

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO

ALEŠ HERMAN

DIPLOMSKA NALOGA

UNIVERZITETNI ŠTUDIJ FARMACIJE

Ljubljana, 2011

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO

ALEŠ HERMAN

***IN VITRO* RAZISKAVE METABOLIZMA
BAZEDOKSIFENA Z MIKROSOMI**

***IN VITRO* STUDIES OF BAZEDOXIFENE METABOLISM
WITH 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.

Posebna zahvala ob diplomi gre asist. Tini Trdan, mag.farm., ki je s svojo pomočjo veliko prispevala k izdelavi te diplomske naloge.

Izjava

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

Aleš Herman

Predsednik diplomske komisije: prof. dr. Stane Srčič, mag. farm.

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

Ljubljana, februar 2011

KAZALO VSEBINE

KAZALO VSEBINE	1
POVZETEK	2
ABECEDNI SEZNAM OKRAJŠAV	4
1 UVOD	6
1.1 OSTEOPOROZA.....	6
1.1.1 Zdravljenje osteoporoze	7
1.2 SELEKTIVNI MODULATORJI ESTROGENSKIH RECEPTORJEV (SERM).....	8
1.2.1 Raloksifen.....	8
1.2.1.1 Metabolizem in farmakokinetični profil raloksifena	9
1.2.2 Bazedoksifen	10
1.2.2.1 Metabolizem in farmakokinetični profil bazedoksifena	11
1.3 URIDINDIFOSFAT-GLUKURONIL-TRANSFERAZE (UGT)	12
1.3.1 Nomenklatura UGT	13
1.3.2 Izražanje UGT	13
1.3.3 Poddružina UGT1A	14
1.3.4 Polimorfizmi v genu za UGT1A1	15
1.4 IN VITRO MODELI ZA PREISKOVANJE METABOLIZMA	16
1.4.1 Mikrosomi	17
1.5 FARMAKOKINETIKA IN ENCIMSKA KINETIKA	19
1.5.1 Kinetika enosubstratne encimsko katalizirane reakcije [48].....	19
1.5.1.1 Substratna inhibicija.....	21
1.5.2 Določevanje navideznih encimskih parametrov	23
1.5.3 Napovedovanje metaboličnega očistka	26
1.5.3.1 Farmakokinetični modeli	26
Intrinzični očistek.....	26
Očistek organa.....	27
2 NAMEN DELA	29
3 MATERIALI IN METODE	30
3.1 MATERIALI.....	30
3.2 METODE.....	35
3.2.1 Časovno spremljanje nastajanja metabolitov raloksifena in bazedoksifena v različnih organih 35	
3.2.2 Kinetika nastajanja metabolitov raloksifena in bazedoksifena v različnih organih	37
3.2.3 Analitika	40
3.2.4 Obdelava podatkov	41
3.3 IZVEDBA POSKUSOV	42
4 REZULTATI IN RAZPRAVA	44
4.1 ČASOVNO SPREMLJANJE NASTAJANJA METABOLITOV RALOKSIFENA IN BAZEDOKSIFENA V RAZLIČNIH ORGANIH.....	44
4.1.1 Raloksifen.....	44
4.1.2 Bazedoksifen	46
4.2 KINETIKA NASTAJANJA METABOLITOV RALOKSIFENA IN BAZEDOKSIFENA V RAZLIČNIH ORGANIH	48
4.2.1 Raloksifen.....	49
4.2.2 Bazedoksifen	54
4.2.3 Vpliv polimorfizma <i>UGT1A1</i> *28 na kinetiko nastajanja metabolitov bazedoksifena z mikrosomi, genotipiziranimi za ta encim.....	59
5 SKLEPI	64
6 LITERATURA	65

POVZETEK

Bazedoksifen je nova učinkovina, ki je bila v Evropi šele pred kratkim registrirana. Strukturno je zelo podoben raloksifenu in naj bi se ravno tako uporabljal za zdravljenje in preprečevanje osteoporoze. Pri terapiji z raloksifenom so opazili pomembne interindividualne razlike v plazemskih koncentracijah raloksifena in njegovih metabolitov, kar je bilo povezano tudi z različno učinkovitostjo terapije pri pacientkah. Eden od vzrokov za variabilnost farmakokinetike raloksifena je relativno pogost polimorfizem v genu za metabolični encim UGT1A1, ki konjugira raloksifen z glukuronsko kislino. Ker je bazedoksifen nova učinkovina, so literaturni podatki o njegovem metabolizmu zaenkrat še zelo skopi. Prav tako še ni popolnoma pojasnjeno, s katerimi encimi in v katerih organih poteka največji del njegovega metabolizma.

S to diplomsko nalogo smo želeli ugotoviti, kateri organ (jetra, pljuča, ledvica, tanko črevo) ima največji prispevek k celokupnemu metaboličnemu očistku raloksifena in bazedoksifena in ugotoviti, če genetski polimorfizem *UGT1A1*28* pomembno vpliva na hitrost metabolične inaktivacije bazedoksifena, tako kot je to naša raziskovalna skupina že ugotovila za strukturno podoben raloksifen.

Najprej smo raloksifen in bazedoksifen inkubirali z mikrosomi različnih organov in spremljali kinetiko nastajanja njunih metabolitov. Nato pa smo z inkubacijo bazedoksifena z genotipiziranimi jetrnimi mikrosomi ugotavljali vpliv polimorfizma *UGT1A1*28* na kinetiko nastajanja metabolitov bazedoksifena.

Z uporabo mikrosomov kot *in vitro* modela in nadaljnjega računanja intrinzičnega očistka ekstrapoliranega na organ, smo ugotovili, da imajo jetra najverjetneje največji prispevek k celokupnemu metaboličnemu očistku raloksifena. Tudi tanko črevo je zelo pomembno pri metabolizmu raloksifena, saj je mikrosomski intrinzični očistek v črevesnih mikrosomih najvišji med vsemi. Ledvice zelo malo prispevajo k celokupnemu metaboličnemu očistku, v pljučnih mikrosomih pa reakcija glukuronidacije sploh ne poteče. Bazedoksifen se v primerjavi z raloksifenom v glavnem metabolizira v jetrih, saj sta tako mikrosomski intrinzični očistek kot tudi intrinzični očistek ekstrapoliran na organ v tankem črevesju in ledvicah zelo nizka. Tako kot pri raloksifenu, tudi pri bazedoksifenu nismo zaznali metabolizma v pljučih. Z uporabo genotipiziranih jetrnih mikrosomov za polimorfizem *UGT1A1*28* pa smo ugotovili, da ta polimorfizem pomembno vpliva na hitrost

glukuronidiranja bazedoksifena z encimom UGT1A1, saj je intrinzični očistek pri genotipu *UGT1A1* *28/*28 mnogo nižji kot pri genotipu *UGT1A1* *1/*1.

ABECEDNI SEZNAM OKRAJŠAV

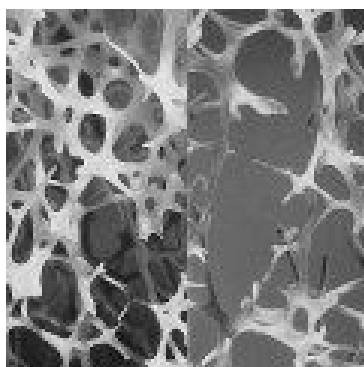
BAZ	bazedoksifen
BLR	bilirubin
CYP450	naddružina citokromov P450
Cl _{int}	intrinzični očistek
Cl _{int,o}	intrinzični očistek ekstrapoliran na celoten organ
c _{max}	maksimalna plazemska koncentracija
E	encim
E ₀	začetna koncentracija encima
ER	endoplazmatski retikulum
ER α , ER β	estrogenski receptor alfa, estrogenski receptor beta
ES	kompleks encima in substrata
$f_{u,b}$	frakcija proste učinkovine na proteine plazme
HAL	haloperidol
K _i	konstanata inhibicije
K _m	Michaelis-Mentenova konstanta
M1	metabolit raloksifena: raloksifen-6-glukuronid
M2	metabolit raloksifena: raloksifen-4'-glukuronid
M3	metabolit raloksifena: raloksifen-6,4'-diglukuronid
M4	metabolit bazedoksifena: bazedoksifen-4'-glukuronid
M5	metabolit bazedoksifena: bazedoksifen-5-glukuronid
M6	metabolit bazedoksifena: bazedoksifen-5,4'-diglukuronid
MS	masni spektrometer
RAL	raloksifen
Q _o	pretok krvi skozi organ
S	substrat
S ₀	začetna koncentracija substrata
SERM	selektivni modulator estrogenskih receptorjev
t _{1/2}	plazemski razpolovni čas
TRIS	tris(hidroksimetil)aminometan
UDPGA	uridindifosfoglukuronska kislina

UPLC	tekočinska kromatografija zelo visoke ločljivosti (ang. »ultra high pressure liquid chromatography«)
UGT	uridindifosfat-glukuronil-transferaza
UGT1A1	uridindifosfat-glukuronil-transferaza iz družine 1, poddružine A, encim 1
V_D	volumen porazdeljevanja
V_{max}	maksimalna hitrost encimske reakcije

1 UVOD

1.1 OSTEOPOROZA

Osteoporoza je sistemska skeletna bolezen, za katero sta značilni zmanjšana količina kostne mase in porušena mikroarhitektura kostnega tkiva (slika 1.1). Oboje vodi do povečane lomljivosti kosti. Svetovna zdravstvena organizacija je definirala osteoporozo na osnovi merjenja mineralne kostne gostote (MKG). Po tej definiciji je osteoporoza opredeljena kot zmanjšanje MKG za 2,5 ali več standardne deviacije od največje kostne gostote v zgodnji odrasli dobi, upoštevajoč spol in raso [1].



Slika 1.1: Mikroarhitektura zdrave (levo) in osteoporozne (desno) kosti [5].

Zaradi podaljševanja življenjske dobe postaja osteoporoza vse večji zdravstveni problem, saj tekom življenja kar 40-50 % žensk in 13-22 % moških doživi zlom kot posledico osteoporoze [1, 2]. Najpogostejši osteoporozni zlomi so zlomi vretenc, zapestja in kolka. Število osteoporoznih zlomov je v vseh starostnih skupinah vsaj enkrat večje pri ženskah kot pri moških, kar pa je do določene mere posledica, da moški nimajo naglega zmanjšanja endogenih spolnih hormonov, da imajo večjo telesno maso in večje kosti ter krajšo življenjsko dobo [3, 6].

Osteoporozo lahko razdelimo na primarno in sekundarno. **Primarno** osteoporozo, za katero vzrok še ni poznan, lahko delimo naprej na **pomenopavzno**, ki se pojavi skupaj z nastopom menopavze, na **senilno**, ki je posledica staranja in na **juvenilno** osteoporozo.

Sekundarna osteoporoza pa je posledica pridruženih bolezni (npr. endokrine bolezni, bolezni prebavil, bolezni kostnega mozga, ...) ali uporabe nekaterih zdravil (npr. kortikosteroidov, varfarina, heparina, ...) [4].

1.1.1 Zdravljenje osteoporoze

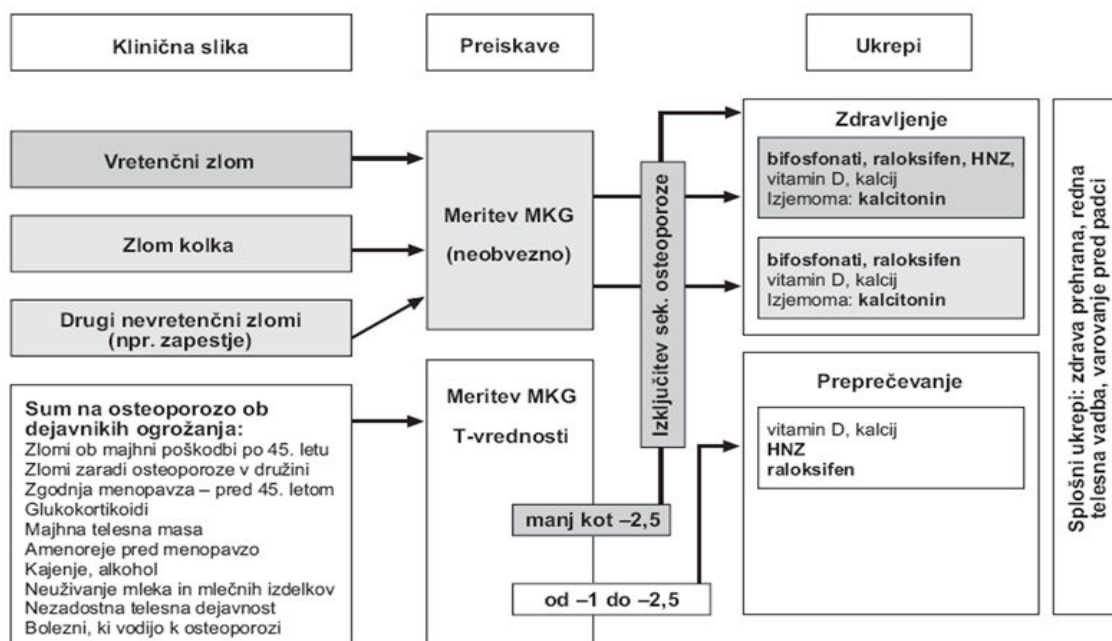
Cilj zdravljenja osteoporoze je preprečevanje zlomov. Za doseganje tega cilja imamo poleg splošnih ukrepov (zdrava prehrana, redna telesna vadba, varovanje pred padci) na voljo različne skupine zdravil:

- *zaviralci kostne resorpcije*: hormonsko nadomestno zdravljenje (HNZ), bisfosfonati (npr. etidronat, alendronat, risedronat,...), raloksifen, kalcitonin; ali
- pripravki s kalcijem in vitaminom D ter analogi vitamina D (kalcitriol, alfakalcidiol).

Terapija je različna glede na to, ali se je zlom že pojavil in osteoporozo zdravimo ali zaradi prisotnih dejavnikov tveganja (zgodnja menopavza, dedna nagnjenost, uporaba glukokortikoidov itd.) izvajamo le preventivno terapijo (slika 1.2) [1].

Nekatere novejšje možnosti za zdravljenje osteoporoze pa so:

- stroncijev ranelat – povečuje osteoblastogenezo in sintezo osteocitom podobnih celic;
- teriparatid – humani rekombinantni parathormon, stimulira sintezo kosti;
- denosumab – monoklonsko protitelo, zavira osteoklastogenezo;
- novi selektivni modulatorji estrogenskih receptorjev (SERM) – npr. bazedoksifen [7, 8].



Slika 1.2: Smernice za odkrivanje, preprečevanje in zdravljenje osteoporoze v Sloveniji [1].

1.2 SELEKTIVNI MODULATORJI ESTROGENSKIH RECEPTORJEV (SERM)

SERM so skupina zdravil, ki na estrogenske receptorje nekaterih organov delujejo kot agonisti estrogena, na druge pa kot antagonist. Klinično pomembni so tisti, ki delujejo kot agonisti estrogena na kosti in srčnožilni sistem in kot antagonist na dojke in maternico (npr. raloksifen in bazedoksifen). To pomeni, da ohranijo ugodne učinke na kosti in srčnožilni sistem in ob tem ne povzročajo proliferacije endometrija in ne povečajo tveganja za raka na dojkah [5].

Tabela 1.1: Primerjava generacij SERM [10, 18].

	tamoksifen	raloksifen	bazedoksifen
generacija	1.	2.	3.
indikacija	zdravljenje raka na dojkah	preventiva in zdravljenje postmenopavzalne osteoporoze	preventiva in zdravljenje postmenopavzalne osteoporoze
stimulacija endometrija	da	ne	ne
pojavnost vročinskih oblivov	↑pojavnost (33-64%)	↑pojavnost (9,7-24,6%)	↑pojavnost (19,6-24,1%)
učinki na holesterol	↓TC, ↓LDL	↓TC, ↓LDL	↓TC, ↓LDL

TC, celokupni holesterol; LDL, lipoproteini nizke gostote.

1.2.1 Raloksifen

Raloksifen uvrščamo v 2. generacijo SERM. Po strukturi je derivat benzotiofena. Njegova strukturna formula je predstavljena na sliki 1.3. Klinično pomembni učinki raloksifena se izražajo v naslednjih tkivih:

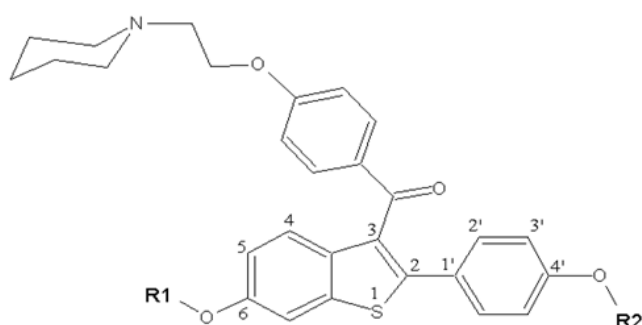
- *v kosteh (agonist estrogenskih receptorjev):* zmanjša število in aktivnost osteoklastov in poveča kostno gostoto. Klinično pomembno poveča kostno gostoto hrbtenice in kolka, zmanjša tveganje za vretenčne zlome (do 55 %), ne vpliva pa na incidenco nevretenčnih zlomov [9];
- *v jetrih (agonist estrogenskih receptorjev):* nižja nivo LDL in celokupnega holesterola, ob tem pa nivo HDL ostane enak [4];
- *v maternici (antagonist estrogenskih receptorjev):* pomembna prednost pred SERM 1.generacije, npr. tamoksifenom, saj tako ne privede do hipertrofije endometrija [4];
- *v dojkah (antagonist estrogenskih receptorjev):* zmanjša obolevnost za od estrogena odvisnim rakom dojke [4].

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

Raloksifen v redkih primerih poleg krčev v nogah in vročinskih oblivov lahko povzroči tudi resne neželene učinke, povezane s tromboemboličnimi zapleti, kot je globoka venska tromboza in smrtna kap (< 1 %). Zato uporabo raloksifena pri osebah, ki so imele v preteklosti že tovrstne težave ali pa so nepokretne, odsvetujejo [4, 11].

1.2.1.1 Metabolizem in farmakokinetični profil raloksifena

Raloksifen je izpostavljen obsežnemu predsistemskemu metabolizmu, zato je njegova absolutna biološka uporabnost ob peroralni aplikaciji zelo nizka, in sicer samo 2 % (obseg absorpcije pa je približno 60 %) [12]. Pri tem se tvorijo predvsem glukuronidi raloksifena, oksidacija s citokromi skupine CYP450 pa je zanemarljiva [4, 13]. Glukuronidi se tvorijo na mestu 4' in na mestu 6 molekule raloksifena, kot je predstavljeno na sliki 1.3.



	R1	R2
raloksifen	H	H
M1		H
M2	H	
M3		

Slika 1.3: Struktura raloksifena in njegovih metabolitov.

V kliničnih študijah in v večini *in vitro* raziskav se je pokazalo, da nastane največ raloksifen-4'-glukuronida (M2), raloksifen-6-glukuronida (M1) pa približno osemkrat manj [14]. Nastajal naj bi tudi raloksifen-6,4'-diglukoronid (M3), manj kot 1% pa raloksifena ostane v plazmi nespremenjenega. Plazemska razpolovna doba raloksifena je 28 ur, obenem pa po enkratnem peroralnem odmerku v časovnem poteku plazemskih koncentracij opazimo več vrhov. Vse to kaže na sistemsko interkonverzijo in enterohepatično kroženje raloksifena in njegovih glukuronidov [15].

Raloksifenovih konjugatov ne moremo gledati kot neaktivno in izločeno učinkovino, temveč kot transportno obliko, iz katere nastaja nazaj raloksifen, deloma že v centralnem krvnem obtoku, deloma pa kasneje po izločanju z žolčem. Od tam se lahko po odcepitvi z β -glukuronidazo ponovno absorbira v centralni krvni obtok in tako zaključi enterohepatični cikel. Predvideva se, da poteka metabolizem raloksifena tako v steni tankega črevesa [15] kot tudi v jetrih [16].

Konverzija glukuronidov raloksifena v prosti raloksifen poteka prek β -glukuronidaz, ki so prisotne tako v tarčnih organih, kot tudi v jetrih in serumu, predvsem pa v črevesju, kjer s hidrolizo v črevo izločenih glukuronidov omogočajo enterohepatično recirkulacijo raloksifena.

Raloksifen je kot učinkovina zanimiv tudi s stališča velike interindividualne variabilnosti v plazemskih koncentracijah in farmakokinetičnih parametrih [16]. Razlog bi lahko iskali v prepletanju metaboličnih poti v različnih organih, kar nudi veliko možnosti za izražanje interindividualnih razlik v presnovi te učinkovine.

Maksimalna plazemska koncentracija raloksifena nastopi po približno 6 h, maksimalna koncentracija metabolitov pa je dosežena že po eni uri. Vezava na plazemske proteine je večja od 95 %, izločanje raloksifena pa poteka predvsem z blatom (0,2 % se ga odstrani nespremenjenega z urinom) [16].

1.2.2 Bazedoksifen

Bazedoksifen je bil razvit na podlagi raloksifena z namenom, da bi izboljšali njegove lastnosti. Uvrščamo ga v 3. generacijo SERM. Po strukturi je derivat indola. Njegova strukturna formula je predstavljena na sliki 1.4. Lahko se uporablja v obliki monoterapije ali pa v kombinaciji s konjugiranim estrogenom za preprečevanje in zdravljenje pomenopavzalne osteoporoze. Bazedoksifen deluje kot:

- estrogenski *agonist v kosteh*: v kosti zmanjša število in aktivnost osteoklastov in poveča kostno gostoto;
- estrogenski *agonist na jetra (vpliv na metabolizem lipidov)*: niža nivo LDL in celokupnega holesterola, ob tem pa nivo HDL ostane nespremenjen;
- estrogenski *antagonist na tkivo maternice*: pomembna prednost pred SERM 1.generacije, npr. tamoksifenom, saj tako ne privede do hipertrofije endometrija;
- estrogenski *antagonist na tkivo dojke*: zmanjša obolevnost za vsemi oblikami raka na dojkah;

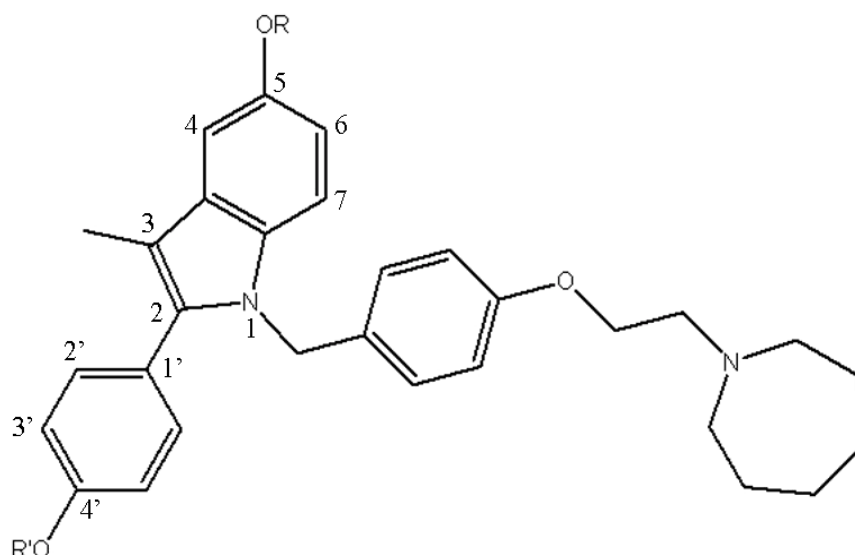
Bazedoksifen ima lahko tudi neželene učinke, med katerimi sta najpomembnejša povečanje pojavnosti vročinskih oblivov in tvorba krvnih strdkov [17]. V kombinaciji bazedoksifena s konjugiranim estrogenom pa se pojavnost vročinskih oblivov značilno zniža [18].

1.2.2.1 Metabolizem in farmakokinetični profil bazedoksifena

Bazedoksifen je prav tako izpostavljen obsežnemu predsistemskemu metabolizmu, zato je njegova absolutna biološka uporabnost ob peroralni aplikaciji nizka in sicer približno 6.2% (vendar še vedno 3-krat večja kot pri raloksifenu) [19]. Tvorijo se predvsem glukuronidi bazedoksifena, oksidacija s citokromi skupine CYP450 pa je zanemarljiva. Glavni metabolit je bazedoksifen-5-glukuronid – M5 (40-95 %), manj je bazedoksifen-4'-glukuronida – M4 (0-20 %), nastaja pa tudi bazedoksifen-5,4'-di-glukuronid – M6. Metabolizem bazedoksifena naj bi potekal tako v jetrih kot tudi izven njih, plazemska razpolovna doba ($t_{1/2}$) bazedoksifena pa znaša približno 28 ur [20, 21].

Dolga razpolovna doba in sekundarni vrh v profilu odvisnosti koncentracije od časa kažeta na to, da pride tudi pri bazedoksifenu, tako kot pri raloksifenu, do sistemske interkonverzije in enterohepatične cirkulacije.

V kliničnih študijah se je pokazalo, da se maksimalna plazemska koncentracije (c_{max}) doseže 1-2 h po aplikaciji; da je vezava na proteine večja kot 99 % in da se stacionarno stanje doseže po 7 dneh. Izločanje bazedoksifena poteka predvsem z blatom (84.7 %), zelo malo pa z urinom (0.81 %) [22].



	R	R'
bazedoksifen	H	H
bazedoksifen-5-glukuronid (M5)		H
bazedoksifen-4'-glukuronid (M4)	H	
bazedoksifen-5,4'- diglukuronid (M6)		

Slika 1.4: Struktura bazedoksifena in njegovih metabolitov.

1.3 URIDINDIFOSFAT-GLUKURONIL-TRANSFERAZE (UGT)

Encimi UGT spadajo v veliko encimsko skupino glikozil-transferaz, ki na različne substrate pripenjajo sladkorne molekule. Glavna funkcija encimov iz te skupine je pripenjanje glukuronske kisline na celo vrsto lipofilnih substratov. Tvorijo se O-glukuronidi (eterskega ali esterskega tipa) ter N-glukuronidi [23]. S tem se substrati praviloma pretvorijo v mnogo bolj hidrofilne spojine, ki se nato lažje izločijo iz organizma z urinom in žolčem. Poleg tega se zaradi spremembe kemične strukture spremeni tudi njihova biološka aktivnost – v glavnem se njihova afiniteta za vezavo na receptor zmanjša [24]. Zaradi tega so UGT zelo pomembne za detoksifikacijo tujih snovi (npr. paracetamol, kloramfenikol,...) in za preprečevanje akumulacije nekaterih strupenih endogenih snovi, kot je bilirubin in žolčne kisline. Encimi UGT so zelo pomembni tudi za vzdrževanje

fizioloških koncentracij nekaterih hormonov, kot so tiroksin, trijodotironin in spolni hormoni [25]. Večinoma gre torej za reakcije deaktivacije, včasih pa se zgodi, da se kakšna snov z glukuronidiranjem aktivira. Tak primer je morfin-6-glukuronid, ki je v primerjavi z izhodno spojino celo bolj lipofilen in se drugače veže na opioidne receptorje ter ostaja dlje časa v organizmu in izkazuje manj neželenih učinkov [26].

1.3.1 Nomenklatura UGT

Nad-družina UGT ima po mednarodni encimski klasifikaciji oznako UGT (E.C. 2.4.1.17).

Včasih so sesalske glukuronozil-transferaze glede na homologijo v sekvenci aminokislin delili na dve veliki družini: UGT1 in UGT2. Po novejših podatkih pa so nad-družino razširili na štiri družine in sicer: UGT1, UGT2, UGT3 in UGT8 [27, 28].

Glukuronozil-transferaze označujemo z oznako UGT skupaj s številko družine, kateri sledi črka, npr. A ali B, ki označuje poddružino. Za omenjeno črko stoji še ena številka, ki označuje točno določeno obliko encima iz poddružine (npr. UGT1A1). Omenjene encime uvrščamo v družine in poddružine glede na aminokislinsko zaporedje: znotraj družine imajo encimi 50 % enakega zaporedja aminokislin, v poddružini pa homologija zavzema okoli 60 % strukture proteinov. Družini UGT1 in UGT2 najbolj učinkovito uporabljata UDPGA kot substrat, zato sta tudi najpomembnejši pri metabolizmu učinkovin [29].

1.3.2 Izražanje UGT

Encimi UGT so v organizmu izraženi v enterocitih (epitelij tankega in debelega črevesa), v hepatocitih, v ledvicah in v možganih. V jetrih so potrdili prisotnost naslednjih izoform: UGT1A1, UGT1A3, UGT1A4, UGT1A6, UGT1A9. V tankem črevesju pa UGT1A1, UGT1A4, UGT1A6, UGT1A7, UGT1A8 in UGT1A10. Zadnji trije izmed naštetih se nahajajo le izven jeter. Ekspresija družine UGT2 je prav tako porazdeljena po različnih tkivih, pri čemer je največ predstavnikov samo v jetrih: UGT2B4, UGT2B7, UGT2B10, UGT2B11 in UGT2B17. Samo UGT2B4 in UGT2B7 so zasledili tudi v črevesju. UGT2B7 in UGT2B11 pa sta izražena tudi v ledvicah [30].

Tako kot CYP, se tudi UGT v celici v največji meri nahajajo v endoplazemskem retikulumu (ER). Toda za razliko od CYP, UGT niso obrnjene na citosolno, temveč na luminalno stran. Tak položaj encima je posledica kotranslacijske translokacije polipeptidne verige čez membrano endoplazemskega retikuluma (ER); ta membrana predstavlja

difuzijsko bariero za substrate in kosubstrat, UDP-glukuronsko kislino (UDPGA) in tudi za produkte [31].

Tabela 1.2: Izraženost UGT izoform v jetrih, tankem črevu, ledvicah [54].

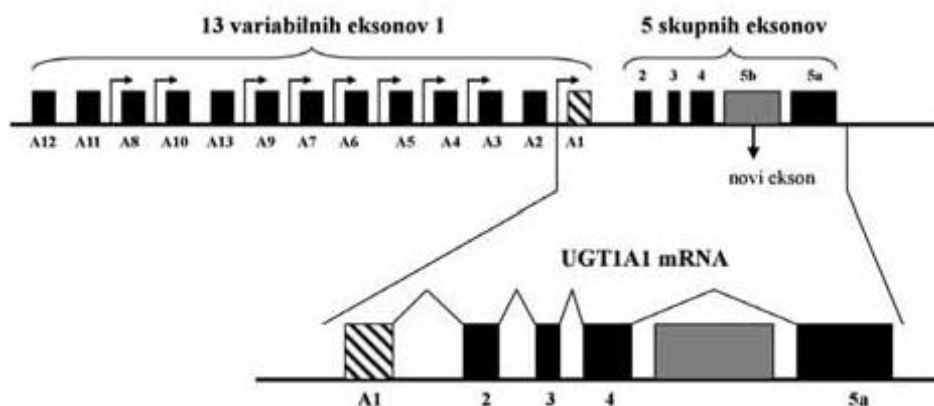
tkivo	UGT-izoforme															
	1A1	1A3	1A4	1A5	1A6	1A7	1A8	1A9	1A10	2B4	2B7	2B10	2B11	2B15	2B17	2B28
jetra	+	+	+	+	+	-	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+
tanko črevo	+	+	+	+	+	-	+	-	+	+	+	+	-	+	+	+
ledvice	-	-	-	n.d.	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+

n.d., ni podatka; +, prisoten; - ni prisoten.

1.3.3 Podružina UGT1A

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

Skupnim eksonom sledijo kasete s trinajstimi eksoni, ki kodirajo celotne N- terminalne dele posameznega predstavnika podružine in najverjetneje kodirajo vezavno mesto za substrat. Od trinajstih možnih mRNA izoform jih 9 kodira funkcionalno aktivne polipeptide (UGT1A1, 1A3, 1A4, 1A5, 1A6, 1A7, 1A8, 1A9 in 1A10), ostali štirje pa so psevdogeni (UGT1A2p, UGT1A11p, UGT1A12p in UGT1A13p) [32].



Slika 1.5: Struktura genskega lokusa UGT1A in izoencim UGT1A1 [33].

V poddružini UGT1A so za glukuronidacijo raloksifena najbolj odgovorne izoforme UGT1A1, UGT1A8, UGT1A9 in UGT1A10 [15], za glukuronidacijo bazedoksifena pa UGT1A1, UGT1A8 in UGT1A10 [21].

1.3.4 Polimorfizmi v genu za UGT1A1

UGT1A1 je izražena predvsem v jetrih; njena glavna naloga je odstranjevanje bilirubina (BLR) in drugih hidrofobnih substratov. UGT1A1 je pri ljudeh edini fiziološko pomemben encim za konjugacijo BLR.

BLR je končni presnovni produkt hema. Nastaja v celicah retikuloendotelnega sistema, predvsem v vranici. V nizkih koncentracijah deluje kot antioksidant, v višjih koncentracijah pa deluje nevrotoksično, zato ga mora telo čimprej izločiti. Nativni BLR je netopen v vodi, zato se veže na albumin in se tako prenese do jeter. To obliko imenujemo nekonjugirani BLR. V jetrih se BLR odcepi od albumina in preko anionskih membranskih prenašalcev ali s procesom difuzije vstopa v hepatocite. V hepatocitih na ER poteče reakcija esterifikacije z glukuronsko kislino, ki jo katalizira UGT1A1. Nastaneta vodotopna BLR monoglukuronid in BLR diglukuronid s skupnim imenom konjugiran BLR. Ta se potem izloča z žolčem v tanko črevo. [33]

Polimorfizmi v UGT1A1 se kažejo kot dedne nekonjugirane hiperbilirubinemije: Crigler-Najjarov sindrom tipa I in II ter Gilbertov sindrom. Crigler-Najjarov sindrom se pojavlja relativno redko, Gilbertov sindrom pa je precej pogost, v celotni človeški populaciji ima frekvenco 3-10 %. [34]

Gilbertov sindrom: Gilbertov sindrom (GS) je dedna motnja, za katero je značilna blaga nekonjugirana hiperbilirubinemija v odsotnosti hemolize in jetrnih bolezni. Najpogostejši je med Afričani, kjer nastopa s frekvenco 36 %, precej pogost je tudi pri Zahodnih Evropejcih z 10-13 %, redkejši pa pri Azijcih, kjer je povprečna pojavnost sindroma 3 % [36]. Moški pogostejše posegajo v območje povišanih koncentracij BLR, značilnih za Gilbertov sindrom (12,4 %), kot ženske (4,8 %). Serumske koncentracije celotnega BLR se dvignejo na 20 do 50 $\mu\text{mol/L}$, redko pa presežejo 85 $\mu\text{mol/L}$ (referenčne vrednosti za odrasle so do 17 $\mu\text{mol/L}$). Značilno je, da vrednosti nihajo in narastejo ob metabolnem stresu kot je stradanje ali prisotnost druge bolezni.

Vzroki za GS še niso povsem razjasnjeni. Najpomembnejšo vlogo igra znižana konjugacija BLR, ki je pri bolnikih z GS znižana na 30 % normalne. K povišanim koncentracijam nekonjugiranega BLR v plazmi pa prispeva tudi zmanjšan privzem v hepatocite. Za prvo so odgovoreni polimorfizemi gena za UGT1A1, za drugo pa polimorfizemi gena za organski anionski prenašalec 1B1 (SLCO1B1) [33].

Za GS je najpomembnejši polimorfizem gena za UGT1A1, kjer gre za dinukleotidni polimorfizem v TATA predelu promotorja. Normalni gen ima sekvenco A(TA)₆TAA, polimorfna oblika pa ima eno ponovitev TA več, torej dvobazno insercijsko mutacijo v promotorju: A(TA)₇TAA. Dinukleotid TA je lahko ponovljen tudi 5x ali 8x; v prvem primeru se transkripcija poveča, v drugem pa se zmanjša [37]. Homozigotno stanje za (TA)₇ in za (TA)₈ ter heterozigotno stanje za (TA)_{7/8} torej vodi v pojav Gilbertovega sindroma.

Diagnostika Gilbertovega sindroma je včasih težavna, ker je krvni nekonjugirani bilirubin lahko prehodno znižan zaradi indukcije jetrne glukuronidacije npr. z alkoholom ali križnicami. Gilbertov sindrom ima lahko za posledico dolgotrajno zlatenico pri doječih se dojenčkih, kasneje pa lahko povzroči zlatenico pri drugih sočasnih motnjah v presnovi hemoglobina. Lahko tudi vodi do počasnejšega glukuronidiranja nekaterih učinkovin in posledično do morebitnih neželenih učinkov [34].

Crigler-Najjarov sindrom: Pacienti s Crigler-Najjarovim sindromom tipa I imajo izredno povečane koncentracije bilirubina v serumu (340-760 µmol/L), ki lahko povzroči smrt zaradi bilirubinske encefalopatije (kernikterus). Gre za popolno odpoved delovanja encima UGT1A1. Pacienti s tipom II pa imajo zmernejšo obliko hiperbilirubinemije, ki se jim vleče od neonatalnega obdobja in s koncentracijami bilirubina 100-430 µmol/L navadno nimajo težav z zdravjem. Encim UGT1A1 v tem primeru ostaja aktiven, vendar je njegova aktivnost zmanjšana (pod 10% normalne) [35].

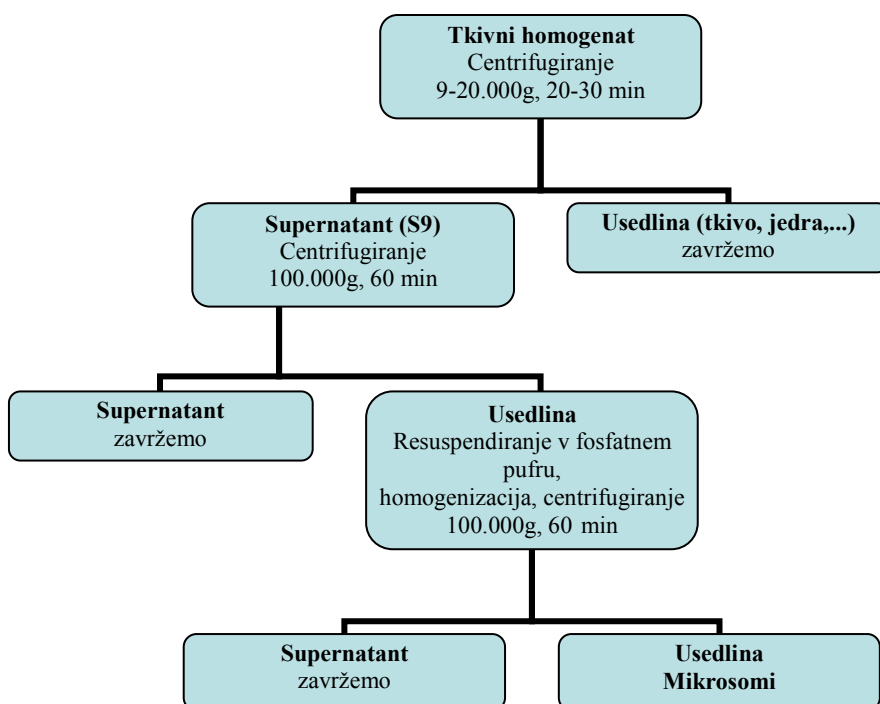
1.4 IN VITRO MODELI ZA PREISKOVANJE METABOLIZMA

Pri raziskovanju metabolizma učinkovin si pomagamo z *in vitro* metodami, ki so cenejše in dostopnejše kot *in vivo* metode. Nudijo nam prve podatke o kinetiki učinkovine, hkrati pa predstavljajo sistem z omejenim številom spremenljivk. Ti modeli, ki poenostavljeno posnemajo pogoje v organizmu, so lahko celični (tkivne rezine, izolirani in kultivirani

hepatociti, jetrne celične linije), kot tudi subcelični (od najbolj kompleksnega k najenostavnejšemu: jetrni homogenat, S9 frakcija, citosol, mikrosomi, peroksisomi in mitohondriji). V naši diplomski nalogi smo uporabili mikrosome.

1.4.1 Mikrosomi

Mikrosomi spadajo med subcelične frakcije. So majhni membranski vezikli, s premerom 20-200 nm. Nastanejo iz gladkega endoplazmatskega retikuluma pri homogenizaciji tkiva in ultracentrifugiranju. Mikrosomi so najenostavnejši *in vitro* model pridobljen iz organov (npr. jeter, tankega črevesa, ledvic,...). V njih so prisotni encimi prve in tudi nekateri encimi druge faze metabolizma zdravil. Tako vsebujejo encime CYP 450, flavinske monooksigenaze (FMO), epoksidne hidrolaze, glukuronoziltransferaze, esteraze, amidaze, mikrosomske glutation-S-transferaze in metiltransferaze [38, 39]. Njihova prednost je ta, da dajejo precej ponovljive rezultate, da imajo visoko vsebnost metaboličnih encimov in da izkazujejo relativno majhno nespecifično vezavo učinkovin. Da se jih dobro shranjevati (krioprezervacija) in tudi po večkratnem zamrzovanju ter odtajevanju dajejo ponovljive rezultate. Vse to so razlogi, da so mikrosomi še danes najpogosteje uporabljan *in vitro* sistem za preučevanje metabolizma [40, 41]. Z njimi lahko napovedujemo poti razgradnje učinkovine in identificiramo ter pridobivamo standarde metabolitov. Uporabni so tako za določanje parametrov encimske kinetike kot tudi za napovedovanje intrinzičnega očistka. Pridobivanje mikrosomov je relativno enostavno. Izolacijo subceličnih frakcij izvedemo z razbitjem celic s homogenizacijo v ustreznem pufri, ki ji sledi diferencialno centrifugiranje (uporaba razlik v gostoti in velikosti delcev) in resuspenzija usedline v primernem pufri za shranjevanje ali izolacija topne frakcije. Shema priprave mikrosomov je prikazana na sliki 6.



Slika 1 6: Shema priprave mikrosomov [42].

Pri napovedovanju *in vivo* metaboličnega očistka iz mikrosomskih kinetičnih podatkov je treba biti previden, ker mnogokrat ne vemo, kakšna je koncentracija učinkovine v celicah (približno v taki koncentraciji moramo inkubirati mikrosome). Podobno težavo imamo s koncentracijo kofaktorjev (npr. uridin difosfoglukuronska kislina in alametacin za UGT) – te moramo običajno dodati v prebitku, kar pa lahko vpliva na rezultate. Dodatna oteževalna okolščina je tudi v izračunu vpliva vezave učinkovine na plazemske proteine na koncentracijo učinkovine v celici.

Uporaba mikrosomov za določitev Cl_{int} , lahko v primeru, ko prevladuje metabolizem druge faze (konjugacija) in/ali mehanizem aktivnega privzema, pripelje do napovedi netočne vrednosti Cl_{int} *in vivo* [43]. Pomanjkljivost uporabe mikrosomov je tudi nezmožnost kvantitativne ocene biotransformacije *in vivo*, saj je v mikrosomih povečana količina CYP in UGT encimov, odsotno pa je tekmovanje z drugimi encimi [44]. Naslednji problem predstavlja dostopnost aktivnega mesta mikrosomskih encimov, ki je v nekaterih primerih, kot na primer pri UGT, obrnjeno v notranjost mikrosoma. Difuzijsko bariero, ki jo predstavlja njegova membrana, lahko prekinemo s pomočjo močnega ultrazvoka, površinsko aktivnih snovi (npr. Brij 58) ali pa s posebnim proteinom, ki naluknja membrano (alametacin) [45]. V primeru, da tega ne storimo, lahko določimo nižji očistek,

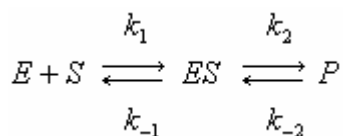
kot je v resnici. Vzrok za prenizko oceno očiščka je lahko tudi vrsta pufra, njegov pH in ionska moč. Na oceno očiščka organa pomembno vpliva tudi obseg vezave na plazemske proteine in mikrosome [46].

1.5 FARMAKOKINETIKA IN ENCIMSKA KINETIKA

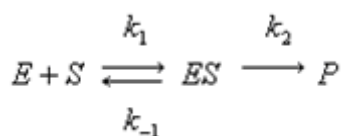
Farmakokinetika poskuša s pomočjo farmakokinetičnih modelov razložiti obnašanje učinkovine v telesu, predvideti koncentracije učinkovine v plazmi in s tem napovedati farmakološki učinek oz. neželene učinke zdravila. Predvsem na nivoju metabolizma se pojem farmakokinetike sreča z encimsko kinetiko. Slednja se osredotoča na časovno odvisne encimske reakcije, ki težijo k temu, da bi dosegle neko stacionarno stanje in predstavlja temelj metaboličnih sprememb v organizmu.[47]

1.5.1 Kinetika enosubstratne encimsko katalizirane reakcije [48]

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



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



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

a) Michaelis-Mentenova kinetika temelji na predpostavki, da se takoj vzpostavi in nato tudi vzdržuje ravnotežje med encimom, substratom in kompleksom encim-substrat, medtem ko

je razpad kompleksa ES v produkt prepočasen, da bi zmotil to ravnotežje. Če želimo uporabiti Michaelis-Mentenovo enačbo, moramo upoštevati naslednje predpostavke:

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

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

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

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

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

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

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

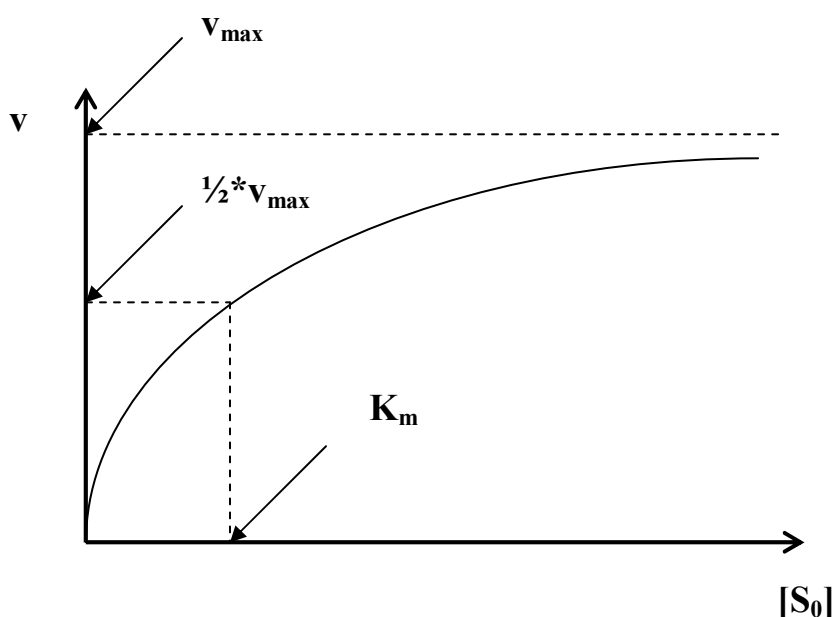
- V_o začetna hitrost
- E_o (začetna) koncentracija encima
- S_o začetna koncentracija substrata
- K_m Michaelis- Mentenova konstanta

k_2 konstanta hitrosti razpada kompleksa ES v produkt P

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

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

Graf odvisnosti hitrosti reakcije od koncentracije substrata pa bo v tem primeru izgledal tako, kot je prikazano na sliki 1.7.



Slika 1.7: Odvisnost hitrosti reakcije od koncentracije substrata glede na enačbo 1.2.

1.5.1.1 Substratna inhibicija

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

manjšo afiniteto, zato se zasede šele pri visokih koncentracijah substrata in ob tem ovira nadaljnjo reakcijo [48].

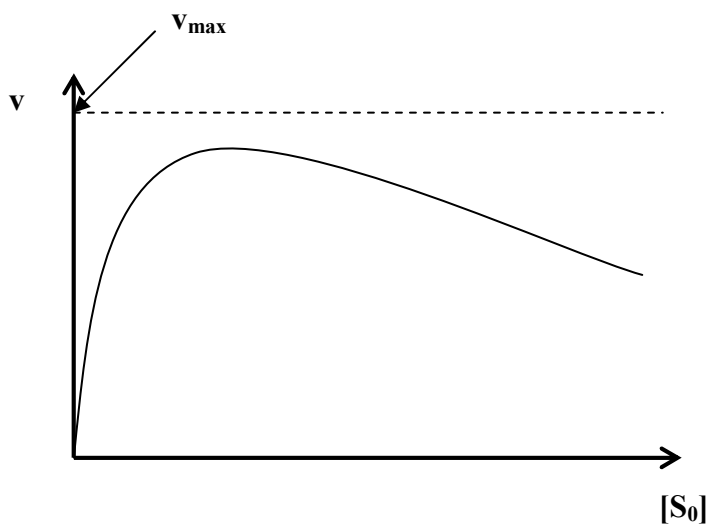
Iz Michaelis-Mentenove enačbe lahko izpeljemo enačbo za substratno inhibicijo in sicer s predpostavko, da gre za nekompetitivno inhibicijo, kjer je inhibitor neka dodatna, sekundarna molekula substrata. Dobimo enačbo 1.3:

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

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

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

Na sliki 1.8, ki prikazuje odvisnost hitrosti reakcije od koncentracije substrata, vidimo pojav substratne inhibicije kot odklon krivulje od asimptotične vrednosti v_{\max} .



Slika 1.8: Odvisnost hitrosti encimske reakcije od količine substrata ob prisotnosti substratne inhibicije.

1.5.2 Določevanje navideznih encimskih parametrov

Navidezni encimski parametri so osnova za izračun intrinzičnega očistka, zato jih je treba pridobiti iz eksperimentalnih podatkov. Slednje lahko obdelamo na več različnih načinov, vendar se moramo ob tem zavedati, da lahko različne metode obdelave podatkov vodijo do različnih rezultatov, saj vsaka metoda v sebi nosi določeno napako. Zato je treba dobljene rezultate tudi ustrezno interpretirati [49]. Cilj obdelave eksperimentalnih podatkov je pridobitev podatov o maksimalni hitrosti (v_{\max}) in Michaelis-Mentenovi konstanti (K_m), ki ju bomo v nadaljevanju uporabili za izračun intrinzičnega očistka.

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

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

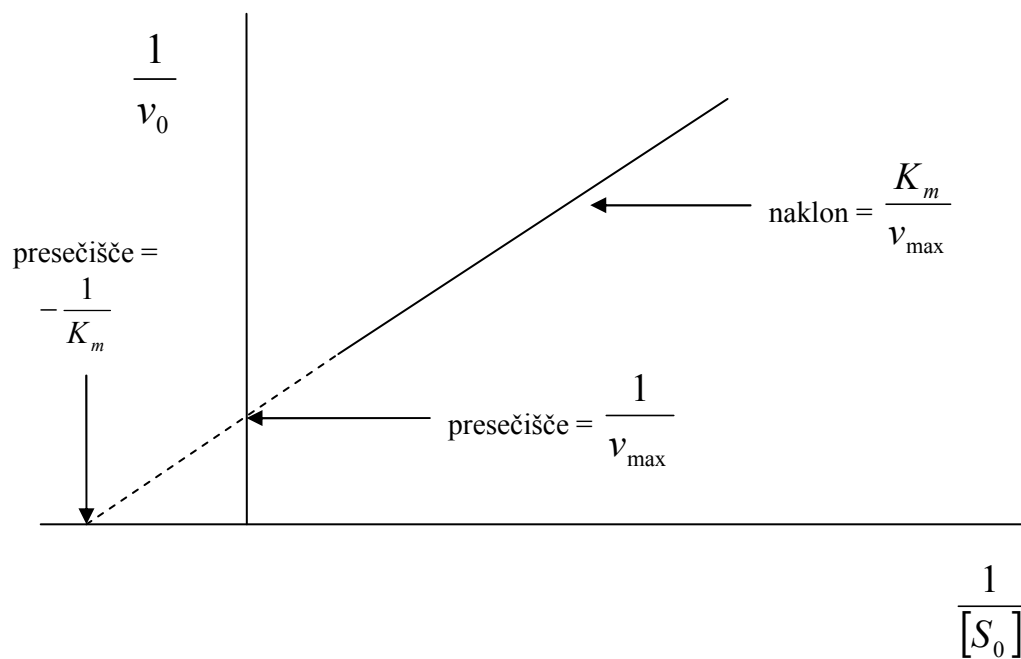
Pri obdelavi podatkov z linearizacijo smo uporabili Lineweaver-Burkov model, ki je predstavljen v nadaljevanju.

Lineweaver Burk-ova enačba

Za sisteme, ki sledijo Michaelis-Mentenovi kinetiki, lahko narišemo graf $1/v_0$ v odvisnosti od $1/S_0$, kot je to predstavljeno na sliki 1.9, in ob tem dobimo premico. Dobljeno premico ekstrapoliramo čez os y , tako da dobimo dve presečišči. Presečišče z osjo y je enako vrednosti $1/v_{\max}$, presečišče z osjo x pa $-1/K_m$. Premica sledi enačbi 1.5.

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

Enačba 1.5

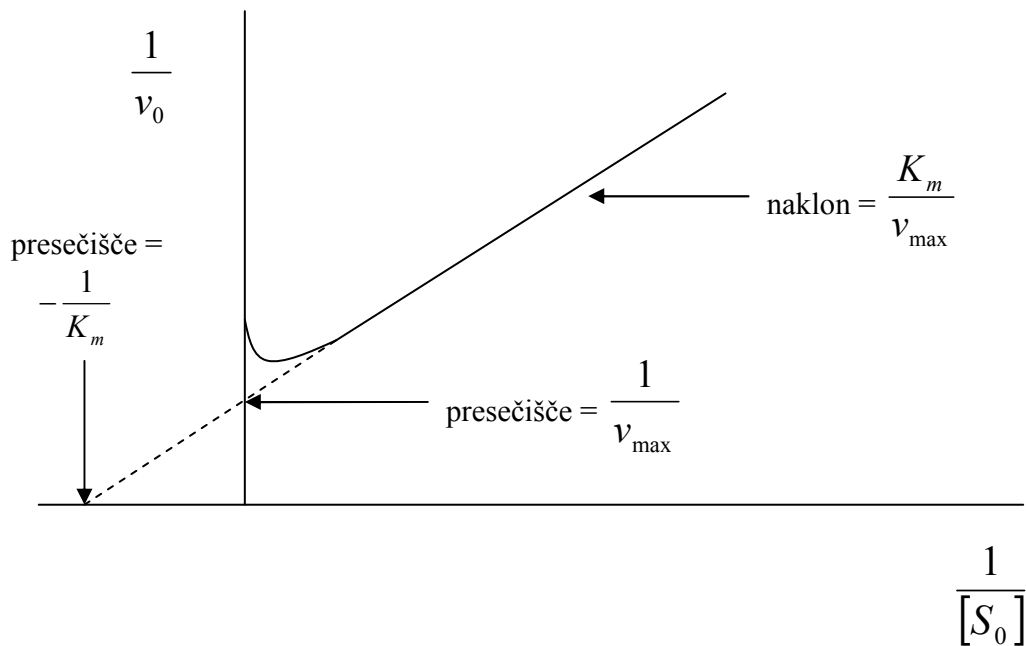


Slika 1.9: Grafični prikaz Lineweaver-Burk-ove enačbe.

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

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

Enačba 1.6



Slika 1.10: Grafični prikaz Lineweaver-Burk-ove enačbe s substratno inhibicijo.

Kot je iz slike 1.10 razvidno, se pri višjih koncentracijah substrata premica odkloni in oblikuje krivuljo, ki se asimptotično približuje osi y . Za izračun parametrov tako upoštevamo le podatke pri nižjih koncentracijah substrata, kjer z linearno regresijo izračunamo enačbo premice in s tem njeno presečišče x in y osi.

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

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

Danes se največ uporablja slednji način obdelave podatkov, se pa priporoča vsaj vizualni pregled katere od metod linearizacije. Bistveni odstop od premice namreč pomeni, da opazovana encimska reakcija ni sledila Michaelis-Mentenovim predpostavkam oziroma da gre za netipično kinetiko [13].

1.5.3 Napovedovanje metaboličnega očistka

Za napovedovanje metaboličnega očistka moramo poznati vrsto metabolične reakcije, odgovoren encim, produkt reakcije in encimske kinetične parametre. S pomočjo encimskih kinetičnih parametrov, kot so npr. K_m , V_{max} , K_i , lahko uporabimo katerega od matematičnih modelov za napovedovanje *in vivo* metaboličnega očistka. Ob tem pa moramo poznati tudi nekatere *in vivo* parametre npr. vezavo učinkovine na plazemske proteine in njen porazdelitveni volumen [50].

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, hitrosti nastajanja in izginjanja snovi pa so največkrat 1. reda. Za fiziološke modele je značilno, da imajo prostori definirano anatomsko sestavo, snovi v teh prostorih lahko nastajajo in izginjajo, hitrosti procesov pa so odvisne od hitrosti pretoka krvi skozi organ.

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

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

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

V_D volumen porazdelitve [L];

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

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

Q pretok skozi organ [L/h]

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

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

Intrinzični očistek

Intrinzični očistek izraža sposobnost organa za metabolično odstranjevanje nevezane učinkovine. Je proporcionalna konstanta med hitrostjo odstranjevanja in koncentracijo nevezane učinkovine. Odraža dogajanja znotraj celice in zato poda vrednost, ki bi jo dobili,

če ne bi bilo prisotne vezave na proteine ali omejitve s pretokom. Prav zaradi tega so vrednosti tega očistka ponavadi več redov velikosti večje od pretoka krvi skozi organ.

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

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

- T_m največja hitrost prenosa učinkovine
 - K_d konstanta disociacije vsakega prenašalca, vpletenega v izločanje učinkovine
- [51]

Očistek organa

Jetra so najpomembnejši organ za odstranjevanje učinkovin iz telesa. So dobro prekrvavljena in imajo strukturo, ki omogoča direkten stik med krvjo in jetrnimi celicami, ki vsebujejo vrsto presnovnih encimov. K metabolizmu učinkovin pomembno prispevajo tudi črevo, ledvice in pljuča.

Za izračun očistka učinkovine v določenem organu lahko uporabimo različne fiziološke modele:

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

Za izračun očistka raloksifena in bazedoksifena v različni organih (jetra, črevo in ledvice) smo izbrali model dobrega mešanja. Ta model predpostavlja, da so molekule učinkovine homogeno razporejene po celem organu, torej je koncentracija učinkovine po celem organu enaka. Določen 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.

Enačba, ki opisuje model dobrega mešanja:

$$Cl_o = \frac{Q_o \times f_{u,b} \times Cl_{int,o}}{Q_o + f_{u,b} \times Cl_{int,o}} ;$$

Enačba 1.10

Cl_o očistek organa

Q_o pretok krvi skozi organ

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

$Cl_{int,o}$ intrinzični očistek organa [52]

2 NAMEN DELA

Bazedoksifen je nova učinkovina, ki je bila v Evropi šele pred kratkim registrirana. Strukturno je zelo podoben raloksifenu in naj bi se tudi uporabljal za zdravljenje in preprečevanje osteoporoze. Pri terapiji z raloksifenom so opazili pomembne interindividualne razlike v plazemskih koncentracijah raloksifena in njegovih metabolitov, kar je bilo povezano tudi z različno učinkovitostjo terapije pri pacientkah. Eden od vzrokov za variabilnost farmakokinetike raloksifena je relativno pogost polimorfizem v genu za metabolični encim UGT1A1, ki konjugira raloksifen z glukuronsko kislino in ga s tem inaktivira. Ker je bazedoksifen nova učinkovina, so literaturni podatki o njegovem metabolizmu zaenkrat še zelo skopi. Prav tako še ni popolnoma pojasnjeno, s katerimi encimi in v katerih organih poteka največji del njegovega metabolizma.

Namen diplomske naloge je ugotoviti, kateri organ (jetra, pljuča, ledvica, tanko črevo) ima največji doprinos k celokupnemu metaboličnemu očistku raloksifena in bazedoksifena, opredeliti vrsto encimske kinetike in izračunati očistek posameznega organa. Drugi namen našega dela je ugotoviti, če genetski polimorfizem *UGT1A1**28 pomembno vpliva na hitrost metabolične inaktivacije bazedoksifena, tako kot je to naša raziskovalna skupina že ugotovila za strukturno podoben raloksifen.

3 MATERIALI IN METODE

3.1 MATERIALI

Testirane učinkovine:

- bazedoksifen; sintetiziran in karakteriziran na Fakulteti za farmacijo, Ljubljana; stopnja čistosti: > 97,5 %,
- raloksifen, ekstrahiran z metanolom iz tablet Evista ® (Lilly & Co.), stopnja čistosti: > 98,5 %.

Druge snovi:

- bidestilirana voda – mili-Q voda, pridobljena z aparatom Milli-Q Advantage A10 Ultrapure Water Purification System (Millipore, Bedford, ZDA), na Fakulteti za farmacijo, Ljubljana,
- DMSO – dimetil sulfoksid; 99%, Kemika, $M = 78,13 \text{ g/mol}$, $\rho = 1,099 - 1,101$,
- Albumin 200 g/L, Octapharma,
- metanol, Sigma,
- haloperidol, Sigma,
- raztopina A (UGT Reaction Mix solution A, BD Biosciences), vsebuje 25 mM uridin 5'-difosfoglukuronske kisline (UDPGA) v vodi,
- raztopina B (UGT Reaction Mix solution B, BD Biosciences), vsebuje 250 mM TRIS-HCl, 40 mM MgCl₂ in 0,125 mg/mL alameticina v vodi,
- Mikrosomi (pooled), 20 mg/mL: gre za združene mikrosome več različnih dajalcev z različnimi genotipi :
 1. človeški jetrni mikrosomi (Human liver microsomes CMV negative pooled, BD Biosciences),
 2. človeški črevesni mikrosomi (Human mixed sex intestinal microsomes pooled, Celsis IVT),
 3. človeški ledvični mikrosomi (Human mixed sex kidney microsomes, pooled, Celsis IVT),
 4. človeški pljučni mikrosomi (Human mixed sex lung microsomes, pooled, Celsis IVT),
- mikrosomi (20 mg/mL), genotipizirani glede na polimorfizem gena za UGT1A1:
 1. homozigoti *UGT1A1**1 / *UGT1A1**1 (Human liver microsomes allelic variant - UGT1A1*1*1),

2. heterozigoti *UGT1A1*1 / UGT1A1*28* (Human liver microsomes allelic variant - UGT1A1*1*28),
3. homozigoti *UGT1A1*28 / UGT1A1*28* (Human liver microsomes allelic variant - UGT1A1*28*28).

Aparature:

- LC/MS/MS sistem: - UPLC: Agilent 1290 Infinity,
- MS: Agilent 6460 Triple quad,
- tehtnica Mettler toledo AB54-S,
- termični stresalnik, Tehnica, Vortemp 56EVC,
- centrifuga, Tehnica, Centric 322A,
- centrifuga Sigma 3K30,
- hladilno-grelna plošča, Cole-Parmer[®], Chilling/Heating Block,
- ročno mešalo, Tehnica, Vibromix 114,
- multipeta, Eppendorf Multipette[®] plus,
- nastavki za multipeto, Combitips pluss 0,1; 1,0; 5 mL,
- večkanalne pipete, Eppendorf, (0,5 – 10 µL, 30 – 300 µL),
- pipete, Eppendorf Research:
 - 0,5 – 10 µL,
 - 2 – 20 µL,
 - 20 – 200 µL,
 - 100 – 1000 µL,
 - 1 – 10 mL,
- mikrotiterske plošče, Eppendorf, Deepwell plate 96 / 1000 µL, Protein LoBind,
- mikrotiterske plošče, Agilent 96 / 300 µL.

PRIPRAVA RAZTOPIN ALBUMINA:

- **Priprava 1,5 % raztopine albumina:** v 10 mL bučko smo odmerili 750 µL 20 % razt. albumina, do vrha napolnili z bidestilirano vodo in dobro premešali.
- **Priprava 1 % raztopine albumina:** v 25 mL bučko smo odmerili 1250 µL 20 % razt. albumina, do vrha napolnili z bidestilirano vodo in dobro premešali.

PRIPRAVA OSNOVNIH RAZTOPIN:

- **Priprava osnovnih raztopin raloksifena:** zatehtali smo 13,20 mg raloksifena in ga raztopili v 1,07 mL DMSO. Tako smo dobili 26 mM raztopino raloksifena. To raztopino smo potem redčili naprej z DMSO, tako da smo dobili 17 različnih koncentracij raloksifena v območju od 0,5 mM do 26 mM (tabela 3.1).
- **Priprava osnovnih raztopin bazedoksifena:** zatehtali smo 13,23 mg bazedoksifena in ga raztopili v 1,08 mL DMSO. Dobili smo 26 mM raztopino bazedoksifena. Postopek redčenja je bil enak kot pri raloksifenu.

PRIPRAVA DONORSKIH RAZTOPIN:

- **Priprava donorskih raztopin raloksifena:** Potrebovali smo 450 μ L vsake donorske raztopine (4 paralelke po 100 μ L + dodatek zaradi izgub). K 6,75 μ L osnovne raztopine raloksifena smo dodali 443,25 μ L 1,5 % raztopine albumina in premešali. Tako smo dobili ustrezne koncentracije donorskih raztopin, ki so zbrane v tabeli 3.1.
- **Priprava donorskih raztopin bazedoksifena:** Postopek je bil enak kot pri raloksifenu, le da smo namesto raloksifena uporabili bazedoksifen.

Tabela 3.1: Koncentracije raloksifena in bazedoksifena v različnih raztopinah

Koncentracija osnovne razt. (mM)	Koncentracija donorske razt. (μ M)	Koncentracija v inkubatu (μ M)
0,5	7,5	5
1	15	10
2	30	20
3	45	30
4	60	40
5	75	50
6	90	60
7	105	70
8	120	80
9	135	90
10	150	100
12	180	120
14	210	140
16	240	160
18	270	180
22	330	220
26	390	260

PRIPRAVA RAZTOPINE METANOLA S HALOPERIDOLOM:

V 1000 mL bučko smo zatehtali 0,5 mg haloperidola in dopolnili do vrha z metanolom. Tako smo dobili raztopino metanola s haloperidolom s koncentracijo 0,5 mg/L.

PRIPRAVA UMERITVENE PREMICE

a) Kinetika

K 10 μL 26 mM osnovne raztopine testirane učinkovine (raloksifena oz. bazedoksifena) smo dodali 990 μL 1 % raztopine albumina in dobro premešali (raztopina 1). Raztopino 1 smo pripravili v dveh paralelkah. Iz ene paralelke raztopine 1 smo odpipetirali 500 μL , 200 μL in 100 μL raztopine 1 v nove epice in jih dopolnili do 1000 μL z 1 % raztopino albumina (dobili smo raztopine 2, 3 in 4). Raztopino 4 smo pripravili 2 \times in nato po enakem postopku redčili naprej vse do raztopine 16 (tabela 3.2). Na ta način smo dobili raztopine s koncentracijami, katerih vrednosti so navedene v tabeli 3.3.

Tabela 3.2: Shema za pripravo umeritvene premice

številka raztopine	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16
volumen učinkovine (μL)	10	500	200	100	500	200	100	500	200	100	500	200	100	500	200	100
volumen 1% razt. albumina (μL)	990	500	800	900	500	800	900	500	800	900	500	800	900	500	800	900
PARALELKE:																
volumen učinkovine (μL)	10			100			100			100			100			
volumen 1% razt. albumina (μL)	990			900			900			900			900			

Tabela 3.3: Koncentracije raztopin raloksifena in bazedoksifena v raztopinah za umeritveno premico

številka raztopine	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16
koncentracija (μM)	260	130	52	26	13	5,2	2,6	1,3	0,52	0,26	0,13	0,052	0,026	0,013	0,0052	0,0026

b) Časovni potek

K 2,3 μL 26 mM osnovne raztopine testirane učinkovine (raloksifena oz. bazedoksifena) smo dodali 997,3 μL 1 % raztopine albumina in dobro premešali (raztopina 1). Raztopino 1 smo pripravili v dveh paralelkah. Iz ene paralelke raztopine 1 smo odpipetirali 500 μL , 200 μL in 100 μL raztopine 1 v nove epice in jih dopolnili do 1000 μL z 1 % raztopino

albumina (dobili smo raztopine 2, 3 in 4). Raztopino 4 smo pripravili 2× in nato po enakem postopku redčili naprej vse do raztopine 10 (tabela 3.4). Na ta način smo dobili raztopine s koncentracijami, katerih vrednosti so navedene v tabeli 3.5.

Tabela 3.4: Shema za pripravo umeritvene premice

številka raztopine	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
volumen učinkovine(μL)	2,3	500	200	100	500	200	100	500	200	100
volumen 1% razt. albumina (μL)	997,7	500	800	900	500	800	900	500	800	900
PARALELKE:										
volumen učinkovine(μL)	2,3			100			100			
volumen 1% razt. albumina (μL)	997,7			900			900			

Tabela 3.5: Koncentracije raztopin raloksifena in bazedoksifena v raztopinah za umeritveno premico

številka raztopine	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
koncentracija (μM)	60	30	12	6	3	1,2	0,6	0,3	0,12	0,06

3.2 METODE

3.2.1 Časovno spremljanje nastajanja metabolitov raloksifena in bazedoksifena v različnih organih

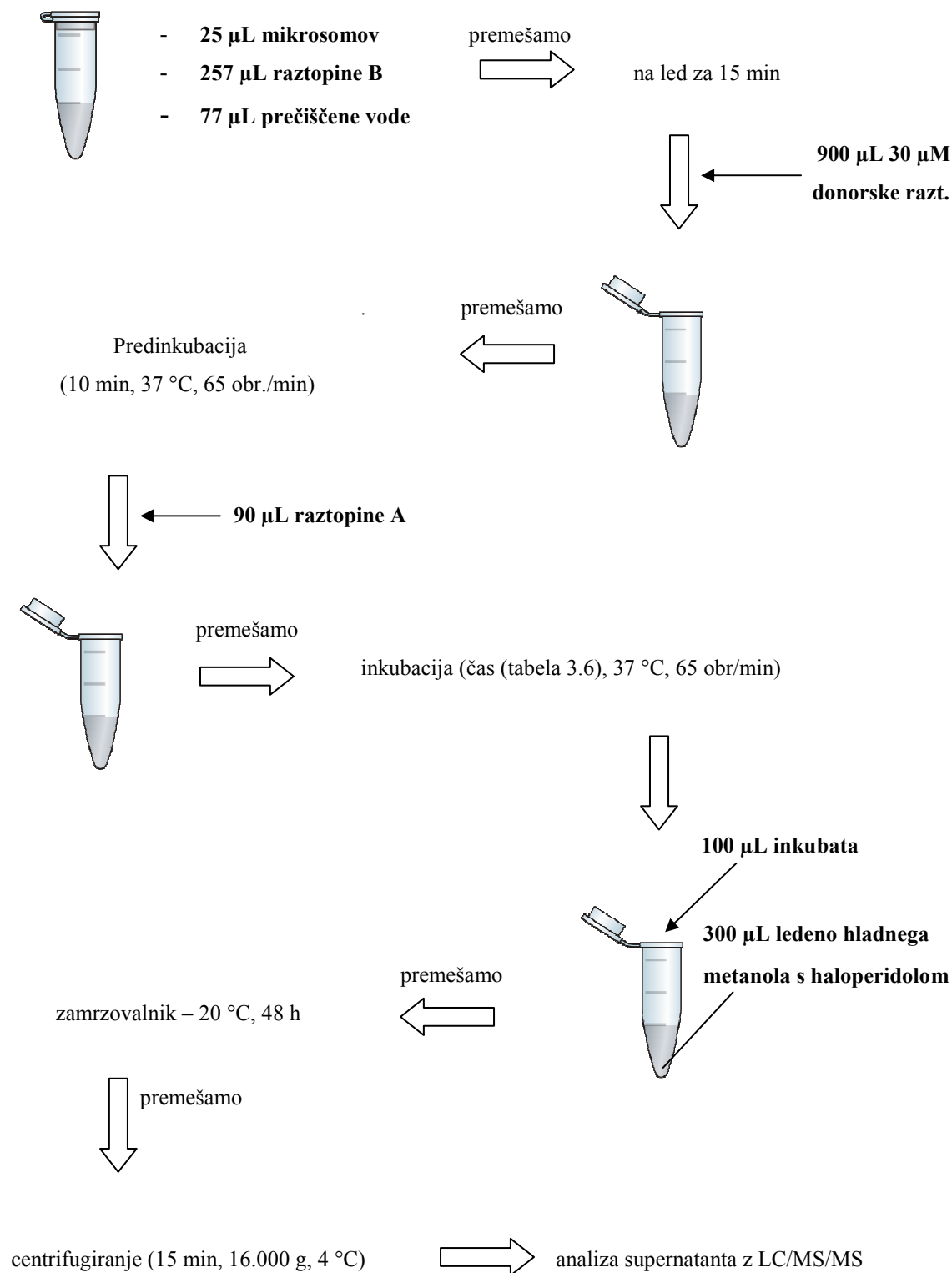
Poskuse smo izvedeli na različnih človeških mikrosomih, in sicer jetrnih, črevesnih, ledvičnih in pljučnih (glej poglavje 3.3). Postopek za izvedbo je bil pri vseh poskusih enak:

1. Mikrosome smo vzeli tik pred poskusom iz zamrzovalnika, kjer smo jih hranili na $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$. Odtalili smo jih pod tekočo vodo in takoj postavili na led.
2. Pripravili smo zmes mikrosomov: k $25\text{ }\mu\text{L}$ mikrosomov smo dodali $257\text{ }\mu\text{L}$ raztopine B in $77\text{ }\mu\text{L}$ prečiščene vode. Zmes smo dobro premešali na ročnem mešalu in postavili na led za 15 min.
3. K zmesi smo dodali $900\text{ }\mu\text{L}$ $30\text{ }\mu\text{M}$ donorske raztopine (raloksifena oz. bazedoksifena) in dobro premešali. Koncentracija testirane učinkovine v končni inkubacijski zmesi je bila $20\text{ }\mu\text{M}$.
4. Sledi predinkubacija: zmes smo postavili v inkubator za 10 min pri temperaturi $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ in hitrosti mešanja 65 obratov/minuto.
5. Po 10 min smo dodali $90\text{ }\mu\text{L}$ raztopine A, dobro premešali in postavili v inkubator ($37\text{ }^{\circ}\text{C}$, hitrost mešanja 65 obratov/minuto).
6. Po točno določenem času (tabela 3.6) smo odpipetirali $100\text{ }\mu\text{L}$ inkubata in ga dodali k $300\text{ }\mu\text{L}$ ledeno hladnega metanola s haloperidolom, ki smo ga že prej pripravili v Eppendorfove epruvete (epice) in hladili na ledu.

Tabela 3.6: Čas inkubacije

Čas (min)	0	7	15	30	45	60	90	120	240	360	480
-----------	---	---	----	----	----	----	----	-----	-----	-----	-----

7. Epice smo dobro premešali in jih postavili v zamrzovalnik na $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ za 48 h.
8. Epice smo premešali in centrifugirali 15 min pri 16.000 g in $4\text{ }^{\circ}\text{C}$.
9. Supernatant smo analizirali z LC/MS/MS:



Slika 3.1: Prikaz izvedbe postopka za časovno spremljanje nastajanja metabolitov raloksifena in bazedoksifena v inkubacijski zmesi

3.2.2 Kinetika nastajanja metabolitov raloksifena in bazedoksifena v različnih organih

Vsak poskus smo izvedli v treh paralelkah, četrta paralelka pa je bila slepa (ni vsebovala raztopine A – UDPGA) in je bila namenjena kontroli koncentracij raloksifena oz. bazedoksifena ter njuni vezavi na sistem. Za vsak poskus smo uporabili drugo vrsto mikrosomov (glej poglavje 3.3).

1. Mikrosome smo vzeli tik pred poskusom iz zamrzovalnika, kjer smo jih hranili na -80 °C. Odtalili smo jih pod tekočo vodo in takoj postavili na led.
2. Sledila je priprava zmesi mikrosomov: k 221 µL mikrosomov smo dodali 2214 µL raztopine B in 664 µL prečiščene vode. Zmes smo dobro premešali na ročnem mešalu ter postavili na led za 15 min.
3. Z multipeto smo odpipetirali po 40 µL zmesi mikrosomov v prvih 18 luknjic na globoki (1000 µL) mikrotiterski plošči. Nato smo v vsako od teh luknjic odpipetirali po 100 µL donorske raztopine z ustrezno koncentracijo, tako da smo imeli na koncu 18 luknjic z različnimi koncentracijami testirane učinkovine (glej tabelo 3.7).

Tabela 3.7: shema pipetiranja različnih konc. (µM) testirane učinkovine (raloksifena oz. bazedoksifena) na mikrotitersko ploščo

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	
A	260	220	180	160	140	120	100	90	80	70	60	50	1. paralelka
B	40	30	20	10	5	1							
C	260	220	180	160	140	120	100	90	80	70	60	50	2. paralelka
D	40	30	20	10	5	1							
E	260	220	180	160	140	120	100	90	80	70	60	50	3. paralelka
F	40	30	20	10	5	1							
G	260	220	180	160	140	120	100	90	80	70	60	50	Kontrola koncentracij
H	40	30	20	10	5	1							

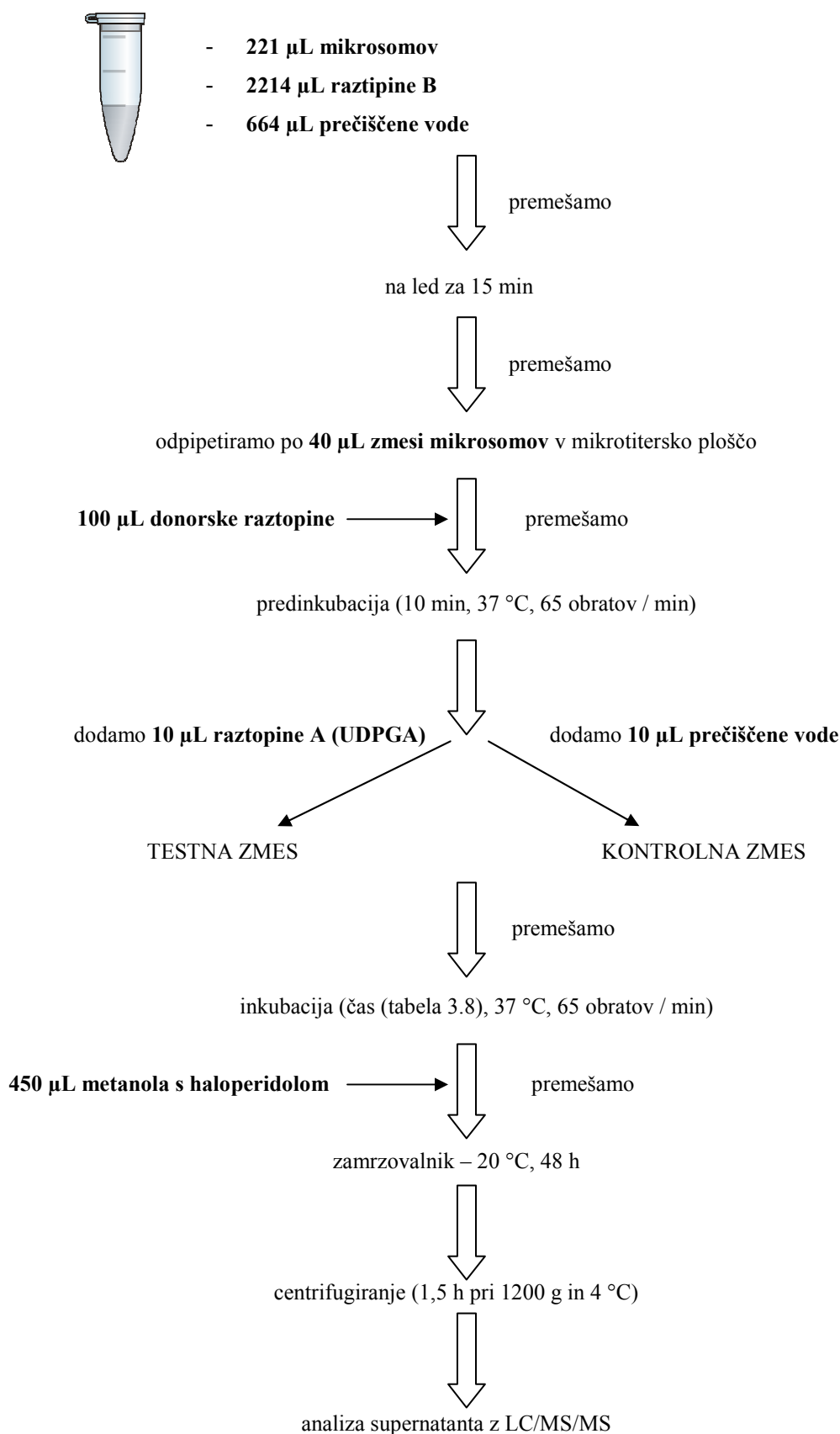
4. Sledila je predinkubacija: mikrotitersko ploščo smo postavili v inkubator za 10 min. Temperaturo v inkubatorju smo nastavili na 37 °C, hitrost mešanja na 65 obratov/minuto, pospešek na 1, čas pa na »hld«.
5. Po 10 min smo vzeli mikrotitersko ploščo iz inkubatorja in v vsako luknjico dodali po 10 µL raztopine A (razen v četrto paralelko smo dodali 10 µL vode, saj smo jo uporabili le za kontrolo koncentracij). Vse skupaj smo dobro premešali in ponovno

postavili v inkubator za določen čas (tabela 3.8). Čas smo začeli meriti, ko smo dodali raztopino A v prvo luknjico.

Tabela 3.8: Čas inkubacije

	BAZEDOKSIFEN (min)	RALOKSIFEN (min)
jetra	7	15
tanko črevo	7	4
ledvice	20	15

6. Po točno določenem času (glej tabelo 3.8) smo vzeli mikrotitersko ploščo iz inkubatorja, postavili na led in v luknjice takoj dodali trojni volumen (450 μL) raztopine metanola s haloperidolom v enakem vrstnem redu kot smo dodajali raztopino A.
7. Mikrotitersko ploščo smo tesno zaprli in postavili v zamrzovalnik na $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ za 48h.
8. Mikrotitersko ploščo smo centrifugirali 1,5 h pri 1200 g in $4\text{ }^{\circ}\text{C}$.
9. Odpipetirali smo po 100 μL supernatanta v nizko (300 μL) mikrotitersko ploščo v enakem vrstnem redu in analizirali z LC/MS/MS.



Slika 3.2: Prikaz izvedbe postopka za spremljanje hitrosti nastajanja metabolitov raloksifena in bazedoksifena v različnih organih.

3.2.3 Analitika

Raloksifen oz. bazedoksifen in njune metabolite smo določili s pomočjo sklopljene tehnike LC/MS/MS:

- UPLC: Agilent 1290 Infinity,
- MS: Agilent 6460 MSD (Triple quad.),
- kolona : Kinetex 2,6 μ m C18 (50 \times 2,10 mm); Phenomenex, Torrance, ZDA,
- predkolona: Phenomenex C18 (4 \times 2 mm),
- mobilna faza: A (vodna: 0,1 % mravljične kisline v bidestilirani vodi) in B (organska: 0,1 % mravljične kisline v 98 % acetonitrilu),
- temperatura kolone: 50 °C.

Raloksifen

Volumen injiciranja: 0,1 μ L.

Čas analize na MS: 0,7 – 2 min.

Tabela 3.9: Program gradientnega izpiranja na koloni po injiciranju vzorca

čas od začetka injiciranja (min)	% 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 3.10: 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 > 112	200	32	+	1,433
M1	650,2 > 474	200	28	+	1,073
M2	650,2 > 474	200	28	+	1,209
M3	826,2 > 474	200	40	+	0,906
HAL	376 > 165	200	32	+	1,463

Bazedoksifen

Volumen injiciranja: 0,1 µL.

Čas detekcije na MS: 1,1 – 2 min

Tabela 3.11: Program gradientnega izpiranja na koloni po injiciranju vzorca

čas od začetka injiciranja (min)	% 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 3.12: 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	+	1,633
M4	647 > 471	200	28	+	1,296
M5*	647 > 471	200	28	+	1,567
M6	823 > 471	200	40	+	-
HAL	376 > 165	200	32	+	1,502

* $V_{inj.} = 1 \mu L$, čas detekcije na MS = 1,1 – 1,61 min

3.2.4 Obdelava podatkov

IZRAČUN OČISTKA ORGANA IZ IN VITRO PODATKOV

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

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

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

Enačba 3.1

Ta očistek smo izračunali za vsak metabolit posebej (M1, M2 za raloksifen in M4, M5 za bazedoksifen). Ker je očistek učinkovine enak vsoti očistkov obeh metabolitov, smo ju sešteli. Sledila je ekstrapolacija dobljene vrednosti na celoten organ po enačbi 3.2, ki poda intrinzični očistek organa ($Cl_{int,o}$):

$$Cl_{int,o} = Cl_{int,mikrosomski} \times \frac{mg \text{ mikrosomov}}{g \text{ organa}} \times \frac{g \text{ organa}}{kg \text{ telesne teže}} \quad * \quad \text{Enačba 3.2}$$

* pri izračunu upoštevamo vrednosti prikazane v tabeli 3.13.

Tako smo dobili vrednost intrinzičnega očistka za celoten organ. V naslednjem koraku smo za izračun očistka organa uporabili model dobrega mešanja (glej poglavje 1.5.3.).

$$Cl_o = \frac{Q_o \times f_{u,b} \times Cl_{int,o}}{Q_o + f_{u,b} \times Cl_{int,o}} \quad ** \quad \text{Enačba 3.3}$$

** pri izračunu upoštevamo vrednosti prikazane v tabeli 3.13 in 3.14

Tabela 3.13: Človeški fiziološki in biokemični parametri pomembni pri ekstrapolaciji in vitro farmakokinetičnih podatkov [53]

	$\frac{mg \text{ mikrosomov}}{g \text{ organa}}$	$\frac{g \text{ organa}}{kg \text{ telesne teže}}$	Q_o (mL/min/kg)
jetra	45	20	20
ledvica	45	4,4	18
tanko črevo	3	30	4,6

Tabela 3.14: Frakcija nevezanega raloksifena [7] in bazedoksifena [22] v krvi

	$f_{u,b}$ (%)
raloksifen	5
bazedoksifen	1

3.3 IZVEDBA POSKUSOV

Naše eksperimentalno delo smo razdelili v več sklopov:

- I. sklop: Časovno spremljanje nastajanja metabolitov raloksifena in bazedoksifena v različnih organih:
 - inkubacija 20 μ M **raloksifena** s človeškimi jetrnimi, črevesnimi, ledvičnimi in pljučnimi mikrosomi,

- inkubacija 20 μ M **bazedoksifena** s človeškimi jetrnimi, črevesnimi, ledvičnimi in pljučnimi mikrosomi.
- II. sklop: Kinetika nastajanja metabolitov raloksifena in bazedoksifena v različnih organih
- inkubacija različnih koncentracij **raloksifena** s človeškimi jetrnimi, črevesnimi in ledvičnimi mikrosomi,
 - inkubacija različnih koncentracij **bazedoksifena** s človeškimi jetrnimi, črevesnimi in ledvičnimi mikrosomi
- III. sklop: Ugotavljanje vpliva polimorfizma *UGT1A1*28* na kinetiko nastajanja metabolitov bazedoksifena z mikrosomi, genotipiziranimi za ta encim.
- inkubacija različnih koncentracij **bazedoksifena** z mikrosomi genotipa *UGT1A1*1/UGT1A1*1*,
 - inkubacija različnih koncentracij **bazedoksifena** z mikrosomi genotipa *UGT1A1*1/UGT1A1*28*,
 - inkubacija različnih koncentracij **bazedoksifena** z mikrosomi genotipa *UGT1A1*28/UGT1A1*28*.

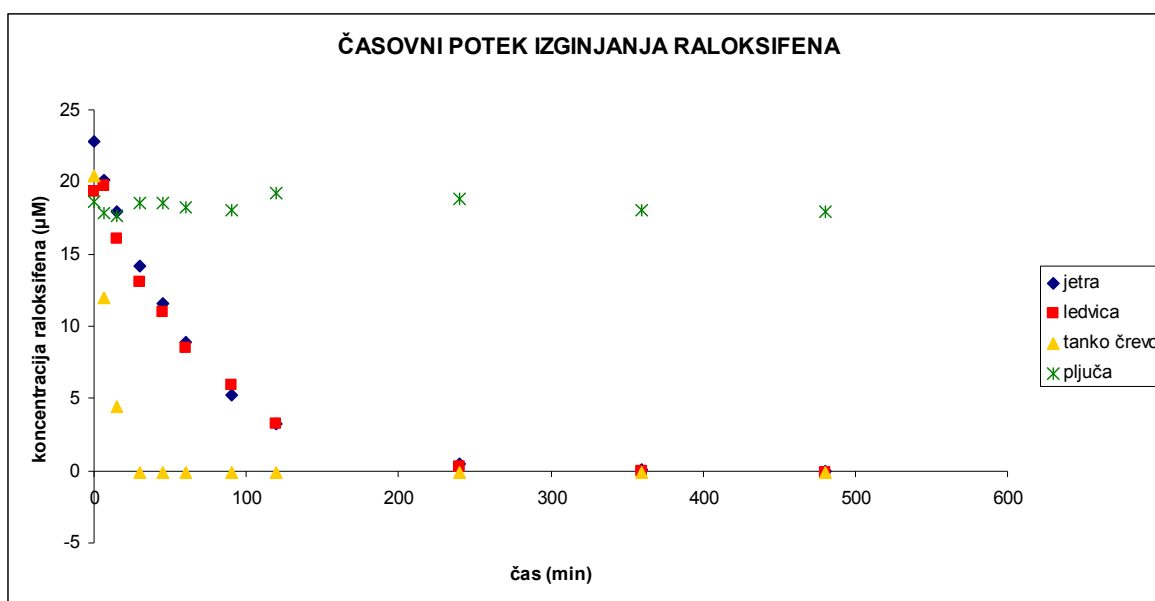
4 Rezultati in razprava

4.1 Časovno spremljanje nastajanja metabolitov raloksifena in bazedoksifena v različnih organih

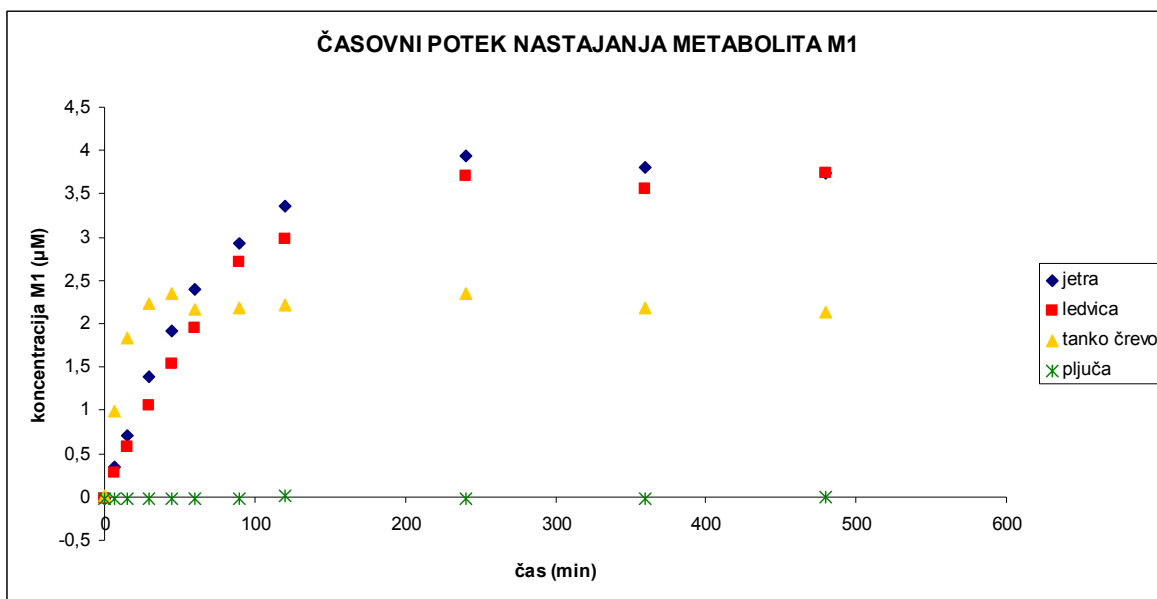
Na koncu vsakega poskusa smo z LC/MS/MS izmerili odzive vzorcev in s pomočjo umeritvene premice izračunali koncentracije nastalih metabolitov v inkubacijski zmesi. Rezultate smo prikazali v obliki grafov, ki prikazujejo časovni potek metabolizma testirane učinkovine oz. nastajanja njenih metabolitov.

4.1.1 Raloksifen

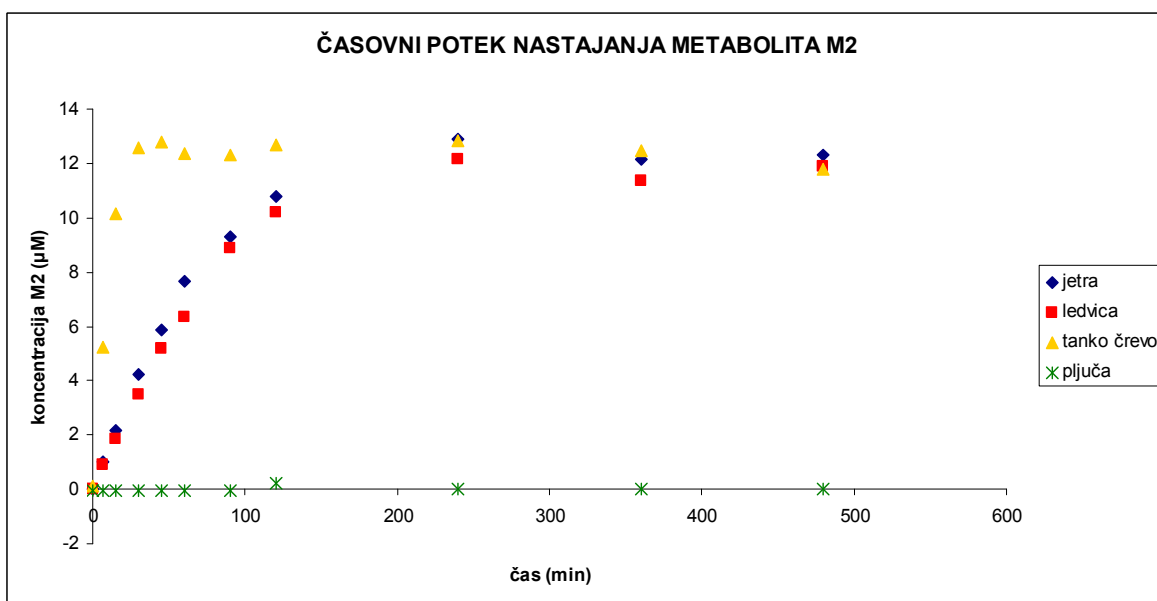
Na grafih (slika 4.1, 4.2, 4.3, 4.4) je prikazan časovni potek izginjanja raloksifena oz. nastajanja metabolitov M1, M2 in M3.



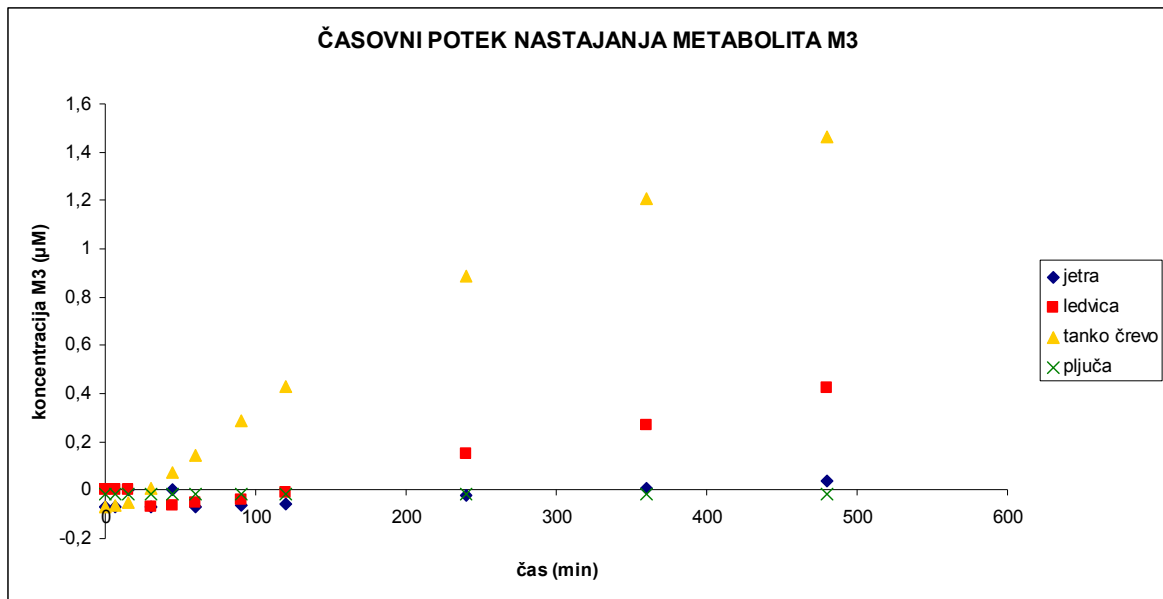
Slika 4.1: Časovni potek izginjanja raloksifena v inkubacijah z jetrnimi, ledvičnimi, črevesnimi in pljučnimi mikrosomi



Slika 4.2: Časovni potek nastajanja metabolita M1 v inkubacijah z jetrnimi, ledvičnimi, črevesnimi in pljučnimi mikrosomi



Slika 4.3: Časovni potek nastajanja metabolita M2 v inkubacijah z jetrnimi, ledvičnimi, črevesnimi in pljučnimi mikrosomi

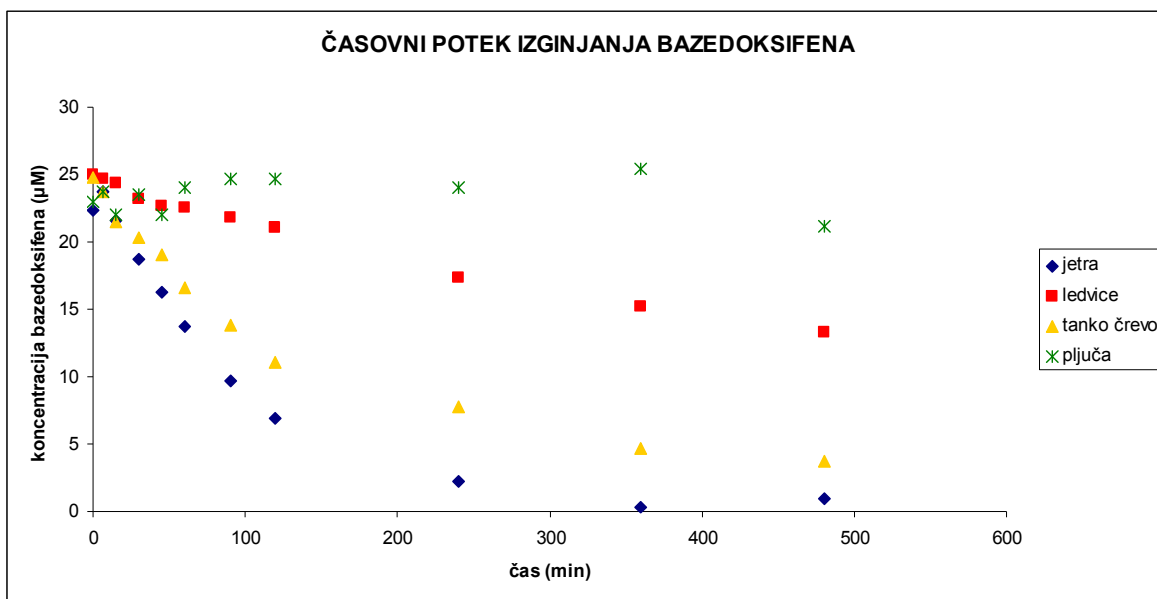


Slika 4.4: Časovni potek nastajanja metabolita M3 v inkubacijah z jetrnimi, ledvičnimi, črevesnimi in pljučnimi mikrosomi

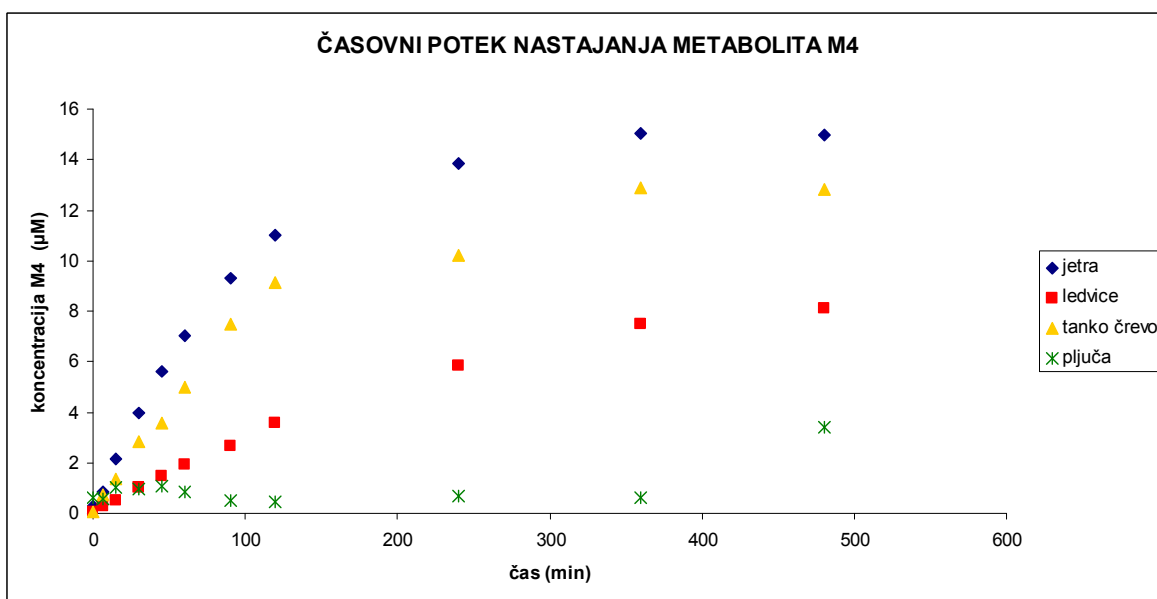
Metabolizem poteka najhitreje v črevesnih mikrosomih, nekoliko počasneje v jetrnih in ledvičnih mikrosomih, v pljučnih mikrosomih pa reakcija sploh ne poteče. V vseh mikrosomih nastane več metabolita M2 kot metabolita M1, v črevesnih in ledvičnih mikrosomih pa opazimo tudi nastanek metabolita M3. Namen časovnega spremljanja metabolizma je bil določiti čas inkubacije, pri katerem so še zagotovljeni pogoji linearne kinetike. Da pa so ti pogoji zagotovljeni, mora v inkubacijski zmesi po ustavitvi reakcije ostati še najmanj 80% nespremenjenega substrata [52]. Na podlagi tega pogoja smo določili čase inkubacij za jetrne, črevesne in ledvične mikrosome, ki so prikazani v tabeli 3.8.

4.1.2 Bazedoksifen

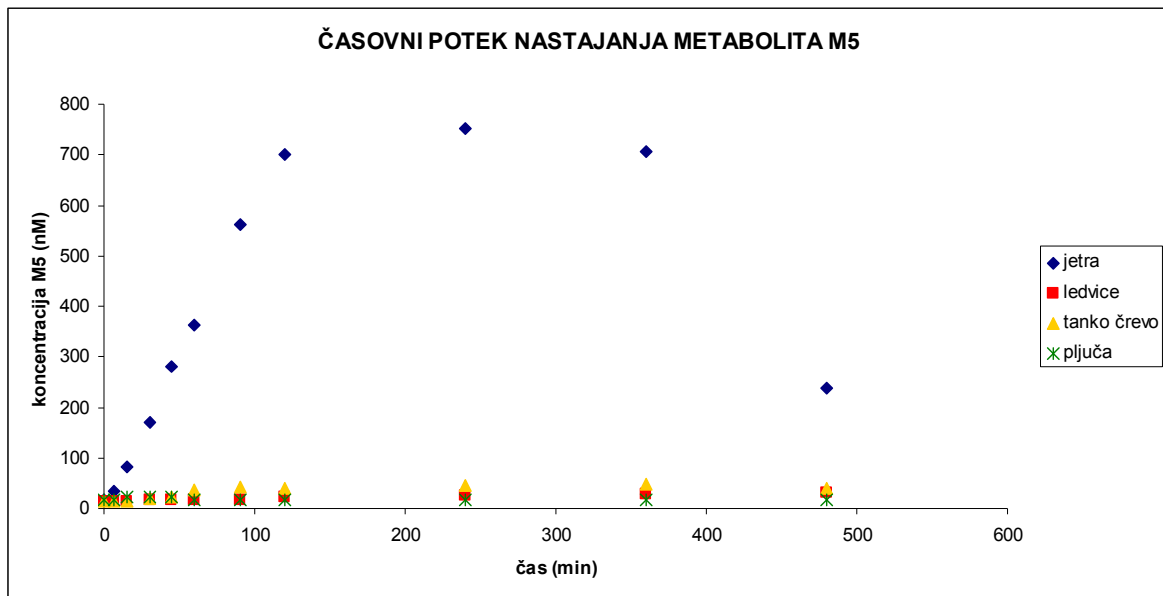
Na grafih (slika 4.5, 4.6, 4.7) je prikazan časovni potek izginjanja bazedoksifena oz. nastajanja metabolitov M4 in M5.



Slika 4.5: Časovni potek izginjanja bazedoksifena v inkubacijah z jetrnimi, ledvičnimi, črevesnimi in pljučnimi mikrosomi



Slika 4.6: Časovni potek nastajanja metabolita M4 v inkubacijah z jetrnimi, ledvičnimi, črevesnimi in pljučnimi mikrosomi



Slika 4.7: Časovni potek nastajanja metabolita M5 v inkubacijah z jetrnimi, ledvičnimi, črevesnimi in pljučnimi mikrosomi

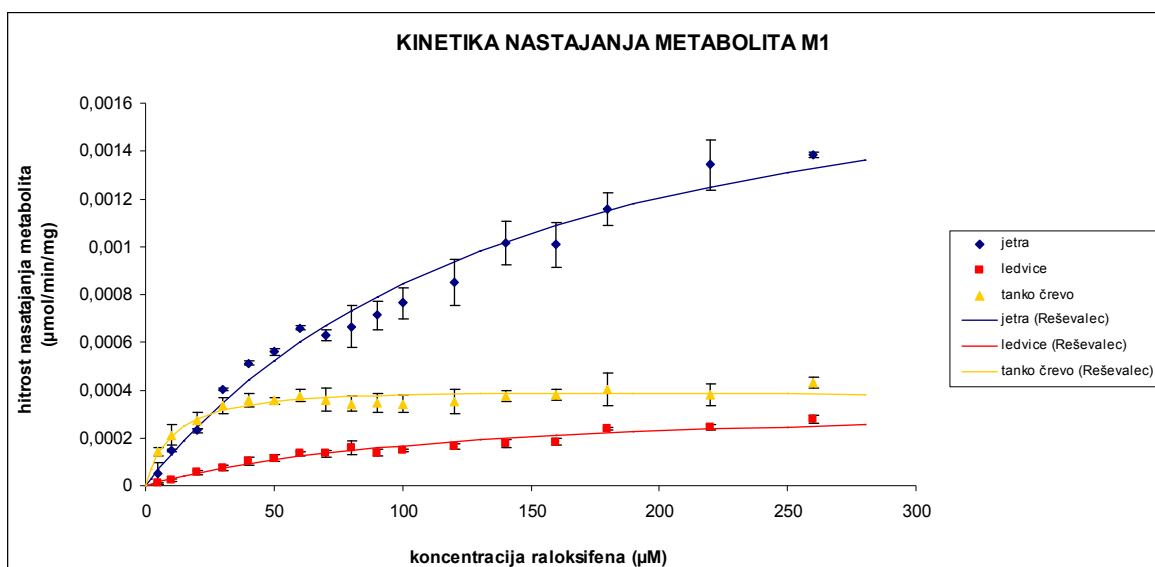
V primeru bazedoksifena so metabolno najbolj aktivni jetrni mikrosomi, sledijo jim črevesni mikrosomi, tem pa ledvični. V pljučnih mikrosomih pa tako kot pri raloksifenu nismo zaznali nastanka metabolitov. V mikrosomih jeter, črevesa in ledvic nastaja metabolit M4, metabolit M5 pa nastaja le v jetrnih mikrosomih. Nastanka metabolita M6 nismo zaznali pri nobeni od testiranih inkubacij. Tudi v primeru bazedoksifena smo določili čase inkubacije pri katerih so še prisotni pogoji linearne kinetike. Le-ti so prikazani na sliki 3.8.

4.2 Kinetika nastajanja metabolitov raloksifena in bazedoksifena v različnih organih

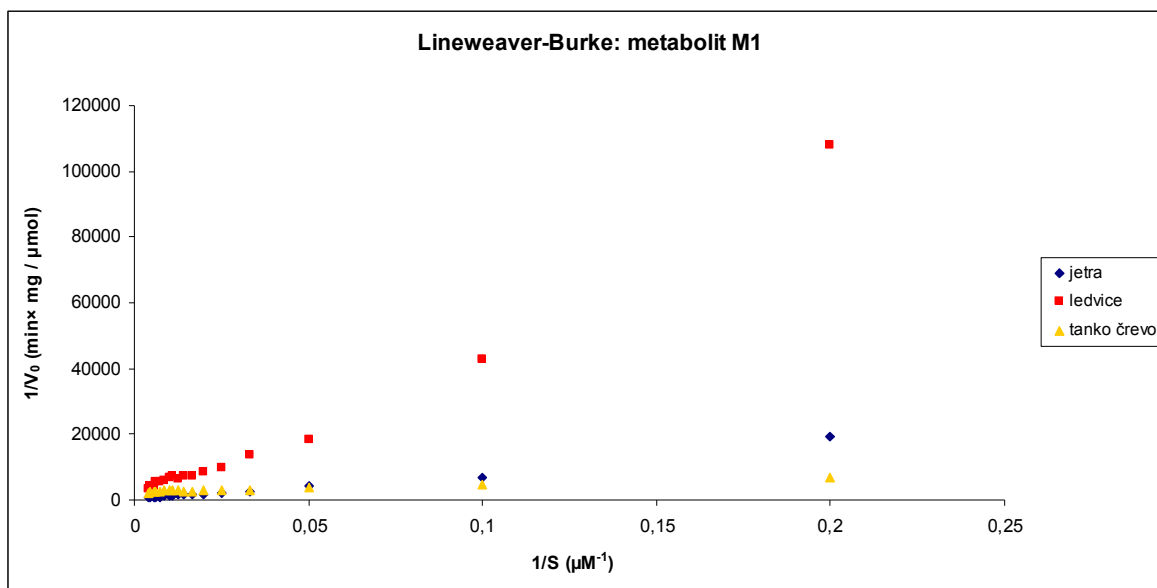
Z LC/MS/MS smo izmerili odzive metabolitov in s pomočjo umeritvene premice izračunali koncentracije nastalih metabolitov v inkubacijski zmesi. Iz teh koncentracij smo izračunali hitrosti nastajanja metabolitov tako, da smo koncentracije delili z ustreznim inkubacijskim časom (tabela 3.8), ki smo ga predhodno določili pri časovnem spremljanju nastajanja metabolitov. Izračunane hitrosti pa smo nato delili še z maso proteinov v inkubacijski zmesi. Rezultate smo prikazali v obliki grafov, ki prikazujejo hitrost nastajanja metabolitov testirane učinkovine v odvisnosti od koncentracije le-te v inkubacijski zmesi.

4.2.1 Raloksifen

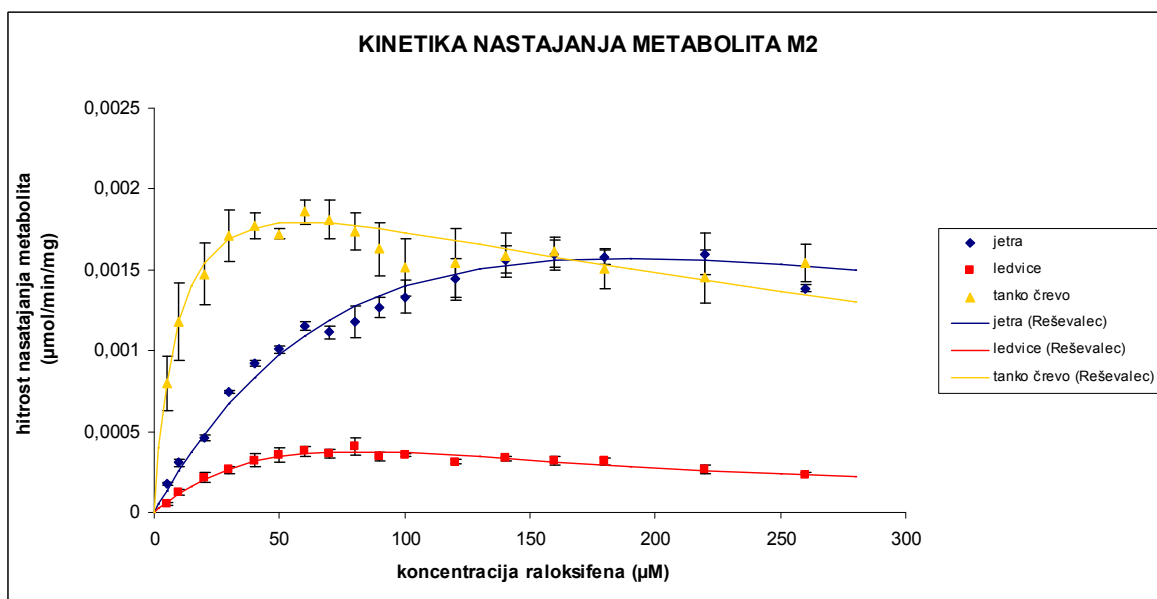
- Slika (I) predstavlja hitrost nastajanja metabolita M1 oz. M2 pri različnih koncentracijah raloksifena v inkubacijski zmesi. Posamezna točka je povprečna hitrost nastajanja metabolita izmerjena v treh paralelkah, označene pa so tudi standardne deviacije meritev. Isti podatki so obdelani tudi z metodo najmanjših kvadratov odklonov. 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.
- Slika (II) pa predstavlja iste podatke obdelane z eno od metod linearizacije in sicer z Lineweaver- Burkovo metodo.



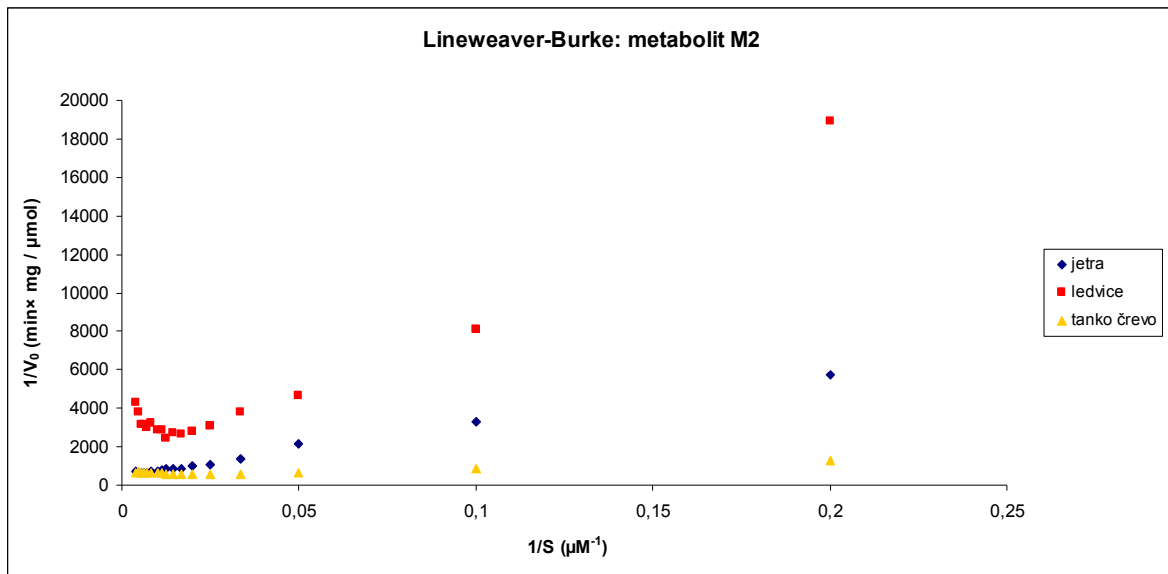
Slika 4.8 (I): Kinetika nastajanja metabolita M1 v inkubacijah z jetrnimi, ledvičnimi in črevesnimi mikrosomi



Slika 4.9 (II): Linearizacija podatkov o hitrosti nastajanja metabolita M1 po Lineweaver-Burkovi metodi



Slika 4.10 (I): Kinetika nastajanja metabolita M2 v inkubacijah z jetrnimi, ledvičnimi in črevesnimi mikrosomi



Slika 4.11 (II): Linearizacija podatkov o hitrosti nastajanja metabolita M2 po Lineweaver-Burkovi metodi

Pri časovnem spremljanju nastajanja metabolitov raloksifena smo predvidevali, da poteka metabolizem po encimski oz. Mihaelis-Mentenovi kinetiki. Iz teh grafov pa je razvidno, da gre za netipično Mihaelis-Mentenovo kinetiko. Glede na odklone grafov proti nižji hitrosti pri višjih koncentracijah raloksifena lahko sklepamo, da gre za substratno inhibicijo. Obliki krivulj se za posamezen metabolit nekoliko razlikujeta, vendar je pri obeh krivuljah mogoče opaziti spust krivulje pri višjih koncentracijah raloksifena (graf 4.8 in 4.10), kar nakazuje substratno inhibicijo encima. Izjema je le krivulja na grafu, ki prikazuje nastajanje metabolita M1 v inkubaciji z jetrnimi mikrosomi, saj ne pride do spusta krivulje, ki je značilen za substratno inhibicijo. Verjetno bi tudi tukaj prišlo do spusta krivulje pri višjih koncentracijah raloksifena, kot je bilo tudi že dokazano na predhodnih študijah [13]. Tudi oblika Lineweaver-Burk-ove krivulje nakazuje na substratno inhibicijo, saj prihaja do odklona krivulje od linearnosti pri višjih koncentracijah raloksifena (graf 4.9 in 4.11).

Že iz samih grafov je razvidno, da obstajajo razlike v kinetiki konjugiranja raloksifena med mikrosomi različnih organov. Metabolizem raloksifena poteka najhitreje v črevesnih mikrosomih, počasneje v jetrnih mikrosomih in najpočasneje v ledvičnih mikrosomih. V tabeli 4.1 in 4.2 so podane izračunane numerične vrednosti intrinzičnega očistka in ostalih parametrov, pomembnih za primerjavo metabolizma med mikrosomi različnih organov. Vrednosti za v_{max} , K_M in K_i smo izračunali z uporabo nelinearne regresije s pomočjo programa »Reševalec«, intrinzični očistek pa po formuli navedenih v uvodu (glej poglavje 3.2.4.).

Tabela 4.1: Izračunani parametri encimske kinetike s substratno inhibicijo za metabolit M1

M1	jetra	ledvice	tanko črevo
v_{\max} (nmol/min/mg)	2,22	0,380	0,435
K_M (μM)	161	126	11,0
K_i (μM)	5000	7000	2800
Cl_{int} ($\mu\text{L}/\text{min}/\text{mg}$)	13,8	3,02	39,6

Tabela 4.2: Izračunani parametri encimske kinetike s substratno inhibicijo za metabolit M2

M2	jetra	ledvice	tanko črevo
v_{\max} (nmol/min/mg)	3,90	1,70	2,40
K_M (μM)	140	139	10,0
K_i (μM)	255	45	350
Cl_{int} ($\mu\text{L}/\text{min}/\text{mg}$)	27,9	12,2	240

Primerjava intrinzičnih očistkov obeh metabolitov raloksifena pokaže, da je vrednost tega večja za metabolit M2 v vseh organih, kar v praksi pomeni, da tega metabolita nastaja več kot M1, kar se sklada z že znanimi odkritji tako na *in vitro* nivoju, kot tudi z izmerjenimi *in vivo* serumskimi koncentracijami metabolitov [14,55]. Najvišji intrinzični očistek, smo dokazali pri inkubaciji s črevesnimi mikrosomi, sledijo jim jetrni mikrosomi, najnižji očistek pa zasledimo pri inkubaciji z ledvičnimi mikrosomi. Iz tega lahko sklepamo, da sta za glukuronidacijo raloksifena poleg izoforme UGT1A1, ki se v največji meri nahaja v jetrnih mikrosomih, zelo pomembni tudi izoformi UGT1A8 in UGT1A10, ki se v glavnem nahajata v črevesju. To so potrdile tudi že predhodne študije o metabolizmu raloksifena na Fakulteti za farmacijo, Univerza v Ljubljani [13].

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

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

M1	jetra	ledvice	tanko črevo
v_{\max} (nmol/min/mg)	1,99	0,517	0,453
K_M (μM)	128	172	11,5
Cl_{int} ($\mu\text{L}/\text{min}/\text{mg}$)	15,5	2,99	39,3

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

M2	jetra	ledvice	tanko črevo
v_{\max} (nmol/min/mg)	2,37	0,655	2,14
K_M (μM)	69,6	42,7	8,21
Cl_{int} ($\mu\text{L}/\text{min}/\text{mg}$)	34,1	15,4	260

Tudi z uporabo Lineweaver-Burk-ove metode za določitev farmakokinetičnih parametrov smo dobili vrednosti intrinzičnih očistkov, ki se skladajo z vrednostmi, pridobljenimi z metodo nelinearne regresije. Tako imajo tudi tukaj najvišji intrinzični očistek črevesni mikrosomi, nato jetrni in najnižji ledvični mikrosomi.

Na podlagi intrinzičnih očistkov, ki smo jih izmerili s pomočjo mikrosomov za vsak metabolit posebej, smo prek modela dobrega mešanja izračunali še očistke organov (glej poglavje 3.2.4). Za izračun intrinzičnega očistka ekstrapoliranega na celotni organ, ki ga potrebujemo za izračun očistka organa, smo uporabili vsoto intrinzičnih očistkov metabolitov. Z izračunom očistka posameznega organa smo ugotovljeno sposobnost organov za metabolizem raloksifena prenesli v realne fiziološke pogoje. Tabela 4.5 prikazuje primerjavo vrednosti intrinzičnega očistka (Cl_{int}), intrinzičnega očistka ekstrapoliranega na celoten organ ($Cl_{\text{int,o}}$) in »in vivo« očistka organa (Cl_o).

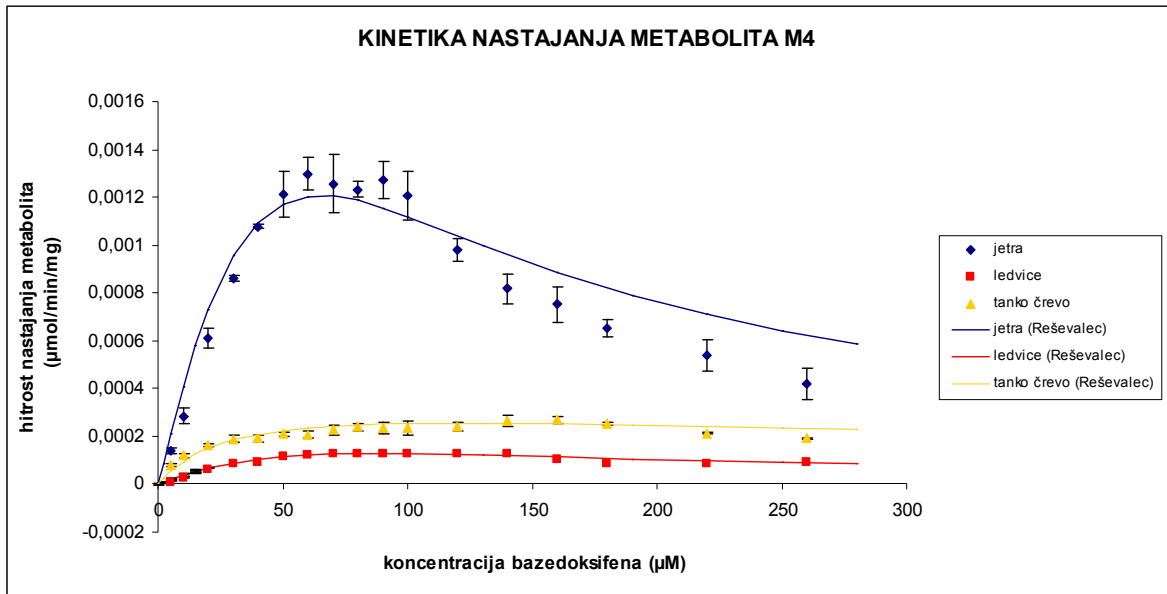
Tabela 4.5: Primerjava intrinzičnega očistka (Cl_{int}), intrinzičnega očistka ekstrapoliranega na celoten organ ($Cl_{int,o}$) in očistka organa, izračunanega po modelu dobrega mešanja (Cl_o) za primer raloksifena

	Cl_{int} ($\mu\text{L}/\text{min}/\text{mg}$)	$Cl_{int,o}$ ($\text{mL}/\text{min}/\text{kg}$)	Cl_o ($\text{mL}/\text{min}/\text{kg}$)
jetra	41,7	37,5	1,72
ledvice	15,2	3,02	0,150
tanko črevo	280	25,2	1,19

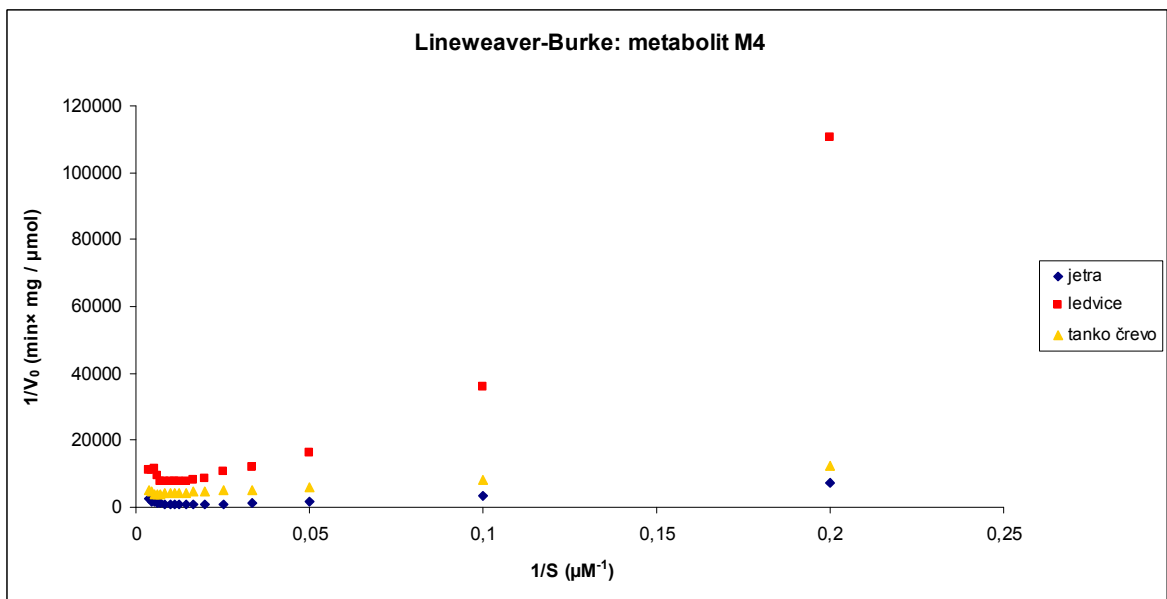
Kljub temu, da imajo črevesni mikrosomi najvišji intrinzični očistek, pa iz očiščkov organov, ki jih izračunamo s pomočjo modela dobrega mešanja, ugotovimo, da jetra največ prispevajo k sistemskemu očistku raloksifena. To pa predvsem zato, ker je vsebnost mikrosomskih encimov v jetrih precej večja kot v tankem črevesu (45 mg proteinov pri jetrih v primerjavi s 3 mg proteinov na gram tkiva pri črevesju) [53] in ker so jetra mnogo bolj prekravljena kot tanko črevo (pretok skozi jetra znaša 20 mL/min/kg telesne teže, pretok skozi tanko črevo pa 4,6 mL/min/kg telesne teže) [53].

4.2.2 Bazedoksifen

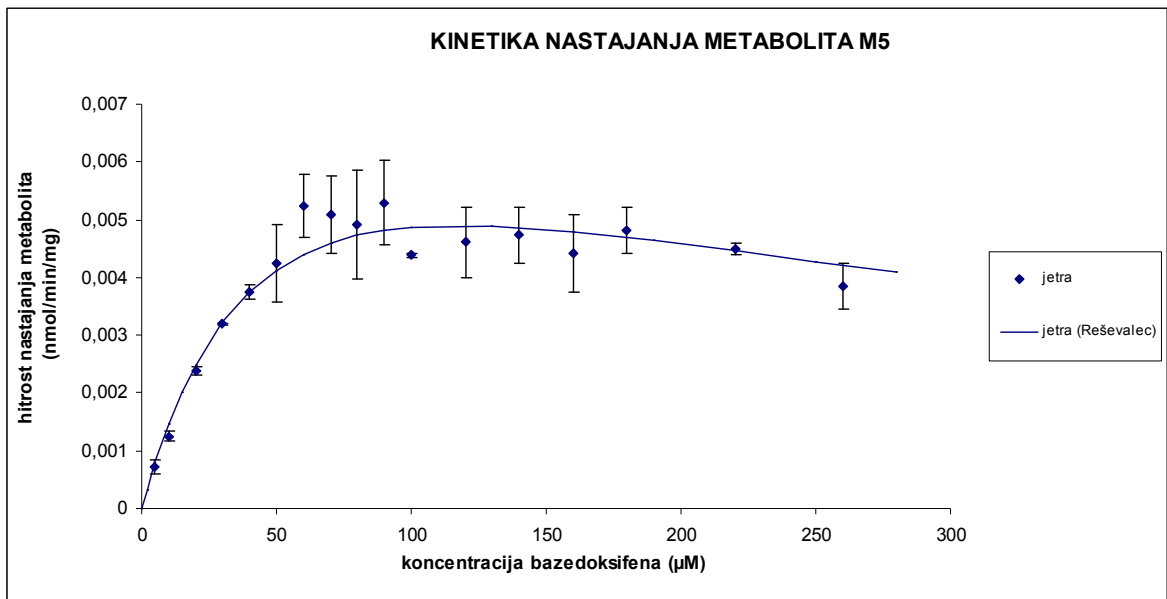
- Slika (III) predstavlja hitrost nastajanja metabolita M4 oz. M5 pri različnih koncentracijah bazedoksifena v inkubacijski zmesi. Posamezna točka je povprečna hitrost nastajanja metabolita izmerjena v treh paralelkah, označene pa so tudi standardne deviacije meritev. Isti podatki so obdelani tudi z metodo najmanjših kvadratov odklonov. 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.
- Slika (IV) pa predstavlja iste podatke obdelane z eno od metod linearizacije in sicer z Lineweaver- Burkovo metodo.



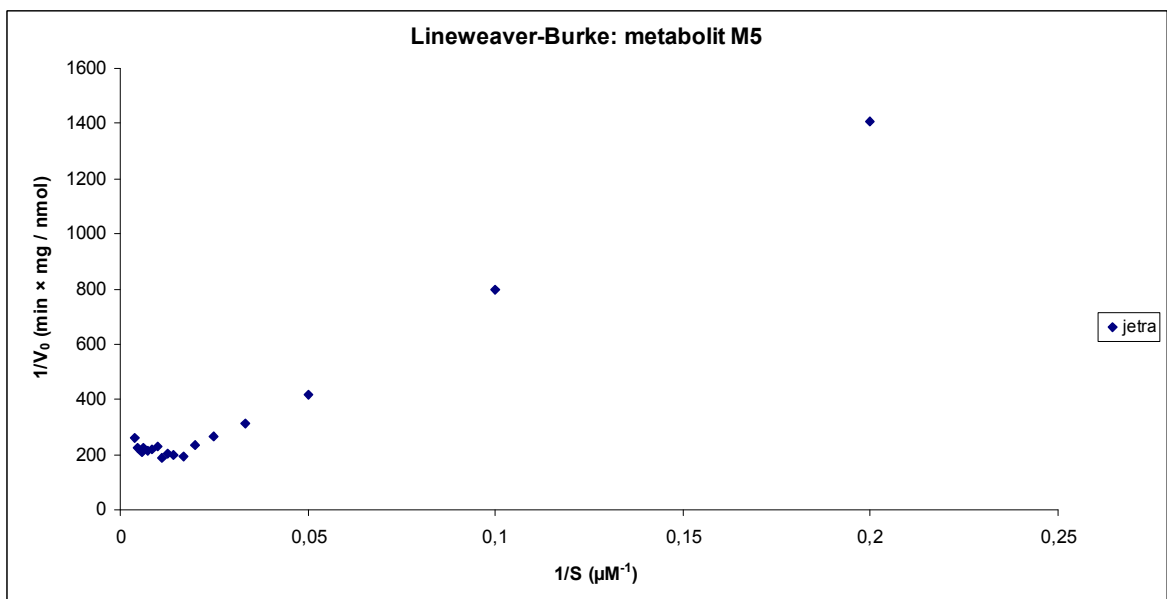
Slika 4.12 (III): Kinetika nastajanja metabolita M4 v inkubacijah z jetrnimi, ledvičnimi in črevesnimi mikrosomi



Slika 4.13 (IV): Linearizacija podatkov o hitrosti nastajanja metabolita M4 po Lineweaver- Burkovi metodi



Slika 4.14 (III): Kinetika nastajanja metabolita M5 v inkubacijah z jetrnimi, ledvičnimi in črevesnimi mikrosomi



Slika 4.15 (IV): Linearizacija podatkov o hitrosti nastajanja metabolita M5 po Lineweaver- Burkovi metodi

Tudi iz teh grafov je razvidno, da gre za netipično Mihaelis-Mentenovo kinetiko. Podobno kot pri raloksifenu pride tudi pri bazedoksifenu do odklonov grafov proti nižji hitrosti pri višjih koncentracijah substrata, zato lahko sklepamo da gre tudi v tem primeru za substratno inhibicijo. Že iz samih grafov vidimo, da poteka metabolizem najhitreje v jetrnih mikrosomih, počasneje v črevesnih mikrosomih in najpočasneje v ledvičnih. Vidimo tudi, da nastaja metabolit M5 samo v jetrnih mikrosomih. V tabeli 4.6 in 4.7 so podane

izračunane numerične vrednosti intrinzičnega očistka in ostalih parametrov, pomembnih za primerjavo metabolizma med mikrosomi različnih organov.

Tabela 4.6: Izračunani parametri encimske kinetike s substratno inhibicijo za metabolit M4

M4	jetra	ledvice	tanko črevo
v_{\max} (nmol/min/mg)	7,50	0,450	3,80
K_M (μM)	170	110	30,0
K_i (μM)	25	70	500
Cl_{int} ($\mu\text{L}/\text{min}/\text{mg}$)	44,1	4,09	12,7

Tabela 4.7: Izračunani parametri encimske kinetike s substratno inhibicijo za metabolit M5

M5	jetra	ledvice	tanko črevo
v_{\max} (nmol/min/mg)	0,0095	ni aktivnosti	ni aktivnosti
K_M (μM)	55,0		
K_i (μM)	250		
Cl_{int} ($\mu\text{L}/\text{min}/\text{mg}$)	0,173		

Iz izračunanih intrinzičnih očistkov vidimo, da imajo jetrni mikrosomi največjo sposobnost odstranjevanja bazedoksifena, saj imajo najvišji intrinzični očistek. Približno $3,5\times$ nižjega opazimo v črevesnih mikrosomih, daleč najnižjega pa v ledvičnih mikrosomih. Opazimo tudi, da je v naših poskusih nastajal metabolit M5 samo v jetrnih mikrosomih in to v zelo majhnih količinah, kar pa se ne ujema z *in vivo* koncentracijami metabolitov v krvi. Glavni metabolit v krvi naj bi bil metabolit M5 (40-95%), metabolita M4 pa naj bi bilo manj (0-20%) [22]. Zakaj pride do tega, zaenkrat še ne vemo.

V spodnjih tabelah 4.8 in 4.9 so podani parametri, ki smo jih dobili z uporabo Lineweaver-Burk-ove metode linearizacije. Pri tem smo upoštevali samo podatke, ki so še padli v linearno območje, torej samo podatke o hitrosti pri nizkih koncentracijah bazedoksifena.

Tabela 4.8: Parametri encimske kinetike za metabolit M4 dobljeni z Lineweaver-Burk-ovo metodo linearizacije

M4	jetra	ledvice	tanko črevo
v_{\max} (nmol/min/mg)	8,73	0,570	0,250
K_M (μM)	289	190	10,6
Cl_{int} ($\mu\text{L}/\text{min}/\text{mg}$)	30,1	3,01	23,6

Tabela 4.9: Parametri encimske kinetike za metabolit M5 dobljeni z Lineweaver-Burk-ovo metodo linearizacije

M5	jetra	ledvice	tanko črevo
v_{\max} (nmol/min/mg)	0,0126	ni aktivnosti	ni aktivnosti
K_M (μM)	89,5		
Cl_{int} ($\mu\text{L}/\text{min}/\text{mg}$)	0,141		

Podobno kot pri raloksifenu se tudi tukaj parametri, pridobljeni z metodo linearizacije, relativno dobro ujemajo s parametri, pridobljenimi z metodo nelinearne regresije. Kljub temu pa pride pri bazedoksifenu do nekoliko manjšega ujemanja kot pri raloksifenu. Možna razlaga za to je, ker je pri bazedoksifenu prisotna večja substratna inhibicija (nižje konstante inhibicije- K_i) kot pri raloksifenu in s tem večji odklon od premice pri višjih koncentracijah substrata.

Tudi pri bazedoksifenu smo s pomočjo uporabe modela dobrega mešanja izračunali očistke organov, ki so prikazani v tabeli 4.10.

Tabela 4.10: Primerjava intrinzičnega očistka (Cl_{int}), intrinzičnega očistka, ekstrapoliranega na celoten organ ($Cl_{\text{int,o}}$) in očistka organa, izračunanega po modelu dobrega mešanja (Cl_o) za primer bazedoksifena

	Cl_{int} (mL/min/mg)	$Cl_{\text{int,o}}$ (mL/min/kg)	Cl_o (mL/min/kg)
jetra	44,3	39,9	0,391
ledvice	4,09	0,810	0,00810
tanko črevo	12,7	1,14	0,0114

Vidimo, da jetra daleč največ prispevajo k celokupnemu metaboličnemu očistku bazedoksifena, doprinos ledvic in tankega črevesa pa je majhen.

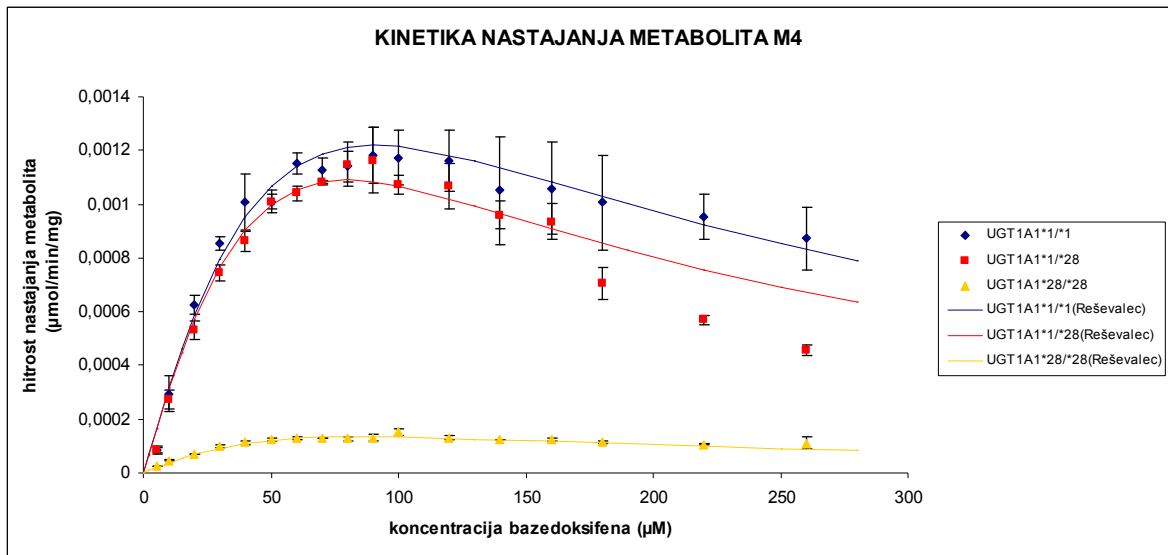
Če primerjamo metabolizem bazedoksifena in raloksifena, lahko vidimo, da ima raloksifen višji očistek v vseh organih predvsem na račun večjega deleža nevezane učinkovine v krvi (5% za raloksifen v primerjavi z 1% za bazedoksifen). Opazimo tudi, da je intrinzični očistek raloksifena v tankem črevesju mnogo višji od intrinzičnega očistka bazedoksifena, kar pomeni, da se raloksifen v veliki meri metabolizira tudi v tankem črevesu v primerjavi z bazedoksifenom, ki se v glavnem metabolizira samo v jetrih. Ledvice pa v obeh primerih zelo malo prispevajo k celokupnemu metaboličnemu očistku.

4.2.3 Vpliv polimorfizma *UGT1A1*28* na kinetiko nastajanja metabolitov bazedoksifena z mikrosomi, genotipiziranimi za ta encim.

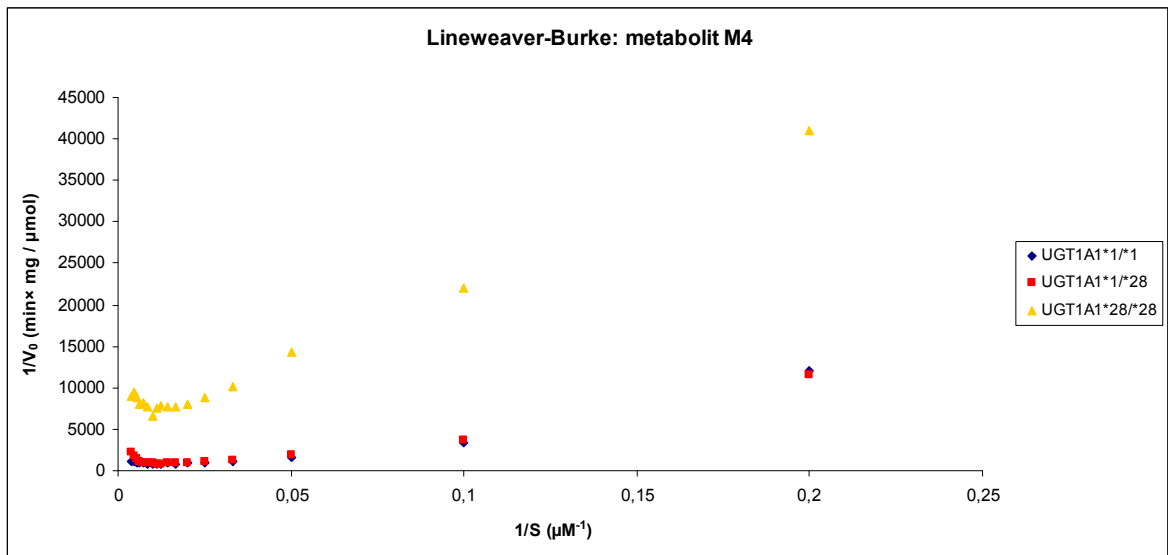
Raziskovalna skupina na Fakulteti za farmacijo je ugotovila, da genetski polimorfizem *UGT1A1*28* pomembno vpliva na hitrost metabolične inaktivacije raloksifena. Nas pa je zanimalo, če do tega pride tudi pri strukturno zelo podobnem bazedoksifenu.

Na naslednjih grafih je prikazana hitrost nastajanja metabolitov bazedoksifena v odvisnosti od koncentracije bazedoksifena v inkubacijski zmesi pri različnih genotipih:

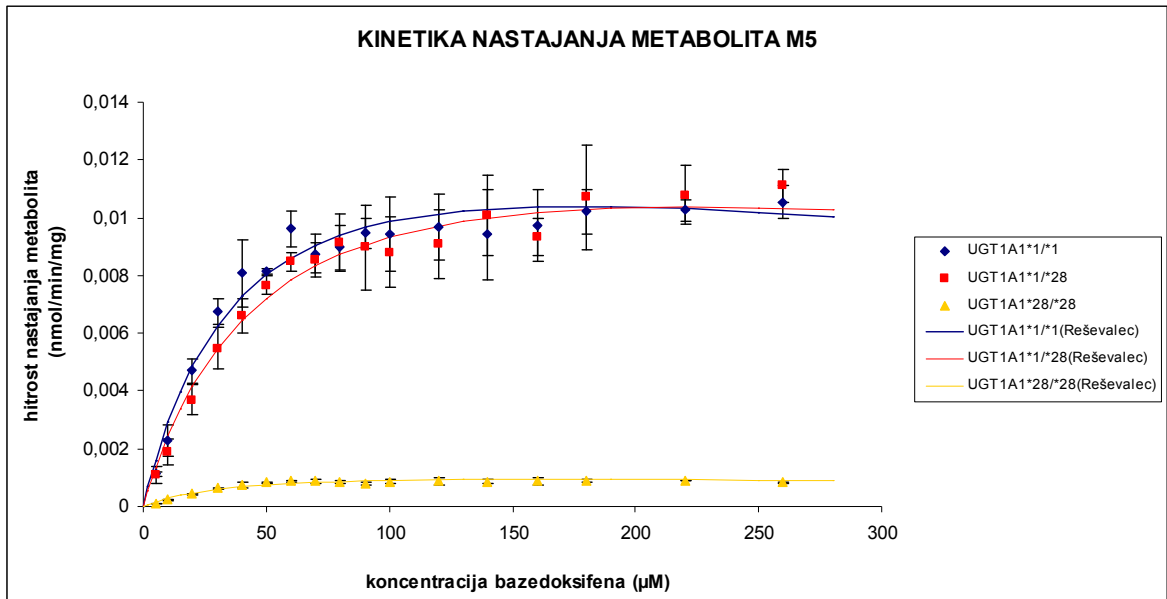
- Slika (V) predstavlja hitrost nastajanja metabolita M4 oz. M5 pri različnih koncentracijah bazedoksifena v inkubacijski zmesi. Posamezna točka je povprečna hitrost nastajanja metabolita izmerjena v treh paralelkah, označene pa so tudi standardne deviacije meritev. Isti podatki so obdelani tudi z metodo najmanjših kvadratov odklonov. 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.
- Slika (VI) pa predstavlja iste podatke obdelane z eno od metod linearizacije in sicer z Lineweaver- Burkovo metodo.



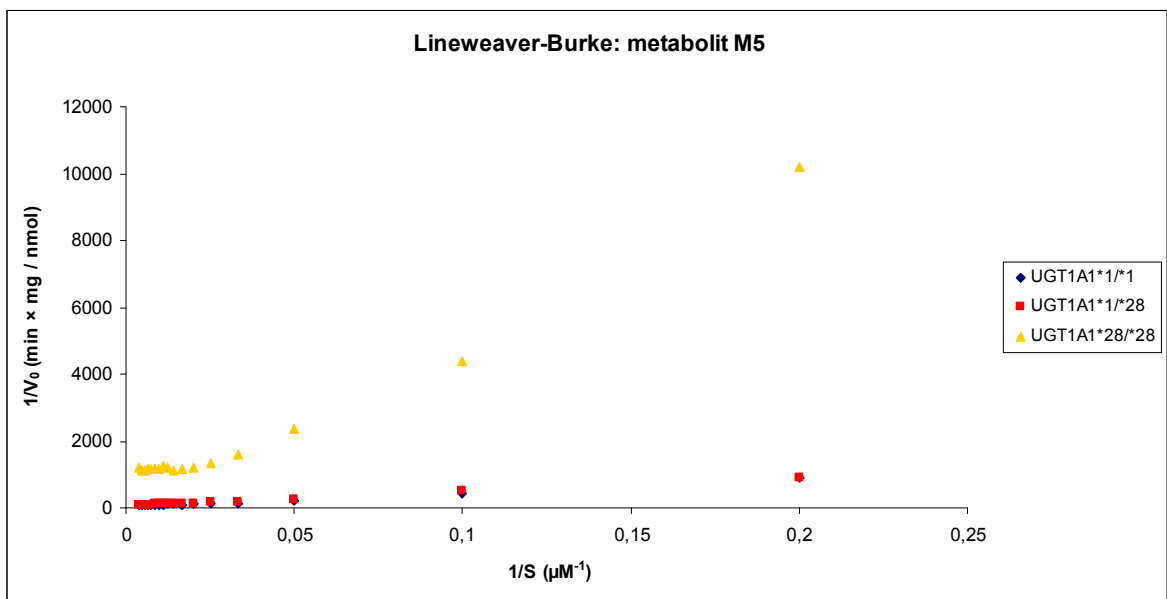
Slika 4.16 (V): Kinetika nastajanja metabolita M4 v inkubacijah z genotipiziranimi jetrnimi mikrosomi



Slika 4.17 (VI): Linearizacija podatkov o hitrosti nastajanja metabolita M4 po Lineweaver- Burkovi metodi



Slika 4.18 (V): Kinetika nastajanja metabolita M5 v inkubacijah z genotipiziranimi jetrnimi mikrosomi



Slika 4.19 (VI): Linearizacija podatkov o hitrosti nastajanja metabolita M5 po Lineweaver-Burkovi metodi

Iz grafov vidimo, da so prisotne razlike v kinetiki konjugiranja basedoksifena med mikrosomi različnih genotipov *UGT1A1*. Najpočasnejši presnavljalci so homozigoti z genotipom *UGT1A1* *28/*28, sledijo jim heterozigoti, najvišje koncentracije metabolitov in s tem najhitrejšo presnovo basedoksifena pa dosegajo homozigoti z genotipom *UGT1A1**1/*1. Izračunane numerične vrednosti intrinzičnega očistka in ostalih

parametrov, pomembnih za primerjavo presnove med nosilci različnih genotipov, so podane v tabeli 4.11 in 4.12.

Tabela 4.11: Izračunani parametri encimske kinetike s substratno inhibicijo za metabolit M4

M4	<i>UGT1A1</i> *1 / *1	<i>UGT1A1</i> *1 / *28	<i>UGT1A1</i> *28 / *28
v_{\max} (nmol/min/mg)	5,50	5,70	0,600
K_M (μM)	160	170	150
K_i (μM)	52	38	50
Cl_{int} ($\mu\text{L}/\text{min}/\text{mg}$)	34,4	33,5	4,00

Tabela 4.12: Izračunani parametri encimske kinetike s substratno inhibicijo za metabolit M5

M5	<i>UGT1A1</i> *1 / *1	<i>UGT1A1</i> *1 / *28	<i>UGT1A1</i> *28 / *28
v_{\max} (nmol/min/mg)	0,0155	0,0151	0,00140
K_M (μM)	43,0	52,0	40,0
K_i (μM)	715	990	650
Cl_{int} ($\mu\text{L}/\text{min}/\text{mg}$)	0,361	0,291	0,0350

Najvišji očistek smo dokazali pri genotipu *UGT1A1* *1/*1. Pri teh homozigotih pride do najhitrejšega konjugiranja bazedoksifena z glukuronsko kislino, kar pomeni hitrejše pretvarjanje bazedoksifena v bolj polarno obliko in s tem hitrejše izločanje iz telesa. Ravno obraten pojav zasledimo pri genotipu *UGT1A1* *28/*28, ki so torej najpočasnejši presnavljalci, saj najpočasneje glukuronidirajo bazedoksifen. Heterozigoti pa dosegajo vrednosti očistka blizu vrednostim homozigotov z genotipom *UGT1A1* *1/*1, ker se genetski polimorfizem *UGT1A1**28 deduje avtosomno recesivno in imajo zato samo homozigoti z genotipom *UGT1A1* *28/*28 zmanjšano sposobnost glukuronidiranja bazedoksifena. Podobno so ugotovili že pri raloksifenu [55].

Tako kot pri spremljanju kinetike nastajanja metabolitov v različnih organih tudi tukaj opazimo, da nastane veliko več metabolita M4 kot metabolita M5, kar pa ni v skladu z *in vivo* koncentracijami metabolitov v krvi (glej poglavje 4.2.2).

Vrednosti intrinzičnih očistkov, pridobljenih z metodo linearizacije (Lineweaver-Burk-ova metoda), pa so prikazane v tabeli 4.13 in 4.14.

Tabela 4.13: Parametri encimske kinetike za metabolit M4 dobljeni z Lineweaver-Burk-ovo metodo linearizacije

M4	<i>UGT1A1</i> *1 / *1	<i>UGT1A1</i> *1 / *28	<i>UGT1A1</i> *28 / *28
v_{\max} (nmol/min/mg)	3,83	2,52	0,214
K_M (μM)	116	74,7	37,6
Cl_{int} ($\mu\text{L}/\text{min}/\text{mg}$)	32,9	33,8	5,68

Tabela 4.14: Parametri encimske kinetike za metabolit M5 dobljeni z Lineweaver-Burk-ovo metodo linearizacije

M5	<i>UGT1A1</i> *1 / *1	<i>UGT1A1</i> *1 / *28	<i>UGT1A1</i> *28 / *28
v_{\max} (nmol/min/mg)	0,0358	0,0261	0,00296
K_M (μM)	143	119	119
Cl_{int} ($\mu\text{L}/\text{min}/\text{mg}$)	0,250	0,219	0,0249

Vrednosti intrinzičnih očistkov genotipiziranih mikrosomov pridobljene z linearizacijo se ujemajo z vrednostmi, pridobljenimi z metodo nelinearne regresije, kljub temu, da pri metodi linearizacije upoštevamo le vrednosti pri nizkih koncentracijah bazedoksifena in s tem izgubimo del informacije.

V tabeli 4.15 so prikazane še vrednosti jetrnih očistkov različnih genotipov, izračunane s pomočjo modela dobrega mešanja

Tabela 4.15: Primerjava intrinzičnega očistka (Cl_{int}), intrinzičnega očistka, ekstrapoliranega na celoten organ ($Cl_{\text{int,o}}$) in očistka organa, izračunanega po modelu dobrega mešanja (Cl_o) za primer bazedoksifena

	Cl_{int} (mL/min/mg)	$Cl_{\text{int,o}}$ (mL/min/kg)	Cl_o (mL/min/kg)
<i>UGT1A1</i> *1 / *1	34,8	31,3	0,308
<i>UGT1A1</i> *1 / *28	33,8	30,4	0,300
<i>UGT1A1</i> *28 / *28	4,04	3,63	0,0362

5 SKLEPI

- 1) Ker je bazedoksifen nova učinkovina, o kateri še ni veliko znanega, smo najprej izvedli poskus na strukturno zelo podobnem raloksifenu, ki pa je že dobro raziskan. Z uporabo mikrosomov kot *in vitro* modela in nadaljnjega računanja intrinzičnega očistka ekstrapoliranega na organ, smo ugotovili, da imajo jetra najverjetneje največji prispevek k celokupnemu metaboličnemu očistku raloksifena. Tudi tanko črevo je zelo pomembno pri metabolizmu raloksifena, saj je mikrosomski intrinzični očistek v črevesnih mikrosomih najvišji med vsemi. Ledvice zelo malo prispevajo k celokupnemu metaboličnemu očistku, v pljučnih mikrosomih pa reakcija glukuronidacije sploh ne poteče.
- 2) V primerjavi z raloksifenom se bazedoksifen v glavnem metabolizira v jetrih, saj sta tako mikrosomski intrinzični očistek kot tudi intrinzični očistek ekstrapoliran na organ v tankem črevesju in ledvicah zelo nizka. Tako kot pri raloksifenu, tudi pri bazedoksifenu nismo zaznali metabolizma v pljučih.
- 3) Z uporabo genotipiziranih jetrnih mikrosomov za polimorfizem *UGT1A1**28 smo ugotovili, da ta polimorfizem pomembno vpliva na hitrost glukuronidiranja bazedoksifena z encimom UGT1A1 v jetrih: nosilci genotipa *UGT1A1* *28/*28 imajo najnižji intrinzični očistek bazedoksifena, nosilci genotipa *UGT1A1* *1/*1 najvišji, heterozigoti pa dosegajo vrednosti intrinzičnega očistka blizu vrednosti homozigotov z genotipom *UGT1A1* *1/*1.

6 LITERATURA

1. Kocijančič A: Smernice za odkrivanje in zdravljenje osteoporoze. Zdrav Vestn 2002; 71: 571-573.
2. <http://www.iofbonehealth.org/facts-and-statistics.html>
3. Olszynski WP, Shawn Davison K, Adachi JD, Brown PJ, Cummings SR, Hanley DA, Harris SP, Hodsman AB, Kendler D, McClung MR, Miller PD, Yuen CK: Osteoporosis in men: epidemiology, diagnosis, prevention and treatment. Clin Ther 2004; 26(1):15-28.
4. Williams DA, Lemke LT: Foye's Principles of Medicinal Chemistry, Fifth Edition, Lippincott Williams & Wilkins, 2002; 694: 1059-1065.
5. Riggs BL, Hartmann LC: "Selective estrogen-receptor modulators -- mechanisms of action and application to clinical practice". N Engl J Med 2003; 348 (7): 618–29.
6. Kocijančič A: Osteoporoza. Farm Vestn, 2000;51: 351-352.
7. Kocjan T, Franić D: Osteoporoza in nadomestno hormonsko zdravljenje. Zdrav Vestn 2008; 77 Suppl 3: III-43-8.
8. Preželj J, Kocjan T, Gantar-Rott U, Pfeifer M: Dopolnilo k smernicam za odkrivanje in zdravljenje osteoporoze.
9. Ettinger B, Black DM, Mitlak BH, Knickerbocker RK, Nickelsen T, Genant HK, Christiansen C, Delmas PD, Zanchetta JR, Stakkestad J, Glüer CC, Krueger K, Cohen FJ, Eckert S, Ensrud KE, Avioli LV, Lips P, Cummings SR: Reduction of vertebral fracture risk in postmenopausal women with osteoporosis treated with raloxifene: results from a 3-year randomized clinical trial. JAMA 1999; 282: 637–45.
10. Stump AL, Kelley KW, Wensel TM. Bazedoxifene: A Third-Generation Selective Estrogen Receptor for Treatment of Postmenopausal Osteoporosis. Ann Pharmacother 2007, 41: 833-839.
11. Stefanick ML: Risk-benefit profiles of raloxifene for women. N Engl J Med 2006; 355(2): 190-2.
12. 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 (maj 2007).

13. Trontelj J: Raziskave metabolizma raloksifena z eksperimentalnimi modeli naraščajoče kompleksnosti, doktorska disertacija. Fakulteta za farmacijo, Univerza v Ljubljani, 2007.
14. Jeong EJ, Liu Y, Lin H, Hu M: Species- and disposition model-dependent metabolism of raloxifene in gut and liver: role of UGT1A10. *Drug Metab. Disp.* 2005; 33(6): 785-94.
15. Kemp DC, Fan PW, Stevens JC: Characterisation of raloxifene glucuronidation in vitro: contribution of intestinal metabolism to presystemic clearance. *Drug metab disp* 2002; 30 (6): 694-700.
16. Hochner-Celnikier D: Pharmacokinetics of raloxifene and its clinical application. *Eur. J. Obstet. Gynecol. Reprod. Biol.* 1999; 85(1): 23-9.
17. Komm BS, Kharode YP, Bodine PVN, Harris HA, Miller CP, Lyttle CR: Bazedoxifene acetate: a selective estrogen receptor modulator with improved selectivity. *Endocrinology* 2005; 146: 3999-4008.
18. Gennari L, Merlotti D, De Paola V, Martini G, Nuti R: Bazedoxifene for the prevention of postmenopausal osteoporosis. *Ther Clin Risk Manag* 2008; 4 (6): 1229-1242.
19. Patat A, McKeand W, Baird-Bellaire S, Ermer J, LeCoz F: Absolute/relative bioavailability of bazedoxifene acetate in healthy postmenopausal women (abstractP43). *Clin Pharmacol Ther* 2003; 73.
20. Ermer J, McKeand W, Sullivan P, Parker V, Orczyk G: Bazedoxifene acetate dose proportionality in healthy postmenopausal women. *Clin Pharmacol Ther* 2003; 73: 46.
21. Chandrasekaran A, McKeand W, Sullivan P, DeMario W, Stoltz R, Scatina J: Metabolic Disposition of [¹⁴C] Bazedoxifene in healthy postmenopausal women. *Weth Research* 2009.
22. Chandrasekaran A, Ermer J, McKeand W, Lee H, DeMaio W, Kotake A, Sullivan P, Orczyk G, Scatina J: Bazedoxifene acetate metabolic disposition in healthy postmenopausal women (abstract P47). *Clin Pharmacol Ther* 2003; 73.
23. Chiu SHL, Huskey SUW: Species differences in N-glucuronidation. *Drug Metab Dis.* 1998; 26(9): 838-847.
24. Meech R, Mackenzie PI: Structure and function of uridine diphosphate glucuronosyltransferases. *Clin. Exp Pharmacol Physiol* 1997; 24: 907-915
25. Woolf TF: *Handbook of Drug Metabolism*, Marcel Dekker, New York, Basel 1999

26. Kilpatrick GJ, Smith TW: Morphine-6-glucuronide: actions and mechanisms. *Med Res Rev* 2005; 25 (5): 521-44.
27. Paul G. Pearson, Larry C. Wienkers: *Handbook of Drug Metabolism, Drugs and pharmaceutical sciences*, letnik 186, Informa Health Care, New York, 2009: 307-308.
28. Mackenzie PI, Bock KW, Burchell B, Guillemette C, Ikushiro S, Iyanagi T, Miners JO, Owens IS, Nebert DW: Nomenclature update for the mammalian UDP-glycosyltransferase (UGT) gene superfamily. *Pharmacogenet Genomics* 2005;15 (10): 677-85.
29. David B. Buckley and Curtis D. Klaassen: Tissue- and Gender-Specific mRNA expression of UDP-Glucuronosyltransferases (UGTs) in Mice. *Drug Metab. Dispos* 2007; 35: 121-127.
30. Tukey RH, Strassburg CP. Genetic multiplicity of the human UDP-glucuronosyltransferases and regulation in the gastrointestinal tract. *Mol Pharmacol* 2001; 59(3):405-14.
31. Meech R, Mackenzie PI: Structure and function of uridine diphosphate glucuronosyltransferases, *Clin Exp Pharmacol Physiol* 1997; 24: 907-915.
32. Guillemette C., Lévesque E., Harvey M., Bellemare J., Menard V.: UGT genomic diversity: beyond gene duplication. *Drug Metab Rev* 2009; 1-21.
33. Ostanek Barbara: Genetika in farmakogenetika Gilbertovega sindroma. *Farm vestn* 2009; 60: 3-7.
34. Maruo Y, Iwai M, Mori A, Sato H, Takeuchi Y: Polymorphism of UDP-glucuronosyltransferase and drug metabolism. *Curr Drug Metab* 2005; 6(2):91-9.
35. Schiff ER, Sorrell MF, Maddrey WC: *Schiff's diseases of the liver*, Tenth edition, Volume 1, Lippincott Williams & Wilkins, 2006: 228.
36. Burchel B, McGurk K, Brierley CH, Clarke DJ: UDP-glucuronosyltransferases, *Comprehensive toxicology* (urednik Mulder GJ), Pergamon Elsevier Science, New York 1996;401-435.
37. Beutler E, Gelbart T, Demina A: Racial variability in the UDP-glucuronosyltransferase 1 (UGT1A1) promoter: a balanced polymorphism for regulation of bilirubin metabolism? *Proc Natl Acad Sci USA* 1998; 95(14):8170-4.
38. Gomez-Lechon MJ, Castell JV, Donato MT: Hepatocytes-the choice to investigate drug metabolism and toxicity in man: In vitro variability as a reflection of in vivo. *Chem. Biol. Interact.* 2007; 168(1):30-50.

39. Hariparsad N, Sane RS, Strom SC, Desai PB: In vitro methods in human drug biotransformation research: implications for cancer chemotherapy. *Toxicol In Vitro* 2006; 20(2):135-53.
40. Baranczewski P, Stanczak A, Kautiainen A, Sandin P, Edlund PO: Introduction to early in vitro identification of metabolites of new chemical entities in drug discovery and development. *Pharmacol Rep* 2006; 58(3):341-52.
41. Brandon EF, Raap CD, Meijerman I, Beijnen JH, Schellens JH: An update on in vitro test methods in human hepatic drug biotransformation research: pros and cons. *Toxicol Appl Pharmacol* 2003; 189 (3): 233-46.
42. Bjornsson TD, Callaghan JT, Einolf HJ, Fischer V, Gan L, Grimm S, Kao J, King SP, Miwa G, NI L, Kumar G, McLeod J, Obach RS, Roberts S, Roe A, Shah A, Snikeris F, Sullivan JT, Tweedie D, Vega JM, Walsh J: The conduct of in vitro and in vivo drug-drug interaction studies: A pharmaceutical research and manufacturers of America (PhRMA) perspective. *Drug Metab. Disp.* 2003; 31:815-832.
43. Soars MG, McGinnity DF, Grimea K, Riley RJ: The pivotal role of hepatocytes in drug discovery. *Review Chem Biol Interact* 2007;168(1):2-15.
44. Skaggs SM, Foti RS, Fisher MB: A streamlined method to predict hepatic clearance using human liver microsomes in the presence of human plasma. *J Pharmacol Toxicol Methods* 2006; 53: 284-290.
45. Narayanan R, LeDuc B, Williams DA: Glucuronidation of haloperidol by rat liver microsomes: involvement of family 2 UDP-glucuronosyltransferases. *Life Sci* 2004; 74(20):2527-39.
46. Miners JO, Knights KM, Houston JB, Mackenzie PI: In vitro-in vivo correlation for drugs and other compounds eliminated by glucuronidation in humans: pitfalls and promises. *Biochem Pharmacol* 2006; 71(11):1531-9.
47. The Merck Manuals: online medicinal library. Dostop prek spleta: <http://www.merck.com/mmpe/sec20/ch303/ch303a.html> (december 2009).
48. Dixon M, Webb EC, Thorne CJR., Tipton KF: *Enzymes*, 3RD ed., London: Longman, 1979; 126.
49. Schnell S, Maini PK. A century of enzyme kinetics: Reliability of the Km and v_{max} estimates, *Comm Theor Biol* 2003; 8: 169-187.

50. 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.
51. Rodrigues AD: Drug-drug interactions. First edition, Marcel Dekker, Inc., New York, 2002: 10.
52. Kwon Y: Handbook of essential pharmacokinetics, pharmacodynamics and drug metabolism for industrial scientists, Kluwer Academic/Plenum Publishers, New York, 2001: 90-91.
53. Soars MG, Burchell B, and Riley RJ: In vitro analysis of human drug glucuronidation and prediction of in vivo metabolic clearance. *J Pharmacol Exp Ther* 2002; 301:382–390.
54. Yamanaka H, Nakajima M, Katoh M and Yokoi T: Glucuronidation of Thyroxine in Human Liver, Jejunum and Kidney Microsomes. *Drug Metab Dispos* 2007; 35: 1642-1648.
55. Trontelj J, Marc J, Zavratnik A, Bogataj M, Mrhar A. Effects of *UGT1A1**28 polymorphism on raloxifene pharmacokinetics and pharmacodynamics. *Br J Clin Pharmacol* 2009; 67(4): 437-444(8).

