, deklarirana vsebnost: 1 kapsula vsebuje 300 mg staranega ekstrakta česna. Standardizacijo smo izvedli s S-alil cisteinom (S-allyl cysteine, Sigma Aldrich).
- Glukozamin: Glukozamin Pharma Nord[®] (reg. kot BRp/p+), Pharma Nord, deklarirana vsebnost 1 kapsule je 400 mg glukozamina oz. 509 mg glukozaminijevega sulfata; odmerek: 1kapsula. Standardizacijo smo izvedli z glukozaminijevim hidrokloridom (Glucosamine hydrochloride, Sigma Aldrich).
- Koencim Q10: Quvital[®] 30 mg (ni reg.), Valens, deklarirana vsebnost 1 kapsule je 30 mg koencima Q10; odmerek: 1 kapsula. Standardizacijo smo izvedli s koencimom Q10 (Ubiquinone, Sigma Aldrich).
- Ginkgo biloba: Tebofortin[®] (ni reg.), Schwabe Pharma AG, deklarirana vsebnost: 1 tableta vsebuje 40 mg listnega ekstrakta, ki vsebuje 9,6 mg ginkgovih flavonskih glikozidov in 2,4 mg terpenskih laktonov (ginkgolid, bilobalid); odmerek: 1 tableta. Standardizacijo smo izvedli s kavno kislino (Caffeic acid, Sigma Aldrich) in kvercetinom (Quercetin dihydrate, Molekula).

- Soja: Menal – Fito soja (ni reg.), Davafitto, deklarirana vsebnost 1 kapsule je 17,5 mg izoflavonov; odmerek: 1 kapsula. Standard je bil daidzin (Daidzin, Molekula).

Pripravili smo raztopine prehranskih dopolnil v treh različnih koncentracijah. Ker proizvajalci prehranskih dopolnil priporočajo zaužitje enega odmerka z 250 mL vode, smo to koncentracijo določili kot najvišjo koncentracijo v inkubatu. Za naslednji dve koncentraciji pa smo izbrali še 10 krat in 100 krat redčeno najvišjo koncentracijo. S tem smo želeli zajeti širše območje možnih koncentracij prehranskih dopolnil na mestu poteka encimske reakcije. Volumen raztopine prehranskega dopolnila, ki smo jo dodali v inkubat, je znašal 25 μL (7,5 μL primarne raztopine prehranskega dopolnila in 17,5 μL vode), končni volumen inkubata pa 150 μL . Če smo torej želeli imeti v inkubatu koncentracijo prehranskega dopolnila enako najvišji, smo morali upoštevati dvajsetkratno redčitev. Vse primarne raztopine so imele zato dvajsetkrat višjo koncentracijo od najvišje koncentracije. Za pripravo primarnih raztopin prehranskih dopolnil smo tako en odmerek raztopili v 12,5 mL 20% raztopine etanola v vodi in dobljeno raztopino pustili 1 uro v ultrazvočni kadički. Raztopino smo nato centrifugirali 10 min pri $16.000 \times g$. Supernatant po centrifugiranju je predstavljal primarno raztopino prehranskega dopolnila (dvajsetkrat bolj koncentrirana kot v inkubatih z najvišjo koncentracijo prehranskega dopolnila). Za pripravo 10 krat redčenih raztopin smo 1 mL primarne raztopine z najvišjo koncentracijo odpipetirali v 10 mL bučko in dopolnili z 20% raztopino etanola v vodi do oznake. Za pripravo 100 krat redčenih raztopin pa smo 1 mL primarne raztopine z najvišjo koncentracijo odpipetirali v 100 mL bučko in dopolnili z 20% raztopino etanola v vodi do oznake. Vse raztopine smo nato zaščitili pred svetlobo z aluminijasto folijo in jih shranili pri -20°C do uporabe.

Ostale snovi:

- Mikrosomi; gre za združene mikrosome več različnih darovalcev:
 - I. človeški jetrni mikrosomi (Human liver microsomes CMV negative pooled, BD Biosciences), vsebnost proteinov: 20 mg/mL
 - II. človeški črevesni mikrosomi (Pooled human intestinal microsomes, BD Biosciences), vsebnost proteinov: 10 mg/mL
- Raztopina A (UGT Reaction Mix solution A, BD Biosciences), vsebnost: 25 mM uridin 5'-difosfoglukuronska kislina (UDPGA) v vodi.
- Raztopina B (UGT Reaction Mix solution B, BD Biosciences), vsebnost: 250 mM TRIS-HCl, 40 mM MgCl_2 in 0,125 mg/mL alameticeina v vodi.

- Albumin Abunorm[®] 200 g/L, Octapharma.
- Haloperidol, Sigma Aldrich.
- DMSO – dimetil sulfoksid, 99%, Kemika, M = 78,13 g/mol, $\rho = 1,099 - 1,101$.
- Metanol, Sigma Aldrich.
- Etanol absolut., Sigma Aldrich.
- Bidestilirana voda – mili-Q voda.

3.2. APARATURE

- LC/MS/MS sistem:
 - UPLC: Agilent 1290 Infinity MS
 - Agilent 6460 Triple quad
- Milli-Q Advantage A10 Ultrapure Water Purification System, za pridobivanje bidestilirane vode (Millipore, Bedford, ZDA), Fakulteta za farmacijo, Ljubljana.
- Grelno-hladilna plošča, Cole-Parmer[®], Chilling/Heating Block.
- Termični stresalnik, Tehtnica, Vortemp 56EVC.
- Centrifuga, Tehtnica, Centric 322A.
- Centrifuga Sigma 3K30.
- Ročno mešalo, Tehtnica, Vibromix 114.
- Mešalec Lab dancer, IKA.
- Tehtnica Mettler Toledo AB54-S.
- Mikrotitrne plošče, Eppendorf, Deepwell plate 96/ 1000 μ L, Protein LoBind.
- Mikrotitrne plošče, Agilent 96/ 300 μ L.
- Multipeta, Eppendorf Multipette[®] plus.
- Nastavki za multipeto, Combitips plus 0,1; 1,0; 5 mL.
- Pipete, Eppendorf: 2 – 20 μ l, 2 – 20 μ l, 20 – 200 μ l, 100 – 1000 μ l, 1 – 10 mL.
- Standardna laboratorijska steklovina.

3.3. METODE

Izvedli smo naslednje poskuse:

- I. Ugotavljanje vpliva različnih koncentracij prehranskih dopolnil na metabolizem raloksifena in bazedoksifena na črevesnih in na jetrnih mikrosomih.

- II. Ugotavljanje spremembe farmakokinetičnih parametrov (K_M , k_i , v_{max} , Cl_i) metabolizma raloksifena in bazedoksifena ob prisotnosti prehranskih dopolnil na črevesnih in na jetrnih mikrosomih.

V prvi fazi smo primerjali vpliv treh različnih koncentracij 10 izbranih prehranskih dopolnil na metabolizem raloksifena in bazedoksifena s črevesnimi in jetrnimi mikrosomi s kontrolnim vzorcem, ki je vseboval 6% raztopino etanola v vodi namesto ekstrakta prehranskega dopolnila. Spreminjali smo torej koncentracije prehranskih dopolnil, medtem ko je bila koncentracija učinkovin konstantna. Z dvostranskim t-testom pri $\alpha=0,05$ smo ugotavljali, če je ob prisotnosti prehranskih dopolnil prišlo do statistično značilno višje ali nižje koncentracije nastalih metabolitov testiranih učinkovin.

V drugem delu pa smo se osredotočili na preučevanje kinetike UGT encimov pod vplivom ekstraktov prehranskih dopolnil. Izbrali smo 8 različnih koncentracij raloksifena in bazedoksifena, ki smo jih inkubirali skupaj z najvišjo koncentracijo prehranskih dopolnil. Rezultate (K_M , k_i , v_{max} , Cl_i) smo nato primerjali s kontrolnim vzorcem, ki je namesto prehranskega dopolnila vseboval 6% vodno raztopino etanola, in jih izrazili kot odstotek spremembe očistka.

3.3.1. Priprava raztopin albumina

- **Priprava 2 % raztopine albumina:** v 25 mL bučko smo odmerili 2500 μ L 20 % raztopine albumina, do oznake napolnili z bidestilirano vodo in dobro premešali. To raztopino smo uporabili pri pripravi primarnih raztopin raloksifena in bazedoksifena za inkubate.
- **Priprava 1 % raztopine albumina:** v 25 mL bučko smo odmerili 1250 μ L 20 % raztopine albumina, do oznake napolnili z bidestilirano vodo in dobro premešali. Ta raztopina nam je v nadaljevanju služila za pripravo umeritvene premice, saj je tudi inkubat, ki smo ga vzorčili, vseboval 1% albumina.

3.3.2. Priprava primarnih raztopin učinkovin za preučevanje vpliva različnih koncentracij prehranskih dopolnil na metabolizem

- **Priprava raztopine raloksifena:** Natehtali smo 13,20 mg raloksifena, ga raztopili v 1,07 mL DMSO in dobili 26 mM raztopino raloksifena. V 10 mL bučko smo odpipetirali 231 μ L 26 mM raztopine raloksifena in dodali 2% raztopino albumina do

oznake. Tako smo pripravili 60 μM primarno raztopino raloksifena, v inkubatu pa je bila koncentracija raloksifena 30 μM .

- **Priprava raztopine bazedoksifena;** Zatehtali smo 9,16 mg bazedoksifena in ga raztopili v 1,08 mL DMSO ter dobili 18 mM raztopino bazedoksifena. V 10 mL bučko smo odpipetirali 333 μL raztopine bazedoksifena in dodali 2% raztopino albumina do oznake. Dobili smo 60 μM primarno raztopino bazedoksifena, v inkubatu pa je bila koncentracija bazedoksifena 30 μM .

3.3.3. Priprava primarnih in sekundarnih raztopin učinkovin za določanje kinetike encimske reakcije (tabela III)

- **Primarna raztopina raloksifena:** natehtali smo 13,20 mg raloksifena, ga raztopili v 1,07 mL DMSO in dobili 26 mM raztopino raloksifena. To raztopino smo redčili naprej z DMSO, tako da smo skupaj z začetno dobili 8 različnih koncentracij raloksifena v območju od 0,5 mM do 26 mM (tabela III).
- **Sekundarna raztopina raloksifena:** Sekundarne raztopine smo pripravili tako, da smo 37,5 μL primarne raztopine raloksifena v DMSO dodali k 1837,5 μL 2% vodne raztopine albumina.
- **Primarna raztopina bazedoksifena:** zatehtali smo 9,16 mg bazedoksifena in ga raztopili v 1,08 mL DMSO ter dobili 18 mM raztopino bazedoksifena. To raztopino smo spet redčili naprej z DMSO, tako da smo skupaj z začetno ponovno dobili 8 različnih koncentracij bazedoksifena v območju od 0,5 mM do 18 mM (tabela III).
- **Sekundarna raztopina bazedoksifena:** Sekundarne raztopine smo pripravili tako, da smo 37,5 μL osnovne raztopine bazedoksifena v DMSO dodali 1837,5 μL 2% vodne raztopine albumina.

Tabela III: Koncentracije primarnih in sekundarnih raztopin učinkovin za določanje kinetike in koncentracije v inkubatih

Koncentracija primarne razt. raloksifena (mM)	Koncentracija primarne razt. bazedoksifena (mM)	Koncentracija sekundarne razt. (μM)	Koncentracija v inkubatu (μM)
0,5	0,5	10	5
2	2	40	20
4	4	80	40
6	6	120	60
/	8	160	80
10	10	200	100
/	/	240	120
14	14	280	140
/	/	320	160
18	18	360	180
26	/	520	260

3.3.4. Priprava raztopine metanola s haloperidolom

V 1000 mL bučko smo natehtali 0,5 mg haloperidola in dopolnili z metanolom do oznake. Pripravljena raztopina je imela koncentracijo 0,5 mg/L. To raztopino, ohlajeno na 4°C, smo uporabili za ustavitev encimske reakcije, hkrati pa nam je haloperidol služil kot interni standard.

3.3.5. Priprava raztopin za umeritveno premico

Pripravili smo 16 različnih koncentracij raztopin raloksifena in bazedoksifena v 1% vodni raztopini albumina (tabela IV). Osnovno raztopino raloksifena (26 mM) in bazedoksifena (18 mM) v DMSO smo najprej 100 krat redčili z 1% albuminom, da smo dobili raztopini s koncentracijama 260 μM oz. 180 μM . Ti raztopini smo nadalje redčili 2 krat, 5 krat in 10 krat. 10 krat redčeno raztopino smo nato spet redčili 2 krat, 5 krat in 10 krat ter tak postopek ponovili še trikrat, dokler nismo imeli 16 različno koncentriranih raztopin.

Tabela IV: Koncentracije raloksifena in bazedoksifena v raztopinah za umeritveno premico

Številka raztopine	1	2	3	4	5	6	7	8
Koncentracija raloksifena (μM)	260	180	52	26	13	5,2	2,6	1,3
Koncentracija bazedoksifena (μM)	180	90	36	18	9	3,6	1,8	0,9
Številka raztopine	9	10	11	12	13	14	15	16
Koncentracija raloksifena (μM)	0,52	0,26	0,13	0,052	0,026	0,013	0,0052	0,0026
Koncentracija bazedoksifena (μM)	0,36	0,18	0,09	0,036	0,018	0,009	0,0036	0,0018

3.3.6. Priprava inkubatorov

Sestava inkubatorov, v katerih je potekala reakcija glukuronidacije, je predstavljena na spodnji shemi (slika 3.1), količine vseh sestavin v inkubatih (pri 150 μL) pa v naslednji tabeli (tabela V).

$V(\text{inkubata}) = 150\mu\text{L}$



Sestava:
 25 μL prehranskega dopolnila
 75 μL sekundarne raztopine učinkovine v 2% albuminu
 40 μL zmesi mikrosomov, raztopine B in bidestilirane vode
 10 μL raztopine A
 450 μL metanola s haloperidolom

$V(\text{po ustavitvi reakcije}) = 600\mu\text{L}$



Sestava:
 25 μL prehranskega dopolnila
 75 μL sekundarne raztopine učinkovine v 2% albuminu
 40 μL zmesi mikrosomov, raztopine B in bidestilirane vode
 10 μL raztopine A
 450 μL metanola s haloperidolom

Slika 3.1: Volumen in sestava inkubatorov med in po zaustavitvi reakcije glukuronidiranja

Tabela V: Koncentracije sestavin v inkubatu

Raztopina A	UDPGA	933 mg/L
Raztopina B	Alameticin	23,8 mg/L
	MgCl ₂	720 mg/L
	HCl	5,80 g/L HCl
Mikrosomi	Masa proteinov	Jetni mikrosomi – 381 mg/L; Črevesni mikrosomi – 191 mg/L
Učinkovina v 2% albuminu	Delež albumina	1%
Prehransko dopnilo	Masa etanola	1%

3.3.7. Določanje vpliva različnih koncentracij prehranskih dopolnil na količino nastalih metabolitov raloksifena in bazedoksifena

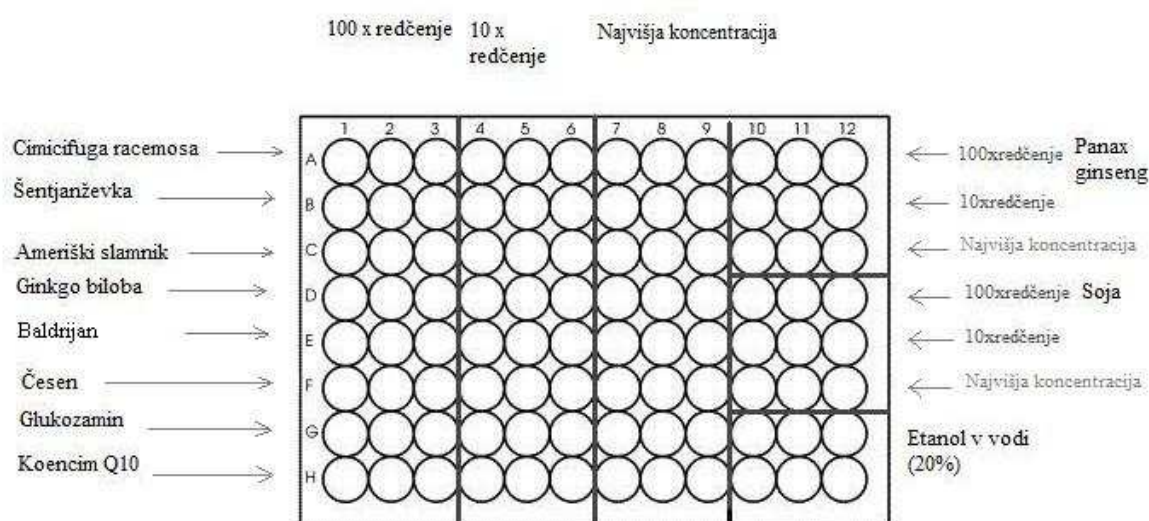
Izvedli smo 4 poskuse:

- I. Inkubacija prehranskih dopolnil, raloksifena in jetrnih mikrosomov,
- II. Inkubacija prehranskih dopolnil, raloksifena in črevesnih mikrosomov,
- III. Inkubacija prehranskih dopolnil, bazedoksifena in jetrnih mikrosomov,
- IV. Inkubacija prehranskih dopolnil, bazedoksifena in črevesnih mikrosomov.

Poskuse smo izvajali v treh paralelkah. Uporabili smo 3 različne koncentracije prehranskih dopolnil (najvišjo ter desetkrat in stokrat nižjo), za kontrolni vzorec, ki je vseboval 1% etanol v vodi pa smo pripravili 6 paralelk. Za en poskus smo tako porabili ravno eno mikrotitrsko ploščo s 96 luknjicami. Inkubate za posamezen poskus (slika 3.2) smo pripravili po naslednjem postopku:

- I. Najprej smo na mikrotitrsko ploščo odpipetirali po 7,5 μ L raztopine prehranskega dopnila z ustrežno koncentracijo (oz. 7,5 μ L 20% etanola v vodi) in 17,5 μ L vode.
- II. Nato smo iz zamrzovalnika (-80°C) vzeli mikrosome, jih odtalili pod tekočo vodo in do uporabe postavili na led.
- III. Sledil je dodatek 75 μ L 60 μ M sekundarne raztopine raloksifena ali bazedoksifena v 2% albuminu.
- IV. Zatem smo pripravili zmes mikrosomov (286 μ L), raztopine B (2857 μ L) in bidestilirane vode (857 μ L). Zmes smo premešali na ročnem mešalu, inkubirali 15 min na ledu, in dodali 40 μ L te zmesi k zmesi prehranskih dopolnil in učinkovine.

- V. Dodatku zmesi mikrosomov je sledila 10 minutna predinkubacija v inkubatorju pri 37°C in hitrosti mešanja 60 obratov na minuto.
- VI. V vsak inkubat smo po 10 minutah predinkubacije dodali 10 µL raztopine A in s tem sprožili reakcijo glukuronidacije. Ploščo smo spet postavili v inkubator pri 37°C in 60 obratih na minuto. Časi inkubacije so bili odvisni od učinkovine in vrste mikrosomov in so bili predhodno določeni. Ob ustavitvi reakcije smo morali namreč zagotoviti pogoje linearne kinetike – vsaj 80% substrata je moralo ostati nespremenjenega. Pri treh poskusih je inkubacija trajala 7 min, razen pri poskusu raloksifena s črevesnimi mikrosomi, kjer je bil čas inkubacij 4 min. Končni volumen inkubata je bil v tem trenutku 150 µL.
- VII. Po pretečenem času inkubacije je sledilo hitro ustavljanje reakcije. Mikrotitrsko ploščo smo postavili na led in dodali 450 µL raztopino metanola s haloperidolom in ploščo dobro premešali. Pazili smo na vrstni red dodajanja raztopine, ki je moral biti enak kot pri dodajanju raztopine A.
- VIII. Po zaustavitvi reakcije smo ploščo ovili s parafilom in zamrznili za 48 ur pri -20°C, pri čemer so se oborili vsi proteini v inkubatu.
- IX. Po dveh dneh smo ploščo centrifugirali 1,5 h pri 4°C in 1200 × g.
- X. Nato smo odpipetirali 100 µL supernatanta v 300 µL mikrotitrsko ploščo ter določili vsebnost učinkovin, nastalih glukuronidov in haloperidola kot internega standarda z LC/MS/MS.



Slika 3.2: Shema poskusa z različnimi koncentracijami prehranskih dopolnil

3.3.8. Določanje kinetike nastajanja metabolitov raloksifena in bazedoksifena v črevesnih in jetrnih mikrosomih pod vplivom prehranskih dopolnil

Poskuse smo za vse kombinacije 8 različnih koncentracij učinkovine in 10 različnih prehranskih dopolnil izvajali v dveh paralelkah. Za preučevanje kinetike smo uporabljali prehranska dopolnila z najvišjo koncentracijo, zaradi predpostavke, da bodo morebitni vplivi pri višji koncentraciji izrazitejši. Pri vsaki koncentraciji učinkovine smo uporabili tudi dva kontrolna vzorca, ki sta namesto prehranskega dopolnila vsebovala samo 20% etanol v vodi in sta služila kot kontrola. Izvedli smo 4 tipe poskusov:

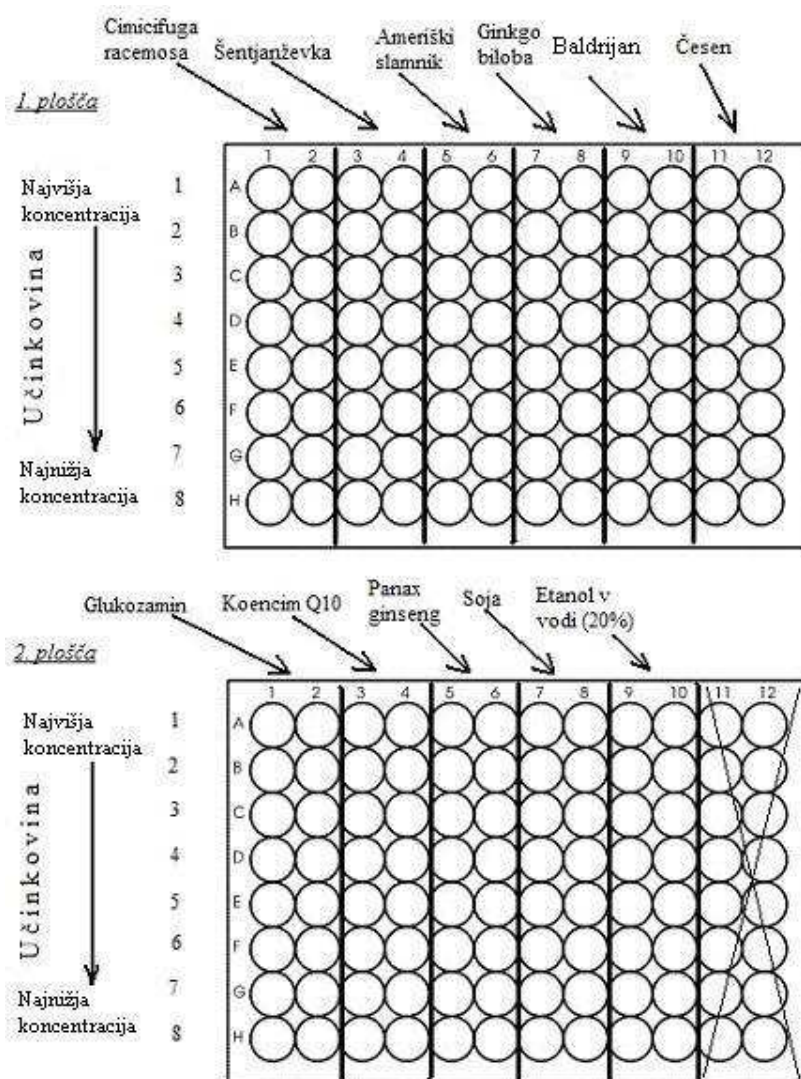
- I. Inkubacija prehranskih dopolnil, raloksifena in jetrnih mikrosomov
- II. Inkubacija prehranskih dopolnil, raloksifena in črevesnih mikrosomov
- III. Inkubacija prehranskih dopolnil, bazedoksifena in jetrnih mikrosomov
- IV. Inkubacija prehranskih dopolnil, bazedoksifena in črevesnih mikrosomov

Inkubate za posamezen poskus (slika 3.3) smo pripravili po naslednjem postopku:

- I. Najprej smo na mikrotitrsko ploščo odpipetirali po 7,5 μL raztopine prehranskega dopolnila z ustrežno koncentracijo (oz. 7,5 μL 20% etanola v vodi) in 17,5 μL vode.
- II. Nato smo iz zamrzovalnika (-80°C) vzeli mikrosome, jih odtalili pod tekočo vodo in do uporabe postavili na led.
- III. Sledil je dodatek 75 μL 60 μM sekundarne raztopine raloksifena ali bazedoksifena v 2% albuminu.
- IV. Zatem smo pripravili zmes mikrosomov (286 μL), raztopine B (2857 μL) in bidestilirane vode (857 μL). Zmes smo premešali na ročnem mešalu, inkubirali 15 min na ledu, in dodali 40 μL te zmesi k zmesi prehranskih dopolnil in učinkovine.
- V. Dodatku zmesi mikrosomov je sledila 10 minutna predinkubacija v inkubatorju pri 37°C in hitrosti mešanja 60 obratov na minuto.
- VI. V vsak inkubat smo po 10 minutah predinkubacije dodali 10 μL raztopine A in s tem sporžili reakcijo glukuronidacije. Ploščo smo spet postavili v inkubator pri 37°C in 60 obratih na minuto. Časi inkubacije so bili odvisni od učinkovine in vrste mikrosomov in so bili predhodno določeni. Ob ustavitvi reakcije smo morali namreč zagotoviti pogoje linearne kinetike – vsaj 80% substrata je moralo ostati nespremenjenega. Pri treh poskusih je inkubacija trajala 7 min, razen pri poskusu

raloksifena s črevesnimi mikrosomi, kjer je bil čas inkubacij 4 min. Končni volumen inkubata je bil v tem trenutku 150 μL .

- VII. Po pretečenem času inkubacije je sledilo hitro ustavljanje reakcije. Mikrotitrsko ploščo smo postavili na led in dodali 450 μL raztopine metanola s haloperidolom in ploščo dobro premešali. Pazili smo na vrstni red dodajanja raztopine, ki je moral biti enak kot pri dodajanju raztopine A.
- VIII. Po zaustavitvi reakcije smo ploščo ovili s parafilmom in zamrznili za 48 ur pri -20°C .
- IX. Po dveh dneh smo ploščo centrifugirali 1,5 h pri 4°C in $1200 \times g$.
- X. Nato smo odpipetirali 100 μL supernatanta v 300 μL mikrotitrsko ploščo ter določili vsebnost učinkovine, nastalih glukuronidov in haloperidola kot internega standarda z LC/MS/MS.



Slika 3.3: Shema poskusa za določanje parametrov encimske kinetike

3.3.9. Analitika

Količino raloksifena, bazedoksifena, haloperidola in nastalih glukuronidov smo merili z LC/MS/MS z naslednjimi komponentami:

- I. UPLC: Agilent 1290 Infinity
- II. Masni spektrometer (MS): Agilent 6460 MSD trojni kvadrupol
- III. Kolona: Kinetex 2,6 μ m C18 (50 \times 2,10 mm), Phenomenex
- IV. Predkolona Security Guard C18 4 \times 2,0 mm

Uporabljena mobilna faza A (vodna faza) je vsebovala 0,1% mravljične kisline v bidestilirani vodi (MilliQ), mobilna faza B (organska faza) pa 0,1 % mravljične kisline v 98 % acetonitrilu. Temperaturo kolone smo ves čas analize ohranjali na 50 °C.

Raloksifen

Volumen injiciranja: 0,1 μ L.

Čas pretoka v MS: 0,7 – 2 min.

Tabela VI: Program gradientnega izpiranja na koloni po injiciranju vzorca

Čas od začetka injiciranja (min)	Delež mobilne faze B (%)	Pretok (mL/min)
0,25	10	0,80
0,50	20	0,65
1,00	30	0,65
1,25	50	0,65
1,70	50	0,65
1,75	10	0,65

Tabela VII: Identifikacija raloksifena in njegovih metabolitov z LC/MS/MS

Analit	MRM prehod (m/z)	Fragmentor	Kolizijska energija (eV)	Polarnost	Retencijski čas (min)
RAL	474,2 \rightarrow 112	200	32	pozitivna	1,433
M1	650,2 \rightarrow 474	200	28	pozitivna	1,073
M2	650,2 \rightarrow 474	200	28	pozitivna	1,209
M3	826,2 \rightarrow 474	200	40	pozitivna	0,906
HAL	376 \rightarrow 165	200	32	pozitivna	1,463

Bazedoksifen

Volumen injiciranja: 0,1 µL.

Čas detekcije na MS: 1,1 – 2 min

Tabela VIII: Program gradientnega izpiranja na koloni po injiciranju vzorca

Čas od začetka injiciranja (min)	Delež mobilne faze B (%)	Pretok (mL/min)
0,25	10	0,80
0,50	20	0,65
1,00	30	0,65
1,80	50	0,65
2,00	50	0,65
2,01	10	0,65
2,50	10	0,65

Tabela IX: Identifikacija bazedoksifena in njegovih metabolitov z LC/MS/MS

Analit	MRM prehod (m/z)	Fragmentor	Kolizijska energija (eV)	Polarnost	Retencijski čas [min]
BAZ	471 → 126	200	32	pozitivna	1,633
M4	647 → 471	200	28	pozitivna	1,296
M5*	647 → 471	200	28	pozitivna	1,567
M6	823 → 471	200	40	pozitivna	-
HAL	376 → 165	200	32	pozitivna	1,502

* $V_{inj.} = 1 \mu L$, čas detekcije na MS = 1,1 – 1,61 min**3.3.10. Urejanje in obdelava podatkov**Izračun intrinzičnega očistka iz *in vitro* podatkov

Podatke smo obdelali s programom Microsoft Excel. Z orodjem »Reševalec« smo zagotovili prileganje krivulje z metodo najmanjših odklonov. Na ta način smo pridobili podatke o v_{max} , K_m in K_i .

Tako pridobljene parametre smo uporabili za izračun intrinzičnega očistka po formuli:

$$Cl_{int} = \frac{v_{max}}{K_m} \quad \text{Enačba 3.1}$$

Izračunali smo očistke za vsak metabolit (M1 in M2 za raloksifen ter M4 in M5 za bazedoksifen) in primerjali rezultate inkubatov z in brez prehranskih dopolnil.

4. REZULTATI IN RAZPRAVA

4.1 Standardizacija ekstraktov prehranskih dopolnil

Rezultati standardizacije prehranskih dopolnil so predstavljeni v tabeli X.

Tabela X: Koncentracije standardov prehranskih dopolnil v osnovnih raztopinah in inkubatih

Prehransko dopolnilo	Standard	Koncentracija v primarni raztopini	Koncentracija v inkubatu (najvišja)	Koncentracija v inkubatu (10 × redč.)	Koncentracija v inkubatu (100 × redč.)
Cimicifuga	Kavna kislina	120 µg/L	6,00 µg/L	0,600 µg/L	0,060 µg/L
Šentjanževka	Kavna kislina	1,99 mg/L	99,5 µg/L	9,95 µg/L	0,995 µg/L
	Hipericin	131 mg/L	6,55 mg/L	655 µg/L	65,5 µg/L
	Kvercetin	146 mg/L	7,30 mg/L	730 µg/L	73 µg/L
Ameriški slamnik	Kavna kislina	7,82 mg/L	391 µg/L	39,1 µg/L	3,91 µg/L
	Kikorna kislina	568 mg/L	28,4 mg/L	2,84 mg/L	284 µg/mL
Ginkgo biloba	Kavna kislina	288 µg/L	14,4 µg/L	1,44 µg/mL	0,144 µg/mL
	Kvercetin	2,40 mg/L	120 mg/mL	12,0 mg/mL	1,20 mg/mL
Zdravilna špajka	Valerenska kislina	37,4 mg/L	1,87 mg/L	187 µg/mL	18,7 µg/mL
Česen	S-alil cistein	141 mg/L	7,05 mg/L	705 µg/L	70,5 µg/mL
Glukozamin	Glukozamin	26,2 g/L	1,31 g/L	131 mg/L	13,1 mg/L
Koencim Q10	Koencim Q10	576 mg/L	28,8 mg/L	2,88 mg/L	288 µg/mL
Panax ginseng	Ginsenzoid Rb1	422 mg/L	21,1 mg/L	2,11 mg/L	211 µg/L
Soja	Daidzin	310 mg/L	15,5 mg/L	1,55 mg/L	155 µg/L

4.2 Določanje vpliva različnih koncentracij prehranskih dopolnil na metabolizem raloksifena in bazedoksifena

Z LC/MS/MS smo izmerili odzive metabolitov v posameznih inkubatih in s pomočjo umeritvene premice izračunali koncentracije nastalih metabolitov. Povprečne koncentracij nastalih metabolitov v 3 paralelkah s prehranskim dopolnilom smo primerjali s povprečjem koncentracij v 6 paralelkah ob odsotnosti prehranskega dopolnila. Primerjali smo količino nastalih produktov, rezultat pa smo izrazili kot odstotek aktivnosti encima glede na kontrolne vzorce. S t-testom smo preverili tudi statistično pomembnost rezultatov

($\alpha=0,05$). Inkubati s p-vrednostjo manjšo od 0,05 izkazujejo statistično pomembno spremembo aktivnosti encima – v tabelah so označeni s sivo barvo. Pri inkubaciji bazedoksifena s črevesnimi mikrosomi metabolit M5 ni nastajal.

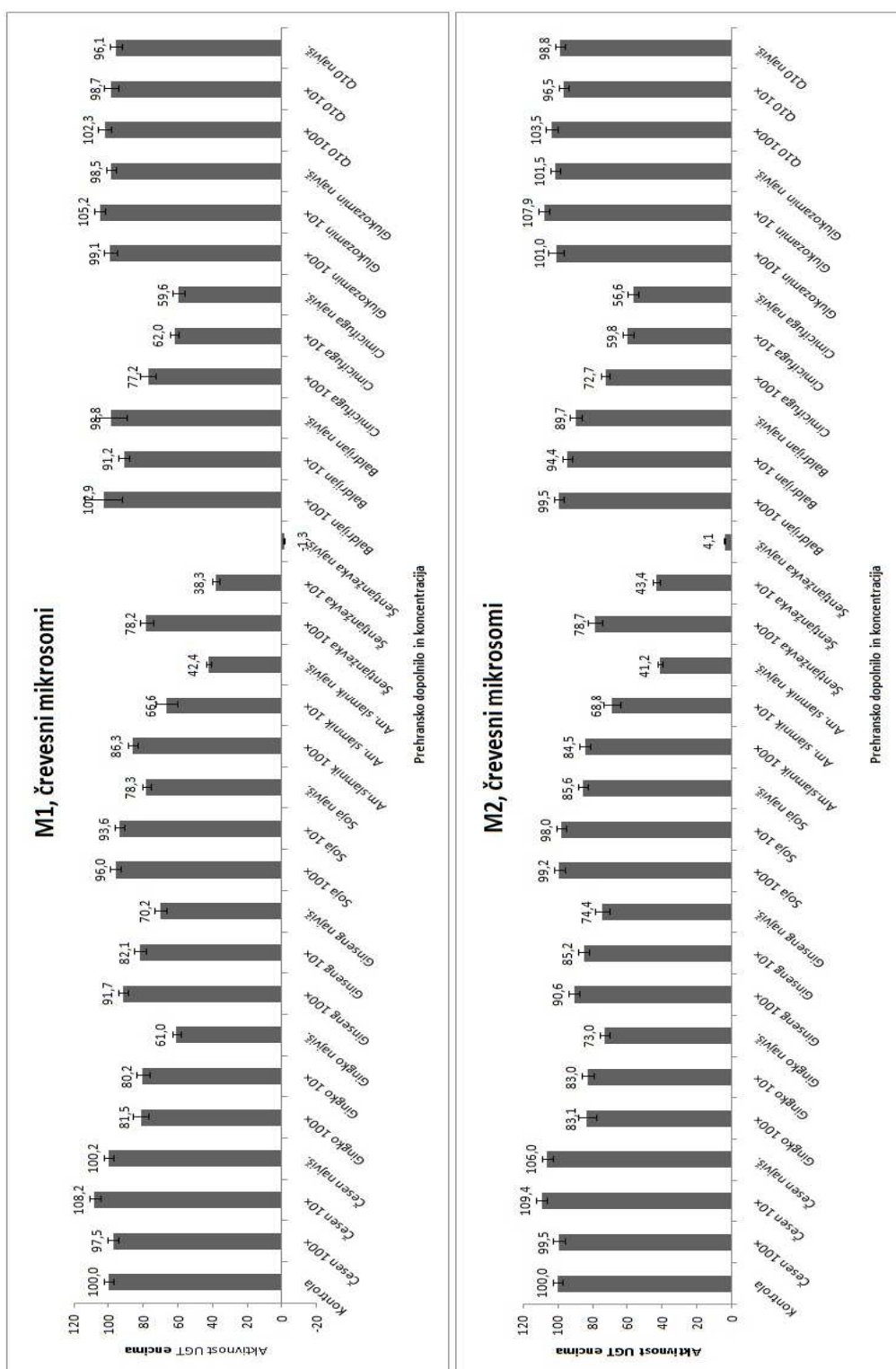
4.2.1 Inkubacija raloksifena s črevesnimi mikrosomi

Tabela XI: Rezultati inkubacije raloksifena s črevesnimi mikrosomi

Vzorec in koncentracija	M1		M2	
	Vrednost p	Sprememba aktivnosti (%)	Vrednost p	Sprememba aktivnosti (%)
Kontrolni vzorec	/	0,00	/	0,00
Česen 100×	0,4301	-2,48	0,8890	-0,45
Česen 10×	0,0252	8,20	0,0101	9,39
Česen najviš.	0,9567	0,16	0,0679	6,04
Ginkgo 100×	0,0021	-18,52	0,0047	-16,87
Ginkgo 10×	0,0007	-19,80	0,0011	-17,00
Ginkgo najviš.	0,0000	-39,04	0,0000	-27,03
Ginseng 100×	0,0230	-8,32	0,0146	-9,40
Ginseng 10×	0,0009	-17,93	0,0018	-14,80
Ginseng najviš.	0,0000	-29,78	0,0002	-25,61
Soja 100×	0,2200	-4,05	0,7941	-0,78
Soja 10×	0,0698	-6,35	0,4938	-2,03
Soja najviš.	0,0001	-21,68	0,0014	-14,39
Am.slamn. 100×	0,0025	-13,66	0,0013	-15,50
Am. slamn. 10×	0,0005	-33,36	0,0003	-31,19
Am. slamn. najviš.	0,0000	-57,60	0,0000	-58,82
Šentjanževka 100×	0,0004	-21,84	0,0005	-21,28
Šentjanževka 10×	0,0000	-61,67	0,0000	-56,63
Šentjanževka najviš.	0,0000	-101,32	0,0000	-95,90
Baldrijan 100×	0,7072	2,91	0,8890	-0,49
Baldrijan 10×	0,0265	-8,76	0,0797	-5,59
Baldrijan najviš.	0,8474	-1,23	0,0331	-10,29
Cimicifuga 100×	0,0006	-22,81	0,0000	-27,31
Cimicifuga 10×	0,0000	-37,95	0,0000	-40,15
Cimicifuga najviš.	0,0000	-40,45	0,0000	-43,41
Glukozamin 100×	0,8074	-0,86	0,7960	0,97
Glukozamin 10×	0,1153	5,18	0,0230	7,95
Glukozamin najviš.	0,6826	-1,51	0,6698	1,51
Q10 100×	0,5204	2,26	0,2771	3,48
Q10 10×	0,7039	-1,33	0,2495	-3,48
Q10 najviš.	0,2567	-3,95	0,6672	-1,23

Iz tabele XI in slike 4.1 je razvidno, da česen (+8% in +9%) ter glukozamin (+5% in +8%) opazno povečata aktivnost encimov, vendar oba samo pri 10 krat redčeni najvišji koncentraciji. Lepo je razvidno, kako ginkgo, ginseng, ameriški slamn. in cimicifuga in šentjanževka že pri najnižjih koncentracijah statistično pomembno zmanjšajo obseg

glukuronidacije tudi za več kot 20%. Vpliv prehranskih dopolnil se nekoliko bolj pozna pri nastajanju M1 kot pri M2.



Slika 4.1: Sprememba aktivnosti encimov pod vplivom prehranskih dopolnil (raloksifen, črevesni mikrosomi)

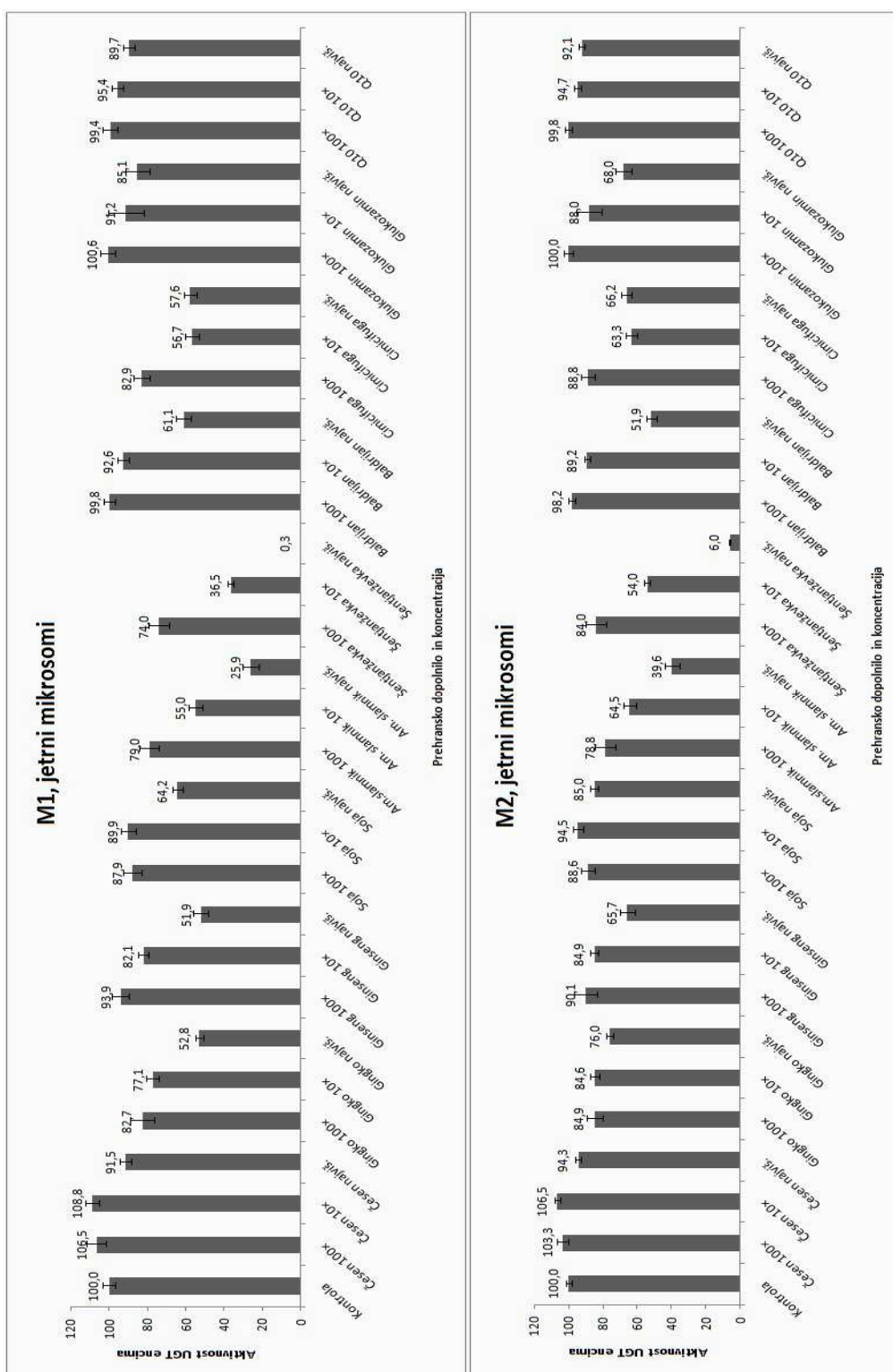
4.2.2 Inkubacija raloksifena z jetrnimi mikrosomi

Tabela XII: Rezultati inkubacije raloksifena z jetrnimi mikrosomi

Vzorec in koncentracija	M1		M2	
	Vrednost p	Sprememba aktivnosti (%)	Vrednost p	Sprememba aktivnosti (%)
Kontrolni vzorec	/	0,00	/	0,00
Česen 100×	0,1618	6,49	0,2592	3,33
Česen 10×	0,0323	8,77	0,0095	6,51
Česen najviš.	0,0343	-8,46	0,0195	-5,66
Ginkgo 100×	0,0108	-17,34	0,0032	-15,10
Ginkgo 10×	0,0003	-22,90	0,0003	-15,35
Ginkgo najviš.	0,0000	-47,18	0,0000	-24,03
Ginseng 100×	0,1611	-6,13	0,0612	-9,95
Ginseng 10×	0,0011	-17,90	0,0002	-15,07
Ginseng najviš.	0,0000	-48,07	0,0000	-34,29
Soja 100×	0,0200	-12,12	0,0085	-11,38
Soja 10×	0,0278	-10,10	0,0569	-5,50
Soja najviš.	0,0000	-35,78	0,0002	-15,02
Am.slamn. 100×	0,0020	-21,04	0,0017	-21,22
Am. slamn. 10×	0,0000	-45,04	0,0000	-35,48
Am. slamn. najviš.	0,0000	-74,11	0,0000	-60,45
Šentjanževka 100×	0,0006	-26,00	0,0056	-16,00
Šentjanževka 10×	0,0000	-63,48	0,0000	-46,00
Šentjanževka najviš.	0,0000	-99,75	0,0000	-93,96
Baldrijan 100×	0,9520	-0,20	0,3869	-1,77
Baldrijan 10×	0,0546	-7,39	0,0007	-10,83
Baldrijan najviš.	0,0000	-38,87	0,0000	-48,12
Cimicifuga 100×	0,0034	-17,07	0,0079	-11,16
Cimicifuga 10×	0,0000	-43,25	0,0000	-36,66
Cimicifuga najviš.	0,0000	-42,42	0,0000	-33,78
Glukozamin 100×	0,8802	0,55	1,0000	0,00
Glukozamin 10×	0,2300	-8,79	0,0527	-12,04
Glukozamin najviš.	0,0213	-14,85	0,0000	-31,97
Q10 100×	0,8763	-0,56	0,9255	-0,18
Q10 10×	0,1924	-4,65	0,0285	-5,33
Q10 najviš.	0,0172	-10,28	0,0036	-7,89

Enako kot pri prejšnjem poskusu, lahko tudi iz tabele XII in slike 4.2 opazimo inhibitorno delovanje ginkga, ginsenga, ameriškega slamnika, cimicifuge in šentjanževke na UGT encime. Zanimivo pa je, da v nasprotju z inkubacijo s črevesnimi mikrosomi, glukozamin (do -32%), soja (-36%) in baldrijan (-48%) tu povzročijo opazen padec aktivnosti. To najverjetneje lahko razložimo z večjim vplivom teh treh prehranskih dopolnil na izoforni UGT1A1 in UGT1A9 kot na izoforni UGT1A8 in UGT1A10, ki ju v jetrih ni. Podobno bi lahko rekli tudi za koencim Q10 (-10%), vendar vpliv vseeno ni tako očiten kot pri prvih

treh. Opazno pa je, da je nastajanje metabolita bolj zmanjšano v primeru M1 kot v primeru M2.

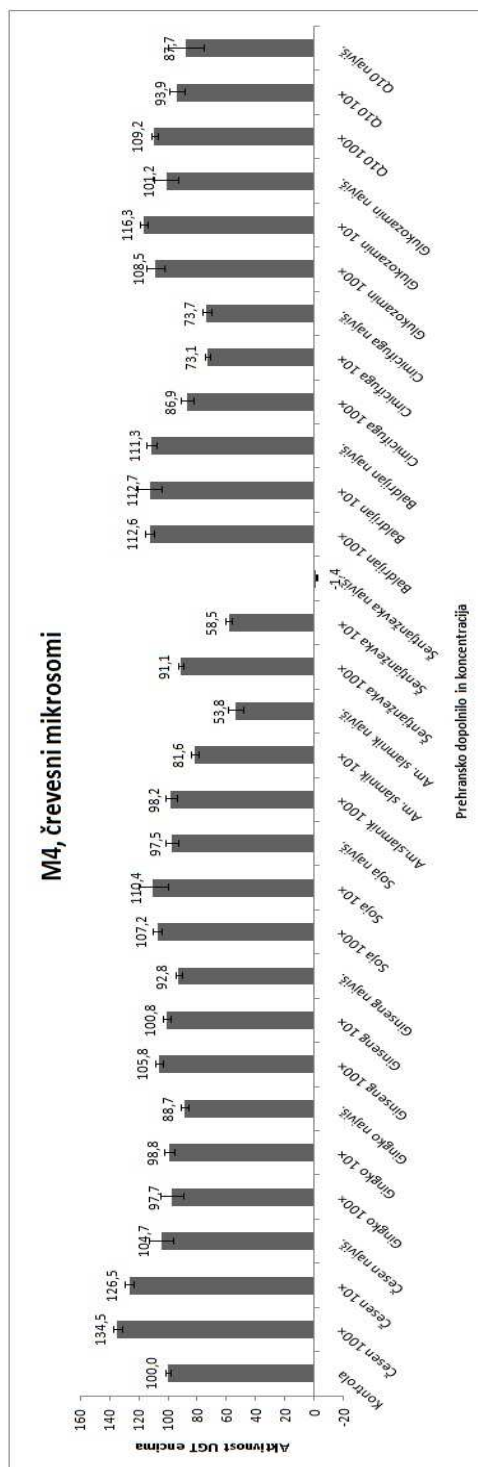


Slika 4.2: Sprememba aktivnosti encimov pod vplivom prehranskih dopolnil (raloksifen, jetrni mikrosomi)

4.2.3 Inkubacija bazedoksifena s črevesnimi mikrosomi

Tabela XIII: Rezultati inkubacije bazedoksifena s črevesnimi mikrosomi

Vzorec in koncentracija	M4	
	Vrednost p	Sprememba aktivnost (%)
Kontrolni vzorec	/	0,00
Česen 100×	0,0003	34,47
Česen 10×	0,0004	26,55
Česen najviš.	0,6080	4,72
Ginkgo 100×	0,7895	-2,25
Ginkgo 10×	0,7500	-1,22
Ginkgo najviš.	0,0106	-11,29
Ginseng 100×	0,0791	5,82
Ginseng 10×	0,8059	0,77
Ginseng najviš.	0,0281	-7,15
Soja 100×	0,0759	7,18
Soja 10×	0,3537	10,44
Soja najviš.	0,5766	-2,54
Am.slamn. 100×	0,6605	-1,84
Am. slamn. 10×	0,0020	-18,35
Am. slamn. najviš.	0,0009	-46,20
Šentjanževka 100×	0,0133	-8,89
Šentjanževka 10×	0,0001	-41,50
Šentjanževka najviš.	0,0000	-101,42
Baldrijan 100×	0,0107	12,59
Baldrijan 10×	0,2172	12,66
Baldrijan najviš.	0,0218	11,31
Cimicifuga 100×	0,0607	-13,09
Cimicifuga 10×	0,0003	-26,85
Cimicifuga najviš.	0,0048	-26,33
Glukozamin 100×	0,2350	8,46
Glukozamin 10×	0,0023	16,31
Glukozamin najviš.	0,8922	1,22
Q10 100×	0,0093	9,21
Q10 10×	0,3406	-6,06
Q10 najviš.	0,3687	-12,32



Slika 4.3: Sprememba aktivnosti encimov pod vplivom prehranskih dopolnil (bazedoksifen, črevesni mikrosomi)

Pri inkubaciji bazedoksifena s črevesnimi mikrosomi smo ugotovili nekoliko manjši vpliv prehranskih dopolnil kot na jetrnih mikrosomih (tabela XIII, slika 4.3). Kljub temu pa lahko tudi tu opazimo nekaj zanimivosti. Opazimo lahko vpliv nižjih koncentracij česna (tudi do 34%) na povečanje aktivnosti encimov. Zopet je viden močan vpliv šentjanževke (popolna inhibicija pri najvišji koncentraciji), vendar pa je pri nižjih koncentracijah vpliv na glukuronidacijo manjši kot pri raloksifenu oz. prejšnjih poskusih. Zmanjšan vpliv smo opazili tudi pri vseh ostalih prehranskih dopolnilih. Vidimo lahko še, da koencim Q10 pri najnižji koncentraciji poveča aktivnost encima (+9%), pri višjih koncentracijah pa zopet zmanjša. Zelo zanimivo je zopet delovanje soje (+10%), baldrijana (+13%) in glukozamina (+16%), saj vsi trije, sicer ne v tolikšnem obsegu kot česen, povzročijo aktivacijo encimov, kar je v nasprotju z inkubacijo jetrnih mikrosomov in raloksifena, kjer je prišlo do padca aktivnosti. Predvsem je ta učinek zanimiv za baldrijan, ki je tudi pri vseh ostalih treh inkubacijah povzročal zmanjšanje aktivnosti encimov, v tem primeru pa ima povsem nasproten učinek.

4.2.4 Inkubacija bazedoksifena z jetrnimi mikrosomi

Tabela XIV: Rezultati inkubacije bazedoksifena z jetrnimi mikrosomi

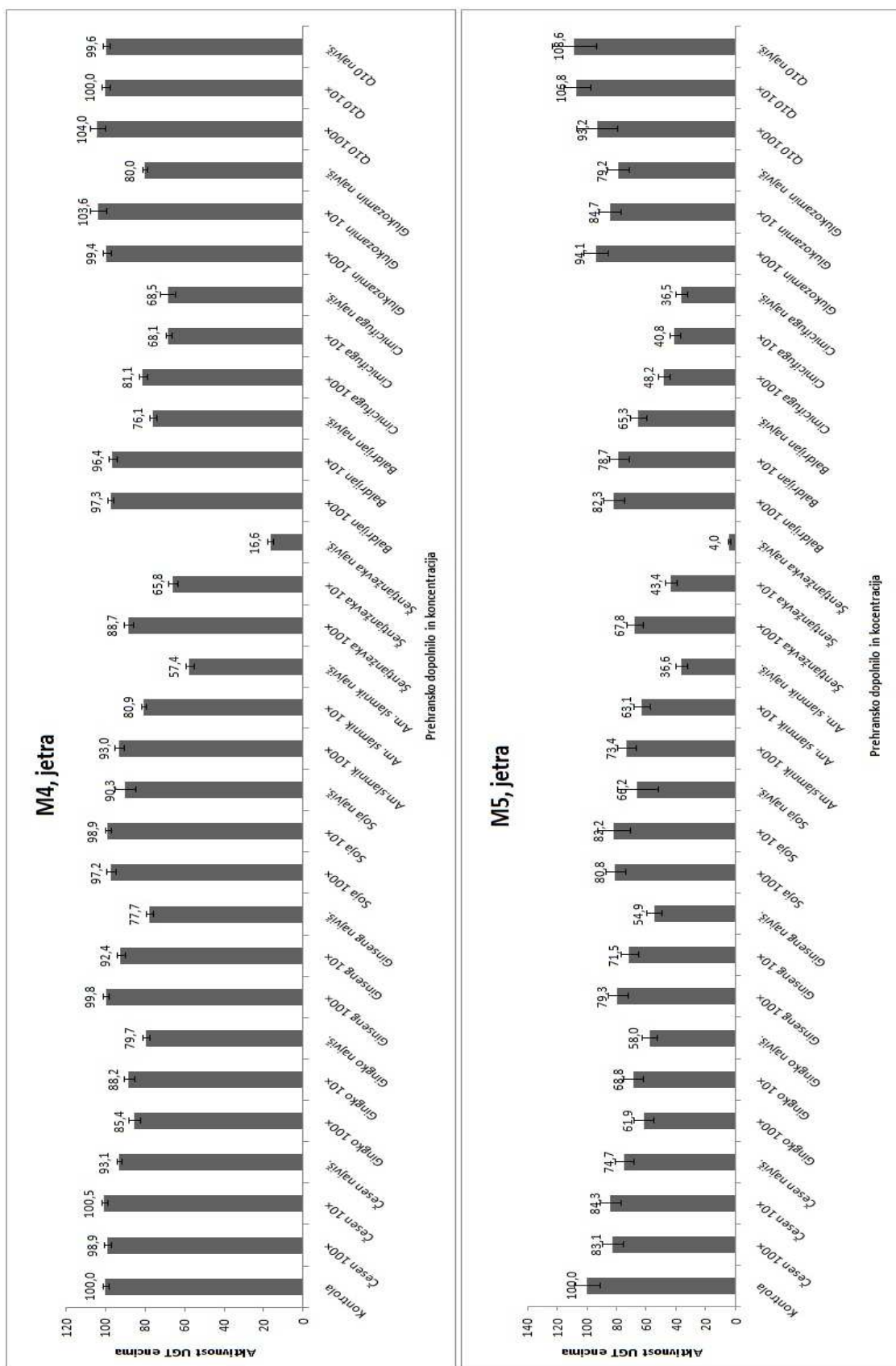
Vzorec in koncentracija	M4		M5	
	p-vrednost	Sprememba aktivnosti (%)	Vrednost p	Sprememba aktivnosti (%)
Kontrolni vzorec	/	0,00	/	0,00
Česen 100×	0,5155	-1,10	0,0938	-16,91
Česen 10×	0,7326	0,51	0,1149	-15,68
Česen najviš.	0,0023	-6,86	0,0226	-25,35
Ginkgo 100×	0,0004	-14,62	0,0042	-38,09
Ginkgo 10×	0,0007	-11,84	0,0104	-31,18
Ginkgo najviš.	0,0000	-20,29	0,0020	-42,02
Ginseng 100×	0,8949	-0,20	0,0491	-20,74
Ginseng 10×	0,0036	-7,60	0,0135	-28,54
Ginseng najviš.	0,0000	-22,30	0,0013	-45,14
Soja 100×	0,1591	-2,84	0,0642	-19,17
Soja 10×	0,4552	-1,14	0,1312	-17,82
Soja najviš.	0,0335	-9,69	0,0257	-33,83
Am.slamnik 100×	0,0088	-7,05	0,0192	-26,58
Am. slamnik 10×	0,0000	-19,13	0,0040	-36,91
Am. slamnik najviš.	0,0000	-42,57	0,0002	-63,35
Šentjanževka 100×	0,0006	-11,35	0,0078	-32,16
Šentjanževka 10×	0,0000	-34,15	0,0003	-56,57
Šentjanževka najviš.	0,0000	-83,38	0,0000	-95,96
Baldrijan 100×	0,1070	-2,69	0,0837	-17,66
Baldrijan 10×	0,0668	-3,56	0,0447	-21,27
Baldrijan najviš.	0,0000	-23,89	0,0053	-34,71

Vzorec in koncentracija	M4		M5	
	p-vrednost	Sprememba aktivnosti (%)	Vrednost p	Sprememba aktivnosti (%)
Cimicifuga 100×	0,0000	-18,93	0,0006	-51,76
Cimicifuga 10×	0,0000	-31,92	0,0003	-59,19
Cimicifuga najviš.	0,0000	-31,49	0,0002	-63,52
Glukozamin 100×	0,7471	-0,55	0,5263	-5,92
Glukozamin 10×	0,2575	3,61	0,1239	-15,32
Glukozamin najviš.	0,0000	-19,96	0,0512	-20,79
Q10 100×	0,1987	4,03	0,5686	-6,83
Q10 10×	1,0000	0,00	0,4602	6,83
Q10 najviš.	0,7761	-0,44	0,4778	8,61

Pri zadnji inkubaciji (tabela XIV, slika 4.4) v tej vrsti poskusov, opazimo zanimiv zasok pri vplivu česna na aktivnost encimov. Nastaja namreč občutno manj M5 (-25%) v primerjavi z M4 (do -7%). Poudariti je treba, da je pri prejšnjih poskusih česen običajno povečeval aktivnost encimov. Na splošno je trend večjega učinka prehranskih dopolnil na M5 kot na M4 opažen tudi pri ostalih prehranskih dopolnilih, saj je nastajanje M5 nekje tudi do štirikrat bolj zmanjšano (npr. ginseng, am. slamnik) kot nastajanje M4.

Pregled rezultatov vseh 4 poskusov, kjer smo določali vpliv različnih koncentracij prehranskih dopolnil na UGT encime, izkazuje trend, da določena prehranska dopolnila vplivajo na spremembo aktivnosti, medtem ko druga ne oz. bistveno manj. Opazimo lahko, da na splošno koencim Q10 nima večjega vpliva na aktivnost encimov UGT, medtem ko ameriški slamnik, šentjanževka in cimicifuga v večini primerov povzročajo močno zmanjšanje aktivnosti encimov. Aktivnost UGT encimov zmanjšujeta tudi ginkgo in ginseng, vendar pa ne v takšnem obsegu kot ameriški slamnik, šentjanževka in cimicifuga. Najbolj ekstremen primer je vsekakor šentjanževka, ki pri najvišjih koncentracijah povzroča popolno inhibicijo encima. Zanimiv primer pa je česen, ki v več primerih povzroči aktivacijo encimov. Vidimo lahko tudi, da so UGT encimi na dodatek prehranskih dopolnil bolj občutljivi, ko je substrat raloksifen. V teh primerih smo namreč opazili več statistično pomembnih vplivov prehranskih dopolnil. Večji vpliv na aktivnosti encimov in posledično zmanjšano nastajanje metabolitov lahko opazimo pri inkubacijah z jetrnimi mikrosomi, manjši pa pri inkubacijah s črevesnimi mikrosomi.

Pri raloksifenu je tako pri črevesnih kot tudi pri jetrnih mikrosomih nastanek M1 zmanjšan v večji meri kot nastanek M2. Vemo, da so v poddružini UGT1A za glukuronidacijo raloksifena odgovorne izoforme 1A1, 1A8, 1A9 in 1A10. Ker je prispevek izoforme UGT1A9 h glukuronidiranju majhen in se encima UGT1A8 in UGT1A10 ne nahajata v



Slika 4.4: Sprememba aktivnosti encimov pod vplivom prehranskih dopolnil (bazedoksifen, jetrni mikrosomi)

jetrih, lahko rečemo, da prehranska dopolnila verjetno še najbolj vplivajo na izoformo UGT1A1. Ravno ta encim namreč proizvaja več M1 kot M2 (31).

Še bolj kot pri raloksifenu za M1, pa je opazen vpliv na nastanek M5 pri bazedoksifenu. Ta metabolit namreč nastaja samo v jetrih preko encimov UGT1A1 (M4 proizvaja poleg izoform 1A1 in 1A10 še izoforma 1A8), kar posledično verjetno pomeni, da sta izoformi UGT1A1 in UGT1A10 najbolj občutljivi na dodatek prehranskih dopolnil (32).

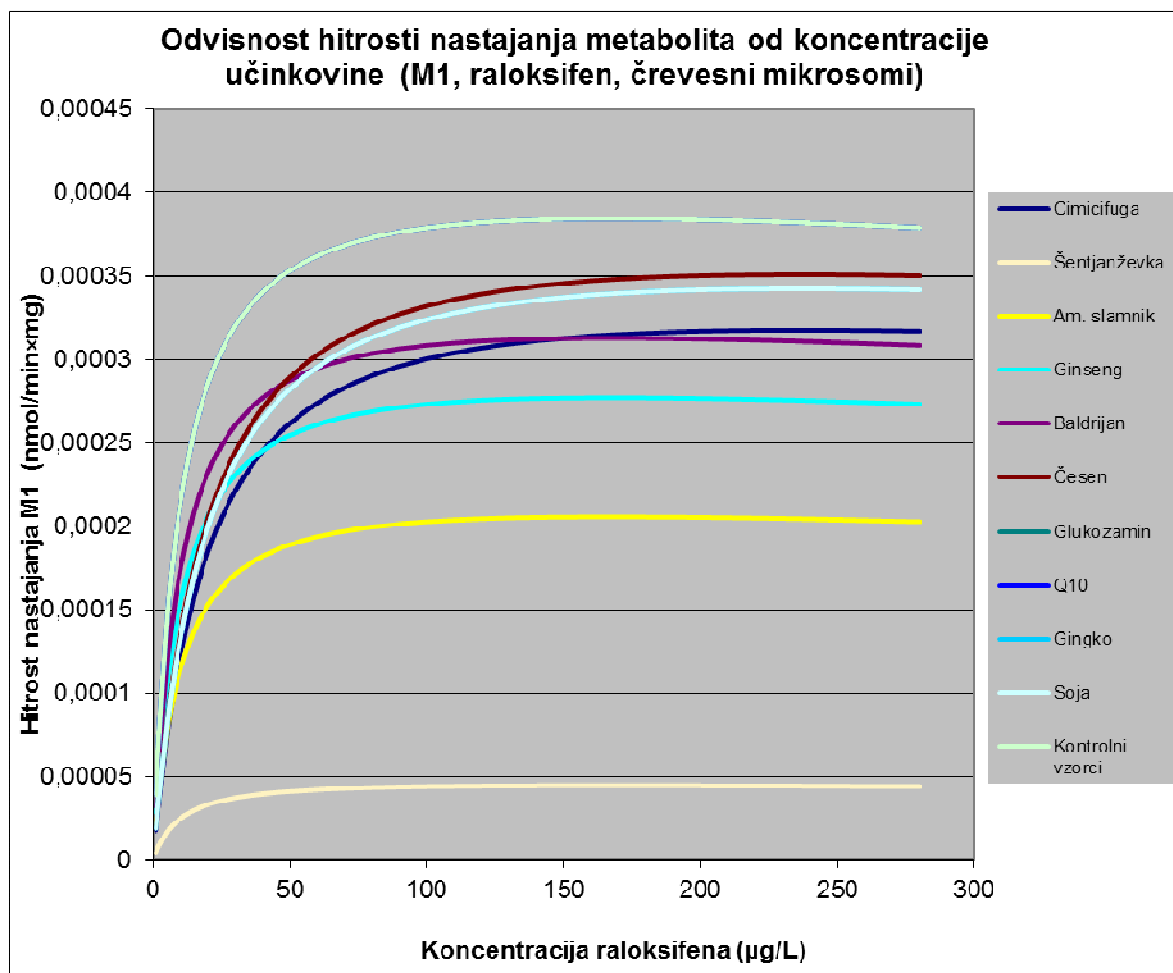
4.3 Določanje kinetike nastajanja metabolitov raloksifena in bazedoksifena v prisotnosti in odsotnosti prehranskih dopolnil

Enako kot pri prejšnjih poskusih smo tudi tu z LC/MS/MS izmerili odzive metabolitov v posameznih inkubatih in preko umeritvene premice izračunali koncentracije nastalih metabolitov. Iz dobljenih koncentracij smo izračunali hitrosti nastajanja metabolitov pod vplivom prehranskih dopolnil tako, da smo koncentracije delili z ustreznim inkubacijskim časom (7 minut, razen v primeru raloksifena in črevesnih mikrosomov, ko je le-ta znašal 4 minute), ki je bil predhodno določen pri časovnem spremljanju nastajanja metabolitov za določen tip mikrosomov in učinkovine. S pomočjo programa »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. Podatke smo obdelali z metodo najmanjših kvadratov odklonov. Rezultate smo predstavili v obliki grafov, ki prikazujejo hitrost nastajanja metabolitov testirane učinkovine v odvisnosti od koncentracije le-te v inkubacijski zmesi in predstavljajo odziv izbranega farmakokinetičnega modela. Posamezen graf predstavlja nastajanje posameznega metabolita pod vplivom prehranskih dopolnil za določen tip mikrosomov in učinkovine. Posamezna točka predstavlja povprečno hitrost nastajanja metabolita v odvisnosti od koncentracije učinkovine, izmerjeno v dveh paralelkah. Krivulje na grafih predstavljajo najboljše prileganje izmerjenim vrednostim in sledijo enačbi za substratno inhibicijo. Končni namen preučevanja kinetike je bila primerjava dobljenih intrinzičnih očistkov za posamezen metabolit v prisotnosti in odsotnosti prehranskih dopolnil.

4.3.1 Inkubacija raloksifena s črevesnimi mikrosomi

Tabela XV: Rezultati inkubacije raloksifena s črevesnimi mikrosomi za M1

Prehransko dopolnilo	Cimicifuga	Šentjanževka	Am. slamniki	Ginseng	Baldrijan
v_{max} (nmol/min)	3,7E-04	5,0E-05	2,3E-04	3,1E-04	3,5E-04
K_M (μ mol/L)	20	10	10	10	10
k_i (nmol/L)	2800	2800	2800	2800	2800
CI (L/min)	1,9E-02	5,0E-03	2,3E-02	3,1E-02	3,5E-02
Sprememba CI (%)	-56,9	-88,4	-46,5	-27,9	-18,6
Česen	Glukozamin	Q10	Ginkgo	Soja	Kontrolni vzorci
4,1E-04	4,3E-04	4,3E-04	4,0E-04	4,0E-04	4,3E-04
20	10	10	20	20	10
2800	2800	2800	2800	2800	2800
2,1E-02	4,3E-02	4,3E-02	2,0E-02	2,0E-02	4,3E-02
-52,3	0,0	0,0	-53,5	-53,5	0,0



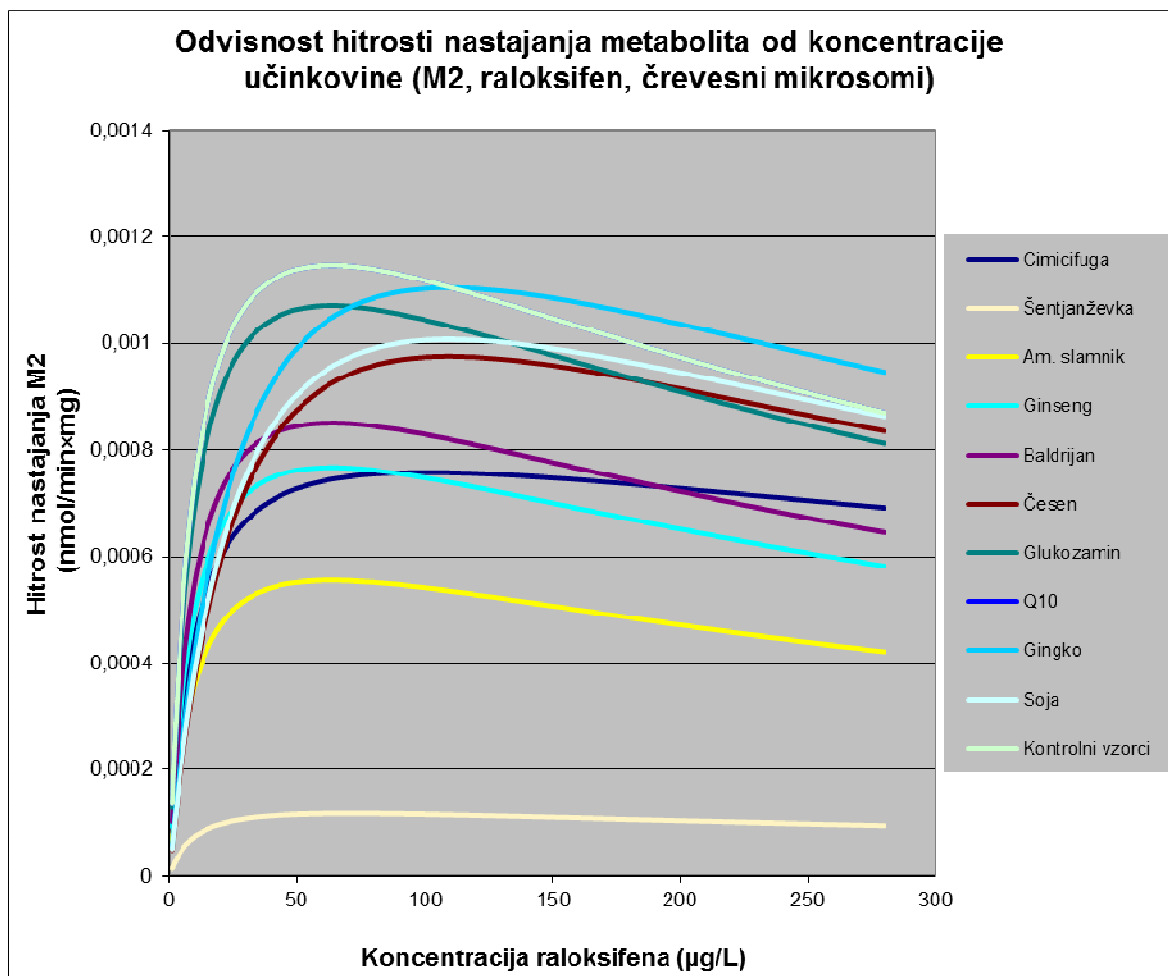
Slika 4.5: Rezultati inkubacije raloksifena s črevesnimi mikrosomi za M1

Iz tabele XV in slike 4.5 lahko razberemo, da cimicifuga, česen, ginkgo in soja za faktor 2 povečajo Michaelis-Mentenovo konstanto, kar pomeni, da zmanjšajo afiniteto encima do raloksifena; učinek, ki je značilen za kompetitivno inhibicijo encima. Očistek reakcije je najnižji pri šentjanževki (-88% vrednosti kontrolnih vzorcev), zelo nizek pa je še pri ameriškem slamniku (-47%). Ti prehranski dopolnili ne spremenita K_M , pač pa v_{max} , torej povzročata nekompetitivno inhibicijo encimov. Enak učinek je sicer opazen tudi pri večini drugih prehranskih dopolnil, vendar ne v tolikšnem obsegu. Pri cimicifugi lahko zaradi spremembe K_M in v_{max} govorimo tudi o mešani inhibiciji.

Tabela XVI: Rezultati inkubacije raloksifena s črevesnimi mikrosomi za M2

Prehransko dopolnilo	Cimicifuga	Šentjanževka	Am. slamnik	Ginseng	Baldrijan
v_{max} (nmol/min)	9,1E-04	1,5E-04	7,3E-04	1,0E-03	1,1E-03
K_M (μ mol/L)	10	10	10	10	10
k_i (nmol/L)	1000	500	400	400	400
CI (L/min)	9,1E-02	1,5E-02	7,3E-02	1,0E-01	1,1E-01
Sprememba CI (%)	-39,7	-90,1	-51,6	-33,1	-25,8
Česen	Glukozamin	Q10	Ginkgo	Soja	Kontrolni vzorci
1,5E-03	1,4E-03	1,5E-03	1,7E-03	1,6E-03	1,5E-03
30	10	10	30	30	10
400	400	400	400	400	400
5,03E-02	1,4E-01	1,5E-01	5,7E-02	5,2E-02	1,5E-01
-66,7	-6,6	0,0	-62,3	-65,6	0,0

V tabeli XVI in na sliki 4.6 lahko vidimo, da česen, ginkgo in soja povzročajo kompetitivno inhibicijo (trikratno povečanje K_M), šentjanževka in ameriški slamnik pa nekompetitivno. Nekompetitivna inhibicija encimov se pojavi tudi pri ginsengu in cimicifugi, zato je pri vseh intrinzični očistek močno zmanjšan. Cimicifuga tudi dvainpolkrat poveča konstanto substratne inhibicije, za 25% pa se le-ta poveča tudi ob dodatku šentjanževke.

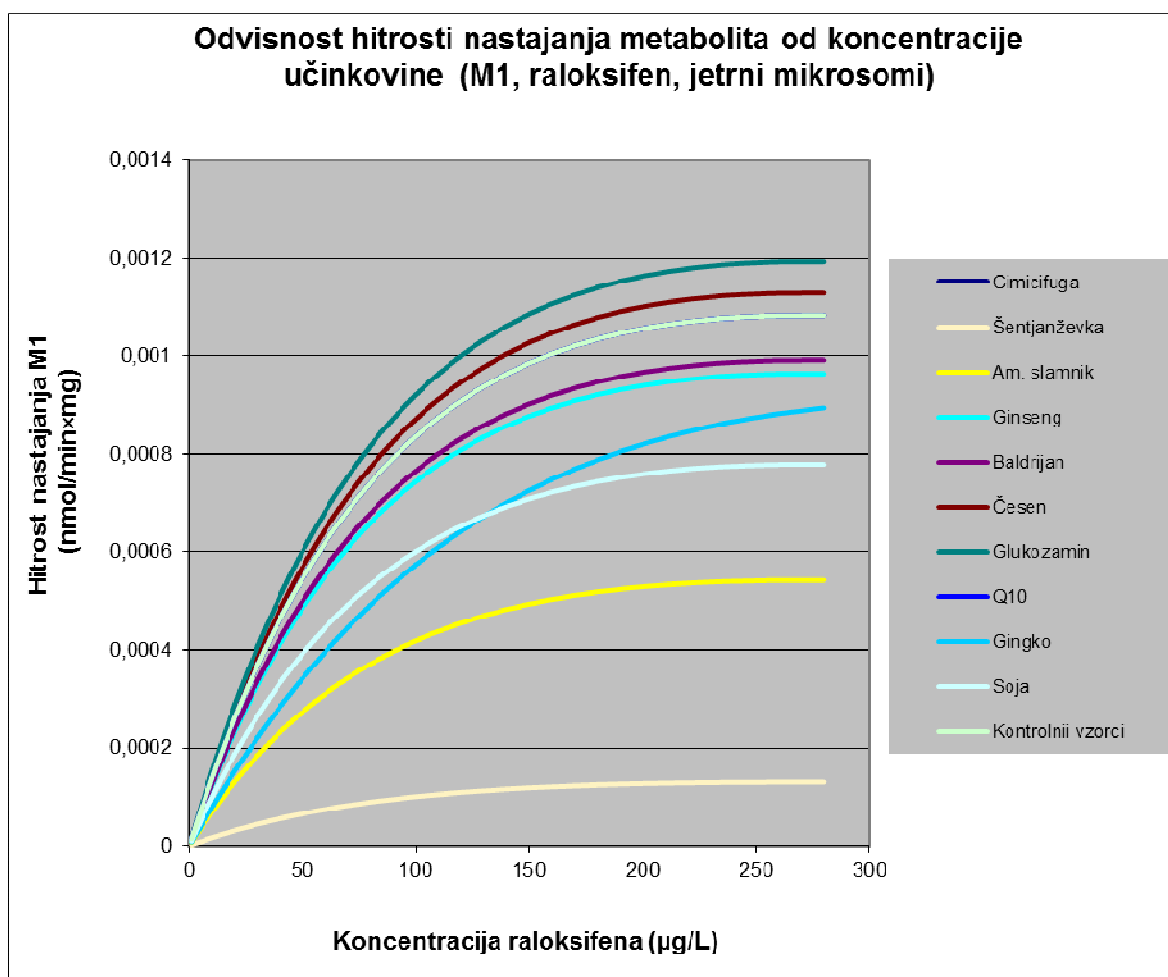


Slika 4.6: Rezultati inkubacije raloksifena s črevesnimi mikrosomi za M2

4.3.2 Inkubacija raloksifena z jetrnimi mikrosomi

Tabela XVII: Rezultati inkubacije raloksifena z jetrnimi mikrosomi za M1

Prehransko dopolnilo	Cimicifuga	Šentjanževka	Am. slamniki	Ginseng	Baldrijan
v_{max} (nmol/min)	2,4E-03	2,9E-04	1,2E-03	2,1E-03	2,2E-03
K_M (µmol/L)	161	161	161	161	161
k_i (nmol/L)	460	460	460	460	460
CI (L/min)	1,5E-02	1,8E-03	7,4E-03	1,3E-02	1,3E-02
Sprememba CI (%)	0,0	-88,0	-49,9	-11,0	-8,5
Česen	Glukozamin	Q10	Ginkgo	Soja	Kontrolni vzorci
2,5E-03	2,6E-03	2,4E-03	2,4E-03	1,7E-03	2,4E-03
161	161	161	290	161	161
460	460	460	460	460	460
1,5E-02	1,6E-02	1,5E-02	8,2E-03	1,1E-02	1,5E-02
4,2	10,2	0,0	-44,5	-28,1	0,0



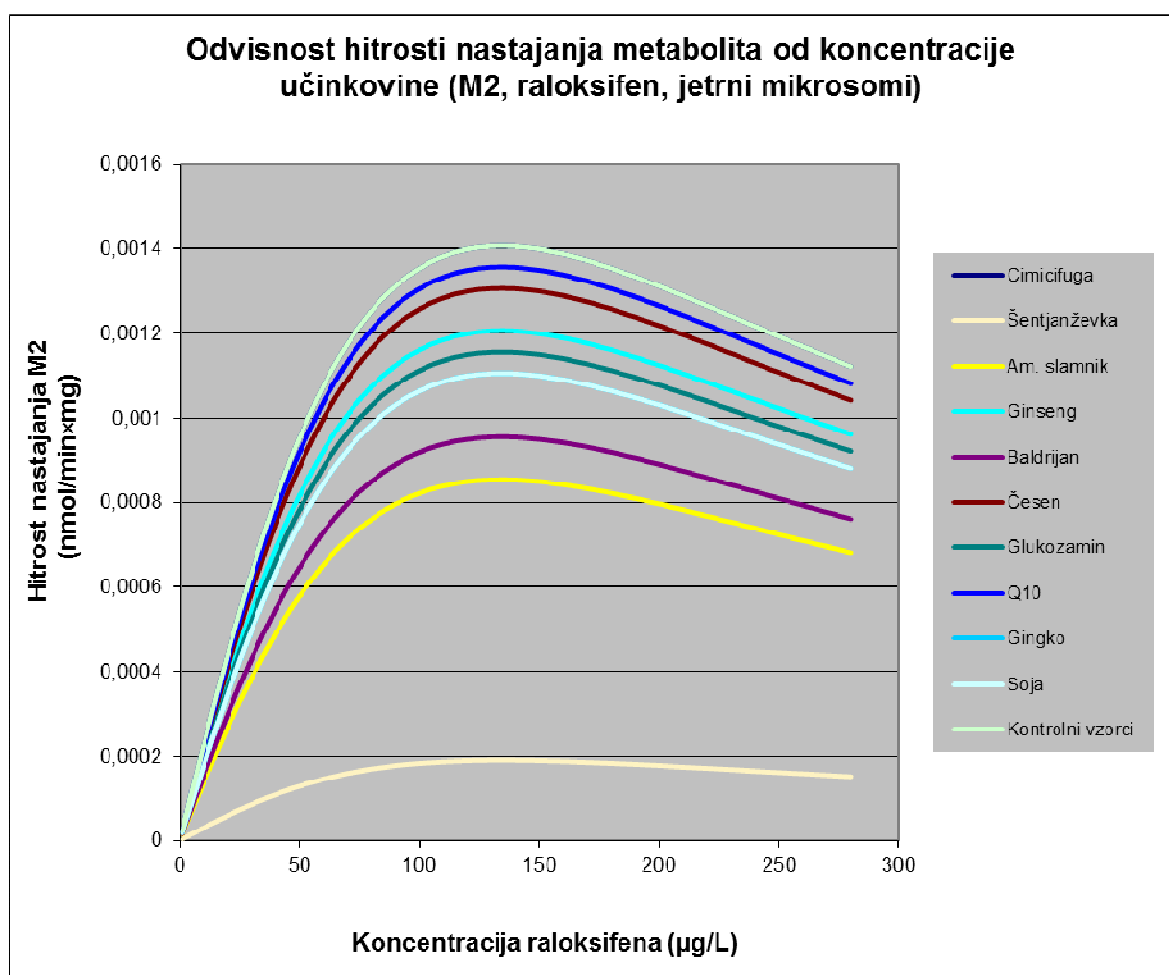
Slika 4.7: Rezultati inkubacije raloksifena z jetrnimi mikrosomi za M1

V tabeli XVII in na sliki 4.7 vidimo, da kompetitivno inhibicijo v tem primeru povzroča samo ginkgo, ki poveča K_M za 80% oz. zmanjša afiniteto substrata do encima. Posledica tega je zmanjšanje intrinzičnega očistka (-44%) do te mere, da lahko vpliv ginkga na intrinzični očistek primerjamo s šentjanževko (-88%) in am. slamnikom (-50%). Opazili nismo nobenega vpliva na konstanto substratne inhibicije, spet pa je vidna nekompetitivna inhibicija šentjanževke in ameriškega slamnika, saj je v_{max} zopet močno znižana. Opazna je aktivacija encima s strani glukozamina, ki celo poveča v_{max} , posledica pa je večji intrinzični očistek raloksifena.

Tabela XVIII: Rezultati inkubacije raloksifena z jetrnimi mikrosomi za M2

Prehransko dopolnilo	Cimicifuga	Šentjanževka	Am. slamnik	Ginseng	Baldrijan
v_{max} (nmol/min)	1,4E-02	1,9E-03	8,5E-03	1,2E-02	9,5E-03
K_M (μ mol/L)	600	600	600	600	600
k_i (nmol/L)	30	30	30	30	30
CI (L/min)	2,3E-02	3,2E-03	1,4E-02	2,0E-02	1,6E-02
Sprememba CI (%)	0,0	-86,4	-39,3	-14,3	-32,1

Česen	Glukozamin	Q10	Ginkgo	Soja	Kontrolni vzorci
1,3E-02	1,2E-02	1,4E-02	1,1E-02	1,1E-02	1,4E-02
600	600	600	600	600	600
30	30	30	30	30	30
2,2E-02	1,9E-02	2,3E-02	1,8E-02	1,8E-02	2,3E-02
-7,1	-17,9	-3,6	-21,4	-21,4	0,0



Slika 4.8: Rezultati inkubacije raloksifena z jetrnimi mikrosomi za M2

V primeru inkubacije raloksifena in jetrnih mikrosomov ni opaziti kompetitivne inhibicije za nastajanje M2 (tabela XVIII in slika 4.8), spet pa je izražena močna nekompetitivna inhibicija s strani šentjanževke in ameriškega slamnika ter tudi baldrijana (-32%).

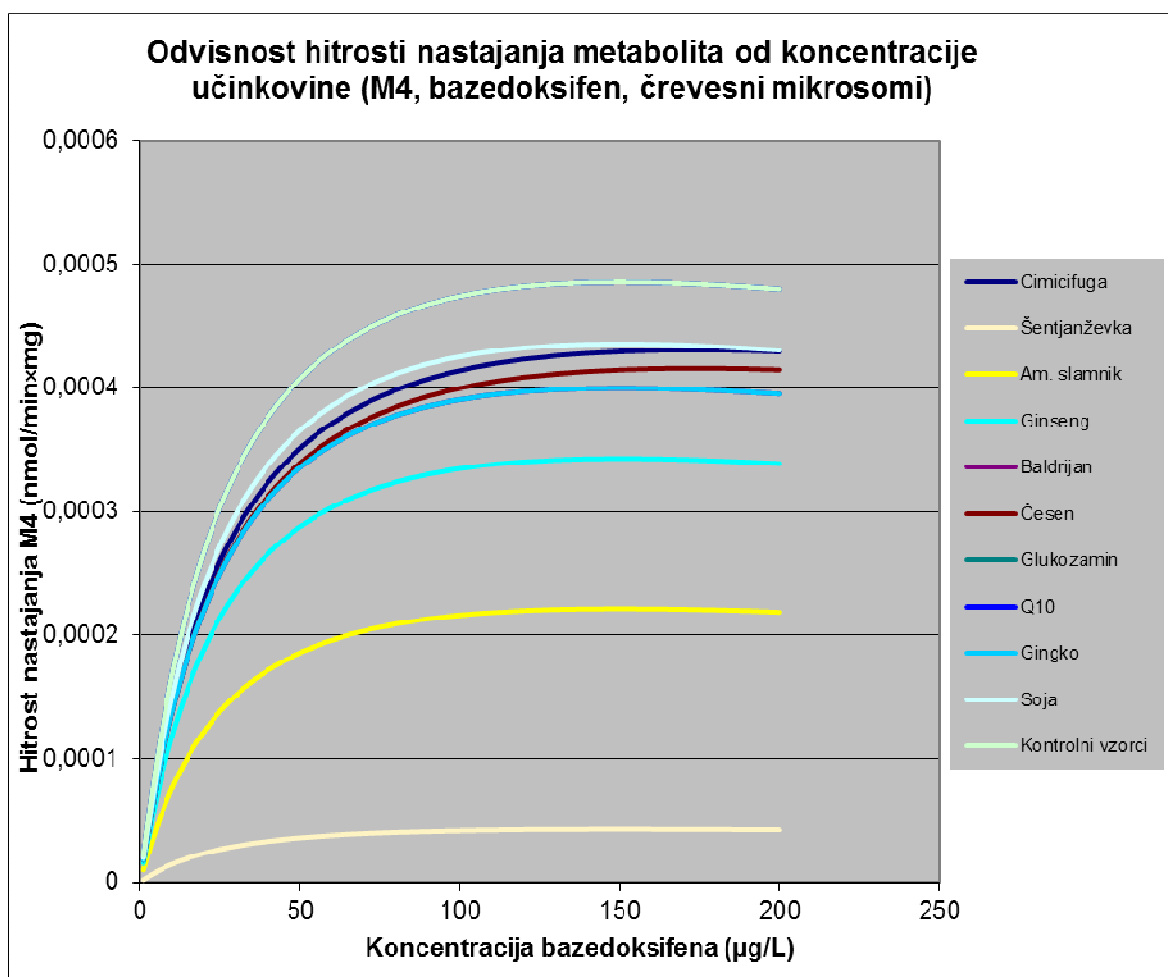
Če na tem mestu na kratko povzamemo vplive prehranskih dopolnil na nastajanje metabolitov raloksifena, lahko zaključimo, da ginkgo najverjetneje povzroča kompetitivno inhibicijo v delovanju UGT encimov, še posebej je to vidno pri črevesnih mikrosomih ter metabolitu M1. Iz tega opažanja lahko sledi, da ginkgo kompetitivno manj inhibira izoformo UGT1A9, bolj pa izoformo UGT1A1 ter izoformi UGT1A8 in UGT1A10, ki pa se nahajata samo v črevesnih mikrosomih in proizvajata predvsem M2. Poudariti moramo še, da tako šentjanževka kot ameriški slamnik povzročata močno nekompetitivno inhibicijo, ne glede na vrsto mikrosomov.

4.3.3 Inkubacija bazedoksifena s črevesnimi mikrosomi

Tabela XIX: Rezultati inkubacije bazedoksifena s črevesnimi mikrosomi za M4

Prehransko dopolnilo	Cimicifuga	Šentjanževka	Am. slamnik	Ginseng	Baldrijan
v_{max} (nmol/min)	5,8E-04	6,0E-05	3,1E-04	4,8E-04	5,6E-04
K_M (μmol/L)	30	30	30	30	30
k_i (nmol/L)	1000	750	750	750	750
CI (L/min)	1,9E-02	2,0E-03	1,0E-02	1,6E-02	1,9E-02
Sprememba CI (%)	-14,7	-91,2	-54,4	-29,4	-17,7
Česen	Glukozamin	Q10	Ginkgo	Soja	Kontrolni vzorci
5,6E-04	6,8E-04	6,8E-04	5,6E-04	6,1E-04	6,8E-04
30	30	30	30	30	30
1000	750	750	750	750	750
1,9E-02	2,3E-02	2,3E-02	1,9E-02	2,0E-02	2,3E-02
-17,7	0,0	0,0	-17,7	-10,3	0,0

V tabeli XIX in na sliki 4.9 ni opaziti kompetitivne inhibicije, saj je K_M povsod enaka. Opazimo lahko rahlo povečanje konstante substratne inhibicije v primeru cimicifuge in česna, spet pa je očitno zmanjšanje v_{max} pri šentjanževki (-91% glede na kontrolno vrednost), ameriškemu slamniku (-54%) ter tudi ginsengu (-29%), ki povzročajo nekompetitivno inhibicijo UGT encimov.

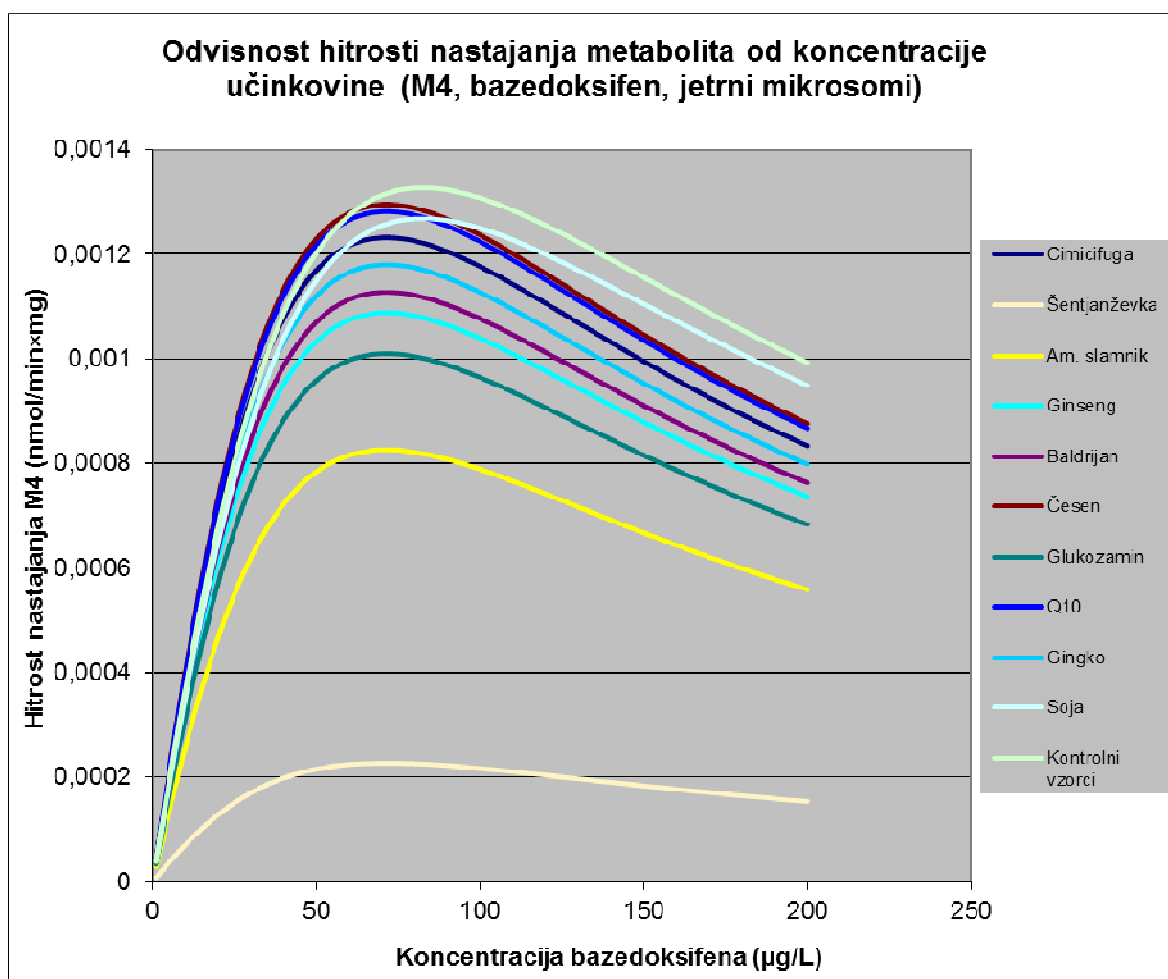


Slika 4.9: Rezultati inkubacije bazedoksifena s črevesnimi mikrosomi za M4

4.3.4 Inkubacija bazedoksifena z jetrnimi mikrosomi

Tabela XX: Rezultati inkubacije bazedoksifena z jetrnimi mikrosomi za M4

Prehransko dopolnilo	Cimicifuga	Šentjanževka	Am. slamniki	Ginseng	Baldrijan
v_{\max} (nmol/min)	7,1E-03	1,3E-03	4,8E-03	6,0E-03	6,5E-03
K_M ($\mu\text{mol/L}$)	170	170	170	170	170
k_i (nmol/L)	30	30	30	30	30
CI (L/min)	4,2E-02	7,7E-03	2,8E-02	3,7E-02	3,8E-02
Sprememba CI (%)	4,4	-80,8	-30,0	-7,8	-4,5
Česen	Glukozamin	Q10	Ginkgo	Soja	Kontrolni vzorci
7,5E-03	5,8E-03	7,4E-03	6,8E-03	6,5E-03	6,8E-03
170	170	170	170	170	170
30	30	30	30	40	40
4,4E-02	3,4E-02	4,3E-02	4,0E-02	3,8E-02	4,0E-02
9,7	-14,4	8,6	0,0	-4,4	0,0



Slika 4.10: Rezultati inkubacije bazedoksifena z jetrnimi mikrosomi za M4

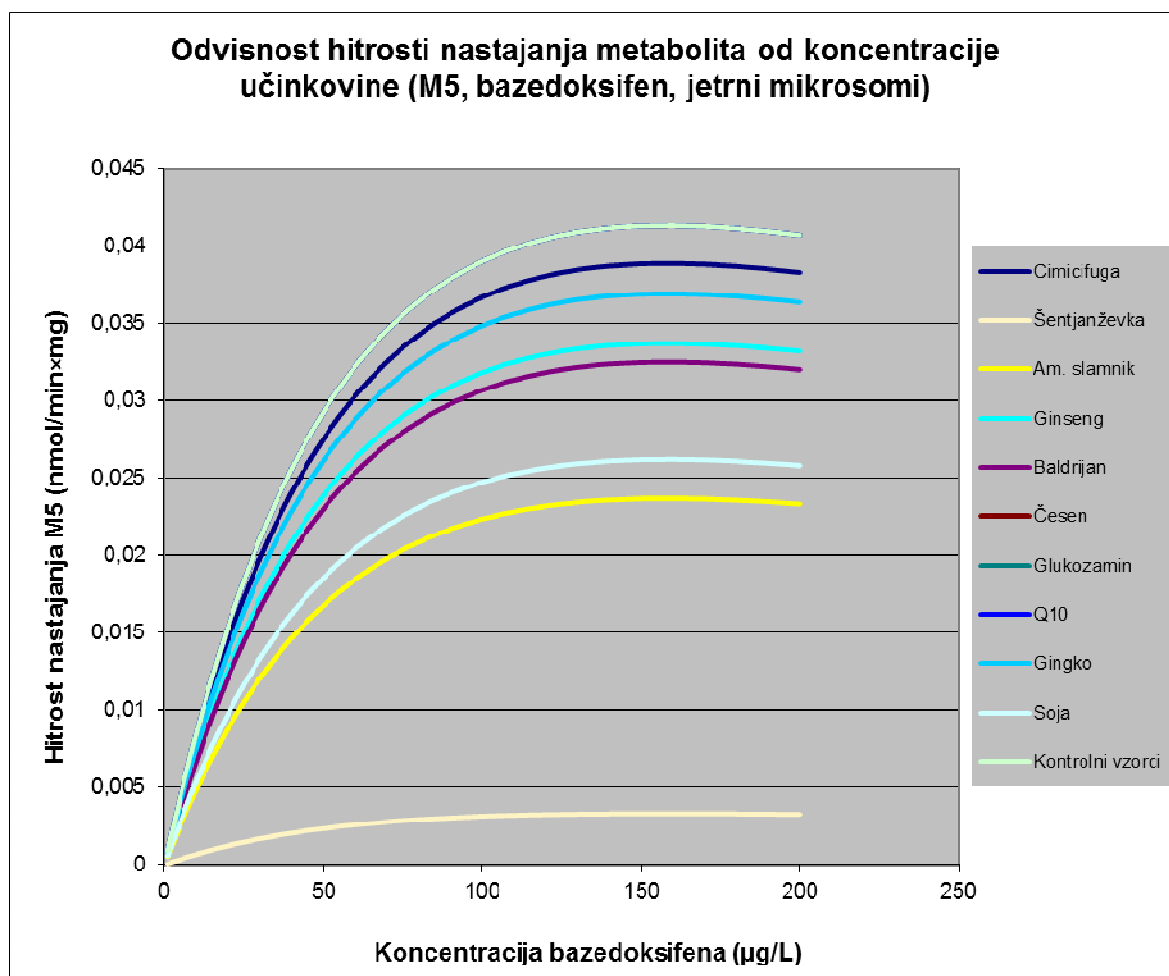
V tabeli XX in sliki 4.10. lahko vidimo, da vsa prehranska dopolnila z izjemo soje zmanjšajo konstanto substratne inhibicije. Kompetitivne inhibicije v tem primeru ni mogoče opaziti, spet pa sta nekompetitivna inhibitorja ekstrakta šentjanževke in ameriškega slamnika. Zanimiv je vpliv koencima Q10, ki maksimalno hitrost reakcije v primerjavi s kontrolnimi vzorci še nekoliko poveča (+9%), posledica pa je tudi večji intrinzični očistek metabolita M4.

Pri zadnji inkubaciji (tabela XXI in slika 4.11) je opazna močna kompetitivna inhibicija soje (K_M je $2,5\times$ večji kot pri ostalih inkubacijah) in tako kot vedno vpliv šentjanževke in ameriškega slamnika na padec v_{max} . Posledica naštetega so nizki intrinzični očistki v primerjavi s kontrolnimi vzorci. Na splošno lahko zaključimo, da je vpliv prehranskih dopolnil na metabolizem bazedoksifena nekoliko manjši kot pri raloksifenu. Izpostaviti gre

morda le učinek soje na nastajanje M5, ter seveda nekompetitivno inhibicijo šentjanževke in ameriškega slavnika na nastajanje obeh glukuronidov basedoksifena.

Tabela XXI: Rezultati inkubacije basedoksifena z jetrnimi mikrosomi za M5

Prehransko dopolnilo	Cimicifuga	Šentjanževka	Am. slanik	Ginseng	Baldrijan
v_{max} (nmol/min)	8,8E-02	7,5E-03	5,4E-02	7,6E-02	7,4E-02
K_M (μ mol/L)	100	100	100	100	100
k_i (nmol/L)	250	250	250	250	250
Cl (L/min)	8,8E-01	7,5E-02	5,4E-01	7,6E-01	7,4E-01
Sprememba Cl (%)	-6,0	-92,0	-42,7	-18,4	-21,4
Česen	Glukozamin	Q10	Ginkgo	Soja	Kontrolni vzorci
9,4E-02	9,4E-02	9,4E-02	8,4E-02	9,4E-02	9,4E-02
100	100	100	100	250	100
250	250	250	250	250	250
9,4E-01	9,4E-01	9,4E-01	8,4E-01	3,8E-01	9,4E-01
0,0	0,0	0,0	-10,7	-60,0	0,0



Slika 4.11: Rezultati inkubacije basedoksifena z jetrnimi mikrosomi za M5

Tudi pri določanju kinetike UGT encimov pod vplivom prehranskih dopolnil lahko govorimo o splošnem trendu za posamezna prehranska dopolnila, ki se pojavlja pri vseh inkubacijah ter pri nastajanju vseh metabolitov. Podobno kot prej se maksimalna hitrost reakcije in intrinzični očistek najbolj zmanjšata pri inkubacijah s šentjanževko, saj sta lahko tudi več kot desetkrat manjša od tistih pri kontrolnih vzorcih, pri ameriškem slamniku, ki je po vplivu na padec intrinzičnega očistka na drugem mestu, pa se lahko zmanjšata tudi za faktor 2. V nasprotju s šentjanževko in ameriškim slamnikom, glukozamin in koencim Q10 z nekaj izjemami redko izražata vpliv na parametre encimske kinetike. Ostala prehranska dopolnila pa ne vplivajo zelo močno, običajno pa nekoliko zmanjšajo aktivnost UGT encimov po principu nekompetitivne inhibicije. Morda je na tem mestu potrebno poudariti tudi, da smo poskuse za določanje kinetike delali samo z najvišjimi koncentracijami prehranskih dopolnil, ki predstavljajo koncentracije enega odmerka raztopljenega v 250 mL tekočine, zato so tudi spremembe očistkov toliko bolj očitne.

V splošnem lahko rečemo, da se, enako kot pri inkubacijah s spremenljivo koncentracijo prehranskih dopolnil, intrinzični očistek bolj zniža v tistih primerih, kjer je substrat raloksifen. Primerjava intrinzičnih očistkov med obema vrstama mikrosomov pa pokaže, da se intrinzični očistek črevesnih mikrosomov bolj zniža kot pri jetrnih mikrosomih. To je sicer v nasprotju z ugotovitvami pri prvih 4 poskusih, ko smo spreminjali koncentracije prehranskih dopolnil, vendar je spet potrebno poudariti, da bi drugačne koncentracije prehranskega dopolnila v poskusih za določanje kinetike, lahko dale nekoliko drugačne rezultate. Izpostaviti moramo še, da se intrinzični očistek M2 in M5 zmanjša bolj kot intrinzični očistek M1 in M4. Iz grafov je lepo razviden odklon krivulje pri višjih koncentracijah substratov oz. učinkovin za M2 in M5, kar pomeni, da imamo pri teh dveh metabolitih tudi pojav substratne inhibicije. Najverjetneje bi do substratne inhibicije prišlo tudi drugje, če bi posegali po višjih koncentracijah učinkovin, saj je bila tudi za ta primer že dokazana substratna inhibicija (29), vendar, kot rečeno, pri višjih koncentracijah substrata. Zanimivo je, da nekatera prehranska dopolnila lahko vplivajo na konstanto inhibicije. Izpostavimo lahko cimicifugo, ki v enem primeru poveča k_i celo za faktor 2,5.

Največji vpliv na UGT encime pa je razviden pri primerjavah maksimalnih hitrosti reakcije. Pri šentjanževki te namreč padejo tudi na desetino vrednosti kontrolnega vzorca. Tam, kjer se najvišja hitrost reakcije zmanjša, govorimo o nekompetitivni inhibiciji encima. Inhibitor se takrat veže na kompleks ES in z alosterično vezavo spremeni terciarno

strukturo encima, posledica pa je zmanjšana hitrost nastajanja produkta. Opazimo lahko tudi posamezne vplive na Michaelis-Mentenovo konstanto. Kjer se le-ta spremeni, se v vseh primerih poveča. To pomeni, da dodana prehranska dopolnila povzročajo kompetitivno inhibicijo encima, saj s substratom tekmujejo za vezavno mesto na encimu, kar se kaže kot povečanje K_M . Pri naših poskusih je kompetitivno inhibicijo včasih spremljala tudi nekompetitivna (npr. kombinacija cimicifuge, črevesnih mikrosomov in raloksifena), saj se je ob povečanju K_M zmanjšala tudi v_{max} . Takšen primer imenujemo mešana inhibicija.

5. ZAKLJUČEK

V prvem delu raziskav vpliva prehranskih dopolnil na metabolizem raloksifena in bazedoksifena z UGT encimi smo se osredotočili na ugotavljanje vpliva različnih koncentracij prehranskih dopolnil na nastanek glukuronidiranih produktov. Z uporabo treh koncentracij prehranskih dopolnil, ki so se med seboj razlikovale za faktorja 10 in 100, smo pokrili širok spekter koncentracij, kar nam je dalo boljši pregled nad odvisnostjo vpliva od koncentracije prehranskega dopolnila. Ugotovili smo, da je *in vitro* vpliv prehranskih dopolnil sicer največji pri njihovi najvišji koncentraciji, vendar se enak trend delovanja posameznega prehranskega dopolnila ohranja tudi pri obeh nižjih koncentracijah. Aktivnost UGT encimov se najbolj zmanjša ob dodatku šentjanževke, nekoliko manj pa pri ameriškem slamniku in cimicifugi. Zanimiv vpliv ima česen, ki v nekaterih primerih aktivira, v drugih pa zmanjša aktivnost encimov. Ginseng in ginkgo ravno tako nekoliko znižata aktivnost encimov, medtem ko je bil vpliv koencima Q10 običajno zanemarljiv. Vpliv na nastajanje metabolitov je večji pri inkubacijah z raloksifenom ter z jetrnimi mikrosomi.

Pri določevanju vpliva prehranskih dopolnil na kinetiko nastajanja metabolitov raloksifena in bazedoksifena smo prišli do podobnih rezultatov. Tudi tu se je vpliv bolj odražal pri inkubacijah z raloksifenom, na dodatek prehranskih dopolnil pa so bolj občutljivi črevesni mikrosomi, saj se intrinzični očistek v teh inkubacijah zmanjša bolj kot pri jetrnih mikrosomih. Izpostaviti moramo nekompetitivno inhibicijo encimov, ki jo povzroča šentjanževka ter v nekoliko manjšem obsegu tudi ameriški slamnik, pri vseh inkubacijah, ne glede na tip substrata in encima. Omeniti velja še kompetitivno inhibicijo ginkga pri inkubacijah z raloksifenom ter soje pri nastajanju metabolita M5 v jetrnih mikrosomih. Zanimivo pa je, da cimicifuga v dveh primerih spremeni oz. poveča konstanto substratne inhibicije. Pregled rezultatov lahko zaključimo z ugotovitvijo, da lahko prehranska dopolnila močno vplivajo na glukuronidacijo raloksifena in bazedoksifena. Predvsem šentjanževka, za katero je že znano, da inducira encima iz naddružine CYP450, CYP3A4 in CYP2C9, ter ameriški slamnik se kažeta kot močna nekompetitivna inhibitorja UGT encimov. Inhibicija je v vseh primerih tako močna, da so za boljšo predstavo o mehanizmu in jakosti inhibicije potrebne nadaljnje raziskave na tem področju. Preučiti bi bilo treba tudi vpliv različnih koncentracij prehranskih dopolnil na kinetiko glukuronidacije z UGT encimi, predvsem pa pridobiti podatke o koncentracijah prehranskih dopolnil v posameznih organih in celicah po zaužitju. Na takšen način bi lahko izvedli nadaljnje *in*

vitro študije, s katerimi bi lahko pridobili informacije o samem mehanizmu in jakosti inhibicije za posamezno prehransko dopolnilo. Ker prehranska dopolnila, predvsem tista rastlinskega izvora, vsebujejo veliko strukturno različnih spojin, ne samo tistih, ki imajo želen oz. dokazan farmakološki učinek, temveč tudi druge, bi bilo treba ugotoviti še, katere spojine so odgovorne za posamezen vpliv na UGT encime. Naša raziskava je tako lahko le uvod v nadaljnje obširnejše preučevanje vpliva prehranskih dopolnil na metabolizem raloksifena, bazedoksifena in tudi drugih učinkovin, ki se metabolizirajo z UGT encimi.

6. LITERATURA

1. Kronenberg F, Fugh-Berman A. Complementary and Alternative Medicine for Menopausal Symptoms: A Review of Randomized, Controlled Trials. *Annals of Internal Medicine* 2002; 137: 805-813
2. UL RS Pravilnik o prehranskih dopolnilih št.82/2003. Dostopen prek spleta: <http://www.uradni-list.si/1/content?id=45054>, (dostopano 18.2.2011).
3. UL RS Zakon o zdravilih št.31/2006. Dostopen prek spleta: <http://www.uradni-list.si/1/objava.jsp?urlid=200631&stevilka=1266>, (dostopano 18.2.2011).
4. JL George, RW Colman et al. Hemostasis and thrombosis: Basic principles and clinical practice. Hagerstown, MD: Lippincott, Williams and Wilkins. 2006; 1239
5. Borrelli F, Ernst E. Black Cohosh (*Cimicifuga racemosa*) for menopausal symptoms: a systematic review of its efficacy. *Pharmacological Research* 2008; 58 (1): 8-14.
6. Mello NK. Commentary on Black Cohosh for Treatment of Menopausal Disorders. *Menopause* 2008; 15(5): 819–820.
7. Freeman EW, Sammel MD. Symptoms associated with menopausal transition and reproductive hormones in midlife women. *Obstetrics & Gynecology* 2008; 110 (2-Pt-1): 230–40.
8. Pien GW, Sammel MD. "Predictors of sleep quality in women in the menopausal transition". *Sleep* 2008; 31 (7): 991–9.
9. Ehrlich SD; <http://www.umm.edu/altmed/articles/st-johns-000276.htm>, (dostopano 18.2.2011).
10. Delgoda R, Westlake ACG. Herbal interactions involving Cytochrome P450 enzymes. *Toxicological Review* 2004; 23(4): 239-249.
11. Ehrlich SD; <http://www.umm.edu/altmed/articles/echinacea-000239.htm>, (dostopano 18.2.2011).
12. Kiefer D, Pantuso T. Panax Ginseng. *American Family Physician* 2003; 68(8): 1539-1542.
13. SD Ehrlich; <http://www.umm.edu/altmed/articles/valerian-000279.htm>, (dostopano 18.2.2011).
14. SD Ehrlich; <http://www.umm.edu/altmed/articles/garlic-000245.htm>, (dostopano 18.2.2011).

15. Dahmer S, Schiller RM. Complementary and Alternative Medicine: Glucosamine. *American Family Physician* 2008; 15(8): 471-476.
16. Miller KL, Clegg DO. Glucosamine and Chondroitin Sulphate. *Rheumatic Disease Clinics of North America* 2011; 37(1): 103-118.
17. Ehrlich SD; <http://www.umm.edu/altmed/articles/coenzyme-q10-000295.htm>, (dostopano 18.2.2011).
18. Pavlin R. Koencim Q10 – Klinična raba. *Zdravniški Vestnik* 2008; 77: 159–62.
19. Ehrlich SD; <http://www.umm.edu/altmed/articles/ginkgo-biloba-000247.htm>, (dostopano 18.2.2011).
20. Geller SE, Studee L. Soy and Red Clover for Midlife and Aging. *Climacteric* 2006; 9(4): 245–263.
21. Barnes S. Soy Isoflavones—Phytoestrogens and What Else? *The Journal of Nutrition* 2004; 134: 1225S-1228S.
22. Johnell O, Kanis J. Epidemiology of osteoporotic fractures. *Osteoporosis International* 2005; 16 Suppl 2: S3-S7.
23. Raisz L. Pathogenesis of osteoporosis: concepts, conflicts, and prospects. *The Journal of Clinical Investigation* 2005; 115 (12): 3318–3325.
24. Williams DA, Lemke LT. *Foye's Principles of Medicinal Chemistry, Fifth Edition*, Lippincott Williams & Wilkins 2002; 694: 1059-1065.
25. Kocijančič A. Smernice za odkrivanje in zdravljenje osteoporoze v Sloveniji. *Zdravniški vestnik* 2002; 71: 571-573.
26. Kung AWC, Chu EYW. Bazedoxifene: a new selective estrogen receptor modulator for the treatment of postmenopausal osteoporosis. *Expert Opinion on Pharmacotherapy* 2009; 10(8): 1377-1385.
27. Stump AL, Kelley KW. Bazedoxifene: A Third generation Selective Estrogen Receptor Modulator for Treatment of Menopausal Symptoms. *The Annals of Pharmacotherapy* 2007;41: 833-839.
28. 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 (dostopano 18.2.2011).
29. Trontelj J. Raziskave metabolizma raloksifena z eksperimentalnimi modeli naraščajoče kompleksnosti, doktorska disertacija. Fakulteta za farmacijo, Univerza v Ljubljani, 2007.

30. Jeong EJ, Liu Y. Species- and disposition model-dependent metabolism of raloxifene in gut and liver: role of UGT1A10. *Drug Metabolism and Disposition* 2005; 33(6): 785-94.
31. Kemp DC, Fan PW. Characterisation of raloxifene glucuronidation *in vitro*: contribution of intestinal metabolism to presystemic clearance. *Drug Metabolism and Disposition* 2002; 30 (6): 694-700.
32. Chandrasekeran A et al. Metabolic Disposition of [14C]Bazedoxifene in Healthy Postmenopausal Women. *Drug Metabolism and Disposition* 2009; 37: 1219-1235.
33. <http://www.drugs.com/mmx/raloxifene-hydrochloride.html>, (dostopano 18.2.2011).
34. Evista SmPC;
<http://www.medicines.org.uk/emc/medicine/595/SPC/Evista+60mg+film-coated+tablets>, (dostopano 18.2.2011).
35. EMEA: Public assesment report for Conbriza. London, 19.2.2009.
http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/EPAR_-_Public_assessment_report/human/000913/WC500033576.pdf, (dostopano 18.2.2011).
36. Hochner-Celnikier D. Pharmacokinetics of raloxifene and its clinical application. *European Journal of Obstetrics, Gynecology and Reproductive Biology* 1999; 85(1): 23-9.
37. Gibson GG, Skett P. Introduction to drug metabolism, Nelson Thornes, Cheltenham, Velika Britanija, 2001: 68-70.
38. Pearson PG, Wienkers LC. Handbook of Drug Metabolism, Drugs and pharmaceutical sciences, letnik 186, Information on Health Care, New York, 2009: 307-308.
39. Mackenzie PI, Bock KW et al.. Nomenclature update for the mammalian UDP glycosyltransferase (UGT) gene superfamily. *Pharmacogenetics and Genomics* 2005; 15(10): 677-85.
40. Buckley DB, Klaassen CD. Tissue- and Gender-Specific mRNA expression of UDP-Glucuronosyltransferases (UGTs) in Mice. *Drug Metabolism and Disposition* 2007; 35: 121-127.
41. Tukey RH, Strassburg CP. Genetic multiplicity of the human UDP-glucuronosyltransferases and regulation in the gastrointestinal tract. *Molecular Pharmacology* 2001; 59(3): 405-14.

42. Yamanaka H, Nakajima M et al. Glucuronidation of Thyroxine in Human Liver, Jejunum and Kidney Microsomes. *Drug Metabolism and Disposition* 2007; 35: 1642-1648.
43. The Merck Manuals: online medicinal library; <http://www.merck.com/mmpe/sec20/ch303/ch303a.html>, (dostopano 18.2.2011).
44. Dixon M, Webb EC et al. *Enzymes*. 3RD ed. London: Longman, 1979; 126.
45. RF Boyer. *Temelji biokemije*. 2008
46. Schnell S, Maini PK. A century of enzyme kinetics: Reliability of the Km and v_{max} estimates. *Comments on theoretical biology* 2003; 8: 169-187.
47. 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.
48. Rodrigues AD. *Drug-drug interactions*. First edition, Marcel Dekker, Inc., New York, 2002: 10.
49. Asha S, Vidyavathi M. Role of Human Liver Microsomes in *In vitro* Metabolism of drugs – A Review. *Application of Biochemistry and Biotechnology* 2010; 160:1699-722.
50. Gomez-Lechon MJ, Castell JV. Hepatocytes-the choice to investigate drug metabolism and toxicity in man: *In vitro* variability as a reflection of *in vivo*. *Chemical and Biological Interactions* 2007; 168(1):30-50.
51. Woolf TF. *Handbook of Drug Metabolism*. Marcel Dekker, New York, Basel 1999.
52. Hariparsad N, Sane RS et al. *In vitro* methods in human drug biotransformation research: implications for cancer chemotherapy. *Toxicology In vitro* 2006; 20(2): 135-53.
53. Baranczewski P, Stanczak A et al. Introduction to early *in vitro* identification of metabolites of new chemical entities in drug discovery and development. *Pharmacological Reports*. 2006; 58(3): 341-52.
54. Brandon EF, Raap CD et al. An update on *in vitro* test methods in human hepatic drug biotransformation research: pros and cons. *Toxicology and Applied Pharmacology* 2003; 189(3): 233-46.
55. Bjornsson TD et al. The conduct of *in vitro* and *in vivo* drug-drug interaction studies: A pharmaceutical research and manufacturers of America (PhRMA) perspective. *Drug Metabolism and Disposition* 2003; 31:815-832.

56. Narayanan R, LeDuc B. Glucuronidation of haloperidol by rat liver microsomes: involvement of family 2 UDP-glucuronosyltransferases. *Life Science* 2004; 74(20):2527-39.
57. LR Jones, SW Maddock. Unmasking effect of alamethicin on the (Na⁺,K⁺)-ATPase, beta-adrenergic receptor-coupled adenylate cyclase, and cAMP-dependent protein kinase activities of cardiac sarcolemmal vesicles. *The Journal of Biological Chemistry* 1980; 255(20); 9971-9980.
58. Miners JO, Knights KM et al. *In vitro-in vivo* correlation for drugs and other compounds eliminated by glucuronidation in humans: pitfalls and promises. *Biochemistry and Pharmacology* 2006; 71(11):1531-9.