

UNIVERZA V LJUBLJANI  
FAKULTETA ZA FARMACIJO

JANJA KLEMENČIČ

DIPLOMSKA NALOGA  
UNIVERZITETNI ŠTUDIJ FARMACIJE

Ljubljana, 2011

UNIVERZA V LJUBLJANI  
FAKULTETA ZA FARMACIJO

JANJA KLEMENČIČ

**VPLIV IZBRANIH RASTLINSKIH EKSTRAKTOV NA DISTRIBUCIJO  
PROTEAZNIH INHIBITORJEV HIV V CELICAH HEPG2**

**IMPACT OF CHOSEN HERBAL EXTRACTS ON HIV PROTEASE  
INHIBITORS' DISTRIBUTION IN HEPG2 CELLS**

Ljubljana, 2011

Diplomsko naloge sem opravljala na Fakulteti za farmacijo pod mentorstvom prof. dr. Albina Kristla in somentorstvom dr. Katje Berginc.

## **Zahvala**

Za ves trud, potrpežljivost, znanje, ki ga je prenesla name, in čas, ki si ga je vzela zame v času nastajanja diplomske naloge, se najlepše zahvaljujem somentorici dr. Katji Berginc. Profesorju Albinu Kristlu sem hvaležna, da mi je bil vedno pripravljen pomagati in svetovati, kar je dalo moji diplomski nalogi visok strokovni nivo.

Hvala bratu Toniju za pomoč in izpopolnitve znanja na področju računalniških orodij, kar mi je nemalokrat olajšalo delo tekom študija, ter sestri Vesni, ki me je vedno podpirala in me spodbujala z neprecenljivimi nasveti.

Predvsem pa sem hvaležna svojim staršem, ki so mi ves čas študija brezpogojno stali ob strani, me spodbujali, verjeli vame in mi vedno nudili vse, kar sem kadarkoli potrebovala.

Najlepša hvala tudi Roku ter vsem prijateljem in sošolcem. Študijska leta so bila zaradi vas nepozabna in polna bogatih izkušenj.

## **Izjava**

Izjavljam, da sem diplomsko naloge izdelala samostojno pod mentorstvom prof. dr. Albina Kristla in somentorstvom dr. Katje Berginc.

Ljubljana, 2011

Janja Klemenčič

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

Mentor: prof. dr. Albin Kristl, mag. farm.

Somentorica: dr. Katja Berginc, mag. farm

Član diplomske komisije: doc. dr. Marko Anderluh, mag. farm.

**KAZALO VSEBINE**

<b>POVZETEK .....</b>	<b>III</b>
<b>ABSTRACT .....</b>	<b>IV</b>
<b>1. SEZNAM KRATIC .....</b>	<b>1</b>
<b>2. UVOD .....</b>	<b>3</b>
<b>    2.1 AIDS (ACQUIRED IMMUNE DEFICIENCY SYNDROME) .....</b>	<b>3</b>
2.1.1 RAZVOJNI KROG HIV RETROVIRUSA .....	4
<b>    2.2 INHIBITORJI HIV PROTEAZE.....</b>	<b>5</b>
2.2.1 SAKVINAVIR .....	6
2.2.1.1 Znane interakcije z rastlinskimi ekstrakti.....	7
2.2.2 DARUNAVIR .....	8
2.2.2.1 Znane interakcije z rastlinskimi ekstrakti.....	9
<b>    2.3 IZBRANE ZDRAVILNE RASTLINE .....</b>	<b>10</b>
2.3.1 ČESEN (ALLIUM SATIVUM) .....	10
2.3.1.1 Sestava česna.....	11
2.3.1.2 Česnovi pripravki .....	11
2.3.1.3 Farmakološki učinki česna .....	12
2.3.2 ŠENTJANŽEVKA (HYPERICUM PERFORATUM) .....	13
2.3.2.1 Sestava šentjanževke.....	13
2.3.2.2 Pripravki šentjanževke.....	13
2.3.2.3 Farmakološki učinki šentjanževke .....	14
2.3.3 GINKO (GINKGO BILOBA).....	15
2.3.3.1 Sestava ginka .....	15
2.3.3.2 Pripravki ginka .....	15
2.3.3.3 Farmakološki učinki ginka.....	15
2.3.4 GINSENG (PANAX GINSENG).....	16
2.3.4.1 Sestava ginsenga.....	16
2.3.4.2 Pripravki ginsenga.....	17
2.3.4.3 Farmakološki učinki ginsenga .....	17
<b>    2.4 SEKRETORNI PRENAŠALCI .....</b>	<b>18</b>
2.4.1 PGP PRENAŠALEC .....	19
2.4.2 MRP-2 PRENAŠALEC .....	21
<b>    2.5 EKSPERIMENTALNI MODELI .....</b>	<b>22</b>
2.5.1 HEPG2 CELIČNA LINIJA .....	22
2.5.2 CELICE, GOJENE NA FILTRIH TRANSWELL .....	23
<b>3. NAMEN DELA .....</b>	<b>25</b>

<b>4. METODE IN MATERIALI.....</b>	<b>27</b>
<b>4.1 REAGENTI IN RAZTOPINE .....</b>	<b>27</b>
<b>4.2 APARATURE .....</b>	<b>29</b>
<b>4.3 METODE.....</b>	<b>30</b>
4.3.1 HEPG2 CELIČNA LINIJA .....	30
4.3.1.1 Gojenje celic HepG2 .....	31
4.3.1.2 Privzem učinkovin oz. modelnih substanc v celice HepG2 .....	31
4.3.1.3 Liziranje celic.....	32
4.3.1.4 Analiza modelnih substanc .....	33
4.3.1.5 Priprava vzorcev in meritev znotrajcelične koncentracije proteinov .....	33
4.3.1.6 Priprava vzorcev za HPLC analizo učinkovin .....	33
4.3.1.7 Priprava vzorcev za LC-MS analizo učinkovin .....	34
4.3.1.8 Statistična obdelava rezultatov .....	34
4.3.1.9 Primer izračuna znotrajcelične koncentracije Saq.....	36
4.3.2 CELICE, GOJENE NA FILTRIH TRANSWELL .....	41
4.3.2.1 Nasajanje in gojenje celic HepG2 na s kolagenom prevlečene Transwell filtre.....	42
4.3.2.2 Določanje <i>in vitro</i> permeabilnosti modelnih substanc in učinkovin skozi monosloj celic HepG2 ....	42
4.3.2.3 Izračun koeficiente permeabilnosti .....	43
4.3.2.4 Analiza vzorcev .....	44
4.3.2.5 Statistična analiza podatkov .....	44
<b>5. REZULTATI .....</b>	<b>45</b>
<b>5.1 PRIVZEM MODELNIH SUBSTANC V CELICE HEPG2 OB PRISOTNOSTI RASTLINSKIH EKSTRAKTOV .....</b>	<b>45</b>
<b>5.2 PRIVZEM SAQ IN DAR V CELICE HEPG2 OB PRISOTNOSTI INHIBITORJEV PRENAŠALCEV.....</b>	<b>49</b>
<b>5.3 PRIVZEM SAQ IN DAR V CELICE HEPG2 OB PRISOTNOSTI RASTLINSKIH EKSTRAKTOV .....</b>	<b>54</b>
<b>5.4 PERMEABILNOST UČINKOVIN IN MODELNIH SPOJIN SKOZI MONOSLOJ CELIC HEPG2 .....</b>	<b>58</b>
<b>6. RAZPRAVA .....</b>	<b>61</b>
<b>7. SKLEP .....</b>	<b>70</b>
<b>8. LITERATURA .....</b>	<b>71</b>

## POVZETEK

Antiretrovirusna terapija z inhibitorji HIV-proteaz in drugimi inhibitorji encimov, pomembnih za razvojni krog virusa, predstavlja zaradi finančnega bremena eno najhitreje razvijajočih se farmacevtskih področij. S HIV okuženi pacienti se zdravijo s kombinacijo več zdravilnih učinkovin. Le-te povzročajo mnoge stranske učinke, kot so hiperolesterolemija, hiperlipidemija, demenca, depresija ter stalnica pri teh pacientih, oslabljen imunski sistem. Veliko pacientov okuženih s HIV posledično posega po izdelkih naravnega izvora, ki največkrat vsebujejo ekstrakte česna, ginsenga, šentjanževke in ginka. Toda pogosto se ne zavedajo, da lahko kombinacija omenjenih rastlinskih ekstraktov s HIV-proteaznimi inhibitorji vodi v resne farmakokinetične interakcije tako z modifikacijo ekspresije ali zaviranjem citokromov P450, kot tudi sekretornih prenašalcev Pgp in MRP-2. V diplomski nalogi smo ovrednotili do sedaj še neraziskane mehanizme morebitnih interakcij omenjenih rastlinskih ekstraktov (česna, ginsenga, šentjanževke in ginka) s sakvinavirjem (Saq) in darunavirjem (Dar), in sicer na sekretornih prenašalcih Pgp in MRP-2 v hepatocitih. Uporabili smo model celične linije HepG2, gojen na enostavni plastični podlagi, ki se uporablja za merjenje privzema učinkovin. Celice HepG2 izražajo le sekretorne prenašalce. Spremljali smo spremembe znotrajceličnih koncentracij obeh učinkovin v prisotnosti vsakega izmed 4 ekstraktov. Pri preučevanju Dar smo opazili pospešeno sekrecijo učinkovine iz hepatocita v prisotnosti kateregakoli od testiranih rastlinskih ekstraktov, kar je povzročilo manjšo znotrajcelično koncentracijo učinkovine. Podobno se je zmanjšala tudi koncentracija Saq v hepatocitu, če smo sočasno aplicirali rastlinske ekstrakte. Edina izjema je bil ekstrakt česna, ki je sekrecijo inhibiral in posledično povečal znotrajcelično koncentracijo Saq. Mehanizem interakcij med rastlinskimi ekstrakti in Saq/Dar je zelo kompleksen. Razložili smo ga s teorijo o pozitivni kooperativnosti vezavnih mest za učinkovino in RE, o kompetitivni inhibiciji vezavnega mesta ali s kombinacijo obeh.

Točnost rezultatov, pridobljenih z modelom celične linije HepG2, smo potrdili z izvedbo poskusov še na drugem modelu. Na s kolagenom prevlečenih filtri Transwell smo namreč vzpostavili monosloj celic HepG2, skozi katerega smo merili permeabilnost učinkovin v prisotnosti ekstrakta česna. Metoda se je izkazala za enako točno in zanesljivo kot uveljavljena metoda HepG2 celične linije. Poleg tega pa sta priprava vzorcev in sama izvedba poskusa mnogo preprostejši ter cenovno bolj dostopni glede na izvedbo poskusov na modelu HepG2 celične linije za merjenje privzema učinkovine.

## ABSTRACT

Antiretroviral therapy with HIV protease inhibitors and other enzyme inhibitors affecting HIV virus development represents one of the quickest developing fields in pharmacy due to the great financial burden. HIV patients combine number of active substances during therapy which leads to many side effects such as hypercholesterolemia, hyperlipdemia, dementia, depression and as constantly present state, weak immune system. Consequently a lot of HIV patients are additionally using natural medicine products mostly with garlic, St. John's Wort, ginseng or ginkgo. However they are not aware that combination of mentioned herbal extracts with HIV protease inhibitors might lead to serious pharmacokinetic interactions with expression modification or inhibition of citochrom P450 as well as with Pgp and MRP-2 efflux transporters. In this work we evaluated possible interaction mechanisms between herbal extracts (garlic, St. John's Wort, ginseng and ginkgo) and saquinavir (Saq) or darunavir (Dar). We were observing these interactions on Pgp and MRP-2 transporters in hepatocytes. The model we used was HepG2 cell line grown on a simple plastic surface which is used for drugs uptake measuring. HepG2 cells express only efflux transporters. We were detecting changes in intracellular concentration of both Saq and Dar in the presence of each herbal extract. Dar efflux rate increased, when combined with any of four herbal extracts, which led to lower Dar concentration in the cell. Similarly happens with Saq. Its concentration in the cell also falls when combined with all mentioned extracts but garlic. Garlic extract inhibits efflux transport and consequently Saq concentration in the cell increases. Interaction mechanism between herbal extracts and Saq/Dar is extremely complexed. We explained it with the theory of positive cooperation of binding sites for herbal extract and active substance, competitive inhibition of binding site or combination of both.

Lastly we confirmed the accuracy of the results, obtained with the HepG2 cell line, by use of another experiment model. We established a monolayer of HepG2 cells on collagen coated Transwell filters so we could measure the permeability of both of the active substances in the presence of garlic extract. The method proved to be as accurate and reliable as the established cell line HepG2 method. Additionally sample preparation with this method was much easier, faster and economically favourable, when compared with sample preparation for HepG2 cell line model for drugs uptake measuring.

## 1. SEZNAM KRATIC

AGE: staran česnov ekstrakt (Aged garlic extraxt)

AIDS: Acquired Immunodeficiency Syndrome

AP-BL: apikalna-bazolateralna smer

AUC: površina pod krivuljo (Area under the curve)

BL-AP: bazolateralna-apikalna smer

CAM: komplementarna in alternativna medicina (Complementary and Alternative medicine)

$c_{max}$ : maksimalna plazemska koncentracija (Maximal plasma concentration)

$c_p$ : plazemska koncentracija (Plasma concentration)

Dar: darunavir (Darunavir)

DMEM: Dullbecco-ov modificiran Eagle medij (Dulbecco's modified Eagle medium)

FDA: Ameriški vladni urad za hrano in zdravila (Food and drug administration)

FITC-D4000: fluoroscein izotiocianat-dekstran 4000

FLU: fluorescein

HAART: visoko aktivna antiretrovirusna terapija (Highly active antiretroviral therapy)

HIV: virus človeške imunske pomanjkljivosti (Human Immunodeficiency Virus)

HIV-PI: HIV-proteazni inhibitor(ji) (HIV protease inhibitor)

MAO: monoaminska oksidaza

MRP-2: protein, povezan z rezistenco na več učinkovin - 2 (Multi-drug resistance associated protein - 2)

NBD: domena za vezavo nukleotida (Nucleotide binding domain)

Pgp: P-glikoprotein (P-glycoprotein)

RE: rastlinski ekstrakt(i)

Rho123: rodamin 123 (Rhodamine 123)

SAC: S-alil-cistein

SD: standardna deviacija (Standard deviation)

Saq: sakvinavir (Saquinavir)

TEER: transepiteljska električna upornost (Transepithelial electrical resistance)

TMD: transmembranska domena (Transmembrane domain)

Ver: verapamil

## 2. UVOD

### 2.1 AIDS (ACQUIRED IMMUNE DEFICIENCY SYNDROME)

Sindrom pridobljene imunske pomanjkljivosti (AIDS) je bil prvič odkrit leta 1981, njegov povzročitelj retrovirus HIV pa je bil identificiran leta 1983. Virus HIV še vedno močno ogroža javno zdravje, saj je z njim okuženih med 30 in 40 milijonov ljudi po svetu (1). Znana sta dva glavna podtipa virusa HIV: HIV-1 in HIV-2. Najbolj pogost in svetovno razširjen je HIV-1, ki se lažje prenaša kot HIV-2 in pri katerem je čas od infekcije do razvoja bolezni, zaradi različnih lastnosti virusne ovojnice, krajši. Kljub tem razlikam pa okužba s katerim koli podtipom HIV virusa vodi v enako klinično sliko. Kadar govorimo o HIV-u na splošno, je običajno mišljen podtip 1 (2, 3).

Nenehno naraščajoče znanje o življenjskem ciklusu tega virusa je privedlo do sinteze učinkovin, ki preprečujejo delovanje virusnih encimov, pomembnih za njegovo razmnoževanje in zorenje v okuženih celicah (4, 5). Prva odkrita učinkovina je bila zidovudin leta 1987, ki je sicer omilila klinično sliko HIV okužbe, bolniki pa so kljub temu živeli le do 6 mesecev. Šele z uvedbo visoko aktivne antiretrovirusne terapije (HAART), ki temelji na sočasni aplikaciji več protivirusnih zdravilnih učinkovin okuženim pacientom, je prišlo do izrazitih izboljšanj na področju zdravljenja (1). Z virusom HIV okuženi, se glede na trenutno veljavne smernice zdravijo sočasno z vsaj tremi antiretrovirusnimi učinkovinami, kar močno izboljša kvaliteto življenja in stopnjo preživetja (6). HAART terapija je tipično sestavljena iz dveh inhibitorjev reverzne transkriptaze in enega inhibitorja HIV proteaze (7). Kljub pozitivnim lastnostim pa ima takšna terapija tudi nekaj slabosti. Dolgotrajna uporaba kombinacije inhibitorjev HIV proteaz namreč povzroča metabolne in nevrološke spremembe, kot so dislipidemija, hiperholosterolemija, inzulinska rezistenca, demenza, depresija itn. HAART neposredno vpliva na metabolizem lipidov, celično funkcijo adipocitov in endotelnih celic, povzroča okvare mitohondrijev ter omogoča povečano sproščanje proinflamatornih citokinov (8).

Vedno več z virusom HIV okuženih zato posega po alternativni in komplementarni medicini (CAM). Pacienti so slabo informirani glede varnosti in učinkovitosti sočasne uporabe CAM metod oz. prehranskih dopolnilnih skupaj s HAART, saj nemalokrat pride do farmakokinetičnih interakcij. Veliko pacientov pa ne glede na to posega po CAM v upanju, da bodo s tovrstnim pristopom izboljšali delovanje imunskega sistema, zmanjšali oz. omilili nekatere izmed

številnih stranskih učinkov HAART terapije ter s tem izboljšali kvaliteto življenja (9). Najpogosteje uporabljena CAM terapija vključuje uporabo vitaminskih, mineralnih in rastlinskih dodatkov, med katerimi so posebej omenjeni ekstrakti šentjanževke, ginka, ginsenga, česna in kamilice (10).

### **2.1.1 RAZVOJNI KROG HIV RETROVIRUSA**

Vstop HIV virusa v tarčno celico limfocita predstavlja zapleten tristopenjski proces, ki vključuje vezavo virusa na membrano tarčne celice, interakcije z receptorjem in koreceptorji na membrani tarčne celice ter zlitje virusne ovojnice s tarčno celico (11).

HIV virus se na membrano limfocita T sprva adsorbira s pomočjo pozitivno nabitega glikoproteina gp120 v virusni ovojnici, ki interagira z negativno nabitim heparin sulfatnim molekulami tarčnih celic. Po stabilizaciji virusa na membrani gp120 virusni protein interagira z receptorji (CD4 receptorji) in koreceptorji (kemokinska receptorja CXCR4 in CCR5) v membrani tarčne celice. Ker takšna interakcija med virusom in tarčno celico povzroči konformacijske spremembe virusne ovojnice, se lahko drug virusni protein vstavi v celično membrano in omogoča fuzijo virusne ovojnice z membrano celice ter vstop virusa v tarčno celico. Virus v celici iz svoje kapside sprosti virusno RNA, encim reverzno transkriptazo ter virusno integrizo. S pomočjo obeh encimov, se virusni dedni material iz RNA prepiše v DNA molekulo ter vgradi v DNA gostitelja. Kadar se okužena celica deli, se med transkripcijo celičnega genoma prepiše tudi vanj integrirana virusna DNA. Produkt prepisovanja je virusna mRNA ter polipeptid, iz katerega v citosolu nastajajo virusni proteini. Iz njih najprej nastane virusni encim HIV proteaza, ki omogoča cepitev preostalih virusnih polipetidov v kapsido in druge encime. Vse sestavine se nato sestavijo v nov virus in zapustijo celice (5, 11).

V odsotnosti terapije neprekinjeno razmnoževanje virusa v celicah omogoči hitro razširitev bolezni; število limfocitov T se naglo zniža, kar privede do oslabljenega imunskega sistema, zato se okuženi ne more obraniti pred vsakdanjimi običajnimi okužbami (11).

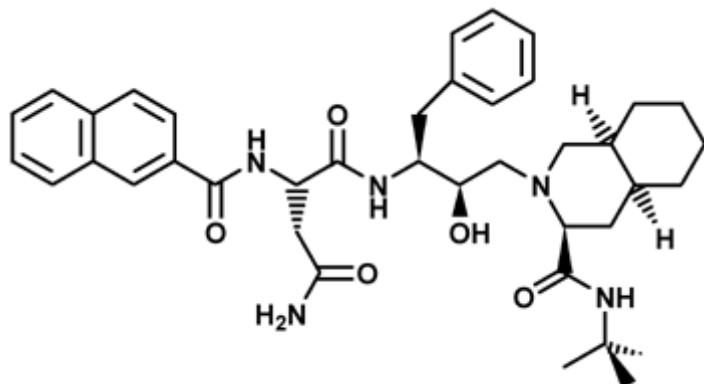
## 2.2 INHIBITORJI HIV PROTEAZE

Encim HIV proteaza je ključnega pomena za razširitev virusne infekcije, saj je prvi encim, ki nastane pri transkripciji in translaciji virusnih mRNA molekul ter omogoča pravilno zorenje in zlaganje preostalih virusnih encimov (reverzna transkriptaza, integraza), nujnih za nastanek virulentnega delca. Inhibicija HIV proteaz privede do neaktivnih, nezrelih virusov, ki niso zmožni nadaljnje okužbe (12).

Dostopnost vse večjega števila inhibitorjev HIV proteaz je omogočila vidno podaljšanje življenjske dobe in kvalitete življenja z virusom HIV okuženih bolnikov. Velik problem pri tej skupini zdravilnih učinkovin predstavlja pojav rezistence, ki nastane zaradi hitrega razmnoževanja virusa in posledično visoke verjetnosti mutacij v genetskem zapisu, tako reverzne transkriptaze, kot tudi HIV proteaze (5, 13). Kljub temu, da predstavlja odkritje HIV proteaznih inhibitorjev enega največjih dosežkov na področju zdravljenja oz. nadzorovanja HIV okužbe, pa pri terapiji lahko opazimo mnoge stranske učinke. Najpogostejši so gastrointestinalne motnje, ki vključujejo erozijo mukusa, disfunkcijo epitelne bariere in diarejo. Stranski učinki so intenzivnejši z višanjem odmerka HIV proteaznih inhibitorjev (14). Pri kombinaciji z drugimi antiretrovirusnimi učinkovinami, torej ko se pacient zdravi v skladu s smernicami HAART terapije, pa se lahko izrazijo še slabost, hiperglikemija, hiperlipidemija hiperholesterolemija in demenca. Zaradi slednjih stranskih učinkov (hiperglikemije, hiperlipidemije), ki vodijo v t.i. metabolni sindrom, se okužena populacija pogosto poslužuje jemanja česnovih pripravkov, ki ugodno vplivajo na plazemske profile glukoze in lipidov (15, 10). Poleg tega pogosto posegajo še po ginku zaradi pojava demence, kar izboljša predvsem kognitivne funkcije. Med popularnimi rastlinskimi pripravki pri pacientih, okuženimi s HIV, pa so še šentjanževka, ki ugodno vpliva na razpoloženje in ima poleg tega še rahel protivirusni učinek, ter ginseng, ki deluje imunomodulatorno in izboljša splošno počutje pacientov (10).

Primeri proteaznih inhibitorjev: sakvinavir (Saq), nelfinavir (Nfv), indinavir (Idv), ritonavir (Rito), darunavir (Dar) (12).

## 2.2.1 SAKVINA VIR



**Slika 1:** Strukturna formula sakvinavirja

Sakvinavir je prvi član skupine proteaznih inhibitorjev. FDA ga je odobrila leta 1995 za uporabo v kombinaciji z nukleozidnimi inhibitorji reverzne transkriptaze pri pacientih z že napredajočo HIV infekcijo. Molekula sakvinavirja je peptidomimetik (slika 1) (5). Učinkovina je zelo specifična, saj ima 50.000-krat večjo afiniteto do HIV proteaze v primerjavi z nekaterimi človeškimi proteazami (metaloproteaze) (16).

Saq se je sprva uporabljal v obliki monoterapije, vendar je bilo kmalu jasno, da kombinacija z drugimi učinkovinami močno izboljša zdravljenje. Učinkovitost monoterapije Saq je bila preverjena v dveh naključnih, dvojno slepih študijah 1. in 2. faze kliničnih testiranj, kjer so uporabili 25 mg do 600 mg odmerke Saq. Za najbolj učinkovito se je izkazala najvišja doza, t.j. 600 mg, kjer je bil opažen največji padec količine HIV mRNA molekul, t.i. virusna obremenitev. Ker monoterapija s Saq nezadovoljivo zniža virusno breme ter izzove hiter nastop rezistence, moramo zdravljenje s Saq nujno dopolnjevati z drugimi antiretrovirusnimi učinkovinami. Največkrat poleg sakvinavirja v terapijo uvedemo zidovudin, zalcitabin ali ritonavir (4).

Dodatna težava pri zdravljenju s Saq je njegova nizka biološka uporabnost po peroralni aplikaciji in visoka interindividualna variabilnost, ki je posledica slabe absorpcije in obsežnega metabolizma prvega prehoda, kar je rezultat usklajenega delovanja sekretornih transporterjev Pgp in MRP-2 ter encimov CYP3A4. Metabolizem in sekrecija potekata tako v jetrih kot tudi v tankem črevesu (17). Biološka uporabnost enkratnega odmerka Saq (600 mg), apliciranega s hrano, znaša le 4 -16 % (18).

### 2.2.1.1 Znane interakcije z rastlinskimi ekstrakti

Saq je znan substrat za Pgp in MRP-2 sekretorne prenašalce ter encim CYP3A4, od koder izhaja poglaviti razlog za interakcije s prehranskimi dopolnili oz. zdravili, ki so sočasno bodisi substrati/inhibitorji teh encimov in/ali transporterjev bodisi vplivajo na izražanje omenjenih proteinov (19).

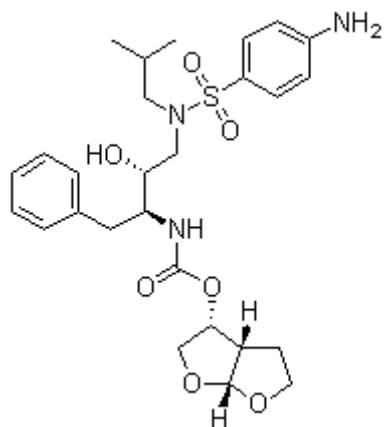
Česnovi pripravki: izsledki 3-tedenske študije na zdravih prostovoljcih, ki so sočasno prejemali Saq (600 mg 3-krat dnevno) in česnov ekstrakt (3,6 mg), so pokazali, da sta najvišja plazemska koncentracija ( $c_{max}$ ) Saq in površina pod krivuljo (AUC) v primerjavi z meritvami istih parametrov pri pacientih, ki so prejemali le Saq v enakem odmerku, značilno znižani. Oba farmakokinetična parametra sta se ob sočasni administraciji česnovega ekstrakta zmanjšala za približno 50 %. Tako signifikantno znižani farmakokinetični parametri so bili najverjetneje posledica indukcije Pgp in MRP-2 sekretornih transporterjev v enterocitih, kar je vodilo v značilno znižano količino absorbiranega Saq po peroralni aplikaciji (19, 20).

Ginkovi pripravki: sestavine ginkovih pripravkov (terpenoidi) so znani zaviralci CYP encimov (CYP2C9, CYP1A2, CYP3A4), kar so pokazale *in vitro* študije s standardiziranim ekstraktom ginka. Po drugi strani pa so v *in vivo* študijah ugotovili, da po nekaj dnevni administraciji ekstrakta, ginkove sestavine inducirajo encime CYP. Kljub temu pa do signifikantnih sprememb  $c_p$  (digoksina, nifedipina itn.) ni prišlo (21).

Pripravki šentjanževke: sestavine pripravkov šentjanževke (hiperforin) inducirajo CYP3A4 encim, kar lahko privede do 60 % zmanjšanja  $c_{max}$  Saq že po dveh tednih sočasne administracije Saq in šentjanževke (19). Konstantno znižane plazemske koncentracije HIV-PI lahko hitro vodijo v razvoj rezistence in v končni fazi do neuspešnega zdravljenja.

Pripravki ginsenga: *in vitro* študije so pokazale velik in raznolik vpliv komponent ginsenga na CYP izoencime. Ginsenozid Rd tako šibko inhibira CYP3A4 in nekatere druge CYP izoencime, medtem ko ginsenozida Re in Rf inducirata CYP3A4. Ob sočasni administraciji s Saq bi se plazemska koncentracija slednjega zmanjšala, saj prevlada induktivni efekt ginsenga na CYP3A4 pred inhibitornim učinkom (19).

## 2.2.2 DARUNAVIR



**Slika 2:** Strukturna formula darunavirja

Darunavir (Dar) je predstavnik druge generacije HIV-PI z višjo učinkovitostjo proti nemutirani obliki virusa in tudi proti nekaterim rezistentnim - mutiranim oblikam. Učinkovina zmanjša virusno obremenitev vsaj 2-krat učinkoviteje kot ostali znani HIV-PI, poleg tega pa izrazito poveča tudi število limfocitov T (22). Dar se dobro absorbira z biološko upravnostjo približno 37 %, ki pa se poveča na približno 48 % pri zaužitju s hrano. Učinkovina je substrat in hkrati tudi inhibitor CYP3A4 encima, zato so z drugimi sočasno zaužitimi substrati ali inhibitorji istega encima možne številne in nepredvidljive farmakokinetične interakcije. Dejstvo, da je Dar substrat CYP3A4, se s pridom izkorišča v terapiji pri s HIV okuženimi pacienti. Najpogosteje se Dar namreč aplicira v kombinaciji z nizkimi odmerki ritonavirja, ki je tudi inhibitor CYP3A4, to pa vodi v optimizacijo terapije. Ritonavir z inhibicijo CYP3A4 namreč povzroči povečanje plazemske koncentracije Dar, kar posledično vodi k zmanjšanju potrebnega odmerka Dar v kombinaciji z ritonavirjem (23).

Dar je znan substrat in inhibitor tudi sekretornega transporterja Pgp, vendar pa klinično pomembne interakcije z drugimi Pgp inhibitorji ali induktorji v literaturi niso opisane (24, 25).

Znanih je več interakcij Dar z drugimi učinkovinami, med katerimi je za HIV paciente najpomembnejša in najbolje opisana farmakokinetična interakcija med Dar in Saq. Ob sočasni administraciji obeh HIV-PI pride do signifikantnega zmanjšanja plazemske koncentracije Dar, zaradi česar se omenjena kombinacija učinkovin v terapiji ne uporablja (26).

### 2.2.2.1 Znane interakcije z rastlinskimi ekstrakti

Darunavir je substrat za CYP3A4 encim ter za sekretorni transporter Pgp, zaradi česar je poleg interakcij z drugimi učinkovinami podvržen tudi nekaterim interakcijam z rastlinskimi ekstrakti.

Česnovi pripravki: ker nekatere česnove sestavine inducirajo Pgp in CYP encime, se s sočasno administracijo česnovih proizvodov ter Dar  $c_{max}$  Dar lahko značilno zniža. Česnove sestavine vplivajo tudi na farmakokinetiko ritonavirja, ki se običajno aplicira skupaj z Dar pri večini terapij. Literatura poroča o hudih gastrointestinalnih motnjah, ki so se pri pacientu, ki je sočasno užival ritonavir in česnove pripravke, najverjetneje izrazile kot posledica inhibitornega ali induktivnega vpliva ritonavirja na metabolizem česnovih sestavin. Ker je ritonavir z indukcijo CYP3A4 encimov pospešil metabolizem česnovih spojin, so novonastali metaboliti česnovih sestavin z dolgim razpolovnim časom sami naprej inducirali svoj metabolizem, preprečili metabolizem ritonavirja in povečali sekrecijo ritonavirja s Pgp nazaj v lumen črevesja. Lokalne koncentracije ritonavirja v prebavilih so se zato značilno povišale, to pa je vodilo v hudo krvavitev iz prebavil (20).

Pripravki ginka: sestavine pripravkov ginka lahko inhibirajo različne izooblike CYP družine encimov, med njimi tudi CYP3A4. Plazemska koncentracija Dar lahko zato zmerno poraste.

Pripravki šentjanževke: klinične študije so pokazale, da dolgoročna terapija (več kot 12 dni) s šentjanževkinimi pripravki lahko vodi do indukcije jetrnega in intestinalnega CYP3A4 encima ter Pgp sekretornega prenašalca. Delovanje šentjanževke lahko tako privede do zmanjšanih plazemskih koncentracij Dar (19).

Pripravki ginsenga: mnoge *in vitro* in *in vivo* študije so pokazale induktiven učinek ginsengovih sestavin (ginsenozida Re in Rf) na CYP3A4 encim in Pgp transporter. Rastlinski ekstrakt ima zatorej potencial, da zmanjša plazemsko koncentracijo Dar, vendar je potrebnih še veliko študij za ovrednotenje klinične pomembnosti tega vpliva *in vivo* (27).

## 2.3 IZBRANE ZDRAVILNE RASTLINE

Zdravilne rastline oz. zdravila rastlinskega izvora so namenjena lajšanju blagih do zmernih težav. Na voljo so v različnih farmacevtskih oblikah od čajev, kapljic, sirupov, tablet ali kapsul.

V naslednjih poglavjih so predstavljene zdravilne rastline, ki jih HIV pacienti najpogosteje uporabljajo. Največkrat pacienti poleg predpisane uradne terapije posegajo po prehranskih dopolnilih in zdravilih rastlinskega izvora, s ciljem izboljšati kvaliteto življenja. Večina pacientov ni poučena in se ne zaveda možnih interakcij med sestavinami zdravilnih rastlin in učinkovinami redne terapije. Posledica je nepredvidljiv izzid terapije, možen razvoj rezistence na določeno učinkovino in v končni fazi tudi slabše počutje pacienta v primeru, ko terapija zaradi interakcij ne dosega predvidenih ciljev zdravljenja. Na področju interakcij zdravilnih rastlin z uveljavljenimi učinkovinami za zdravljenje pacientov, okuženih z virusom HIV pa je še veliko potencialno pomembnih interakcij nejasnih oz. nepotrjenih.

### 2.3.1 ČESEN (ALLIUM SATIVUM)

Česen izhaja iz družine Alliaceae, njemu bližnji sorodniki pa so čebula, drobnjak, zimski luk ter por. Tekom zgodovine je bil česen uporabljen v kulinarične in medicinske namene. Najpogosteje uporabljeni del rastline je čebulica, ki vsebuje 84,1 % vode, 13,4 % organskih in 1,5 % anorganskih spojin (28).

Česnove sestavine ter nekateri metaboliti njegovih fitokemikalij, ki nastanejo v telesu po zaužitju, inducirajo CYP encime, predvsem CYP3A4, medtem ko do indukcije sekretornih prenašalcev (Pgp, MRP-2) ne pride vedno. Ta je namreč odvisen od vrste zaužitega česnovega pipravka (npr. oljni ali vodni ekstrakt). Sekretorni prenašalci imajo več vezavnih mest (Pgp – 4 vezavna mesta, MRP-2 – 2 vezavni mesti), zaradi česar je vpliv česnovih sestavin odvisen od njihove vezave na določeno mesto ob prisotnosti drugih substratov/učinkovin za taisti prenašalec (29).

### 2.3.1.1 Sestava česna

Česnovo čebulico gradijo tiosulfati in  $\gamma$ -glutaminski prekurzorji okusa, ki predstavljajo zalogo dušika in žvepla. Žveplo vsebujoče spojine (S-alil-cistein SAC, S-alil merkaptocistein SAMC, alicin, aliin, dialil polisulfidi) veljajo za glavne aktivne sestavine česna (30).

Sestavine česna lahko razdelimo tudi na naslednji način:

- encimi: alinaza (razgradi aliin do alkilsulfenske kisline in ketamina, ki so odgovorne za okus in vonj), peroksidaza, mirozinaza;
- žveplo-vsebujoče snovi: nehlapne substance (S-alil-cistein,  $\gamma$ -glutamil peptidi, S-substituirani cisteini, cikloaliin), hlapne substance (sekundarni produkti aliina, nastali po encimski in neencimski poti: alil metil sulfid);
- druge snovi: voda, proteini, glutation, minerali, vitamini, lipidi, glikolipidi, maščobne kisline, prostaglandini, flavonoidi, polisaharidi, saponini itd.

### 2.3.1.2 Česnovi pripravki

Česnovi pripravki se med seboj razlikujejo po metodi pridobivanja in po uporabi različnih delov česnove droge oz. droge iz različnih virov. Ker se česnovi pripravki zaradi tega med seboj razlikujejo po kemijski sestavi in končni koncentraciji posameznih sestavin v pripravku, je zelo pomembno natančno poznavanje sestave pripravka. Na tržišču lahko tako poleg svežega česna zasledimo česnove pripravke v obliki uprašenega ali tekočega česnovega ekstrakta, česnov prašek in česnovo olje (31).

Svež česen je široko tržno dostopen in se lahko uživa surov ali kuhan. Če ga uporabljamo za kuhanje, ga je najbolje narezati in kratek čas pustiti stati pred kuhanjem. S tem dopustimo encimu alinazi, da iz aliina omogoči nastanek alicina, saj se sicer encim na vročini denaturira.

Uprašen česnov ekstrakt (v obliki želatinastih kapsul) ima podobne učinke kot svež česen. Česnov prašek je možno dobiti v trgovinah z zdravo prehrano in drogerijah. Pripravek vsebuje encim alinazo, ki ob sprostitvi vsebine kapsul v črevesju tvori alicin, zaradi česar je pomembno, da so kapsule gastrorezistentne, da se encim alinaza v kislem želodčnem pH ne denaturira in s tem deaktivira. Kapsule pa še dodatno preprečijo neprijeten dražeč občutek, ki bi ga lahko povzročile česnove sestavine v želodcu. Uprašen ekstrakt dobre kvalitete naj bi vseboval vsaj 10 mg alicina.

Staran česnov ekstrakt (AGE) ima najdaljši rok uporabe med vsemi česnovimi pripravki. Pridobljen je s pomočjo namakanja celih ali narezanih česnovih strokov v mešanici vode in etanola. Ekstrakt vsebuje predvsem hidrofilne snovi (S-alil-cistein, S-alilmerkaptocistein,

saponine) in veliko manj lipofilnih, ki večinoma razpadajo med postopkom staranja. Pripravek je standardiziran na vsebnost S-alil-cisteina (SAC). SAC se absorbira iz gastrointestinalnega trakta v plazmo in je zato primeren marker pri standardizaciji česnovih pripravkov (32).

Česnovo olje je pridobljeno z maceracijo in kot edino vsebuje veliko ajoena, ki je eden izmed razpadnih produktov aliina (aliin z encimom alinaza razpade do nestabilnega alicina, ta pa naprej spontano do različnih žveplovih spojin, med katere sodi tudi ajoen). Ostali oljni česnovi pripravki (pridobljeni z drugačnim postopkom) imajo zelo majhen medicinski pomen. Česnovo olje je dosegljivo v mehkih želatinastih kapsulah, ki morajo biti zaradi oksidacije sestavin zrakotesne (31).

### 2.3.1.3 Farmakološki učinki česna

1. Protiinfekcijsko delovanje: skozi zgodovino lahko opazimo široko uporabo česna na področju infekcij z bakterijami, virusi in paraziti. Poleg uporabe za zdravljenje milih infekcij se uporablja tudi pri resnejših okužbah skupaj z antibiotiki. Predvsem je uporaben svež česen v kombinaciji z amfotericinom B. Uporablajo ga tudi mnogi z virusom HIV okuženi pacienti zaradi antivirusnega delovanja. Laboratorijske raziskave so pokazale, da ajoen, sestavina česnovega olja, preprečuje replikacijo virusa HIV.

2. Znižanje c<sub>p</sub> holesterola in trigliceridov: povišane plazemske koncentracije lipidov in holesterola vodijo v aterosklerozo in bolezni, povezane z njo. Številne študije so pokazale, da česnovo olje, surov česen in staran česnov ekstrakt, signifikantno znižajo nivo celokupnega holesterola, LDL, VLDL in zvišajo vrednosti HDL (33). Zaradi navedenega so česnovi pripravki pogosto uporabljeni med ljudmi s povišanim nivojem holesterola in trigliceridov ter pri HIV okuženih pacientih, pri katerih so aterosklerotični zapleti posledica HAART terapije.

3. Antitrombotično in fibrinolitično: iz česna in česnovega olja so bili izolirani številni inhibitorji agregacije trombocitov (alicin, ajoen), ki so se izkazali za učinkovite *v in vitro* ter v *in vivo* študijah (33).

4. Imunomodulatorno: česnove sestavine (ni še znano katere) stimulatorno vplivajo na delovanje celic imunskega sistema. Poveča se aktivnost celic ubijalk, ki uničujejo tumorske celice in celice, okužene z virusi. Ker česen poveča delovanje imunskega sistema, bi lahko zmanjšal možnost nastanka raka in preprečil poslabšanje imunskega odgovora, ki se pojavi pri z virusom HIV okuženimi pacienti.

### **2.3.2 ŠENTJANŽEVKA (HYPERICUM PERFORATUM)**

Šentjanževka izhaja iz družine Hypericaceae (krčnikovke). Za zdravljenje uporabljamo posušeno drogo, in sicer njeno zel. Zdravilna rastlina se že leta uporablja kot pomirjevalo ob depresiji, napadih anksioznosti, menopavzalnih nevrozah itd. Poleg tega pa se je v tradicionalni medicini uporabljala topikalno za celjenje ran v obliki tinkture ali šentjanževega olja. Danes se vse več uporablja v homeopatiji (34).

Šentjanževka poveča aktivnost sistema citokromov P-450 v jetrih ter inducira Pgp. Posledice so lahko resne interakcije z učinkovinami, ki se metabolizirajo predvsem s CYP3A4, CYP1A2 in CYP2C9 ter učinkovinami, ki so substrati za Pgp prenašalec. Rezultat takšnih interakcij je zmanjšana plazemska koncentracija učinkovine zaradi zmanjšane absorpcije ali povečanega obsega metabolizma (35).

#### **2.3.2.1 Sestava šentjanževke**

Glavne sestavine šentjanževke, ki so odgovorne za značilni sedativni učinek droge, so hipericin, hiperforin in flavonoidi. Hiperforinu literatura trenutno pripisuje najmočnejši antidepresivni učinek, ostale sestavine pa delujejo sinergistično (hipericin, flavonoidi). Mehanizem delovanja glavnih sestavin je zapleten in še vedno ne povsem pojasnjen (36). Po sestavi lahko v pripravkih šentjanževke zasledimo:

- antrakinonske derivate: hipericin (inhibira MAO in s tem prepreči razgradnjo monoaminov, tudi serotonina), psevdohipericin in izohipericin;
- flavonoide: kuercetin, luteolin, rutin, katehini;
- prenilirane floroglucinole: hiperforin (zavira ponovni privzem živčnih prenašalcev: serotonin, NA, A, glutamat in GABA), adhiperforin;
- tanine: vrsta ni določena;
- ostale fenole: p-kumarinska kislina, kavna kislina, vanilna kislina;
- ostale sestavine: olja, kisline, karotenoidi, nikotinamid, alkoholi (36, 37).

#### **2.3.2.2 Pripravki šentjanževke**

Največ se uporablja etanolni in metanolni ekstrakt šentjanževke, ki vsebujejo 0,1-0,3 % hipericina in do 6 % hiperforina. Ti ekstrakti so najpogosteje standardizirani na 0,3 % hipericina. Odmerek takega ekstrakta (v obliki kapsul ali tablet) je 300 mg trikrat dnevno.

Posušena droga: priporočeni odmerek je 2-4 g droge v obliki infuza trikrat dnevno.

Tekoči ekstrakt: razmerje droge proti 25 % alkoholu (metanol ali etanol) je 1:1.

Tinktura: razmerje droge proti 45 % alkoholu (etanol ali metanol) je 1:10 (36).

### 2.3.2.3 Farmakološki učinki šentjanževke

Ekstraktu šentjanževke je bilo pripisanih mnogo farmakoloških aktivnosti kot so: antidepresivni, protitumorni, antivirusni in antibakterijski učinki, potrjeni s predkliničnimi študijami. Klinične študije pa so potrdile le močan antidepresiven učinek šentjanževkinih pripravkov.

1. Antidepresivni učinek: učinkovitost šentjanževke v terapiji blage ali zmerno hude depresije je bila dokazana s številnimi kliničnimi študijami. Izkazalo se je, da so uporabljeni pripravki mnogo boljši kot placebo ali celo tako učinkoviti kot sintezni antidepresivi. Kot pri sinteznih antidepresivih se tudi pri šentjanževki učinek pojavi šele po 10 do 14 dneh neprestanega jemanja. Točen mehanizem delovanja še ni povsem pojasnjen. Najverjetnejše gre za sinergistični učinek predvsem hipericina in hiperforina. Hipericin naj bi inhibiral encim monoamino oksidazo A in B (MAO A in B), s čimer se poveča koncentracija monoaminov, kot so serotonin, dopamin, adrenalin, noradrenalin v možganih. Sočasno k višanju koncentracij sproščenih monoaminov v centralnem živčnem sistemu pripomore tudi sinergistično delovanje hiperforina, ki zavira ponovni privzem teh monoaminov - nevrotransmiterjev nazaj v nevrone. Povečana količina monoaminov v sinaptičnih špranjah po daljšem času vpliva na ekspresijo receptorjev, kar naj bi bil glavni razlog za antidepresivno delovanje šentjanževke (38).

2. Protitumorni učinek: s študijo na miših so ugotovili signifikantno zmanjšanje števila človeških tumorskih celic, ki so bile aplicirane mišim deset dni po začetku aplikacije ekstrakta šentjanževke. Po istem postopku je bila dokazana tudi zmanjšana sposobnost proliferacije rakastih celic, zmanjšanje metastaznih sefov ter indukcija apoptoze tumorskih celic določenih vrst raka (39).

3. Antibakterijski učinek: glede na odkritja *in vitro* študij ima ekstrakt šentjanževke antibakterijski učinek na grampozitivnih bakterijah, predvsem na *Bacillus subtilius* in *Bacillus cereus* (40).

4. Antivirusni učinek: več posameznih sestavin ekstrakta šentjanževke izkazuje protivirusni učinek. Flavonoidi inhibirajo virus influence v 83-100 % primerih. Hipericin in psevdohipericin pa sta *in vitro* inhibirala herpes simpleks virus tipa 1 in 2 ter virus HIV (35).

### 2.3.3 GINKO (GINKGO BILOBA)

Ginko izhaja iz družine Ginkgoaceae (ginkovke). Del rastline, ki se uporablja v zdravstvene namene, je list dvokrpega ginka. List ginka se uporablja pri psihičnih motnjah ali za izboljšanje funkcij centralnega živčnega sistema. Poleg tega pa se na Kitajskem že vrsto let uporablja tudi seme ginka, kot antitusik, antiastmatik ter za ublažitev vnetij mehurja (41). Ginko je znan inhibitor encima CYP3A4, še močneje pa inhibira sekretorni prenašalec PgP (42).

#### 2.3.3.1 Sestava ginka

Farmakološki učinki ginkovih pripravkov so posledica sinergističnega delovanje več njegovih fitokemikalij, in sicer zlasti flavonoidov, ginkolidov in bilobalidov. Ostale pomembne sestavine ginkovih pripravkov pa predstavljajo tudi:

- aminokisline: metaboliti triptofana;
- flavonoidi: dimerni flavoni (npr. bilobetin), flavonoli (npr. kvercetin) in njihovi glikozidi;
- terpenoidi: seskviterpeni (bilobalid), diterpeni (ginkolidi A, B, C, J, M) in triterpeni (steroli);
- ostale sestavine: benzojska kislina, sladkorji, voski, peptid (35).

#### 2.3.3.2 Pripravki ginka

Najpogosteje uporabljeni ginkov ekstrakt je standardiziran na vsebnost 24-26 % flavonoidov, 3 % ginkolidov in 3 % bilobalida. S tem ekstraktom je bilo izvedenih tudi največ študij. Na tržišču obstajajo različna zdravila z ginkom, ki vsebujejo obogaten suhi ekstrakt s 24 % flavonoidov in 6 % terpenoidov. Ekstrakt je lahko vgrajen v različne farmacevtske oblike, kot so kapsule, tablete, peroralne raztopine. Priporočeni dnevni odmerek je od 40 do 80 mg ekstrakta, 3- do 4-krat dnevno.

#### 2.3.3.3 Farmakološki učinki ginka

Ginkovi pripravki blagodejno vplivajo na povečanje tolerance oseb za hipoksijo, zmanjšujejo edeme, izboljšujejo sposobnosti pomnjenja in učenja, izkazujejo antioksidativne in še mnoge druge ugodne učinke.

1. Vpliv na kardiovaskularni sistem: kardioprotективne učinke ginka so potrdile mnoge *in vitro* ter *ex vivo* študije. Pretok skozi koronarke se poveča v primeru uporabe prašičjega srca in standardiziranega ekstrakta ginka. Ginkovi pripravki zaščitno delujejo tudi proti ishemični miokardni poškodbi. Možen razlog za tovrstni učinek je protektivno delovanje bilobalidov na mitohondrijsko aktivnost. Nedvomno pa k ugodnemu učinku na ožilje prispeva tudi antioksidativni učinek droge (43).

2. Zaviranje strjevanja krvi: po rezultatih zadnjih študij naj bi bili ginkolidi odgovorni za omenjeni učinek ekstrakta ginka. Ginkolidi namreč kompetitivno inhibirajo vezavo aktivirajočega faktorja trombocitov (PAF) na pripadajoč membranski receptor in s tem zavirajo agregacijo trombocitov (44).

3. Izboljšanje sposobnosti pomnjenja in zmanjšanje demence: prve študije so pokazale izboljšanje simptomov, ki so povezani s cerebralno insuficienco ob uporabi ekstrakta ginka. Pokazalo se je vidno izboljšanje pri težavah s spominom in koncentracijo, zmedenostjo, vrtoglavico, prisluhi itd. Potrebno je poudariti, da rastlinski ekstrakt nima vidnega učinka pri zdravih ljudeh, temveč le pri tistih z blago ali srednje blago obliko cerebralne insuficience. Zaradi tovrstnega učinka po ekstraktu ginka posegajo tudi z virusom HIV okuženi pacienti. Čeprav je HAART zmanjšala pojavnost motenj pomnenja in koncentracije pri tej skupini pacientov, pa se blage oblike teh motenj še vedno pojavljajo v 30 % do 60 % vseh pacientov (1).

#### 2.3.4 GINSENG (PANAX GINSENG)

Sinonim za ginseng je še pravi ginseng ali azijski ginseng. Spada v družino bršljanovk (Araliaceae). Rastlina raste v vzhodnem delu Azije, predvsem v Koreji, na Japonskem, Kitajskem in tudi v Severni Ameriki. Kot drogo uporabljam očiščeno in posušeno korenino (Ginseng radix). Ginseng ima induktiven vpliv na CYP3A4 in Pgp, kar lahko vodi v številne interakcije z zdravilnimi učinkovinami.

##### 2.3.4.1 Sestava ginsenga

Glavne sestavine, ki prispevajo k učinku rastline so ginsenozidi. Preostale fitokemikalije, ki lahko prav tako ugodno vplivajo ob njihovi stalni uporabi, pa so še:

- terpenoidi: gre za kompleksno mešanico ginsenozidov, ki so strukturno triterpenski glikozidi (terpen + sladkor). Obstaja več načinov poimenovanja ginsenozidov, med katerimi je najbolj pogost: R<sub>a</sub>, R<sub>b</sub>, R<sub>c</sub>, R<sub>d</sub> itd.;

- ostale sestavine: hlapna olja (predvsem seskviterpeni), škrob,  $\beta$ -amilaza, prosti sladkorji, maščobe, minerali (35).

#### 2.3.4.2 Pripravki ginsenga

Ekstrakti ginsenga naj bi vsebovali med 20-80 % ginsenozidov. V raziskovalne namene se uporablja standardizirani ekstrakt korenine ginsenga, ki se označuje z G115. Dnevna doza znaša med 100 do 400 mg ekstrakta dnevno. Priporočeno jemanje ekstrakta ginsenga je do 2 meseca, saj se lahko po dolgotrajni uporabi, kot posledica jemanja pojavijo hipertenzija, diareja, vaginalne krvavitve in vnetje kože (35).

#### 2.3.4.3 Farmakološki učinki ginsenga

Ekstrakt ginsenga deluje predvsem adaptogeno, kar pomeni, da zvečuje odpornost organizma na stres. Sestavine ginsenga vodijo v adaptacijo oz. zaščito organizma pred škodljivimi učinki, ki so posledica odziva na stres. Poleg tega je znano, da izboljša fizične in psihične sposobnosti pri človeku.

1. Adaptogeno delovanje: pomeni, da je delovanje droge usmerjeno k normalizaciji funkcij organizma ne glede na to, v kakšnem stanju je. Slednje pomeni, da adaptogen približa določen telesni parameter normalni vrednosti, če je le-ta visok ali nizek. Ginseng deluje adaptogeno preko dveh mehanizmov. Prvi poteka preko aktivacije hipotalamo-hipofizo suprarenalne osi, ki vodi do povečane  $c_p$  kortizola, s čimer se sproži nespecifični obrambni mehanizem za stres. Drugi mehanizem pa je imunostimulativni učinek. Ginseng namreč vsebuje snovi, ki inducirajo celični imunski sistem (povečana produkcija citokinov, povečana funkcija makrofagov in celic ubijalk) (45).

2. Vpliv na fizične sposobnosti: klinične študije so pokazale, da se pri obremenitvi na kolesu in hkratnem jemanju ginsenga (študija izvedena s produkтом G115) zviša maksimalni privzem kisika, zniža nivo laktata v krvi ter zniža srčna frekvenca. Poleg tega so dokumentirali signifikantno izboljšanje forsiранega ekspiratornega volumna, forsiранe vitalne kapacitete in srčnega utripa pri maksimalni obremenitvi (45).

3. Hipoglikemični učinek: ekstrakt ginsenga zmanjša nivo sladkorja v krvi tako pri diabetikih kot pri nedיאabetikih. Ginsenozidi povzročijo povečano sproščanje inzulina po mehanizmu, ki je neodvisen od ekstracelularnega  $Ca^{2+}$  in glukoze (46).

4. Antivirusno delovanje: je bilo dokumentirano v poskusih na podganah (prav tako z G115 Pharmaton pripravkom). Sestavine ginsenga inducirajo sintezo interferonov in povečajo

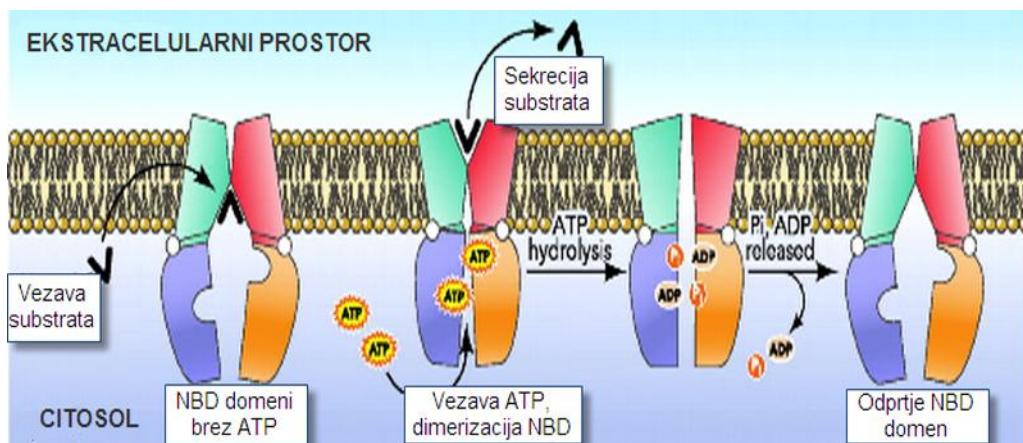
delovanje celic ubijalk. Antivirusno delovanje je najverjetneje posledica imunomodulatornega delovanje ginsenga. Zaradi slednjega po njegovih pripravkih pogosto posegajo pacienti okuženi z virusom HIV (47).

## 2.4 SEKRETORNI PRENAŠALCI

Glavno mesto absorpcije peroralno apliciranih učinkovin, sestavin zdravilnih rastlin in sestavin hrane predstavlja tanko črevo, kjer enterociti oblikujejo selektivno absorpcijsko bariero (48). Že na tem mestu prihaja do prvih interakcij z učinkovinami, ki lahko privedejo do spremembe v absorpciji. Drugo mesto pojava večjih interakcij pa so jetra, kjer so skoncentrirani tako vsi metabolni encimi (zlasti encimi iz družine citokromov) kot tudi transmembranski prenašalci, ki skupaj določajo končno biološko uporabnost posamezne učinkovine. Med transportne sisteme spadajo sekretorni prenašalci, kot sta Pgp in MRP-2. Oba sodita v družino ABC (ATP-binding cassette proteins) prenašalcev. To so transmembranski proteini, ki s pomočjo hidrolize ATP (uporaba energije) omogočajo sekrecijo ksenobiotikov in endogenih spojin iz celic v zunanje okolje. Le-ti so udeleženi v transport različnih endo- in eksogenih substratov (lipidi, proteini, steroli, zdravila) skozi membrano in uravnavaajo druge procese, ki niso povezani s transportom; npr. s translacijo RNA (12, 48).

- Struktura: ABC proteini so sestavljeni iz dveh različnih domen; dveh transmembranskih domen (TMD) in dveh domen za vezavo nukleotida (NBD). TMD sestavlja  $\alpha$ -heliks, ki 6-krat prehaja lipidni dvosloj. V tem delu se nahajajo tudi vezavna mesta za substrate. Vezava substrata na vezavno mesto v TMD povzroči konformacijske spremembe, ki po hidrolizi ATP omogočijo transport substratov v zunanje okolje. Zaporedje aminokislin in 3D struktura TMD je močno variabilna, kar kaže na relativno visoko število substratov, ki jih lahko ABC proteini translocirajo. NBD sta locirani v citoplazmi, kjer vežeta in hidrolizirata ATP. Slednje ABC prenašalcu zagotavlja energijo, potrebno za transport substratov v nasprotni smeri elektrokemičnega gradiента. Zaporedje aminokislin in struktura te domene nista variabilni.
- Mehanizem: vsi ABC proteini delujejo enako. Sprva se na prosto vezavno mesto na TMD domeni veže substrat prenašalca, čemur sledi vezava dveh molekul ATP na obe NBD domeni. Po vezavi ATP molekule na NBD domeni, le-ti dimerizirata, kar

omogoči spremembo konformacije TMD domene. V primeru sekretornega proteina je TMD domena sprva obrnjena v notranjost celice, kjer veže substrat. Po vezavi ATP na NBD pa se njena konformacija spremeni tako, da se obrne proti zunanjosti celice (slika 3) in sprosti substrat (49).

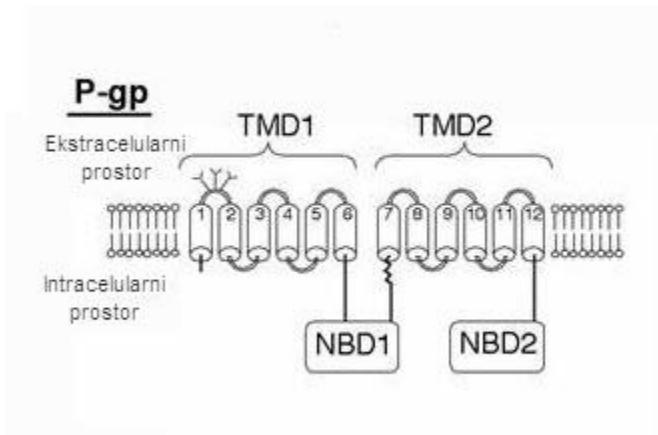


**Slika 3:** Mehanizem sekretornega ABC proteina (povzeto po literaturi št. 68)

#### 2.4.1 PGP PRENAŠALEC

P-glikoprotein (permeabilnostni glikoprotein) je ABC transporter iz MDR poddružine, ki ga kodira MDR1 gen. Predstavniki te poddružine so odgovorni za zmanjšano akumulacijo učinkovin v celicah in za razvoj rezistence na zdravila, zlasti citostatike. P-glikoprotein (Pgp) so prvič odkrili v tumorskih celicah, izraža pa se tudi v jetrih, pankreasu, ledvicah, kolonu, jejunumu ter hematoencefalni barieri. Zaradi specifične lokalizacije Pgp v organih, pomembnih za absorpcijo, metabolizem in distribucijo učinkovin, lahko pomembno zaznamuje predsistemske metabolizem učinkovin in posledično tudi njihovo biološko uporabnost ter terapevtsko učinkovitost.

- Struktura: Pgp je transmembranski glikoprotein z molsko maso 170 kDa, katerega struktura ustreza zgornjemu opisu za ABC proteine. Sestavlja ga torej 2 TMD, ena dolga citoplazemska domena z dvema NBD, ki sta povezani s fleksibilno polipeptidno verigo. Na N-terminalnem koncu je protein glikoziliran. Transmembranske domene imajo na zunajcelični strani štiri vezavna mesta za substrate (slika 4) (50).



**Slika 4:** Struktura P-glikoproteina (povzeto po literaturi št. 68)

- Funkcija: Pgp vpliva na metabolizem in distribucijo učinkovin ter posledično na njihovo učinkovitost in biološko uporabnost. Iz celic omogoča odstranjevanje toksičnih metabolitov in ksenobiotikov v urin, žolč, gastrointestinalni lumen ali plazmo. Glavni Pgp substrati so kemoterapevtiki, steroidi, lipidi, peptidi, bilirubin, srčni glikozidi, imunosupresivi, glukokortikoidi in HIV proteazni inhibitorji (51).
- Mehanizem: Pgp transport poteka v nasprotni smeri elektrokemičnega potenciala Pgp substratov, je nasitljiv, odvisen od ATP in osmotsko občutljiv. Prvi korak predstavlja prepoznavanje substrata, njegova vezava na prenašalec ter vezava in hidroliza ATP. Transporter ima 4 vezavna mesta, zaradi česar se nanj lahko hkrati vežeta tudi dva substrata. Tako pride do alosteričnih sprememb enega vezavnega mesta ter posledično do spremembe afinitete drugega vezavnega mesta do njegovega substrata. Pojav imenujemo pozitivna kooperacija vezavnih mest.

Za transport vsake molekule se porabita 2 molekuli ATP; ena za transport substrata in druga za konformacijske spremembe, ki pripravijo Pgp črpalko za naslednji cikel (52).

- Lokacija Pgp: nahaja se v apikalni membrani enterocitov (meji na lumen gastrointestinalnega trakta), kanalikularni membrani hepatocitov (t.j. apikalna membrana, ki meji na lumen žolčnih kanalikulov), v apikalni membrani proksimalnih tubulnih celic ledvic (meji na lumen nefrona), apikalni membrani endotelijskih celic hematoencefalne bariere itd. (12, 48, 53).

## 2.4.2 MRP-2 PRENAŠALEC

MRP-2 spada med ABC proteine in prenaša širok spekter organskih anionov kot so konjugati učinkovin z glutationom, glukuronidom in sulfatom, poleg tega pa je udeležen tudi v prenos nekonjugiranih spojin (npr. vinkristin, doksorubicin, inhibitorji HIV proteaz, nukleozidni fosfati, p-aminohipurna kislina in flourokinolonski antibiotiki). MRP-2 je znan tudi pod imenom cMOAT (Kanalikularni Multispecifični Organski Anionski Transporter), z dvema vezavnima mestoma v svoji strukturi (54).

- Funkcija: MRP-2 nasprotuje absorpciji spojin iz lumna gastrointestinalnega trakta ter sodeluje pri njihovi distribuciji v jetrih, ledvicah in možganski barieri (55). Odsotnost funkcionalnega MRP-2 je povezana z zmanjšano hepatobiliarno eliminacijo organskih anionov. Tipični primer odsotnosti aktivnih MRP-2 prenašalcev v jetrih je Dubin – Johnsonov sindrom, katerega posledica je akumulacija bilirubin glukuronata in nekonjugiranega bilirubina v plazmi, kar privede do hiperbilirubinemije in vnetja jeter (48).
- Mehanizem: natančen mehanizem sekrecije spojin z MRP-2 še ni popolnoma pojasnjen. Transport MRP-2 substratov najverjetneje vključuje vezavo in hidrolizo ATP, ki inducira konformacijske spremembe tega prenašalca, to pa povzroči sprostitev vezanega substrata iz intracelularnega v ekstracelularni prostor. Sekretorni prenašalec MRP-2 ima dve vezavni mesti, kar pomeni, da bi lahko tudi pri tem prenašalcu prišlo do pozitivne kooperacije vezavnih mest (56).
- Lokacija: MRP-2 se izraža na apikalni membrani polariziranih celic, kot so hepatociti, renalne epitelne celice, enterociti tankega črevesa in hepatoencefalni barieri (57).

Ekspresija MRP-2 se spreminja glede na določene patofiziološke situacije; ekspresija je nizka pri jetrni holestazi ter povišana pri rakastih obolenjih. Količina MRP-2 prenašalcev v membrani hepatocitov in enterocitov je odvisna od znotrajceličnih signalnih poti, ki usmerjajo vezikle z MRP-2 do apikalne membrane (58, 59).

## 2.5 EKSPERIMENTALNI MODELI

Za *in vitro* preverjanje morebitnih interakcij na nivoju sekretornih prenašalcev so potrebni ustrezeni eksperimentalni modeli. V nadaljevanju je predstavljen model hepatične celične linije, ki ne izraža CYP encimov, temveč le sekretorne prenašalce. Poleg tega pa je predstavljen še novejši model istovrstnih celic, gojenih na filtrih Transwell, s katerim je mogoče interakcije spremljati z merjenjem permeabilnosti učinkovin skozi monosloj na filtrih z gojenimi hepatociti.

### 2.5.1 HEPG2 CELIČNA LINIJA

HepG2 jetrna celična linija je bila pridobljena iz jetrnega tkiva 15-letnega Američana z diferenciranim hepatocelularnim karcinomom. Celice HepG2 izražajo vrsto jetrnospecifičnih funkcij, saj sproščajo plazemske proteine, kot so: albumin, transferin, fibrinogen, plazminogen in  $\alpha$ -2-makroglobulin. Tekom rasti se HepG2 oprimejo podlage (so adherentne celične kulture) in izkazujejo morfološke lastnosti, podobne epiteliju. Celice tako rastejo v obliki monosloja ter v obliki majhnih agregatov. HepG2 celična linija ne izraža metabolnih encimov CYP, čeprav imajo genetski zapis zanje, saj je le-ta zaradi karcinoma okvarjen. Glede na rezultate nekaterih raziskav pa imajo v membrani izražene membranske sekretorne prenašalce, kot sta Pgp in MRP-2 (60).

Celice HepG2 so zaradi navedenih lastnosti primeren *in vitro* model za posnemanje funkcij polariziranih humanih hepatocitov. S primernimi pogoji kultivacije lahko celice HepG2 izkazujejo ustrezne morfološke lastnosti (celice HepG2 oblikujejo apikalno in bazolateralno membrano) in diferenciranost. Tovrstne celice so zatorej primeren model za preučevanje mehanizma transporta učinkovin preko kanalikularne in sinusoidne membrane (meji na arteriole v jetrih) (60).

## 2.5.2 CELICE, GOJENE NA FILTRIH TRANSWELL

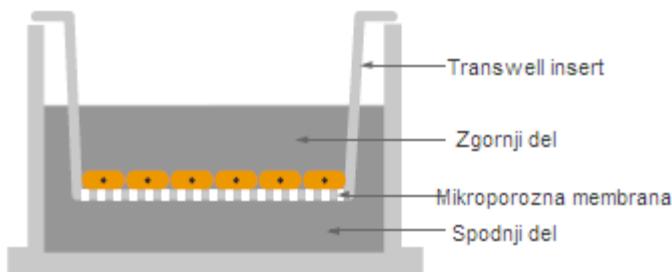
Na filtrih Transwell gojene celice predstavljajo priročen in enostaven model za določanje transporta in metabolizma učinkovin *in vitro*. Prednost tega sistema je prost dostop gojišča do na filtrih gojenih celic z obeh strani. Ker je na voljo več vrst različnih materialov, iz katerih so filtri pripravljeni, to močno poveča uporabnost Transwell modela.

- Standardni Transwell nastavki so na voljo v različnih premerih in površinah, ki so na voljo za rast celic. V tabeli I so podani premeri membran, njihova površina in število filtrov na eni plošči (61).

Patentirana oblika Transwell nastavkov preprečuje mediju, da bi zaradi kapilarnega tlaka prehajal skozi membrano ali ob stenah nastavka v zgornji prostor. Viseči nastavek vzdržuje Transwell membrano milimeter nad dnem. Odprtina ob strani Transwell nastavka omogoča dostopanje do prostora pod membrano (slika 5) (61).

Premer nastavkov	Število nastavkov ali vsebnik	Površina za rast celic [cm <sup>2</sup> ]
6,5 mm	24	0,33
12 mm	12	1,12
24 mm	6	4,67
75 mm	100	44

Tabela I: Lastnosti Transwell nastavkov (povzeto po literaturi št. 61)



Slika 5: Prikaz Transwell nastavka (povzeto po literaturi št. 61)

- Vrste membran: membrane za Transwell nastavke so narejene iz treh različnih materialov. Polikarbonatne membrane so tanke, prosojne in imajo 6 različnih velikosti por (med 0,1µm do 12,0µm), so sterilne in kompatibilne z večino organskih spojin.

Poliestrske membrane so mikroskopsko transparentne, celice na njih so dobro vidne pod mikroskopom, možna je ocena vitalnosti celic in formacija monosloja. S kolagenom prevlečene politetrafluoroetilenske membrane spodbudijo pritrditev in razrast celic. Ta tip membran je prevlečen z ekvimolarno mešanico kolagena tipa I in III, pridobljenega iz goveje placente. Kolagen, ki nastane, je biološko stabilen in prekrije celotni matriks filtra, kar zagotavlja poroznost membrane (61).

- Velikost por: izbira pravilne velikosti por je zelo pomembna glede na to, kakšen poskus izvajamo. Za študije transporta in permeabilnosti so v uporabi manjše velikosti por (od 0,4 µm do 3,0 µm), ki ne dovoljujejo migracije celic. Študije celične invazije, kemotakse in motilitete so izvedene na porah z velikostjo 3,0 µm ali več. Pred izvedbo poskusa je potrebna izvedba kontrole, ki nam pove, katera velikost por najbolje ustreza našim eksperimentom (61).

### 3. NAMEN DELA

V diplomski nalogi bomo preučevali aktivnost jetrnih sekretornih prenašalcev Pgp in MRP-2 ob prisotnosti izbranih rastlinskih ekstraktov (RE) s pomočjo *in vitro* modela HepG2 celične linije. Zanimalo nas bo kako spremenjena aktivnost sekretornih prenašalcev zaradi prisotnosti RE vpliva na distribucijo HIV proteaznih inhibitorjev (HIV-PI).

V prvem delu naloge bomo uporabili HepG2 celično linijo, gojeno na običajnih polikarbonatnih ploščah z 48 vzorčnimi mesti.

Zdravilni učinkovini, ki ju bomo preučevali ob sočasni aplikaciji ekstrakta šentjanževke, ginsenga, česna ali ginka, sta sakvinavir (Saq) in darunavir (Dar). Zanimalo nas bo predvsem, katera učinkovina ima najbolj spremenjen aktivni transport skozi kanalikularno membrano hepatocita ob prisotnosti izbranega RE. Dodatno se bomo poglobili v razlago in razumevanje mehanizma, ki je odgovoren za spremembo distribucije HIV-PI ob prisotnosti vsakega izmed dodanih RE. Nekoliko natančneje bomo detektirali le vpliv česnovega ekstrakta na distribucijo obeh učinkovin, saj gre za ekstrakt, ki ga HIV pacienti uporabljajo pogosteje kot ostale tri (10).

Dar in Saq bomo s serijo poskusov in s pomočjo literaturnih podatkov sprva določili ustrezeno donorsko koncentracijo (t.j. pripravljena koncentracija učinkovine, ki je aplicirana na zunanjou stran celic HepG2), za katero želimo, da se čim bolj približa dejanskim vrednostim v organizmu. Za učinkovini bomo nato določili oz. potrdili, ali sta substrata Pgp in/ali MRP-2 prenašalcev v celicah HepG2. Nadalje bomo spremljali vpliv sočasne aplikacije vsakega izmed RE z Dar oz. Saq na privzem v celice HepG2. Določili bomo, kateri izmed štirih RE ima največji vpliv na prerezorejanje preučevanih HIV-PI v hepatocite ter skušali sklepati na spremembo biološke uporabnosti učinkovine *in vivo*.

V drugem delu bomo prav tako uporabili celice HepG2, vendar gojene na filtri Transwell, kar bo močno spremenilo potek poskusa. V tem sklopu bomo preučevali le vpliv česnovega ekstrakta na obe učinkovini, saj je naš primarni namen potrditev ustreznosti rezultatov, pridobljenih na standardnem modelu HepG2 celične linije.

Ker je priprava vzorcev za določevanje znotrajceličnih koncentracij inhibitorjev HIV proteaz dolgotrajen, večstopenjski in zapleten proces, bomo celice HepG2 gojili na s kolagenom prekrite filtre Transwell tako, da bodo celice med rastjo oblikovale monosloj. Ko bomo s pomočjo mikroskopa potrdili, da so celice HepG2 oblikovale monosloj, bomo ob prisotnosti

česnovega ekstrakta in inhibitorjev Pgp ter MRP-2 prenašalcev spremljali permeabilnost inhibitorjev HIV proteaz. S spremeljanjem permeabilnosti namesto privzema učinkovine v celice bomo z omenjenim modelom omogočili hitro in zanesljivo kvalitativno ugotavljanje interakcij med sočasno apliciranimi učinkovinami oz. med učinkovinami in sestavinami prehrane.

## 4. METODE IN MATERIALI

### 4.1 REAGENTI IN RAZTOPINE

- **Dulbecco modificiran Eagle medij – DMEM:** medij za kultiviranje celic HepG2 iz Sigma Aldrich Chemie, Diesenhofen, Nemčija (mediju dodamo še 10 % govejega seruma - FBS, 1 % 100 mM L-glutamina in 1 % antibiotikov ampicilina ter streptomicina).
- **Dimetil sulfoksid – DMSO:** za razapljanje učinkovin, zamrzovanje celic HepG2.
- **Staran ekstrakt česna – AGE:** standardiziran na 1,27 g/l vsebnosti S-alilcisteina, kupljen pri Wakanuga of America CO., Ltd.
- **Ekstrakt šentjanževke:** izdelan po naročilu v Pleterju, Slovenija
- **Ekstrakt ginka Tebonin:** Tebonin forte 40 mg, proizvajalec Dr. Willmar Schwabe. 1ml tekočine vsebuje 40 mg suhega ekstrakta iz listov Ginko biloba. Kvantificiran na 8,8-10,8 mg flavonoidov, 1,04-1,28 mg bilabolidov, 2,0-2,8 mg terpenlahktonov od tega 1,12-1,136 mg ginkolidov A, B, C.
- **Ekstrakt ginsenga Ginsana G115:** suh ekstrakt korenine ginsenga. Proizvajalec Tentan Deutschland GmbH.
- **Sakvinavir:** proteazni inhibitor Sequoia Research Products Ltd. Koncentrat sakvinavirja pripravimo tako, da natančno zatehto raztopimo v 1 ml DMSO. Preračunamo volumen DMSO koncentrata Saq, potrebnega za pripravo ustreznih donorskih koncentracij (2,5, 5, 10, 15 ali 20  $\mu\text{M}$  koncentracijo Saq) in odpipetiramo v donorski medij.
- **Darunavir:** proteazni inhibitor, pridobljen z etanolno ekstrakcijo iz Prezista® tablet (300 mg) in evaporacijo etanola. Zatehto darunavirja raztopimo v DMSO. Čistost ekstrahiranega Dar potrdimo s HPLC analizo pri 240 nm.
- **Verapamil:** inhibitor PgP iz Sigma Aldrich Chemie, Diesenhofen, Nemčija. Pripravimo ustrezno koncentracijo v donorski raztopini po istem postopku kot pri Saq.

- **MK-571:** inhibitor MRP-2 iz Sigma Aldrich Chemie, Diesenhofen, Nemčija. Pripravimo ustrezeno koncentracijo v donorski raztopini po istem postopku kot pri Saq.
- **Rodamin 123:** (Rho123) Pgp substrat iz Sigma Aldrich Chemie, Diesenhofen, Nemčija.
- **Fluorescein:** (FLU) MRP-2 substrat iz Sigma Aldrich Chemie, Diesenhofen, Nemčija.
- **Fosfatni pufer – PBS** (Phosphate buffer solution) za vzorčenje (sestava: NaCl, KCl, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, pH 7.4) .
- **Donorska raztopina:** DMEM mediju z dodatki dodamo učinkovino, ki jo preiskujemo in/ali rastlinski ekstrakt.
- **Acetonitril:** za obarjanje proteinov.
- **Vodna faza za HPLC:** KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> raztopimo v bidestilirani vodi in na umerjenem pH metru z ortofosforjevo kislino uravnamo pH pufra na 4,6. Pufer pred HPLC analizo filtriramo.
- **BCA<sup>TM</sup> Protein assay kit Lot # KC131027:** komplet raztopin za pripravo medija in umeritvene premice za merjenje proteinov v lizatih celic HepG2.
- **Ringerjev pufer, pH = 7,4:** v 2 L bučko do 80 % volumna napolnimo z ohlajeno bidestilirano vodo in nato postopoma po predpisanem zaporedju dodajamo navedene soli tako, da dodamo naslednjo šele, ko se je predhodna popolnoma raztoplila. Potrebujemo 4,2 g NaHCO<sub>3</sub>, 0,11 g NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>\*H<sub>2</sub>O, 13,082 g NaCl, 0,746 g KCl, 0,352 g CaCl<sub>2</sub>\*2H<sub>2</sub>O 0,488 g MgCl<sub>2</sub>\*6H<sub>2</sub>O 0,569 g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>\*2H<sub>2</sub>O. Po dodatku zadnje soli prepihamo s karbogenom (95 % O<sub>2</sub>, 5 % CO<sub>2</sub>), s čimer v raztopino uvedemo CO<sub>2</sub>, znižamo pH in omogočimo raztpljanje bazičnih soli.
- **Fluorescin izotiocianat-dekstran 4000** (FITC-D4000): substanca, ki prehaja skozi monosloj celic HepG2 le paracelularno.
- **L-glutamin:** 10 mM iz Sigma Aldrich Chemie.
- **L-glukoza:** 10 mM iz Sigma Aldrich Chemie.
- **L-manitol:** 10 mM iz Sigma Aldrich Chemie.

- **CellTitter-Glo® Luminiscent test** celične vitalnosti iz Promega-e: uporabimo za določevanje koncentracije ATP v celicah HepG2, ki smo jih predhodno izpostavili naraščajočim koncentracijah Saq ali Dar. Z ATP meritvami ugotavljam toksične koncentracije obeh inhibitorjev HIV proteaz, ki značilno znižajo celično vitalnost pod 95 %.

## 4.2 APARATURE

- HPLC sistem (tekočinski kromatograf visoke ločljivosti): Hewlett Packard 1100 Series (črpalka, avtomatski vzorčevalnik, razplinjevalec, UV-detektor), fluorescentni detektor (Shimadzu RF-535 Fluorescence HPLC monitor), kolona (Phenomenex Onyx Monolithic C18 50 X 4,6 mm);
- tehnica Mettler toledo AB54-S;
- tehnica Mettler H54AR;
- termostatirana plošča Cole-Parmer Chilling/Heating Block;
- ultrazvočna sonda Ultrasonic Homogenizer 4710 series;
- centrifuga Eppendorf Centrifuge 5415R;
- centrifuga Sigma 3K30;
- Fluorescenčni detektor Tecan GENious ;
- pH-meter Iskra-MA 5750;
- mikrotitrski čitalec: Tecan GENios s pripadajočima filtroma;
- LC/MS/MS: Varian 1200 L triple quadrupole LC-MS Varian (Palo Alto, CA, USA). Masni spektrometer s ProStar 210 binarnimi črpalkami, avtomatski vzorčevalnik Varian 420 in Varian 510 kolonska pečica.

## 4.3 METODE

Pri eksperimentalnem delu smo uporabili 2 različna *in vitro* modela:

- HepG2 celično linijo, gojeno na običajni plastični podlagi, kjer se celice v treh dneh oprimejo podlage ter razmnožijo, pri čemer ni pomembno, ali tvorijo monosloj. Celice tako niso polarizirane. Z modelom spremljamo privzem učinkovin v celice tako, da merimo njihove znotrajcelične koncentracije, bodisi kadar je učinkovina v mediju prisotna sama bodisi da so v mediju prisotni inhibitorji prenašalcev oz. rastlinski ekstrakti;
- HepG2 celični monosloj, gojen na s kolagenom prevlečenih Transwell insertih. Celice v tem primeru tvorijo monosloj in izkazujejo polariziranost. Spremljali smo permeabilnost učinkovin iz apikalne proti bazolateralni (t.j. iz kanalikularne proti sinusoidalni strani) strani in iz bazolateralne proti apikalni strani.

### 4.3.1 HEPG2 CELIČNA LINIJA

S pomočjo HepG2 celične linije smo ovrednotili vpliv sekretornih ABC prenašalcev Pgp ter MRP-2 na transport učinkovin (sakvinavir in darunavir) ob prisotnosti izbranih rastlinskih ekstraktov (RE): česen, šentjanževka, ginko, ginseng.

Ker literatura navaja, da imajo omenjeni RE inhibitoren ali induktiven vpliv na sekretorne prenašalce, smo to dejstvo poskušali potrditi s poskusi, ko smo aplicirali RE z znanimi substrati Pgp in MRP-2. Vsakemu RE smo dodali rodamin (Pgp substrat) in nato še fluorescein (MRP-2 substrat) ter ovrednotili vpliv RE na Pgp ali MRP-2 glede na spremembo znotrajcelične koncentracije modelnih substanc (rodamin, fluorescein) v primerjavi z referenco (66, 67). Modelni substanci smo izbrali, ker sta substrata prenašalcev ter zato ker fluorescirata, zaradi česar je analiza hitra v primerjavi s HPLC metodo. Vpliv česnovega ekstrakta na omenjene transporterje smo še dodatno ovrednotili tako, da smo fluoresceinu dodali MK-571 (inhibitor MRP-2) in rodaminu verapamil (inhibitor Pgp). Prav tako smo funkcionalno aktivnost Pgp in MRP-2 potrdili tudi za Saq in Dar z znanimi inhibitorji Pgp in MRP-2. Na celice HepG2 smo aplicirali Saq skupaj z verapamilom in z MK-571, Dar pa z verapamilom in ritonavirjem, ki je znan inhibitor Pgp in MRP-2 sekretornega prenašalca. Učinkovini smo na podlagi spremembe znotrajcelične koncentracije v primerjavi z referenco opredelili kot substrata enega ali obeh prenašalcev.

Po tem, ko smo opredelili RE kot inhibitorje oz. aktivatorje sekretornih prenašalcev, učinkovini pa kot substrata za iste prenašalce, smo poskuse nadaljevali v smeri interpretacije morebitnih interakcij med RE in učinkovinami.

V prvi fazi smo določili optimalno donorsko koncentracijo učinkovin za ovrednotenje vpliva RE na njihovo znotrajcelično koncentracijo. Saq smo zato posamično aplicirali na HepG2 celično linijo z več različnimi donorskimi koncentracijami: 2.5, 5, 10, 15 ali 20  $\mu\text{M}$ . Časovne točke vzorčenja so bile bolj zgoščene v prvi fazi (tabela II). Med zgoraj navedenimi koncentracijami smo izbrali eno, s katero smo nadaljevali drugo fazo poskusov. Za Dar je bila koncentracija določena iz literturnih virov (znaša nad 10  $\mu\text{M}$ ) in se je ujemala z določeno optimalno koncentracijo Saq (62). Učinkovini z določeno donorsko koncentracijo smo dodali 1 v/v % RE in ovrednotili vpliv le-teh na spremembo znotrajcelične koncentracije Saq oz. Dar. Časovne točke v drugi fazi poskusov so bile manj zgoščene (tabela III). Izjema je nastopila le v primeru česnovega ekstrakta, ko smo vzorčili pogosteje (tabela II).

#### **4.3.1.1 Gojenje celic HepG2**

Celice HepG2 smo odmrznili in kultivirali v DMEM mediju, kateremu smo dodali serum, L-glutamin in antibiotike. Ko so celice dosegle ustrezno gostoto na gojišču, smo jih odlepili s pomočjo tripsina v EDTA ter nasadili na plošče z 48 vzorčnimi mestami tako, da je gostota sejanja 150.000 celic/vzorčno mesto. Celice na ploščah smo gojili še 3 dni, da so se celice dobro oprijele podlage in da je bila gostota celic ustrezna. Celicam smo dnevno zamenjali gojišče.

#### **4.3.1.2 Privzem učinkovin oz. modelnih substanc v celice HepG2**

Na dan eksperimenta smo odstranili medij iz vseh vzorčnih mest na ploščici, ki smo jo ves čas eksperimenta greli na termostatirani plošči, tako da je bila temperatura medija 37 °C. Dodali smo 0.3 ml na 37 °C ogrete donorske raztopine z določeno koncentracijo učinkovin z oz. brez rastlinskih ekstraktov ali ustreznega inhibitorja. Vzorčenje (celotne količine dodane donorske raztopine, torej 0.3 ml) je potekalo ob ustreznih časovnih točkah v 4 paralelkah, kot je prikazano v tabeli III. Časovne točke za ovrednotenje referenčnih koncentracij same učinkovine v hepatocitih, torej brez vpliva rastlinskih ekstraktov, pa so prikazane v tabeli II.

VZOREC 1 (Saq/Dar)							
1 min	1 min	1 min	1 min	3 min	3 min	3 min	3 min
5 min	5 min	5 min	5 min	7 min	7 min	7 min	7 min
10 min	10 min	10 min	10 min	12 min	12 min	12 min	12 min
15 min	15 min	15 min	15 min	20 min	20 min	20 min	20 min
25 min	25 min	25 min	25 min	30 min	30 min	30 min	30 min
35 min	35 min	35 min	35 min	40 min	40 min	40 min	40 min

Tabela II: Pregled vzorčenja - časovne točke na plošči s HepG2 celično linijo v prvi fazi poskusov

VZOREC 2 (Saq + rastl.ekstrakt)				VZOREC 3 (Dar + rastl.ekstrakt)			
5 min	5 min	5 min	5 min	5 min	5 min	5 min	5 min
10 min	10 min	10 min	10 min	10 min	10 min	10 min	10 min
15 min	15 min	15 min	15 min	15 min	15 min	15 min	15 min
20 min	20 min	20 min	20 min	20 min	20 min	20 min	20 min
30 min	30 min	30 min	30 min	30 min	30 min	30 min	30 min
40 min	40 min	40 min	40 min	40 min	40 min	40 min	40 min

Tabela III: Pregled vzorčenja - časovne točke na plošči s HepG2 celično linijo v drugi fazi poskusov

Ob časih vzorčenja smo najprej posrkali donorsko raztopino in dodali leden PBS, s katerim smo 3-krat sprali vzorčna mesta. Nato smo dodali 0.2 ml PBS ter celice s pomočjo nastavkov pipet odlepili od podlage. Celice smo skupaj s PBS posrkali s pipeto ter shranili na ledu do liziranja.

#### 4.3.1.3 Liziranje celic

Vsak vzorec smo zamrznili v tekočem dušiku in ga zatem potopili v vročo vodo. Postopek smo ponovili 3-krat. Po obdelavi s tekočim dušikom smo vzorce lizirali še z ultrazvočno sondjo, ki je dodatno prispevala k lizi celic ter znotrajceličnih organelov. Lizat smo centrifugirali na 16.000 obratih/min 10 min.

#### 4.3.1.4 Analiza modelnih substanc

Koncentraciji fluoresceina (FLU) in rodamina (Rho123) smo izmerili s fluorescenčnim detektorjem Tecan GENios ( $\lambda_{\text{ex}} = 485\text{nm}$ ,  $\lambda_{\text{em}} = 535\text{nm}$ ). 0.1 ml vzorca smo dodali 0.1 ml 0.025 M NaOH za merjenje FLU oz. 0.1 ml 0.01 M HCl za merjenje Rho123. Rezultate smo normirali na koncentracijo proteinov, tako da smo za rezultat uporabili razmerje med koncentracijo FLU oz. Rho123 in koncentracijo proteinov. Takšne koncentracije učinkovine so tako med seboj primerljive, saj so proteini dober pokazatelj količine celic na vzorčno mesto. Vsako vzorčno mesto namreč nima popolnoma enakega števila celic.

#### 4.3.1.5 Priprava vzorcev in meritev znotrajcelične koncentracije proteinov

Vzorec smo po liziranju in prvem centrifugiraju uporabili za merjenje koncentracije znotrajceličnih proteinov. 0.01 ml vzorca smo odpipetirali na mikrotitrsko ploščo in dodali raztopino ustreznega barvila iz kompleta, BCA<sup>TM</sup> Protein assay Kit. Po 30 min mešanja pri 37 °C smo s fluorescenčnim detektorjem pri eksitatorni valovni dolžini 595 nm izmerili absorbanco proteinov ter izračunali njihovo koncentracijo glede na umeritveno krivuljo, ki smo jo pripravili iz priloženega standarda albumina. Pripravljeni vzorce smo analizirali še isti dan.

#### 4.3.1.6 Priprava vzorcev za HPLC analizo učinkovin

S HPLC smo analizirali vzorce, ki so vsebovali samo učinkovino brez dodanih RE. K 80 µL lizata celic HepG2 smo dodali acetonitril v razmerju 1:1 in močno premešali (Vortex) ter pustili na ledu vsaj 10 min. Proteine, ki so se oborili, smo odstranili s centrifugiranjem pri 160.00 obratih/min 10 min. Supernatant smo napolnili v viale in analizirali s HPLC. Hitrost pretoka mobilne faze je bila 2 ml/min, temperatura kolone 30 °C, retencijski čas pa 4.6 min za sakvinavir in darunavir. Sakvinavir smo detektirali pri 240 nm, darunavir pa pri 266 nm. Koncentracije učinkovin smo preračunali glede na umeritveno premico za vsako izmed učinkovin. Standardne raztopine učinkovin so bile pripravljene v koncentacijskem območju od 0,02 % do 20 % glede na začetne donorske koncentracije učinkovine (2.5, 5, 7.5, 10, 15 in 20 µM). Pripravljeni vzorce smo še isti dan analizirali, kadar pa to ni bilo izvedljivo, smo jih zamrznili pri – 20 °C do naslednjega dne. Koncentracijo učinkovin, določeno s HPLC, smo normirali na koncentracijo proteinov. Glede na dobljene rezultate smo izbrali ustrezeno

konzentracijo učinkovine (Dar in Saq) za vrednotenje vpliva rastlinskih ekstraktov na distribucijo Saq in Dar v hepatocitih.

#### **4.3.1.7 Priprava vzorcev za LC-MS analizo učinkovin**

Vzorce, ki so poleg učinkovine imeli dodatek enega izmed rastlinskih ekstraktov, smo zaradi preveč motenj pri detekciji, ki bi jih povzročile mnoge sestavine RE (zmes veliko fitokemikalij, ki onemogoča točnost analize s HPLC), uporabili analizo z LC/MS/MS sistemom. Vzorce smo pripravili na enak način kot za HPLC analizo do točke, ko odpipetiramo 80 µL lizata celic HepG2. Lizat smo v primeru LC-MS analize, za oboritev proteinov dodali acetonitril ki je vseboval 0,5 mg/L haloperidola. Slednji je služil kot interni standard. Lizat celic in mešanico haloperidola + acetonitrila smo mešali v razmerju 1:3 (torej 80 µL vzorca in 240 µL acetonitril + 0,5mg/L haloperidol) na vortexu. Vzorce smo postavili na led za vsaj 10 minut, čemur je sledilo centrifugiranje pri 16.000 obratih/min 10 min. Supernatant smo odpipetirali v HPLC viale ter jih analizirali z LC/MS/MS.

Za kromatografsko separacijo smo uporabili C-18 kolono (Phenomenex Kinetex 50 X 2.0mm) z delci premera 2,6 µm za Dar in kolono C-18 (Phenomenex Gemini 150 X 2.0mm) z delci premera 3,0 µm za Saq. Volumen injiciranja je bil 10 µL in temperatura kolone 50 °C. Mobilna faza je vsebovala vodo in acetonitril z 0,1 % mravljične kisline. Za elucijo Dar smo uporabili linerani gradient od 20 % do 65 % acetonitrila v 4 min s pretokom 0,4 mL/min. Retencijski čas za Dar in interni standard (haloperidol) je bil 5.5 in 3.9 min. Pri analizi Saq smo uporabili linearni gradient acetonitrila od 20 % do 36 % v 12 min s pretokom 0.5 mL/min ter dobili retencijski čas za Saq 9.8 min in za interni standard (haloperidol) 3.1 min.

Pri masnem spektrometu smo za vir ionizacije uporabili negativno (nastanejo anioni) in pozitivno (nastanejo kationi) ionizacijo z razprševanjem raztopin v električnem polju (ESI). Tlak razpršilnega plina pri analizi obeh učinkovin je znašal 150 kPa, temperatura desolvatacije pa je bila 400 °C.

#### **4.3.1.8 Statistična obdelava rezultatov**

Rezultate v tabelah in grafih smo predstavili kot aritmetično sredino ± SD štirih meritev. Podatke smo obdelali statistično s programom Microsoft Excel s pomočjo paketa SPSS Analiza podatkov. Testirali smo hipotezo o aritmetični sredini za dva neodvisna vzorca s pomočjo Studentovega t-testa. Pri tem smo predhodno izvedli F-test, da smo ugotovili, ali sta varianci obeh vzorcev enaki ali različni in na podlagi tega smo nato izvedli ustrezen t-test.

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

(Enačba 1)

 $s^2$  .....variancaPostavimo ničelno hipotezo  $H_0$  in njej nasprotno alternativno hipotezo  $H_1$ :

$$H_0 : s_x^2 = s_y^2$$

$$H_1 : s_x^2 \neq s_y^2 \quad (Enačba\ 2)$$

Ničelna hipoteza kaže, da se varianci dveh vzorcev ne razlikujeta signifikantno, alternativna pa nasprotno, da se varianci signifikantno razlikujeta. F-test izvedemo po enačbi 3:

$$F = \frac{s_x^2}{s_y^2}$$

(Enačba 3)

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

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

(Enačba 4)

X.....povprečna vrednost meritev v prvi skupini primerjalnih meritev

y.....povprečna vrednost meritev v drugi skupini primerjalnih meritev

s.....skupna standardna deviacija

m.....število meritev v prvi skupini primerjalnih meritev

n.....število meritev v drugi skupini primerjalnih meritev

α.....stopnja tveganja

f.....stopnje prostosti ( $f = m + n - 2$ )Če pa ugotovimo, da je  $F_{eks} > F_{tab}$  ( $p < \alpha$ ), ničelno hipotezo zavrnemo in sprejmemo alternativno. Zato uporabimo t-test, kjer upoštevamo, da sta varianci vzorcev različni.

$$t = \frac{\bar{x} - \bar{y}}{\sqrt{\frac{s_1^2}{m} + \frac{s_2^2}{n}}} \quad (Enačba\ 5)$$

$s_1^2$  ..... standardna deviacija v eni skupini primerjalnih meritev

$s_2^2$  ..... standardna deviacija v drugi skupini primerjalnih meritev

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

#### 4.3.1.9 Primer izračuna znotrajcelične koncentracije Saq

Primer izračuna je prikazan z vzorcem, ki je vseboval  $10\ \mu M$  Saq brez RE.

Izmerimo absorbance proteinov in jih preračunamo v koncentracijo s pomočjo umeritvene premice za proteine.

Paralelke	1	2	3	4
<b>1min</b>	0,3059	0,2647	0,2807	0,293
<b>3min</b>	0,2728	0,2983	0,301	0,3068
<b>5min</b>	0,2849	0,2903	0,2964	0,2833
<b>7min</b>	0,304	0,3075	0,3249	0,2963
<b>10min</b>	0,3235	0,2976	0,2976	0,3042
<b>12min</b>	0,2469	0,2727	0,2971	0,2984
<b>15min</b>	0,2824	0,2882	0,3143	0,2756
<b>20min</b>	0,3144	0,306	0,3006	0,2778
<b>25min</b>	0,2972	0,3253	0,3031	0,2928
<b>30min</b>	0,298	0,2842	0,2994	0,3004
<b>35min</b>	0,2865	0,2773	0,2843	0,2969
<b>40min</b>	0,2904	0,2793	0,2788	0,2788

Tabela IV: Vrednosti absorbance proteinov, izmerjene za vse časovne točke v 4 paralelkah pri valovni dolžini  $\lambda = 595\text{nm}$ .

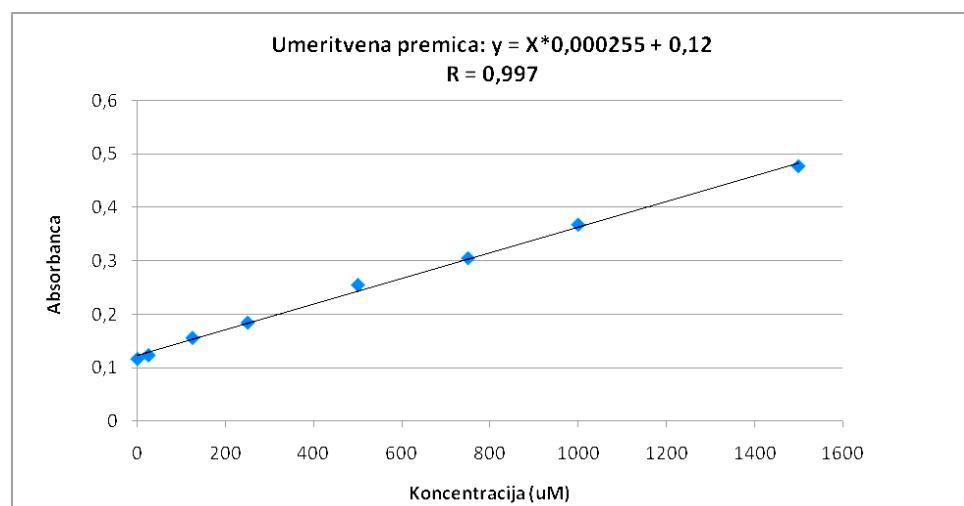
Splošna enačba umeritvene premice:

$$y = x * k + n \quad (k = \text{naklon umeritvene premice}, n = \text{odsek na ordinatni osi}, x = \text{konzentracija}, y = \text{absorbanca}) \quad (\text{Eračba 6})$$

$$y = x * 2,55 * 10^{-4} + 0,12 \quad (\text{enačba umeritvene premice za izračun intracellularne koncentracije proteinov) s korelacijo } R = 0,997. \quad (\text{Eračba 7})$$

$x = \text{konz} (\mu\text{g/ml})$	$y = A (595)$
0	0,11585
25	0,1229
125	0,15555
250	0,18365
500	0,2543
750	0,30455
1000	0,3672
1500	0,47645

Tabela V: Koncentracije standardnih raztopin proteinov s pripadajočo izmerjeno absorbancijo. Vrednosti za pripravo umeritvene premice.



**Slika 6:** Umeritvena premica standardnih koncentracij proteinov s pripadajočo absorbancijo in izračunano enačbo.

<b>Paralelka</b>	1	2	3	4
<b>1 min</b>	732,38	570,53	633,39	681,71
<b>3 min</b>	602,35	702,53	713,13	735,92
<b>5 min</b>	649,89	671,10	695,06	643,60
<b>7 min</b>	724,92	738,67	807,02	694,67
<b>10 min</b>	801,52	699,78	699,78	725,70
<b>12 min</b>	500,61	601,96	697,81	702,92
<b>15 min</b>	640,07	662,85	765,38	613,35
<b>20 min</b>	765,77	732,77	711,56	622,00
<b>25 min</b>	698,20	808,59	721,38	680,92
<b>30 min</b>	701,35	647,14	706,85	710,77
<b>35 min</b>	656,17	620,03	647,53	697,03
<b>40 min</b>	671,49	627,89	625,92	625,92

Tabela VI: Intracelularna koncentracija proteinov [ $\mu\text{g/ml}$ ] v vseh časovnih točkah v 4 paralelkah.

S HPLC izmerimo površino kromatografskega vrha vzorcev Saq poobarjanju proteinov ter s pomočjo umeritvene premice in pripadajoče enačbe premice, za to učinkovino izračunamo znotrajcelične koncentracije Saq.

<b>Paralelka</b>	1	2	3	4
<b>1 min</b>	7	8,6	10	8,8
<b>3 min</b>	24,9	24,1	31,7	23
<b>5 min</b>	35,8	34,5	36	30,3
<b>7 min</b>	34,3	53,6	55,8	54,2
<b>10 min</b>	38,1	68,6	63,5	64
<b>12 min</b>	51,1	70	71,9	67,3
<b>15 min</b>	67,9	88,2	90,9	66,3
<b>20 min</b>	118,1	112,2	98,7	95,3
<b>25 min</b>	110,6	135,2	114	112
<b>30 min</b>	144,6	120,2	136,2	117,8
<b>35 min</b>	97,8	126,8	126,9	140,1
<b>40 min</b>	130,5	119,1	100,5	95,6

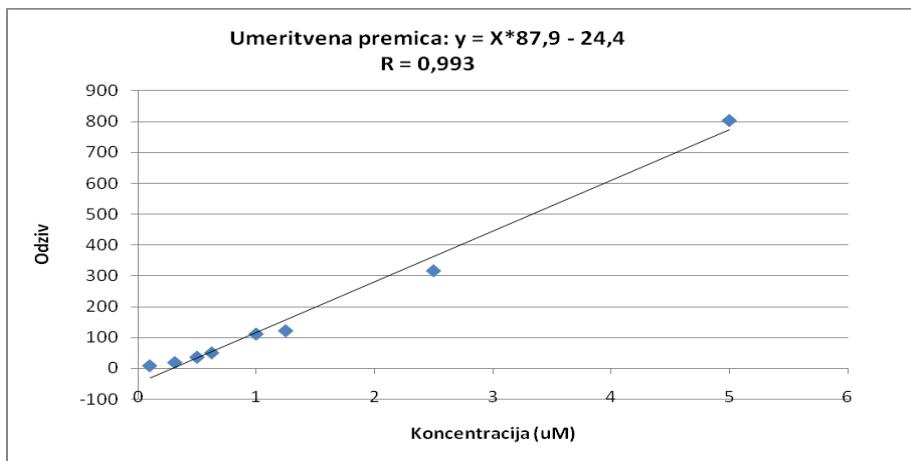
Tabela VII: Odzivi (površina kromatografskega vrha) Saq izmerjeni za vse časovne točke, v 4 paralelkah pri valovni dolžini  $\lambda = 240$  nm.

$y = x * 87,9 - 24,4$  (enačba umeritvene premice za izračun intracelularne koncentracije Saq) s korelacijo  $R = 0,993$

(Enačba 8)

x = konc ( $\mu\text{M}$ )	y = Odziv
0,1	8,1
0,3125	18,3
0,5	35,8
0,625	50
1	111,1
1,25	121,6
2,5	316,6
5	804,6

Tabela VIII: Koncentracije standardnih raztopin Saq s pripadajočimi izmerjenimi odzivi, merjenimi pri valovni dolžini  $\lambda = 240$  nm. Vrednosti za izdelavo umeritvene premice.



Slika 7: Umeritvena premica standardnih koncentracij Saq s pripadajočo absorbanco in izračunano enačbo.

Paralelka	1	2	3	4
<b>1 min</b>	0,3574	0,37567	0,391	0,3779
<b>3 min</b>	0,5612	0,5520	0,6385	0,5395
<b>5 min</b>	0,6852	0,67046	0,687	0,6226
<b>7 min</b>	0,6681	0,8878	0,9128	0,8946
<b>10 min</b>	0,7114	1,0585	1,000	1,0062
<b>12 min</b>	0,8594	1,0745	1,0961	1,0437
<b>15 min</b>	1,0506	1,28165	1,312	1,0324
<b>20 min</b>	1,6219	1,5548	1,4011	1,3624
<b>25 min</b>	1,5366	1,81659	1,575	1,5525
<b>30 min</b>	1,9235	1,6458	1,8279	1,618
<b>35 min</b>	1,3909	1,72099	1,722	1,8723
<b>40 min</b>	1,7631	1,633	1,421	1,365

Tabela IX: Koncentracija Saq [ $\mu\text{M}$ ] v vseh časovnih točkah, kot so navedene v tabeli II.

Koncentracijo sakvinavrija delimo s koncentracijo znotrajceličnih proteinov (vrednosti v tabeli IX delimo z vrednostmi v tabeli VI). Rezultati so prikazani v tabeli X.

<b>Paralelka</b>	1	2	3	4
<b>1 min</b>	0,0004	0,0007	0,0006	0,0005
<b>3 min</b>	0,0009	0,0007	0,0008	0,0007
<b>5 min</b>	0,0010	0,0009	0,0009	0,0009
<b>7 min</b>	0,0009	0,0012	0,0011	0,0012
<b>10 min</b>	0,0008	0,0015	0,001	0,0013
<b>12 min</b>	0,0017	0,0017	0,0015	0,0014
<b>15 min</b>	0,0016	0,0019	0,0017	0,0016
<b>20 min</b>	0,0021	0,0021	0,0019	0,0021
<b>25 min</b>	0,002	0,0022	0,0021	0,0022
<b>30 min</b>	0,0027	0,0025	0,0025	0,0022
<b>35 min</b>	0,002	0,0027	0,0026	0,0026
<b>40 min</b>	0,0026	0,0026	0,0022	0,0021

Tabela X: Koncentracije Saq [ $\mu\text{M}/(\mu\text{g/ml})$ ] normirane na vsebnost proteinov za vsako časovno točko v štirih paralelkah.

#### 4.3.2 CELICE, GOJENE NA FILTRIH TRANSWELL

V nadaljevanju smo celice HepG2 namesto na enostavni plastični podlagi gojili na s kolagenom prevlečenih filtri Transwell. S tem pristopom smo dosegli, da so celice med rastjo oblikovale monosloj polariziranih celic, saj je znano, da sestavine zunajceličnega matriksa (kot je kolagen) znatno pripomorejo k vzpostavitvi celične polarnosti (63). Monosloj celic HepG2 nam je omogočal določevanje permeabilnosti učinkovin samih ali ob prisotnosti snovi, ki vplivajo na delovanje prenašalcev. Spremljanje permeabilnosti namesto privzema učinkovine v celice predstavlja enostavnnejši in hitrejši *in vitro* pristop za ugotavljanje morebitnih interakcij med sočasno apliciranimi učinkovinami oz. učinkovino in RE. Poleg tega so vzorci, ki jih dobimo med poskusi spremeljanja permeabilnosti, bolj čisti kot celični lizati, saj ne vsebujejo znotrajceličnih sestavin celic HepG2, torej so postopki liziranja celic, obarjanja proteinov in priprave vzorcev pred HPLC in LC-MS analizo nepotrebni. Na Transwell sistemu smo testirali le vpliv AGE na spremembo prehoda Saq in Dar in primerjali rezultate s tistimi pridobljenimi na HepG2 celični liniji ter tako ovrednotili ustreznost in primernost tega *in vitro* sistema. Vsi koraki, potrebni za izvedbo poizkusov merjenja permeabilnosti, so opisani v nadaljevanju.

#### **4.3.2.1 Nasajanje in gojenje celic HepG2 na s kolagenom prevlečene Transwell filtre**

Celice HepG2 smo gojili na gojišču, dokler niso dosegle ustrezne konfluence in hitrosti delitve celic. Celice smo odlepili s tripsinom v EDTA ter jih nasadili na s kolagenom prevlečene filtre Transwell z gostoto sejanja 200.000 celic/filter. Suspenzija celic, ki smo jo nasajali, je bila kar se da enakomerna. Celicam smo dnevno menjali gojišče (DMEM s FBS, L-glutaminom in antibiotiki), dokler s pomočjo mikroskopa nismo potrdili, da so celice oblikovale monosloj. Uporabljene celice HepG2 so v 3 dneh po nasajanju oblikovale monosloj in bile tako pripravljene za izvedbo poizkusov.

#### **4.3.2.2 Določanje *in vitro* permeabilnosti modelnih substanc in učinkovin skozi monosloj**

##### **celic HepG2**

Monosloj celic HepG2, gojenih na s kolagenom prevlečenih filtrih Transwell, še ni bil opisan ali uporabljen za spremjanje permeabilnosti učinkovin in potencialnih interakcij učinkovine z RE zaradi možnosti spremembe aktivnosti sekretornih prenašalcev (Pgp, MRP-2). V prvem koraku smo zato s pomočjo modelnih substanc ovrednotili, ali celice HepG2 v monosloju izražajo Pgp ter MRP-2 prenašalce v apikalni (kanalikularni) membrani v zadostni meri, da bi lahko v nadaljevanju spremljali interakcije na omenjenih prenašalcih za Saq in Dar ob prisotnosti AGE. Preverili smo tudi, ali sta aktivnosti obeh sekretornih prenašalcev občutljivi na prisotnost inhibitorjev. Monosloju smo izmerili TEER vrednosti in permeabilnost FITC-D4000, s čimer smo opredelili paracelularno permeabilnost monosloja celic HepG2.

Ko smo potrdili, da monosloj celic HepG2 predstavlja ustrezni in primeren *in vitro* model za spremjanje aktivnosti Pgp in MRP-2 prenašalcev, smo določili permeabilnost obeh preučevanih HIV-PI v dvofaznih poskusih. V prvi fazi smo eno uro (vzorčenje na 15 min) spremljali permeabilnost izbrane učinkovine v AP-BL in BL-AP smereh, nato pa smo v drugi fazi dodali 1 v/v % AGE in spremljali permeabilnost še dodatno uro z vzorčenjem na 15 min. Poskuse smo izvajali v Ringerjevem pufru pH 7.4, kateremu smo dodali 10 mM L-glutamin ter 10 mM glukozo na bazolateralno stran oz. 10 mM manitol na apikalno stran. Vse raztopine, ki smo jih uporabili med poskusom, smo segreli na 37 °C ter prepihalni s karbogenom (CO<sub>2</sub> 95 %, O<sub>2</sub> 5 %).

Pred poskusom smo najprej odstranili gojišče in celice previdno sprali s segretim in s karbogenom prepihanim Ringerjevim pufrom pH 7.4 tako, da nismo poškodovali monosloja

celic HepG2. Nato smo dodali donorske in akceptorske raztopine ter celice postavili v stresalnik z najnižjo hitrostjo mešanja in s temperaturo vodne kopeli 40 °C (plošča celic je bila nameščena nad vodno koppeljo). Vzdrževali smo atmosfero karbogena (95 % CO<sub>2</sub> in 5 % O<sub>2</sub>). Na apikalno (tj. kanalikularna stran) stran monosloja celic HepG2 smo dodajali 0.5 ml ustrezne raztopine, na bazolateralno (tj. sinusoidna stran) pa 1.5 ml. Ko smo spremljali prehod spojin v AP-BL smeri, smo na apikalno (AP) stran monosloja dodali 0.5 ml donorske raztopine (t.j. Ringerjev pufer pH 7.4 z 10 mM L-glutaminom in 10 mM manitolom ter preučevano spojino). V tem primeru smo vzorčili 100 µL akceptorske raztopine na bazolateralni (BL) strani ter odvzet vzorec vsakokrat nadomestili z enakim volumnom akceptorske raztopine (Ringerjev pufer pH 7.4 z 10 mM L-glutaminom in 10 mM glukozo). Pri spremeljanju permeabilnosti spojine v BL-AP smeri pa smo na BL stran dodali 1.5 ml donorske raztopine in vzorčili na AP strani po 100 µL akceptorske raztopine (0,5ml) ter jo nadomeščali z ustrezno akceptorsko raztopino.

Vzorčimo v mikrotitrsko ploščico in jo po poizkusu analiziramo s HPLC brez dodatnih korakov, potrebnih za čiščenje in pripravo vzorcev.

#### 4.3.2.3 Izračun koeficiente permeabilnosti

Permeabilnostni koeficient smo izračunali po enačbi 9:

$$P_{app} = \frac{dc}{dt} \frac{V}{c_0 A} \quad (\text{Enačba 9})$$

Kjer je dc/dt sprememba koncentracije preiskovane substance v akceptorskem prostoru na enoto časa v ravnotežnem stanju, V je volumen akceptorskega prostora (0.5 oz. 1.5 ml), A (1.13 cm<sup>2</sup>) je izpostavljena površina in c<sub>0</sub> začetna koncentracija preiskovane substance v donorski raztopini.

#### **4.3.2.4 Analiza vzorcev**

Koncentracijo modelnih spojin Rho123, FLU in FITC-D4000 smo izmerili s flourescenčnim detektorjem ( $\lambda_{\text{ex}} = 485$  nm;  $\lambda_{\text{em}} = 535$  nm), Saq in Dar pa smo določali s HPLC, kot že opisano v poglavju 4.3.1.6.

#### **4.3.2.5 Statistična analiza podatkov**

Rezultati so predstavljeni kot srednje vrednosti  $\pm$  SD treh meritev. Podatki so bili obdelani statistično v programu Microsoft Excel s pomočjo paketa Analiza podatkov na isti način kot predstavljeno v poglavju 4.3.1.8.

## 5. REZULTATI

*In vitro* interakcije med inhibitorji HIV-proteaz (Saq in Dar) in RE smo spremljali s pomočjo dveh različnih pristopov. Opazovali smo privzem obeh učinkovin v celicah HepG2, gojenih na plastični podlagi. Celice HepG2 predstavljajo rakasto jetrno celično linijo s popolno odsotnostjo ekspresije citokromnih encimov in absorptivnih prenašalcev (60). Pri poskusih na celicah HepG2 smo posebej izpostavili česen, saj gre za ekstrakt, ki ga pacienti, okuženi z virusom HIV, uporabljajo najpogosteje. Celice HepG2 smo nazadnje gojili še v obliki monosloja na Transwell insertih, prevlečenih s kolagenom. Na HepG2 monosloju smo ovrednotili le vpliv česnovega ekstrakta na obe učinkovini, saj smo hoteli samo potrditi oz. ovreči ustrezost novejšega modela za preverjanje interakcij. Rezultate, pridobljene na obeh modelih, smo primerjali in ugotavliali, ali je kvaliteta informacij o morebitnih interakcijah, pridobljena z obema modeloma, primerljiva/ustrezna.

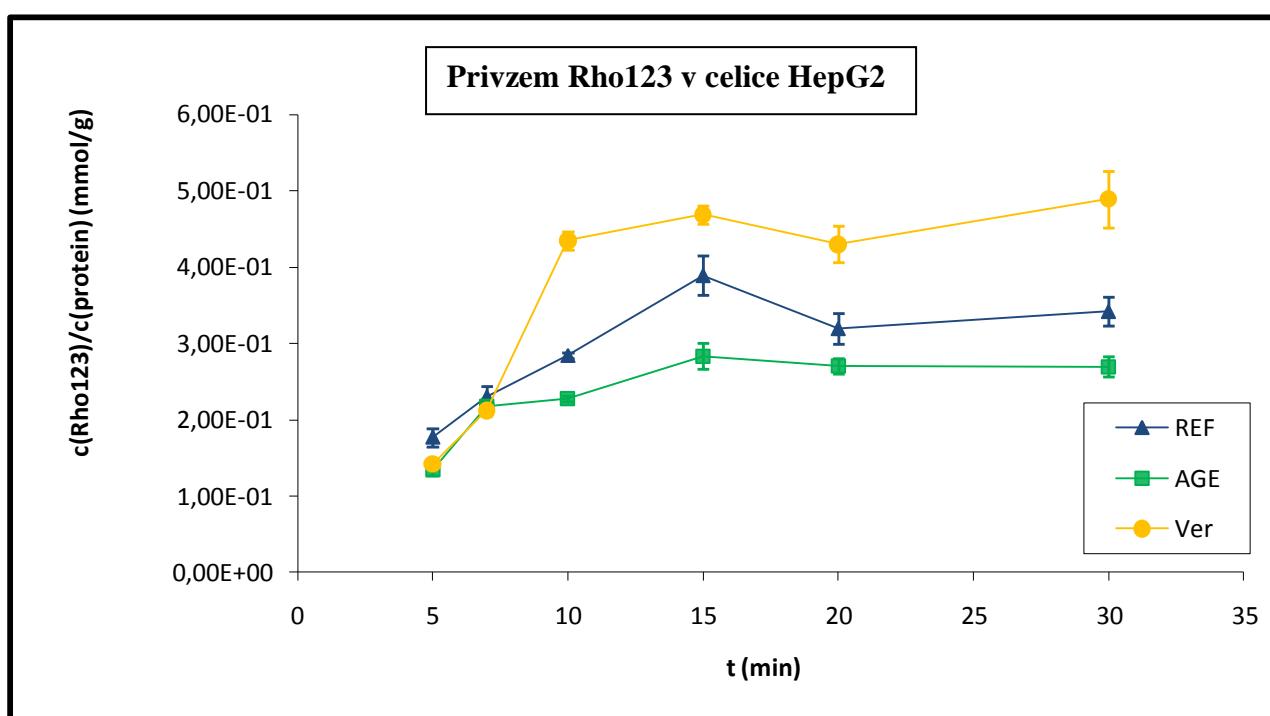
### 5.1 PRIVZEM MODELNIH SUBSTANC V CELICE HEPG2 OB PRISOTNOSTI RASTLINSKIH EKSTRAKTOV

Kljud literaturnim podatkom o zadostni izraženosti in aktivnosti Pgp in MRP-2 prenašalcev v celicah HepG2 smo izvedli poskuse privzema Rho123 (Pgp substrat) oz. FLU (MRP-2 substrat) v celice HepG2. Obema substancama smo dodali ustrezen inhibitor prenašalca, čigar substrat je spojina, ter tako z gotovostjo potrdili prisotnost in aktivnost obih prenašalcev v celicah HepG2. Z dodatkom RE k znanim substratom (Rho123, FLU) za oba prenašalca smo določili še vpliv na Pgp in/ali MRP-2 za posamezne ekstrakte.

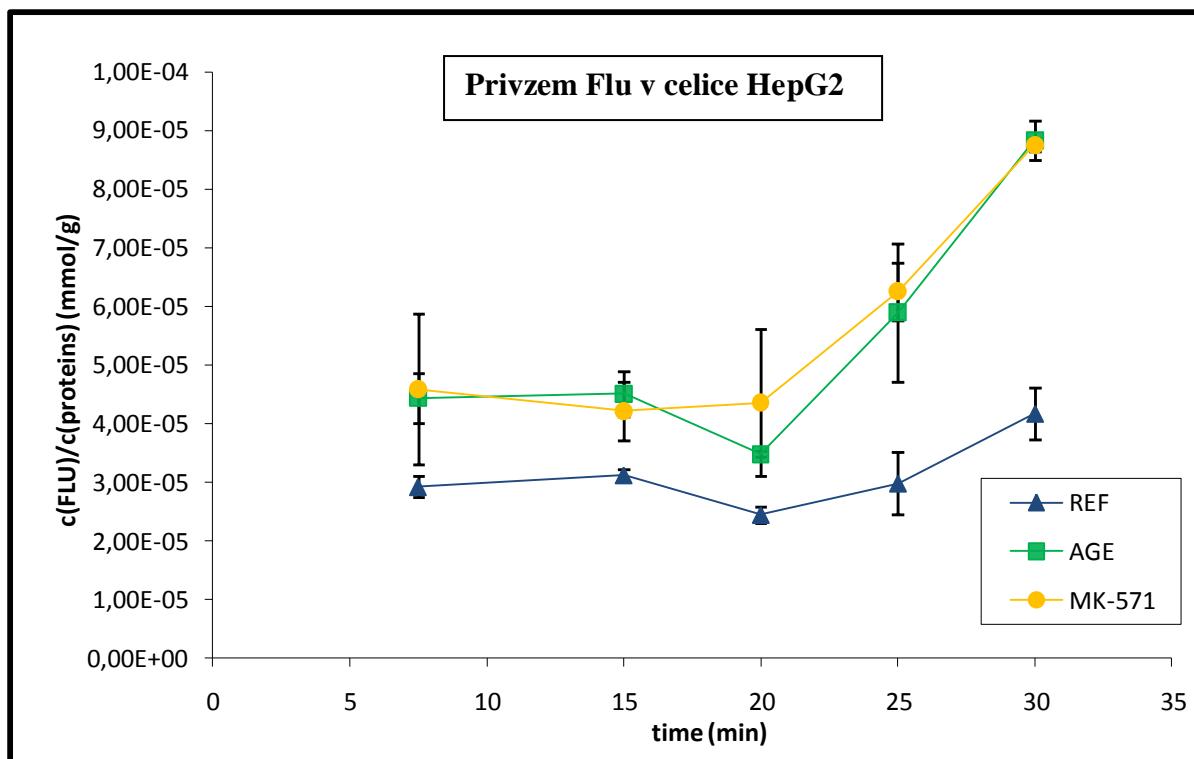
Na spodnjih slikah smo prikazali privzem Rho123 in FLU v Celice HepG2. Na sliki 8 je prikazan graf z referenčno koncentracijo Rho123 (znan substrat Pgp) v celicah HepG2 ter spremembu te koncentracije, kadar privzem Rho123 spremljamo ob prisotnosti staranega česnovega ekstrakta (AGE) ali Ver (znan inhibitor Pgp). Na sliki 9 pa je prikazan graf z referenčno koncentracijo FLU (substrat MRP-2) ter spremembu znotrajceličnih koncentracij FLU ob dodanem AGE ali MK-571 (znan inhibitor MRP-2). Vpliv AGE in inhibitorjev prenašalcev na spremembo znotrajcelične koncentracije modelnih substanc smo analizirali v istem dnevu ter rezultate predstavili na istem grafu. Taka predstavitev rezultatov je pomembna predvsem za lažjo predstavo o velikosti vpliva AGE na koncentracijo FLU/Rho123 v celicah HepG2. Na ta način predvidimo, ali gre za relativno veliko/majhno

spremembo koncentracije ob sočasni aplikaciji AGE v primerjavi s spremembami, ki jo povzroči znani inhibitor. Enako lahko predvidimo za sočasno aplicirane ekstrakte šentjanževke, ginka in ginsenga z modelnimi substancami, ko ne potrebujemo ponovno izvajati poskusa z inhibitorji pod pogojem, da eksperimente izvajamo pod istimi pogoji.

Nadalje je na sliki 10 prikazan graf privzema Rho123 v hepatocite ob prisotnosti ekstrakta šentjanževke, ginsenga ali ginka. Sledi grafični prikaz spremembe znotrajcelične koncentracije FLU ob prisotnosti istih RE na sliki 11. Vzorčenje in meritve znotrajcelične koncentracije so potekale v časovnih točkah, kot so prikazane v tabeli III in pod istimi pogoji kot poskusi privzema modelnih substanc z AGE.



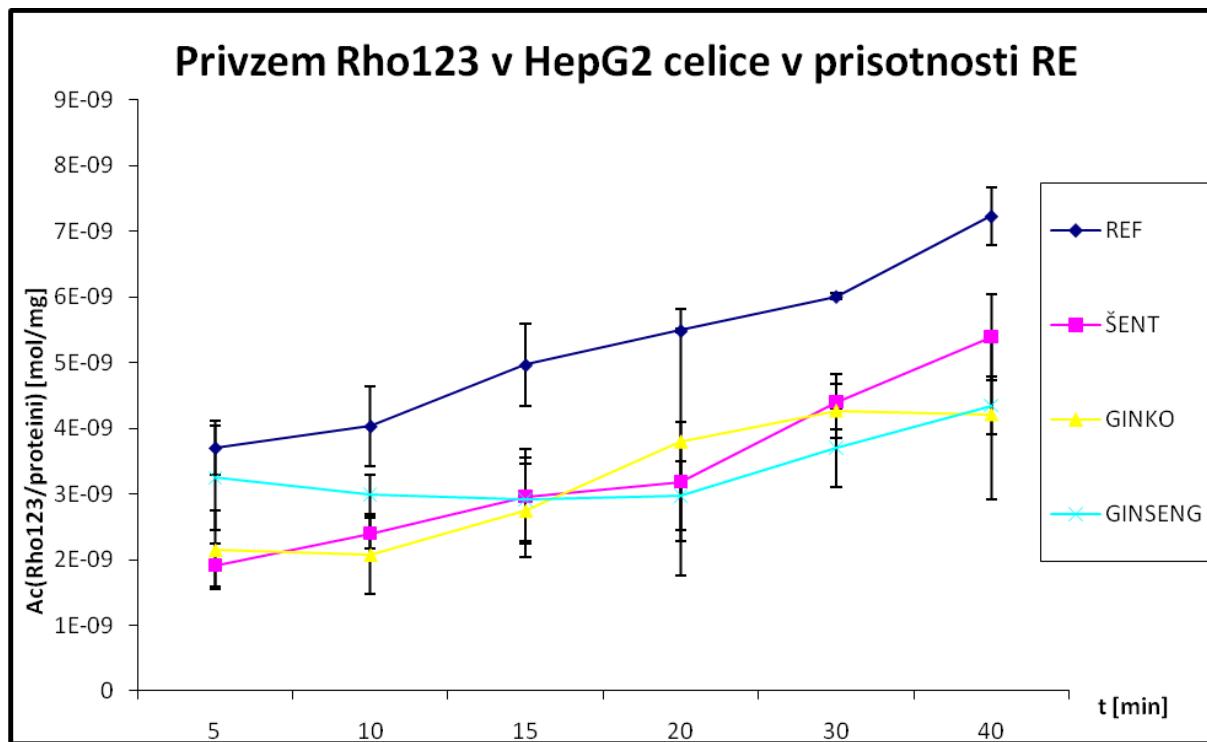
**Slika 8:** Privzem 2uM Rho123 v celice HepG2 (REF) ob prisotnosti 1 v/v% AGE in ob prisotnosti Pgp inhibitorja Ver 20uM. Rezultati so predstavljeni kot povprečje 4 meritev s SD. Intervalli vzorčenja so bili: 5, 7, 10, 15, 20 in 30 min.



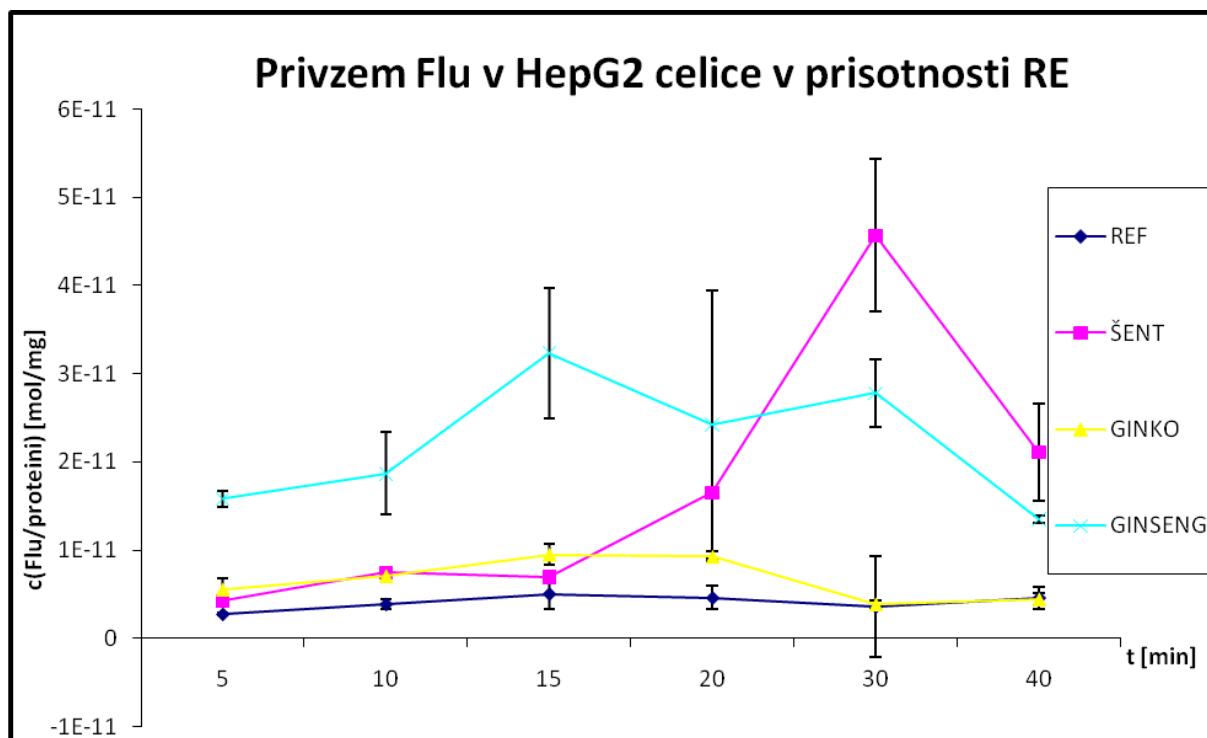
**Slika 9:** Privzem 10uM Flu v celice HepG2 (REF) ob prisotnosti 1 v/v% AGE in ob prisotnosti MRP-2 inhibitorja MK-571 50uM. Rezultati so predstavljeni kot povprečje 4 meritev s SD. Intervalli vzorčenja so bili: 7, 15, 20, 25 in 30 min.

Znotrajcelični koncentraciji tako Rho123 kot FLU sta se signifikantno povišali ob prisotnosti inhibitorjev sekretornih prenašalcev Ver in MK-571 (sliki 8 in 9, rumena krivulja). Inhibitorni vpliv Ver na Pgp prenašalec je postal signifikanten po sedmi minutu in je ostal značilen do konca eksperimenta (slika 8), medtem ko so bile znotrajcelične koncentracije FLU značilno višje ob prisotnosti MK-571 glede na referenčne vrednosti celoten čas poizkusa (slika 9). Ob prisotnosti 1 v/v% ekstraktov česna, šentjanževke, ginsenga in ginka so bile znotrajcelične koncentracije Rho123 signifikantno nižje (slika 8, 10). Vpliv rastlinskih ekstraktov na koncentracijo Rho123 je ravno obraten kot vpliv inhibitorja Pgp prenašalca, Ver.

V nasprotju z vplivom ekstraktov na privzem Rho123 pa privzem FLU ob prisotnosti RE signifikantno zvišal glede na ustrezne referenčne vrednosti. Vpliv AGE na privzem FLU se skoraj popolnoma ujema z delovanjem MK-571, MRP-2 inhibitorjem (slika 9). Ekstrakta ginsenga in tudi šentjanževke (slednja signifikantno zmanjša sekrecijo po 20. min) pa imata celo večji vpliv na povečanje znotrajcelične koncentracije FLU v celicah HepG2 (slika 11). Najmanjši vpliv na povečanje FLU v celici ima ginko. Zmerno povečanje koncentracije FLU se pojavi takoj, vendar popolnoma izgine po 30. minutu poskusa (slika 11).



**Slika 10:** Privzem 2uM Rho123 v celice HepG2 (REF) ob prisotnosti 1 v/v% ekstrakta šentjanževke (ŠENT), ginka in ginsenga. Rezultati so predstavljeni kot povprečje 4 meritev s SD.



**Slika 11:** Privzem 10 uM FLU v celice HepG2 (REF) ob prisotnosti 1 v/v% ekstrakta šentjanževke (ŠENT), ginka in ginsenga. Rezultati so predstavljeni kot povprečje 4 meritev s SD.

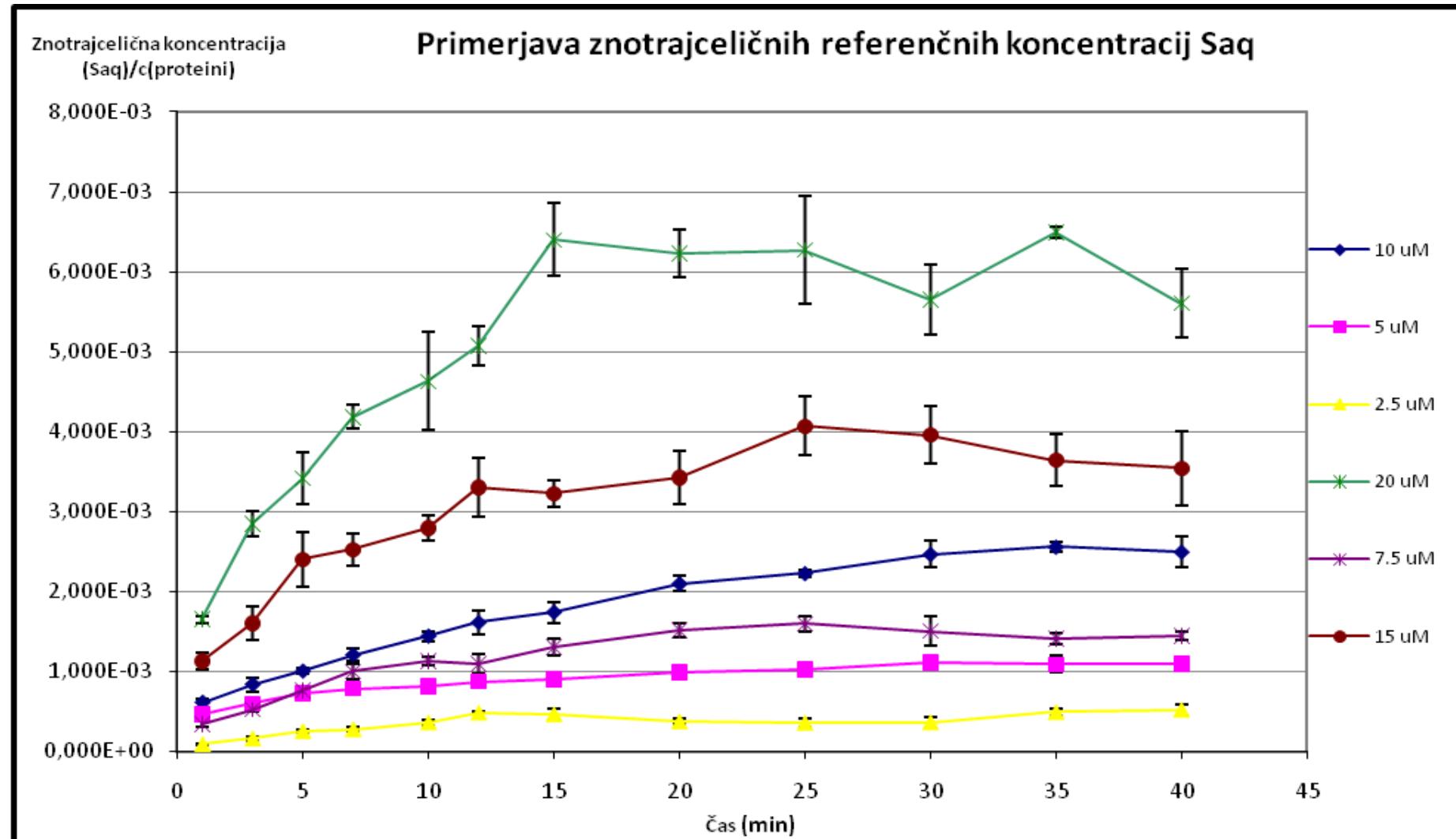
## 5.2 PRIVZEM SAQ IN DAR V CELICE HEPG2 OB PRISOTNOSTI INHIBITORJEV PRENAŠALCEV

Saq in Dar sta substrata ali enega ali obeh sekretornih prenašalcev: Pgp in MRP-2 (17, 24). V tem poglavju smo pred preverjanjem vpliva RE na transport obeh učinkovin v celice HepG2 žeeli preveriti, ali se obe učinkovini prenašata z omenjenima prenašalcema. Prenos Saq in Dar s Pgp in/ali MRP-2 prenašalcem smo preverili tako, da smo njun privzem v celice spremljali ob prisotnosti inhibitorjev obeh prenašalcev (Ver za Pgp ter MK571 za MRP-2). Tako pridobljene rezultate smo primerjali z referenčnimi vrednostmi, t.j. z znotrajcelično koncentracijo obeh učinkovin v celicah HepG2 ob istih časovnih točkah, ki smo jih določili v referenčnih poskusih, izvedenih brez prisotnosti inhibitorjev ali RE.

Poleg tega smo hoteli določiti, katere donorske koncentracije učinkovin so najprimernejše za spremeljanje farmakokinetičnih interakcij.

### 1. Privzem Saq v celice HepG2 pri različnih donorskih koncentracijah

Za nadaljevanje poskusov smo morali določiti optimalno donorsko koncentracijo Saq, pri kateri smo lahko opazovali sekretorni vpliv transporterjev, hkrati pa naj bi se približala terapevtskim količinam učinkovine. Za Dar tovrstnih poskusov nismo izvajali, saj smo imeli dovolj zanesljive literaturne podatke o koncentraciji učinkovine v organizmu (20).

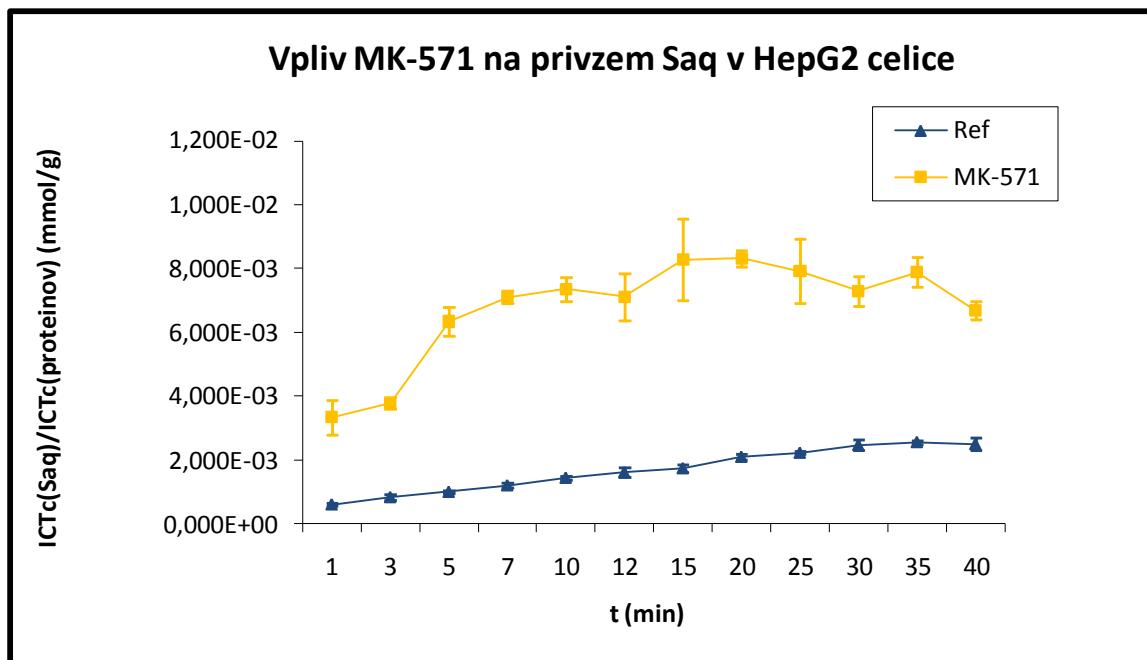


**Slika 12:** Privzem Saq v Celice HepG2 pri različnih donorskih koncentracijah (2.5, 5, 7.5, 10, 15 in 20  $\mu\text{M}$ ). Rezultati so predstavljeni kot povprečje štirih meritev s SD v časovnih intervalih: 1, 5, 7, 10, 12, 15, 20, 25, 30, 35 in 40 min

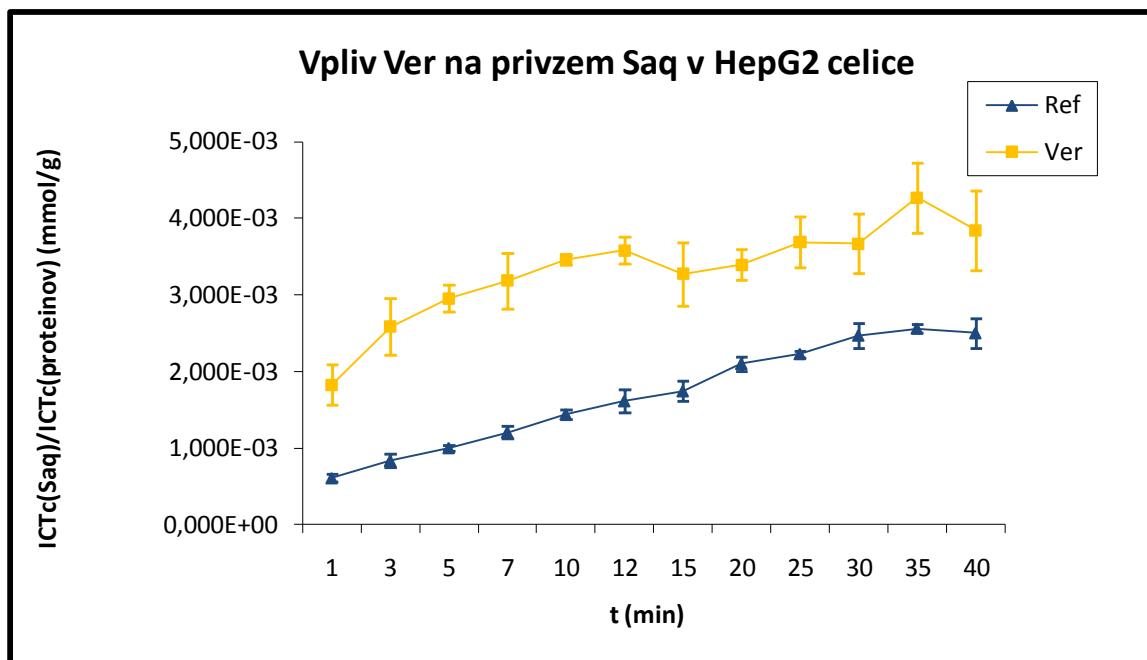
Privzem Saq v celice HepG2 smo ovrednotili pri različnih donorskih koncentracijah (2.5, 5, 7.5, 10, 15 in 20  $\mu\text{M}$ ) in izmerjene znotrajcelične koncentracije Saq normalizirali na vsebnost znotrajceličnih proteinov (slika 12). Višje koncentracije Saq v donorski raztopini so vodile do višjih znotrajceličnih koncentracij Saq. Pri najnižji donorski koncentraciji Saq (2,5  $\mu\text{M}$ ) je bila hitrost porasta znotrajcelične koncentracije Saq na minuto najnižja, pri najvišji donorski koncentraciji Saq (20  $\mu\text{M}$ ) pa najvišja. Hitrost privzema učinkovine v celice HepG2 je premo sorazmerna s pasivno difuzijo učinkovine skozi lipidno membrano v celico in obratno sorazmerna z njeno sekrecijo iz celic s pomočjo sekretornih prenašalcev. Pri 2,5  $\mu\text{M}$  bomo torej teoretično lahko opazili največji prispevek sekretornih prenašalcev (Pgp in MRP-2) na privzem Saq. Zaradi tega bi bila ta koncentracija Saq teoretično najprimernejša za ovrednotenje vpliva RE na aktivnost Pgp in MRP-2 prenašalcev v celicah HepG2. Koncentracija 2,5  $\mu\text{M}$  Saq pa ne odraža terapevtskih vrednosti v organizmu, zato bi bila izvedba poskusov pri tej koncentraciji nesmiselna. Natančnih literaturnih podatkov o koncentraciji Saq v hepatocitih ni na voljo, zato smo si pomagali s podatki o približnih terapevtskih koncentracijah Dar v organizmu. Koncentracija Dar po absorpciji je v plazmi višja od 10  $\mu\text{M}$  (20). Terapevtska doza Dar znaša vsaj 600 mg učinkovine 2-krat dnevno, medtem ko dnevna doza Saq znaša 1000 mg 2-krat dnevno (4, 64). Na podlagi teh podatkov smo se odločili, da bomo za obe učinkovini uporabili donorsko koncentracijo 20  $\mu\text{M}$ .

## 2. Privzem Saq in Dar ob prisotnosti znanih inhibitorjev prenašalcev, Pgp in MRP-2

Literatura navaja, da je Saq substrat za oba prenašalca (MRP-2 in Pgp), kar smo potrdili s privzemom Saq ob sočasni aplikaciji Ver (inhibira Pgp) in MK-571 (inhibira MRP-2). Na sliki 13 je razvidno, da znotrajcelična koncentracija Saq značilno poraste (opazimo lahko 3-kratno zvišanje znotrajceličnih koncentracij Saq), kadar inhibiramo sekretorni transporter MRP-2 z MK-571. Podoben učinek smo opazili tudi z uporabo inhibitorja Ver (Pgp inhibitor), saj so se znotrajcelične koncentracije Saq v celicah HepG2 značilno zvišale (slika 14).

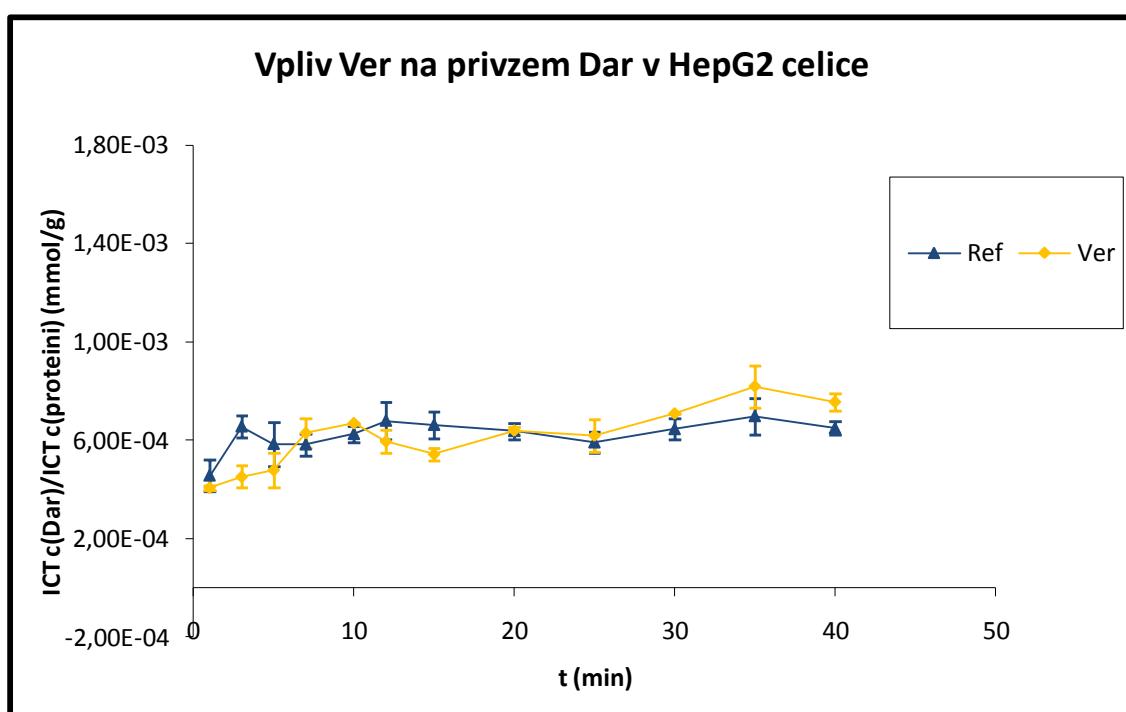


**Slika 13:** Vpliv 100  $\mu\text{M}$  MK-571 na privzem 20  $\mu\text{M}$  Saq v celice HepG2. Privzem 20  $\mu\text{M}$  Saq, samega (Ref) in ob prisotnosti MK-571, v celice HepG2. Rezultati so podani kot povprečje 4 meritev  $\pm$  SD.

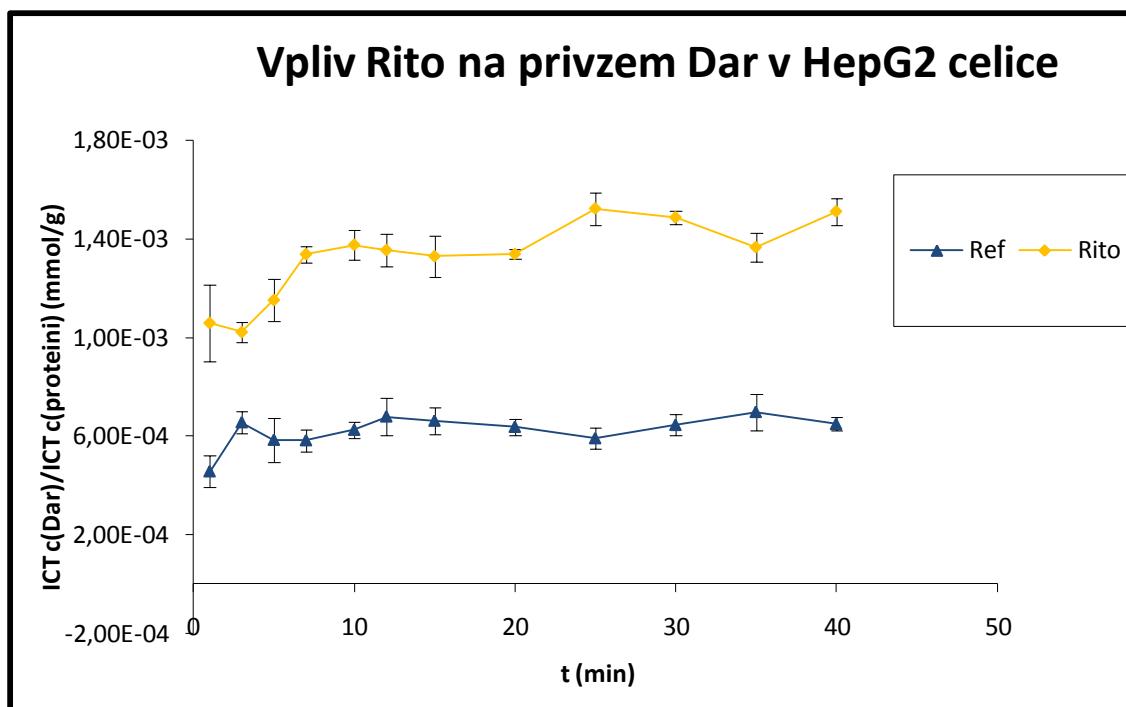


**Slika 14:** Vpliv 100  $\mu\text{M}$  Ver na privzem 20  $\mu\text{M}$  Saq v celice HepG2. Privzem 20  $\mu\text{M}$  Saq, samega (Ref) in ob prisotnosti verapamila (Ver), v celice HepG2. Rezultati so podani kot povprečje 4 meritev  $\pm$  SD.

Dar pa je glede na literaturo sicer znan Pgp in MRP-2 substrat, vendar je vpliv obeh prenašalcev na farmakokinetiko Dar po dosedanjih podatkih majhen (24, 25). Na sliki 15 so predstavljeni rezultati privzema Dar v celice HepG2 ob prisotnosti Ver. Znotrajcelična koncentracija učinkovine se, ob inhibiciji Pgp transporterja, signifikantno ne spreminja. Količina Dar se rahlo poveča šele po 30. minuti poskusa (slika 15). Ker Ver ni izzval pričakovanega učinka na znotrajcelične koncentracije Dar v celicah HepG2, smo izvedli poskus še z bolj specifičnim in močnejšim inhibitorjem prenašalcev, t.j. z ritonavirjem, ki pa je znan inhibitor tako Pgp kot tudi MRP-2 transporterja (18). Znotrajcelična koncentracija Dar ob prisotnosti ritonavirja se je povečala kar 2-krat (slika 16).



**Slika 15:** Vpliv 100  $\mu\text{M}$  verapamila na privzem 20  $\mu\text{M}$  Dar v celice HepG2. Privzem 20  $\mu\text{M}$  Dar samega (Ref) in ob prisotnosti verapamila (Ver) v celice HepG2. Rezultati so podani kot povprečje 4 meritev  $\pm$  SD.



**Slika 16:** Vpliv 50  $\mu\text{M}$  ritonavirja na privzem 20  $\mu\text{M}$  Dar v celice HepG2. Rezultati prikazujejo privzem 20  $\mu\text{M}$  Dar v celice HepG2 (Ref) ter ob prisotnosti ritonavirja (Rito). Rezultati so podani kot povprečje 4 meritev  $\pm$  SD.

### 5.3 PRIVZEM SAQ IN DAR V CELICE HEPG2 OB PRISOTNOSTI RASTLINSKIH EKSTRAKTOV

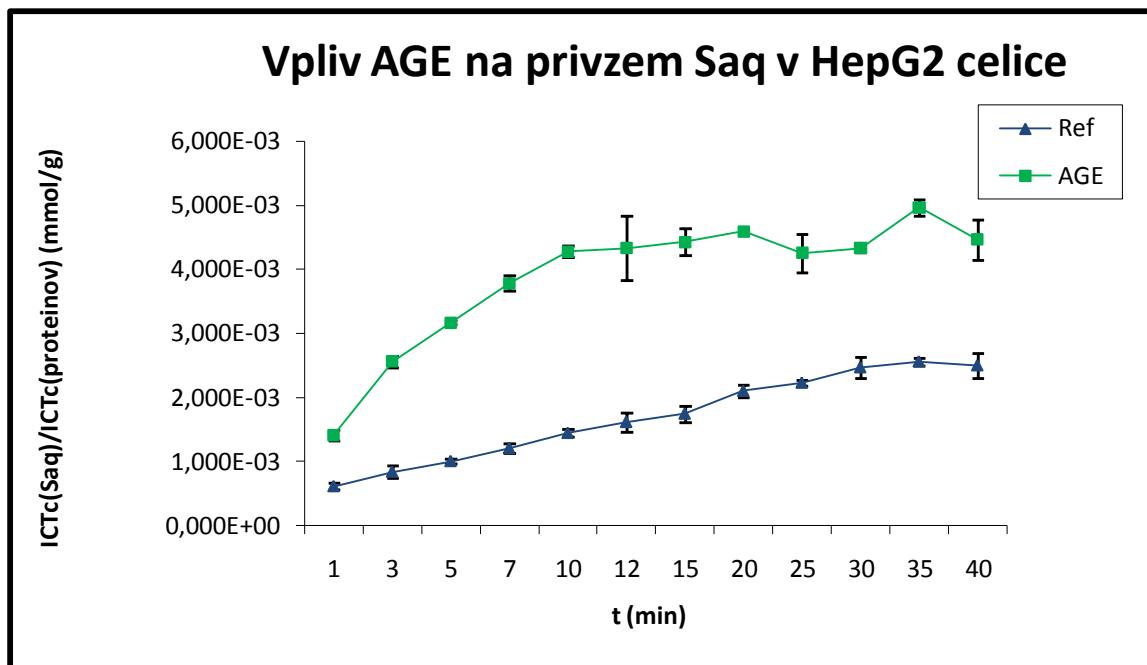
V tem poglavju je predstavljen vpliv rastlinskih ekstraktov na spremembo znotrajcelične koncentracije Saq in Dar v celicah HepG2.

Sprva smo izvedli poskuse s sočasno apliciranim 1 v/v% česnovim ekstraktom in uporabili drugačno časovno shemo z več odvzemi vzorcev (tabela II). Poskuse sočasne aplikacije 1 v/v% ekstraktov ginsenga, šentjanževke ali ginka smo izvedli po manj zgoščeni časovni shemi (tabela III), saj smo med poskusi z AGE ugotovili, da bi pridobili enako zanesljive in točne rezultate tudi z manj pogostim vzorčenjem. Na ta način smo postopek izvedli nekoliko hitreje, saj je pridobivanje večjega števila vzorcev za analizo zelo dolgotrajno.

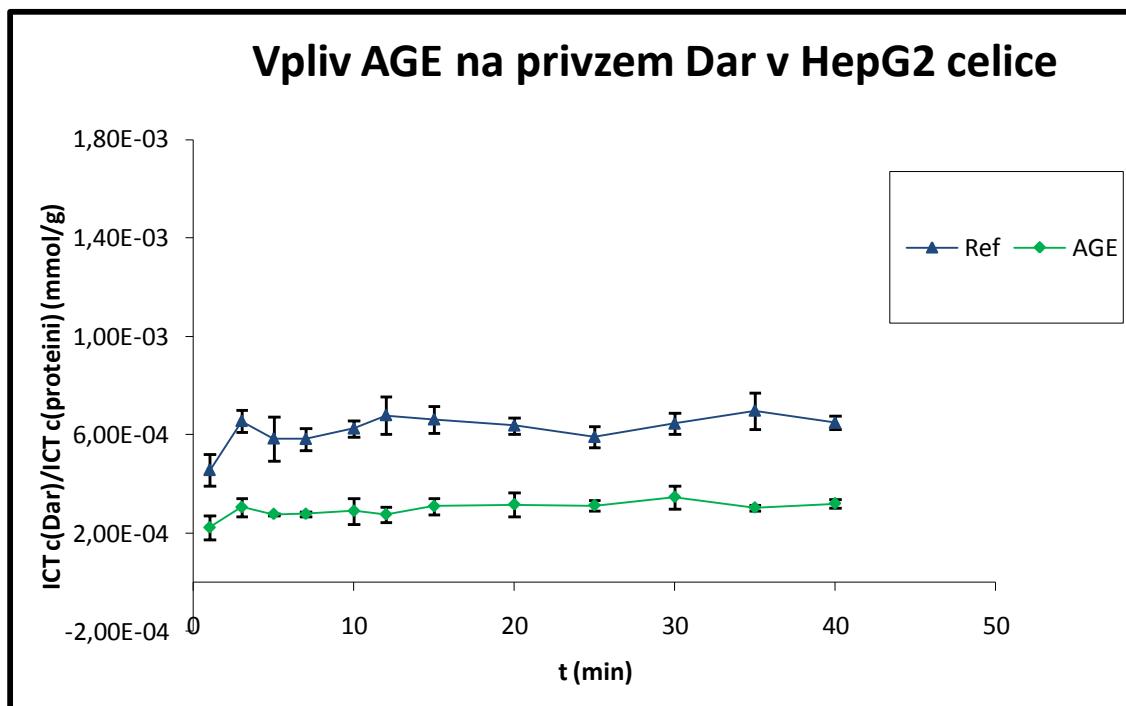
Na grafu spodaj (slika 17) je prikazan privzem Saq v celice HepG2 posamično (referenčni poizkus) ter ob prisotnosti AGE. Znotrajcelična koncentracija učinkovine se je značilno zvišala ob sočasni aplikaciji česnovega ekstrakta. Koncentracija je močno porasla po 5. minutu in ostala povišana za približno faktor 3 celoten čas poskusa. Slika 19 predstavlja graf, na katerem so prikazane spremembe koncentracije Saq v celicah HepG2 ob prisotnosti ekstrakta

šentjanževke, ginka in ginsenga. Vsak izmed naštetih je, za razliko od ekstrakta česna, povzročil padec znotrajcelične koncentracije preučevane učinkovine. Najbolj signifikanten odklon od referenčne vrednosti je povzročil dodatek ekstrakta šentjanževke. Podobno je zmanjšanje koncentracije povzročila tudi sočasna aplikacija ginka, medtem ko je imel ginseng najmanjši efekt na spremembe znotrajcelične koncentracije Saq.

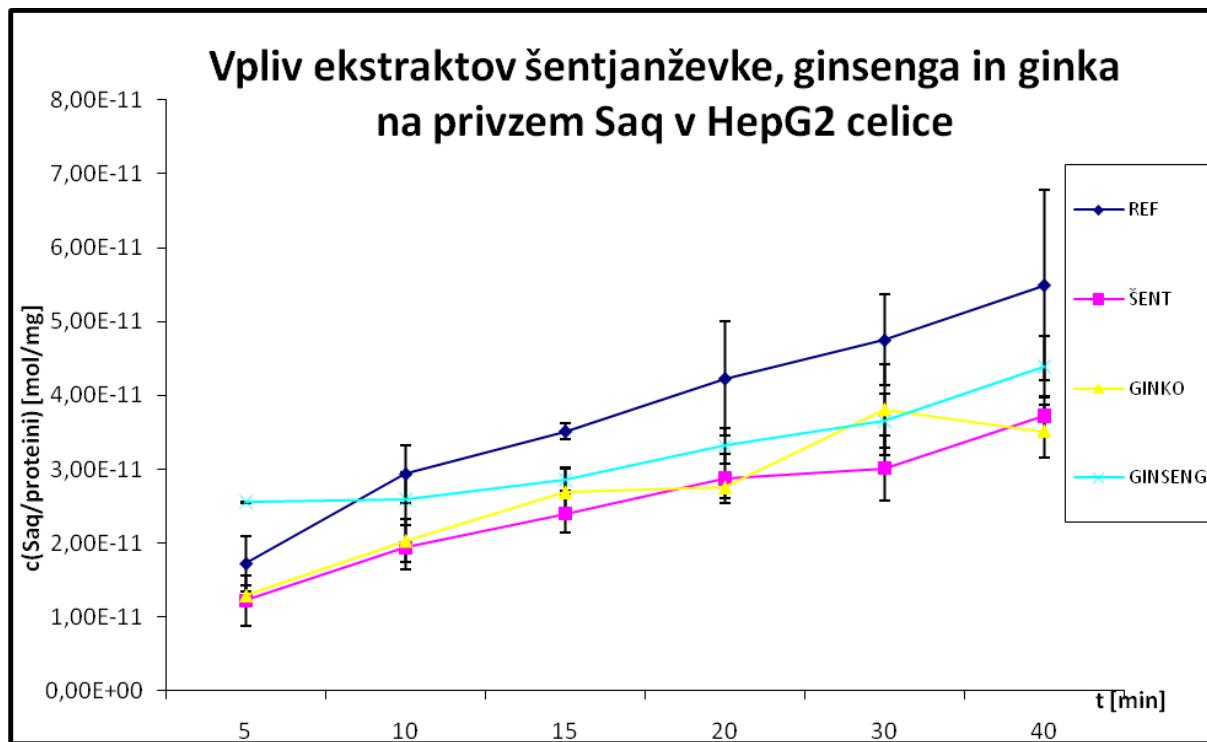
Sočasna aplikacija vsakega izmed preučevanih RE z Dar je prikazana na slikah 18 in 20. Vsi RE imajo enak učinek na Dar, njegovo znotrajcelično koncentracijo namreč znižajo v primerjavi z referenco. Ekstrakta šentjanževke in ginsenga med vsemi RE najbolj signifikantno zmanjšata znotrajcelično koncentracijo Dar in sicer za več kot polovico v primerjavi z referenčno vrednostjo (slika 20). Česnov ekstrakt zmanjša koncentracijo učinkovine v celicah HepG2 že na začetku približno za polovico in se do konca poskusa ne spreminja (slika 18). Skorajda nesignifikanten vpliv na spremembo koncentracije Dar pa ima ekstrakt ginka (slika 20).



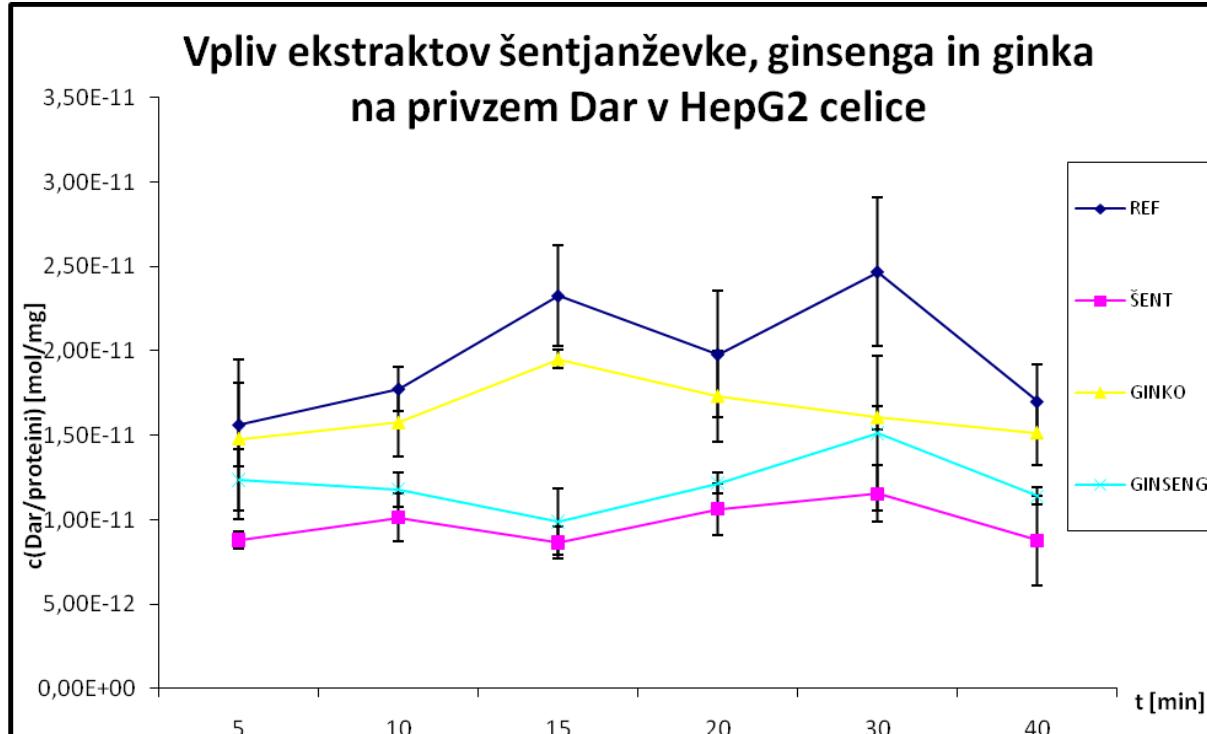
**Slika 17:** Vpliv 1 v/v % AGE na privzem 20  $\mu\text{M}$  Saq v celice HepG2. Graf prikazuje privzem 20  $\mu\text{M}$  Saq v celice HepG2 brez dodatkov (Ref) ter ob prisotnosti AGE (AGE). Rezultati so podani kot povprečje 4 meritev  $\pm$  SD.



**Slika 18:** Vpliv 1 v/v % AGE na privzem 20  $\mu\text{M}$  Dar v celice HepG2. Graf prikazuje privzem 20  $\mu\text{M}$  Dar v celice HepG2 brez dodatkov (Ref) ter ob prisotnosti AGE (AGE). Rezultati so podani kot povprečje 4 meritev  $\pm$  SD.



**Slika 19:** Vpliv 1 v/v % RE na privzem 20  $\mu\text{M}$  Saq v celice HepG2. Graf prikazuje privzem 20  $\mu\text{M}$  Saq v celice HepG2 samega (Ref) ter ob prisotnosti 1 v/v % šentjanževke (ŠENT), ginka in ginsenga. Rezultati so podani kot povprečje 4 meritev  $\pm$  SD.



**Slika 20:** Vpliv 1 v/v % RE na privzem 20  $\mu\text{M}$  Dar v celice HepG2. Graf prikazuje privzem 20  $\mu\text{M}$  Dar v celice HepG2 samega (Ref) ter ob prisotnosti 1 v/v % šentjanževke (ŠENT), ginka in ginsenga. Rezultati so podani kot povprečje 4 meritev  $\pm$  SD.

## **5.4 PERMEABILNOST UČINKOVIN IN MODELNIH SPOJIN SKOZI MONOSLOJ CELIC HEPG2**

Pri spremeljanju privzema antiretrovirusnih učinkovin v celice HepG2 smo ugotovili, da je eksperimentalni protokol dolg, saj smo morali izvesti številne časovno zahteve postopke (kvantitativna odstranitev celic s podlage, liziranje, merjenje znotrajceličnih koncentracij proteinov,obarjanje proteinov, večkratno centrifugiranje) pred dejansko HPLC ali LC-MS analizo znotrajceličnih koncentracij učinkovin. Zato smo se odločili celice HepG2 gojiti na s kolagenom prevlečenih filtrih Transwell, s čimer smo oblikovali monosloj celic HepG2 na porozni membrani, kar je omogočalo spremeljanje permeabilnosti učinkovin. Tako pridobljeni vzorci pa so bili dovolj čisti, da smo jih brez predhodnega čiščenja lahko aplicirali neposredno na HPLC oz. LC-MS. Monosloj celic HepG2 smo tudi ustrezno ovrednotili; določili smo, ali so v tako gojenih celicah Pgp in MRP-2 prenašalci izraženi v apikalni (kanalikularni) membrani in, ali je njihova aktivnost ustrezna za nadaljnje preučevanje interakcij med antiretrovirusnimi učinkovinami in RE. Celice HepG2 smo gojili na filtrih, prevlečenih s kolagenom, saj ima le-ta adhezivne lastnosti in tako pripomore k pravilni orientaciji celic na filtru, ki se zato lahko polarizirajo. Rezultati določevanja permabilnosti učinkovin in modelnih spojin so prikazani v tabeli XI. Prehod skozi celice smo v referenčnem poskusu preučevali v obe smeri: z apikalne proti bazolateralni (AP-BL) in z bazolateralne proti apikalni (BL-AP). Vpliv dodatka AGE ali Rito pa smo merili le skozi kanalikularno membrano (BL-AP smer), saj smo potrdili, da se le tu nahajata Pgp in MRP-2 prenašalca.

			$P_{app} (*10^{-6} \text{ cm/s})$				
			Ref		AGE/Rito		
Substanca	Substrat za	C ( $\mu\text{M}$ )	AP-BL	BL-AP		AP-BL	BL-AP
FITC-D4000	-	5	29.4±2.2	32.5±3.4	AGE		30.5±1.2
FLU	MRP-2	1	33.6±1.7	40.0±0.8*	AGE		37.8±2.3
Rho123	Pgp	2	34.5±0.9	42.6±1.9*	AGE		88.2±5.2**
Saq	Pgp, MRP-2	20	15.5±1.0	40.1±2.1*	AGE		8.3±0.6**
Dar	MRP-2	20	45.6±0.7	75.6±5.8*	AGE	Nesignifikantno za preučevanje mehanizma interakcij.	110±14.9**
					Rito		62.8±6.4**

Tabela XI: Vrednosti permeabilnostnih koeficientov ( $P_{app}$ ) modelnih spojin (Rho123, FLU, FITC-D4000) ter antiretrovirusnih učinkovin (Saq, Dar), določene skozi monosloj celic HepG2 v AP-BL in BL-AP smereh.

V tabeli so podane preiskovane substance, sekretorni prenašalci, vpleteni v njihov transport, donorske koncentracije substanc in vrednosti permeabilnostnih koeficientov ( $P_{app}$ ), določene v AP-BL (žolčni prenos s kanalikularne na sinusoidalno stran) in BL-AP (prenos s sinusoidalne na kanalikularno stran) smereh (Ref).  $P_{app}$  smo določili tudi ob prisotnosti 1 v/v % AGE za Saq ter AGE in 50  $\mu\text{M}$  ritonavirja (Rito) za Dar. Rezultati so podani kot povprečje treh meritev  $\pm$  SD.

\* -  $P_{app}$  vrednosti v BL-AP smeri so statistično signifikantno višje kot tiste, določene v AP-BL smeri.

\*\* -  $P_{app}$  vrednosti ob prisotnosti AGE oz. Rito v BL-AP smeri so statistično signifikantno višje/nižje kot referenčne BL-AP vrednosti (Ref).

S pomočjo modelnih substanc (FITC-D4000, Rho123 in FLU) smo ovrednotili lastnosti monosloja celic HepG2. Ugotovili smo, da so vrednosti  $P_{app}$  paracelularnega markerja FITC-D4000, ki prehaja izključno skozi tesne stike, visoke glede na vrednosti  $P_{app}$  za preostale učinkovine ter modelne spojine. Prav tako smo monosloju pred izvedbo poskusa izmerili TEER vrednosti, ki odražajo tesnost monosloja. Ugotovili smo, da so povprečne TEER vrednosti monosloja celic HepG2 pred poskusom znašale  $6.6 \pm 1.2 \Omega\text{cm}^2$  in se niso spremenile signifikantno med poskusom (povprečne TEER vrednosti na koncu poskusa  $5.9 \pm 0.9 \Omega\text{cm}^2$ ). Iz podatkov o povprečnih TEER vrednostih in  $P_{app}$  vrednostih FITC-D4000 smo sklepal, da je oblikovan monosloj celic HepG2 izrazito netesen (ang. »leaky«), vendar pa se

celice kljub temu med rastjo ustrezeno polarizirajo, saj so bile BL-AP  $P_{app}$  vrednosti Rho123 in FLU, substratov za Pgp in MRP-2 prenašalce, statistično signifikantno višje od pripadajočih AP-BL  $P_{app}$  vrednosti (tabela XI). To pomeni, da so se Pgp in MRP-2 prenašalci izrazili v apikalni (oz. kanalikularni) membrani in omogočili višji transport modelnih spojin iz BL v AP (tj. iz sinusoidalnega v kanalikularni) prostor kot obratno. Obenem smo opazili, da dodatek 1 v/v % AGE k celicam povzroči signifikantno povišanje permeabilnosti Rho123 in znižanje permeabilnosti FLU. Vpliv AGE na aktivnost Pgp in MRP-2 prenašalcev je bil tako identičen vplivu na oba prenašalca v celicah HepG2, ki smo jih gojili na enostavnih podlagi in spremljali privzem Rho123 in FLU vanje.

Tudi koeficient permeabilnosti Saq in Dar je bil signifikantno višji v BL-AP kot AP-BL smereh, kar potrjuje, da sta se obe učinkovini zaradi aktivnosti Pgp in MRP-2 prenašalcev iz BL v AP prostor prenašali hitreje kot v obratni smeri. Transport Dar smo signifikantno znižali s Pgp in MRP-2 inhibitorjem ritonavirjem ter s tem nedvoumno potrdili, da so značilno višje  $P_{app}$  vrednosti antiretrovirusnih učinkovin v BL-AP smeri posledica aktivne sekrecije učinkovin s Pgp in MRP-2.

Ob prisotnosti 1 v/v % AGE smo opazili, da se je transport Saq v BL-AP smeri statistično signifikantno znižal, transport Dar v isti smeri pa signifikantno povišal. Znižanje  $P_{app}$  vrednosti Saq ob prisotnosti AGE pomeni znižano aktivnost sekretornih prenašalcev, kar ustreza višim znotrajceličnim koncentracijam Saq, ki smo jih opazili ob prisotnosti AGE v lizatih celic HepG2 (poglavlje 5.3). Zvišanje  $P_{app}$  vrednosti za Dar ob prisotnosti 1 v/v % AGE pa pomeni, da so se aktivnosti sekretornih prenašalcev povečale, to pa se ujema z nižjimi koncentracijami Dar v lizatih celic HepG2.

## 6. RAZPRAVA

Inhibitorji HIV proteaz predstavljajo pomembno terapevtsko skupino antiretrovirusnih učinkovin, ki so podvrženi obsežnemu predsistemskemu metabolizmu v jetrih in črevesju. Ker dolgotrajna terapija z inhibitorji HIV proteaz pri okuženih vodi v nastanek t.i. metabolnega sindroma, za katerega so značilne aterosklerotične spremembe, hiperlipidemija in drugi stranski učinki, kot je demenza, so rastlinski pripravki pogost spremjevalec antiretrovirusne terapije. Kljub splošnemu prepričanju, da so prehranska dopolnila varna, pa mnoga, ki vsebujejo rastlinske ekstrakte (RE), lahko povzročijo pomembne farmakokinetične interakcije z učinkovino. V kliničnih študijah in različnih *in vivo* ter *in vitro* raziskavah so bile dokazane spremenjene farmakokinetične lastnosti učinkovin ob prisotnosti RE. Študija na zdravih prostovoljcih je pokazala 50 % zmanjšanje  $c_{\max}$  sakvinavirja (Saq) ob sočasni aplikaciji s česnom, vendar so avtorji opažene interakcije pripisali le vplivom ekstrakta na transport/metabolizem v enterocitih in ne v hepatocitih. Podobno kot za česnove pripravke so bile izvedene študije vpliva tudi za šentjanževko, ginseng in ginko na farmakokinetiko Saq. Potrjeno je, da omenjeni ekstrakti pomembo vplivajo na CYP encime, medtem ko vpliva vseh preučevanih RE na transport Saq, bodisi v črevesne bodisi v jetrne celice, omenjene študije ne vrednotijo.

Študije, ki bi preverjale vpliv rastlinskih ekstraktov na transport darunavirja (Dar) pa navkljub opozorilom v temeljnem povzetku značilnosti za Dar o možnih farmakokinetskih interakcijah z zeliščnimi pripravki še niso bile izvedene.

Ker mehanizma interakcij na sekretornih prenašalcih med rastlinskimi ekstrakti in inhibitorji HIV proteaz še ne poznamo, smo vpliv RE na distribucijo učinkovin v jetrih ovrednotili v tej nalogi. V primeru značilnih sprememb transporta učinkovin v/iz hepatocitov, to pomeni spremenjeno izpostavljenost učinkovine metabolnim encimom, spremenjen obseg predsistemskega metabolizma učinkovine in posledično spremenjeno terapevtsko učinkovitost.

## 1. PGP IN MRP-2 PRENAŠALCA STA PRISOTNA V HEPG2 CELIČNI LINIJI

Pred spremeljanjem vpliva RE na distribucijo učinkovin v celicah HepG2 smo najprej s pomočjo modelnih substratov in inhibitorjev za Pgp (rodamin 123, verapamil) in MRP-2 (fluorescein, MK-571) preverili, ali sta ekspresija in aktivnost obeh prenašalcev v HepG2 celični liniji ustrezni in zadostni, da bi lahko v nadaljevanju ocenili vpliv RE na transport preučevanih inhibitorjev HIV proteaz. Ugotovili smo, da sta tako ekspresija kot aktivnost Pgp in MRP-2 prenašalcev primerni (slika 8 in 9), saj se je privzem obeh substratov (Rho123 in FLU) ob prisotnosti inhibitorjev Pgp (Ver) in MRP-2 (MK-571) signifikantno povišal. Sekrecija Rho123 in FLU je bila zaradi inaktivacije transporterjev znižana, znotrajcelična koncentracija pa posledično povišana.

## 2. VSI RE IMAJO VPLIV NA DELOVANJE PGP IN MRP-2 PRENAŠALCEV

S pomočjo istih modelnih substratov (Rho123 in FLU) smo zatem preverili tudi vpliv RE na oba prenašalca. Ugotovili smo, da vsi testirani ekstrakti značilno znižajo znotrajcelično koncentracijo Rho123 v celicah HepG2, medtem ko se znotrajcelične koncentracije FLU signifikantno zvišajo. Koncentracija Rho se je ob dodatku šentjanževke, ginsenga in ginka zmanjšala za približno polovico, v primeru česna pa za približno četrino glede na referentno koncentracijo. Največjo spremembo znotrajcelične koncentracije FLU smo opazili ob sočasni aplikaciji FLU z ekstrakti ginsenga oz. šentjanževke. Dodatek AGE ali ekstrakta ginka v primerjavi s preostalima dvema ekstraktoma ni povzročil signifikantnih sprememb koncentracije FLU v celicah HepG2.

Ker imata oba preučevana sekretorna prenašalca v svoji strukturi več vezavnih mest (Pgp ima štiri vezavna/regulatorna mesta, MRP-2 pa dve vezavni mesti), se sočasno na isti prenašalec lahko veže več substratov. Vezava substrata na izbrano mesto v prenašalcu povzroči strukturne – alosterične spremembe. Takšna vezava na prenašalec sproži spremembe v njegovi strukturi, ki so nujne za aktivni transport substrata. Sočasno pa se omenjene strukturne/alosterične spremembe na vezavnem mestu, ki ga je zasedel substrat, odrazijo tudi na strukturi preostalih vezavnih mest istega prenašalca. Vezava substrata na eno izmed vezavnih mest tako povzroči alosterične spremembe v strukturi preostalih vezavnih mest, katerih afiniteta do drugih morebitnih substratov se poveča, kar pomeni, da se poveča transport preostalih substratov z istim prenašalcem. Opisan pojav, znan pod imenom pozitivna kooperativnost vezavnih mest, omogoča, da se transport dveh substratov, ki se vežeta na različni mesti v istem prenašalcu, poveča. V primeru vseh obravnavanih rastlinskih ekstraktov predvidevamo, da se sestavine vežajo na drugo vezavno mesto na Pgp transporterju kot

Rho123, saj opazimo povečanje transporta Rho123 s Pgp prenašalcem in tako znižane znotrajcelične koncentracije Rho123. Največje alosterične spremembe najverjetneje povzročijo ekstrakti šentjanževke, ginka in tudi ginsenga, saj se po vezavi sestavin teh ekstraktov na Pgp prenašalec afiniteta vezavnega mesta za Rho123 bolj poveča kot ob dodatku AGE (faktor spremembe koncentracije je manjši). Vezavno mesto za sestavine vsakega izmed štirih ekstraktov in FLU na MRP-2 pa je najverjetneje isto. Tekmovanje med dvema MRP-2 substratoma tako povzroči, da sestavine RE iz vezavnih mest na MRP-2 izpodrinejo FLU, kar opazimo kot inhibicijo MRP-2 oz. kot kopičenje FLU v celicah HepG2. Glede na prikazane rezultate lahko sklepamo, da ima MRP-2 sekretorni prenašalec največjo afiniteto do ekstrakta ginsenga in šentjanževke, saj sestavine le-teh povzročijo največjo spremembo koncentracije FLU v celicah HepG2. Nekoliko manjšo afiniteto do prenašalca imajo sestavine AGE in najmanjšo sestavine ekstrakta ginka, ki je povzročil najmanjše spremembe znotrajcelične koncentracije FLU (slika 11).

Glede na prikazane rezultate lahko trdimo, da se sestavine preučevanih ekstraktov vežejo na Pgp in MRP-2 prenašalca in tako vplivajo na transport drugih substratov. V primeru preučevanja učinkovin (Saq in Dar) lahko, zaradi sočasne vezave sestavin RE in učinkovine na isti prenašalec, pričakujemo spremembo v transportu učinkovine s sekretornim prenašalcem. Sočasna vezava lahko vodi v zvišanje ali v znižanje znotrajceličnih koncentracij učinkovine. Smer spremembe koncentracije učinkovine (t.j. zvišanje oz. znižanje) je tako odvisna od vezavnih mest, ki jih zasede učinkovina in sestavine RE. V primeru, da sta vezavni mesti za oba substrata (učinkovino in RE) različni, lahko v skladu s teorijo o pozitivni kooperativnosti med vezavnimi mesti, pričakujemo povečan transport obeh substratov s prenašalcem in posledično znižane znotrajcelične koncentracije učinkovine. Kadar pa učinkovina in sestavine RE tekmujejo za isto vezavno mesto, bo med njimi prišlo do kompetitivne inhibicije ter posledično do zmanjšane sekrecije učinkovine. Učinek posameznega rastlinskega ekstrakta na aktivni transport učinkovin v hepatocitih bo torej odvisen od vezavnega mesta učinkovin na sekretornih Pgp in MRP-2 prenašalcih.

### 3. SAQ IN DAR STA PGP IN MRP-2 SUBSTRATA

V nadaljevanju smo skušali potrditi oz. ovreči literaturne podatke, da sta Saq in Dar substrata za oba sekretorna prenašalcev. S pomočjo inhibitorjev (Ver, MK571 in ritonavirjem) smo za obe učinkovini potrdili, da sta Pgp in MRP-2 prenašalca izredno pomembna pri njunem transportu iz hepatocitov. Vpliv inhibitorjev Pgp in/ali MRP-2 prenašalcev na privzem obeh učinkovin v celice HepG2 smo preučevali pri donorski koncentraciji, ki se najbolj približa

terapevtskim vrednostim obeh učinkovin v človeški plazmi. Slika 12, ki prikazuje privzem Saq v celice HepG2 pri različnih donorskih koncentracijah prikazuje, da je vpliv sekretornih prenašalcev na privzem učinkovine v celice največji pri nižjih donorskih koncentracijah, saj je privzem substance v celice HepG2 premosorazmeren s pasivno difuzijo HIV-PI v celico in obratno sorazmeren s prispevkom sekretornih prenašalcev. Ker je torej hitrost naraščanja koncentracije Saq v celicah HepG2 najnižja pri najnižji donorski koncentraciji ( $4,1 \cdot 10^{-5}$  mmol/g\*min), je aktivnost in s tem vpliv prenašalcev Pgp in MRP-2 na privzem v celice pri teh pogojih največji. Z višanjem donorskih koncentracij postaja prispevek pasivne difuzije učinkovine večji, prispevek aktivnega transporta pa nižji vse do mejne koncentracije, ko se prenašalci nasitijo in k prenosu spojine prispeva v nadaljevanju predvsem še pasivna difuzija. Ker smo želeli vrednotiti farmakokinetske interakcije med HIV-PI učinkovinama in RE pri relevantnih *in vivo* koncentracijah učinkovin, smo si tako izbrali najvišje, 20  $\mu\text{M}$  koncentracije Saq ter Dar kot tiste merodajne koncentracije, pri katerih smo v nadaljevanju vrednotili vpliv inhibitorjev (Ver, MK-571, Rito) ter RE na privzem Saq in Dar. Z višjo donorsko koncentracijo obeh inhibitorjev HIV proteaz (20  $\mu\text{M}$ ) smo se tako poskušali približati resničnim *in vivo* koncentracijam učinkovin v organizmu.

Pri opazovanju privzema HIV-PI v celice HepG2 smo tako potrdili, da z Ver, MK-571 in Rito uspešno inhibiramo sekrecijo obeh učinkovin iz celic. Zaznali smo signifikantno višjo koncentracijo Saq tako ob prisotnosti MK-571 (inhibitor MRP-2) kot ob prisotnosti Ver (inhibitor Pgp) (slika 13, 14). Distribucija Saq v hepatocitih je torej močno odvisna od obeh prenašalcev, saj se znotrajcelična koncentracija te učinkovine po inhibiciji vsakega od obeh prenašalcev poveča kar za faktor 3. Koncentracija Dar v hepatocitih je bila ob prisotnosti Ver zanemarljivo povišana, signifikantno povišanje znotrajcelične koncentracije Dar pa smo opazili šele z uporabo bolj specifičnega in močnejšega inhibitorja ritonavirja (inhibitor obeh prenašalcev) (slika 15, 16). Na spremembo znotrajcelične koncentracije Dar vpliva predvsem MRP-2 prenašalec, saj se ob inhibiciji le-tega koncentracija učinkovine v hepatocitu signifikantno poviša (za več kot 100 %) (slika 16).

#### 4. RE VPLIVAVO NA DISTRIBUCIJO SAQ IN DAR V HEPATOCITIH

Ko smo potrdili zadostno izraženost in aktivnost prenašalcev na uporabljenem eksperimentalnem modelu (celice HepG2) ter transport preučevanih učinkovin (Saq in Dar) s Pgp in MRP-2 prenašalcema, smo v naslednjem koraku preverili vpliv RE na njun transport in na ta način preverili potencial za nastanek farmakokinetičnih interakcij med učinkovinama in RE.

V primeru sočasne aplikacije ekstraktov šentjanževke, ginsenga, česna in ginka z Dar smo vsakokrat opazili zmanjšanje koncentracije učinkovine v hepatocitu. Signifikantna sprememba znotrajcelične koncentracije Dar (zmanjšanje za več kot polovico) smo opazili ob dodatku ekstrakta šentjanževke in ginsenga. AGE je tudi signifikantno vplival na koncentracijo Dar (zmanjšanje za približno polovico) medtem ko je imel ginko najmanjši vpliv (slika 18, 20). Tudi pri opazovanju privzema Saq v celice HepG2 ob prisotnosti ekstraktov šentjanževke, ginsenga in ginka je prišlo do padca koncentracije v celicah. Ekstrakt česna, apliciran skupaj s Saq, pa je povzročil povišanje koncentracije učinkovine v hepatocitu. Največjo spremembo znotrajcelične koncentracije Saq je povzročil sočasno aplicirani AGE (povišanje za faktor 3), medtem ko je imel ekstrakt ginsenga najmanjši vpliv na spremembo znotrajcelične koncentracije Saq.

Mehanizem interakcij med RE in učinkovinama je dokaj kompleksen. Saq je namreč substrat obeh sekretornih prenašalcev (Pgp in MRP-2), Dar pa je glede na rezultate le substrat MRP-2 prenašalca. Hkrati imajo sestavine RE vpliv na aktivnost obeh transporterjev. Upoštevati moramo še, da ima lahko isti RE drugačen učinek na enem prenašalcu kot na drugem, saj je vsak RE zmes več spojin (t.i. fitokemikalij). Fitokemikalije določenega RE lahko na enem prenašalcu vodijo v pozitivno kooperativnost, na drugem prenašalcu pa lahko ali te iste fitokemikalije ali druge povzročijo kompetitivno inhibicijo. Natančno napoved mehanizma interakcij onemogoča tudi dejstvo, da ni znano, na katero vezavno mesto na prenašalcu se veže učinkovina in tudi ne na katero fitokemikalije. Zaradi vseh zgoraj navedenih faktorjev, ki vplivajo na interakcije med RE in Saq/Dar, je možnosti za razlago mehanizma le-teh več.

Predvideli smo, da na distribucijo Dar vpliva predvsem MRP-2 prenalec, saj smo šele z dodatkom Rito spremenili znotrajcelično koncentracijo učinkovine. Fitokemikalije ekstrakta ginsenga, ki najbolj spremenijo znotrajcelično koncentracijo Dar, se vežejo na drugo vezavno mesto na MRP-2 prenašalcu (ima 2 vezavni mest) kot Dar. Posledica je strukturna sprememba vezavnih mest in s tem povečana aktivnost MRP-2 prenaleca. Sekrecija učinkovine se močno poveča, koncentracija v celici pa posledično zmanjša. Po istem

mehanizmu delujejo tudi fitokemikalije ekstrakta šentjanževke, aplicirane skupaj z Dar. Sestavine ekstrakta česna in ginka se prav tako vežejo na drugo vezavno mesto na MRP-2 prenašalcu kot Dar, vendar pa povzročijo veliko manjše strukturne spremembe drugega vezavnega mesta kot fitokemikalije šentjanževke ali ginsenga. Aktivnost MRP-2 prenašalca je namreč povečana v manjši meri, kar vodi do manjšega padca znotrajcelične koncentracije Dar ob prisotnosti AGE ali ekstrakta ginka (slika 18, 20).

Pri Saq je napoved mehanizma interakcij kompleksnejša, saj pri distribuciji učinkovine sodelujeta tako Pgp kot MRP-2 prenašaleca (z dodatkom Ver in MK-571 smo spremenili znotrajcelično koncentracijo Saq). Poleg tega pa ima Pgp prenašalec 4 vezavna mesta, kar vodi v veliko več različnih kombinacij vezave fitokemikalij in učinkovine kot v primeru Dar ter s tem v težjo opredelitev samega mehanizma interakcij.

Sestavine AGE se vežejo na Pgp in MRP-2 prenašalcu na isto vezavno mesto kot Saq, s čimer povzročijo kompetitivno inhibicijo obeh prenašalcev. Sekrecija učinkovine se signifikantno zmanjša, kar se odraža na močno povišani znotrajcelični koncentraciji Saq.

Fitokemikalije ginka in šentjanževke imajo primerljiv efekt na zmanjšanje znotrajcelične koncentracije Saq v hepatocitu, kar pa ne pomeni, da je tudi mehanizem interakcij primerljiv. Predpostavimo, da se sestavine ekstrakta ginka vežejo le na Pgp prenašalec (ekstrakt ginka ni imel vpliva na spremembo znotrajceličnih koncentracij MRP-2 substratov FLU in Dar (slika 11, 20)), in sicer na drugo vezavno mesto kot Saq. V skladu s teorijo pozitivne kooperativnosti vezavnih mest pride do povečane sekrecije učinkovine oz. do manjše koncentracije le-te v celici (slika 19).

Fitokemikalije ekstrakta šentjanževke pa se vežejo na oba sekretorna prenašalca (sprememba znotrajcelične koncentracije tako substrata Pgp kot tudi MRP-2 (slika 10, 11)). Sestavine ekstrakta šentjanževke se na prenašalcih najverjetneje vežejo na drugo vezavno mesto kot Saq. Alosterične spremembe vezavnih mest vodijo v večjo aktivnost obeh prenašalcev in s tem povečano sekrecijo Saq iz celice. Največji padec koncentracije Saq je opazen ravno ob sočasni aplikaciji ekstrakta šentjanževke, kar je posledica sočasne aktivacije obeh prenašalcev.

Tudi sestavine ekstrakta ginsenga se vežejo na oba sekretorna prenašalca (sprememba znotrajcelične koncentracije Rho123 in Flu, substratov Pgp in MRP-2 (slika 10, 11)). Padec koncentracije Saq ob sočasni aplikaciji ginsenga je najmanjši. Ena izmed možnih razlag mehanizma interakcije je hipoteza o kombiniran mehanizem delovanja na sekretorne prenašalce. Predpostavimo, da se fitokemikalije ginsenga vežejo na enem izmed sekretornih

prenašalcev na isto vezavno mesto kot Saq, na drugem prenašalcu pa na drugo vezavno mesto kot učinkovina. Prenašalec, na katerem je prišlo do vezave na različna vezavna mesta, se aktivira in pospeši sekrecijo Saq. Drugi prenašalec pa je zaradi morebitne vezave fitokemikalij in Saq na isto vezavno mesto (kompetitivna inhibicija prenašalca) zmanjšal sekrecijo Saq. Padec koncentracije Saq ob prisotnosti ekstrakta ginsenga ob upoštevanju predlagane hipoteze pomeni, da prevlada učinek prenašalca, na katerem je prišlo do vezave fitokemikalij in Saq na različna vezavna mesta.

## 5. REZULTATI ENOSTAVNEJŠEGA MODELA CELIC HEPG2 SO USTREZNI

Ker smo pri preučevanju interakcij med RE in antiretrovirusnima učinkovinama opazili, da je eksperimentalno delo dolgotrajno zlasti zaradi protokola priprave vzorcev (liziranje celic v tekočem dušiku ter nato s pomočjo ultrazvočne sonde, določevanje koncentracij znotrajceličnih proteinov za normalizacijo koncentracije vzorcev glede na število celic, obarjanje proteinov in pipetiranje v HPLC viale), smo za namene hitrejšega in zanesljivega potrjevanja sprememb aktivnosti sekretornih prenašalcev ob prisotnosti drugih substanc (t.j. substanc, ki lahko inhibirajo/aktivirajo delovanje prenašalcev), celice HepG2 gojili na s kolagenom prevlečenimi filtrih Transwell. Kolagen je sestavina zunajceličnega matriksa in interreagira s komponentami plazemske membrane celic ter tako pripomore k oblikovanju polariziranega sloja celic (63). Hepatociti so namreč polarizirane celice, kar pomeni, da sta sestavi kanalikularne in sinusoidalne membrane različni. Sekretorna Pgp in MRP-2 prenašalca se izražata le v kanalikularni membrani in tako omogočata enosmerni prenos učinkovin oz. njihovih metabolitov iz plazme v žolč. Ker pri rasti celic na enostavni plastični podlagi o polariziranosti celic ne moremo govoriti, smo predpostavili, da bi pri gojenju celic HepG2 lahko pripravili monosloj celic, ki bi imel sekretorne prenašalce izražene izključno v apikalni/kanalikularni membrani. Z ustreznimi protokoli sejanja in dnevne menjave medija smo s pomočjo mikroskopa potrdili, da se monosloj celic HepG2 oblikuje v 3 dneh, nato pa smo s tako oblikovanim monoslojem celic HepG2 v Ringerjevem mediju izvedli poskuse, kjer smo najprej spremljali permeabilnost modelnih substanc za MRP-2 (FLU) in Pgp (Rho123) ter obeh učinkovin (Saq, Dar). Preverili pa smo tudi integriteto tesnih stikov oz. tesnost modela tako, da smo merili koeficient permeabilnosti paracelularnega markerja FITC-D4000 in monosluju izmerili transepiteljsko električno upornost (TEER).

Z meritvami TEER in koeficiente permeabilnosti FITC-D4000 smo ugotovili, da celice HepG2 oblikujejo netesen monosloj, zaradi česar bi bilo morda težko zaznati prispevek aktivnega prenosa substanc s Pgp in MRP-2 prenašalcema v smeri iz sinusoidalne proti

kanalikularni strani (BL-AP smer). Pasivna difuzija v takšnih netesnih celicah/celičnem monosloju bi namreč lahko presegla prispevek aktivnega transporta, ki ga morda tudi z ustreznim analitskim pristopom ne bi zaznali. Pri določevanju permeabilnosti ( $P_{app}$ ) obravnavanih spojin smo ugotovili, da so  $P_{app}$  vrednosti le-teh, enakega velikostnega razreda kot  $P_{app}$  vrednosti FITC-D4000.  $P_{app}$  vrednosti paracelularnih markerjev so običajno nekaj velikostnih razredov nižje od  $P_{app}$  vrednosti učinkovin, ki prehajajo membrano transcelularno (pasivno ali aktivno). Vendar pa smo s pomočjo primerjav  $P_{app}$  vrednosti, ki smo jih določili v AP-BL in BL-AP smeri za Rho123 in FLU potrdili, da kljub visoki paracelularni permeabilnosti tesnih stikov monosloja celic HepG2 lahko opazimo signifikantne razlike v  $P_{app}$  vrednostih, določenih v obeh smereh. Torej lahko zaznamo prispevek aktivnega transporta v tako gojenih celicah HepG2. Znatno višji transport v BL-AP smeri, torej pomemben prispevek Pgp in MRP-2 prenašalcev smo opazili za obe antiretrovirusni učinkovini. V nadaljevanju smo zato preverili vpliv 1 v/v % AGE na delovanje prenašalcev in odprtost tesnih stikov. Ugotovili smo, da se paracelularna permeabilnost celic HepG2 ne spremeni ( $P_{app}$  vrednosti za FITC-D4000 se niso spremenile), medtem ko sta se sekreciji Saq in FLU signifikantno znižali, Dar in Rho123 pa signifikantno zvišali. Ob prisotnosti AGE smo tako opazili enake spremembe kot pri poskusih, ko smo spremljali privzeto obeh učinkovin in modelnih substanc v celice HepG2, le da je bilo spremjanje permeabilnosti cenovno in časovno manj zahtevno.

## 6. RE VPLIVAVO NA PLAZEMSKO KONCENTRACIJO SAQ IN DAR

Za napoved vpliva farmakokinetičnih interakcij na spremembo plazemske koncentracije ( $c_p$ ) Saq in Dar ob prisotnosti RE, so potrebne informacije o vplivu sekretornih prenašalcev in CYP encimov tako v hepatocitih kot tudi v eneterocitih. Enterociti so namreč prvo mesto, kjer lahko pride do farmakokinetičnih interakcij. Poleg tega pa so tu encimi CYP in prenašalci v stiku z najvišjimi koncentracijami učinkovine in RE. Za ovrednotenje  $c_p$  učinkovin ob prisotnosti RE si moramo zato pomagati z dosedaj znanimi literurnimi podatki. Žal pa je zelo malo znanega o vplivu RE na metabolizem Saq/Dar v enterocitih. Razne študije večinoma vrednotijo vpliv RE na CYP metabolne encime v enterocitih in hepatocitih, le redko vpliv na sekretorene prenašalce (65). Tako vemo, da ekstrakta česna in ginka inhibirata določene CYP encime (predvsem CYP3A4), katerih substrata sta Saq in Dar (29, 42). Ekstrakta šentjanževke in ginsenga pa povečata ekspresijo CYP3A4 encimov, s čimer lahko povišata obseg metabolizma Saq in Dar, saj sta oba CYP3A4 substrata (35, 19). Podatki vpliva RE na Pgp ali MRP-2 prenašalca v enterocitih so znani le za Saq ob prisotnosti

česnovega ekstrakta. Sekrecija učinkovine v lumen črevesja se zaradi vpliva ekstrakta česna poveča in njena koncentracija v enterocitu posledično zmanjša (20).

Ekstrakt česna, apliciran sočasno s Saq, zmanjša njegovo plazemsko koncentracijo ( $c_p$ ) (19), kar pomeni da vpliv sekretornih prenašalcev v enterocitih (povečana sekrecija v lumen črevesja) prevlada nad vplivom teh prenašalcev v hepatocitih (zmanjšana sekrecija iz celice). Za vse ostale kombinacije RE in preučevanih zdravilnih učinkovin lahko govorimo le o prispevku posameznih interakcij na spremembo  $c_p$  Saq/Dar, saj nam manjkajo ključne informacije o interakcijah na prenašalcih v enterocitih. Do sedaj znani vplivi ekstrakta ginsenga in šentjanževke prispevajo k zmanjšanju  $c_p$  tako Saq kot Dar, zaradi povečane razgradnje učinkovin s CYP encimi (enterociti in hepatociti) in povečane sekrecije učinkovin v žolčno izvodilo (kanalikule). Ekstrakt ginka bi lahko na podlagi interakcij v hepatocitih prispeval k povečani  $c_p$  Saq in Dar, v primeru da inhibitorni vpliv ginka na CYP sistem preseže vpliv na povečanje sekrecije iz hepatocita. Končne spremembe  $c_p$  Saq in Dar ob sočasnem jemanju z ekstraktom ginka pa seveda ne moremo napovedati brez podatkov o delovanju sekretornih prenašalcev v enterocitih.

## 7. SKLEP

V nalogi smo ovrednotili vpliv rastlinskih ekstraktov (RE) šentjanževke, ginsenga, česna in ginka na distribucijo sakvinavirja (Saq) in darunavirja (Dar) v hepatocitih. S pomočjo modela HepG2 celične linije smo Saq označili kot substrat Pgp in MRP-2 prenašalcev, Dar pa le kot substrat MRP-2 prenašalca. Z gotovostjo lahko trdimo, da imajo obravnavani RE signifikanten in raznolik vpliv na spremembo distribucije obeh učinkovin. Ugotovili smo namreč, da vsi štirje rastlinski ekstrakti signifikantno vplivajo na povečan transport obeh učinkovin v smeri iz hepatocita v kanalikule. Edina izjema med preučevanimi ekstrakti je bil česen, ki je povečal koncentracijo Saq v hepatocitu. S tako zbranimi podatki smo določili mehanizme interakcij med RE in učinkovinama. Smer interakcij (aktivacija/inhibicija) ob prisotnosti RE je odvisna od dodane substance – substrat prenašalca, ki je hkrati prisotna v celici. Glede na to, na katero vezavno mesto na prenašalcu se substrat veže, povzroči sočasno aplicirani RE ali aktivacijo ali inhibicijo istega prenašalca. Na področju farmakokinetičnih interakcij RE z učinkovinami pa je do danes še premalo odkritega, da bi lahko mehanizme interakcij, obravnavane v tej nalogi, aplicirali na druge zdravilne učinkovine oz. druge substrate prenašalcev.

Zaradi potreb po hitrem in zanesljivem kvalitativnem potrjevanju interakcij med učinkovinami, smo v ta namen razvili nov model, tako da smo celice HepG2 gojili na s kolagenom prevlečenih filtrih Transwell. S tem modelom smo preverjali potencialne interakcije med antiretrovirusnimi učinkovinami in sestavinami rastlinskih ekstraktov. Model, na osnovi permeabilnosti učinkovin skozi monosloj celic HepG2, se je izkazal za enako učinkovitega kot uveljavljen model HepG2 celične linije, ki temelji na privzemu učinkovine v celice. Lahko trdimo, da je razviti model veliko bolj enostaven, z manj procesnimi koraki in manj porabljenimi reagenti ter posledično nižjimi stroški.

## 8. LITERATURA

1. Dennis B, Houff S, Han D, Schmitt F: Development of neurocognitive disorders in HIV/AIDS. *Neurobehavioral HIV Medicine* 2011; 3: 9-18
2. Gallo S, Reeves J, Garg H, Foley B, Doms R, Blumenthal R: Kinetic studies of HIV-1 and HIV-2 envelope glycoprotein-mediated fusion. *Retrovirology* 2006; 3: 90
3. Pridobljeno: maj 2011. <http://www.avert.org/hiv-types.htm>
4. Hoetelmans RM, Meenhorst PL, Mulder JW, Burger DM, Koks CH: Clinical pharmacology of HIV protease inhibitors: focus on Saquinavir, Indinavir and Ritonavir. *Pharmacy, World & Science* 1997; 19: 159-75
5. Brik A, Wong CH: HIV-1 protease: mechanism and drug discovery. *Organic and Biomolecular Chemistry* 2003; 1: 5-14
6. Piacenti FJ: An update and review of antiretroviral therapy. *Pharmacotherapy* 2006; 26: 1111-1133
7. Ghosn J, Flandre P, Cohen-Codar I, Girard P-M, Chaix M-L, Raffi F, Dellamonica P, NgoVan P, Nortonus M, Delfraissy J-F: Long-term (96-week) follow-up of antiretroviral-naïve HIV-infected patients treated with first-line lopinavir/ritonavir monotherapy in the MONARK trial. *British HIV Association* 2009; 11: 137-142
8. Barbaro G, Iacobellis G: Metabolic syndrome associated with HIV and highly active antiretroviral therapy, *Current Diabetes Reports* 2009, 9: 37-42
9. Hoogbruin A: Complementary and alternative therapy (CAT) use and highly active antiretroviral therapy (HAART): current evidence in the literature, 2000-2009. *Jurnal of Clinical Nursing* 2011; 20: 325-39
10. Chang B, Servellen G, Lombardi E: Factors Associated with Complementary Therapy Use in People Living with HIV/AIDS Receiving Antiretroviral Therapy. *The Jurnal of Alternative and Complementary Medicine* 2003; 9: 695-710
11. Štrukelj B, Kos J: Biološka zdravila: od gena do učinkovine. Slovensko farmacevtsko društvo, Ljubljana, 2007: 500-501
12. Rang HP, Dale MM, Ritter JM, Moore PK: Pharmacology. Churchill Livingstone, London, 2003: 657-661, 94-95
13. Ogden R, Flexner CW: Protease inhibitors in AIDS therapy, Marcel Dekker Inc. 2001; 10: 119-120
14. Lei B, Zha W, Wang Y, Wen C, Studer EJ, Wang X, Jin F, Wang G, Zhang L, Zhou H: Development of a Novel Self-Microemulsifying Drug Delivery System for Reducing HIV

Protease Inhibitor-Induced Intestinal Epithelial Barrier Dysfunction. Molecular Pharmaceutics 2010; 7: 844-53

15. Carr A: HIV Protease Inhibitor-Related Lipodystrophy Syndrome. Clinical Infectous Disease 2000; 30: 135-42

16. Plosker GL, Scott LJ: Saquinavir A Review of its Use in Boosted Regimens for Treating HIV Infection. Drugs 2003; 63: 1299-1324

17. Sinko PJ, Kunta JR, Usansky HH, Perry BA: Differentiation of Gut and Hepatic First Pass Metabolism and Secretion of Saquinavir in Ported Rabbits. The Jurnal of Pharmacology and Experimental Therapeutics 2004; 310: 359-366

18. Usansky HH, Hu P, Sinko PJ: Differential Roles of P-Glycoprotein, Multidrug Resistance-Associated Protein 2, and CYP3A on Saquinavir Oral Absorption in Sprague-Dawley Rats. Drug Metabolism and Disposition 2008; 36: 863-869

19. Hu Z, Yang X, Ho PCL, Chan SY, Heng PWS, Chan E, Duan W, Koh HL and Zhou S: Herb-Drug Interactions A Literature Review. Drugs 2005; 65: 1239-1282

20. Berginc K: Vpliv staranega etanolno-vodnega česnovega ekstrakta na intestinalne in jetrne prenašalce ter jetrni encim citokrom 3A4. Doktorska disertacija, Fakulteta za farmacijo, Ljubljana, 2010

21. Markowitz JS, Donovan JL, Lindsay DeVane C, Spikes L, Chavin KD: Multiple-dose administration of Ginkgo biloba did not affect cytochrome P-450 2D6 or 3A4 activity in normal volunteers. Jurnal of Clinical Psychopharmacology 2003; 23: 576-581

22. Busse KHS, Penzak SR: Darunavir: A second-generation protease inhibitor. American Jurnal of Health-System Pharmacy 2007; 64: 1593-1602

23. Sekar VJ, Lefebvre E, De Marez T, Guzman SS, De Pauw M, De Paepe E, Vangeneugden T, Hoetelmans RMW: Pharmacokinetics of Darunavir (TMC114) and Atazanavir during Coadministration in HIV-Negative, Healthy Volunteers. Drugs R D 2007; 8: 241-248

24. Vermir M, Lachau-Durand S, Mannens G, Cuyckens F, Hoof B, Raoof A: Absorption, Metabolism, and Excretion of Darunavir, a New Protease Inhibitor, Administreated Alone and with Low-Dose Ritonavir in Healthy Subjects. Drug Metabolism and Disposition 2009; 30: 809-820

25. Fujimoto H, Higuchi M, Watanabe H, Koh Y, Ghosh AK, Mitsuya H, Tanoue N, Hamada A, Saito H: P-Glycoprotein Mediates Efflux Transport of Darunavir in Human Intestinal Caco-2 and ABCB1 Gene-Transfected Renal LLC-PK1 Cell Lines. Biological and Pharmaceutical Bulletin 2009; 32: 1588-1593

26. Rittweger M, Arasteh K: Clinical Pharmacokinetics of Darunavir. Clinical Pharmacokinetics 2007; 46: 739-756

27. Beukel CJPB, Koopmans PP, Ven AJAM, Smet PAGM, Burger DM: Possible drug-metabolism interactions of medical herbs with antiretroviral agents. *Drug Metabolism Reviews* 2006; 38: 477-514
28. Block E: Garlic and other Alliums: The Lore and the science. Royal Society of Chemistry, Cambridge, 2010
29. Foster BC, Foster MS, Vandenhoek S, Krantis A, Budzinski JW, Arnason JT, Gallicano KD, Choudri S: An *In Vitro* Evaluation of Human Cytochrome P450 3A4 and P-glycoprotein Inhibition by Garlic. *Jurnal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences* 2001; 4: 176-184
30. Nutrition Information Centre University of Stellenbosch: Alternative nutritional remedies for people living with HIV/AIDS (pridobljeno: april 2010)  
[http://sun025.sun.ac.za/portal/page/portal/Health\\_Sciences/English/Centres%20and%20Institutions/Nicus/Nutrition\\_Facts\\_sheets/HIV%20-%20Alternative%20N%20Remedies.pdf](http://sun025.sun.ac.za/portal/page/portal/Health_Sciences/English/Centres%20and%20Institutions/Nicus/Nutrition_Facts_sheets/HIV%20-%20Alternative%20N%20Remedies.pdf)
31. Lyons L: Supplement sheet, Garlic. The Canadian College of Naturopathic Medicine, 2000
32. Berginc K, Žakelj S, Uršič D, Kristl A: Aged garlic Extract Stimulates P-Glycoprotein and Multidrug Resistance Associated Protein 2 Mediated Effluxes. *Biological and Pharmaceutical Bulletin* 2009; 32: 694-699
33. Agarwal KC: Therapeutic actions of garlic constituents. *Medicinal research reviews* 1996; 16:111-24
34. British Herbal Pharmacopeia. Keighley: British Herbal Medicine Association 1983
35. Barnes J, Anderson LA, Phillipson JD: *Herbal Medicines*. Pharmaceutical Press, London, 2007: 299-303, 325-333, 553-563
36. American Herbal Pharmacopeia and Therapeutic Compendium. Analytical, quality control and therapeutic monographs. Santa Cruz: American Herbal Pharmacopeia 1997-2005
37. Bisset NG: *Herbal Drugs and Phytopharmaceuticals*. Medpharm, Stuttgart, 1994
38. Cott JM: In vitro receptor binding and enzyme inhibition by Hypericum perforatum extract. *Pharmacopsychiatry* 1997; 30: 108-112
39. Martarelli D et al: Hypericum perforatum methanolic extract inhibits growth of human prostatic cell line orthotopically implanted in nude mice. *Cancer Letters* 2004; 210: 27-33
40. Avato P et al: Extracts from St John's wort and their antimicrobial activity. *Phytotherapy Research* 2004; 18: 230-232
41. Foster S, Tyler VE: *Tyler's Honest Herbal*. The Howorth Herbal Press, New York, 1999

42. Hellum BH, Nilsen OG: In vitro inhibition of CYP3A4 metabolism and P-glycoprotein-mediated transport by trade herbal products. *Basic and Clinical Pharmacology and Toxicology* 2008; 102: 466-75
43. Liebgott T, Miollan T, Berchadsky Y, Drieu K, Culcasi M, Pietri S: Complementary cardioprotective effects of flavonoid metabolites and terpenoid constituents of *Ginkgo biloba* extract (Egb-761) during ischemia and reperfusion. *Basic Research in Cardiology* 2000; 95: 368-377
44. Braquet P: The ginkolides: potent platelet-activating factor antagonists isolated from *Ginkgo biloba* L.: Chemistry, Pharmacology and clinical application. *Drugs of the future* 1987; 12: 643-699
45. Umek A: Adaptogene droge. Predavanje na Fakulteti za farmacijo, Univerza v Ljubljani, Fitofarmaki 2010
46. Guodong L, Zhongqi L: Effects of ginseng saponins on insulin release from isolated pancreatic islets of rats. *Chinese Journal of Integrative Traditional Western Medicine* 1987; 7: 326
47. Singh VK: Combined treatment of mice with *Panax ginseng* extract and interferon inducer. *Planta Medica* 1983; 47: 235-236
48. Chan LMS, Lowes S, Hirst BH: The ABCs of drug transport in intestine and liver: efflux proteins limiting drug absorption and bioavailability. *Journal of Pharmaceutical Sciences* 2004; 21: 25-51
49. Procko E, O'Mara LM, Bennett WFD, Tielemans DP, Gaudet R: The mechanism of ABC transporters: general lessons from structural and functional studies of an antigenic peptide transporter. *The FASEB Journal* 2009; 23: 1287-1302
50. Skach WR, Calayag MC, Lingappa VR: Evidence for alternate model of human P-glycoprotein structure and biogenesis. *The Journal of Biological Chemistry* 1993; 268: 6903-6908
51. Lin JH, Yamazaki M: Role of P-glycoprotein in pharmacokinetic: clinical implications. *Clinical Pharmacokinetics* 2003; 42: 59-98
52. Bansal T, Jaggi M, Khar KR, Talegaonkar S: Emerging Significance of Flavonoids as P-Glycoprotein Inhibitors in Cancer Chemotherapy, *Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, 2009, 12: 46-78
53. Prebil U: Določanje permeabilnosti modelnega proteina K 1983 skozi jejunum podgane in vitro ter merjenje pH mikrookolja na mukozni površini. Diplomsko delo, Fakulteta za farmacijo, Ljubljana 2002

54. Lai Y, Xing L, Poda IG, Hu Y: Structure-Avtivity Relationships for Interaction with Multidrug Resistance Protein 2 /ABCC2/MRP«): The Role of Torsian Angel for Siries of Biphenyl-Substituted Heterocycles. *Drug Metabolism and Disposition* 2007; 35: 937-945
55. Zimmermann C, Wetering K, Steeg E, Wagenaar E, Vens C, Schinkel HA: Species-Dependent Transport and Modulation Properties of Human and Mouse Multidrug Resistance Protein 2 (MRP2/Mrp2, ABCC2/Abcc2). *Drug Metabolism and Disposition* 2008; 36: 631-640
56. Gerk PM, Vore M: Multidrug Resistance Proteins and Hepatic Transport of Endo- and Xenobiotics. *The Jurnal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 2002; 302: 407-415
57. Loe WD, Almquist CK, Deeley GR, Cole PCS: Multidrug Resistance Protein (MRP)-mediated Transport of Leukotriene C<sub>4</sub> and Chemotherapeutic Agents in Membrane Vesicels, The American Society for Biochemistry and Molecular Biology, Inc. 1996
58. Payen L, Sparfel L, Courtois A, Guillouzo A, Fardel O: The drug efflux pump MRP2: Regulation of expression in physiopathological situations and by endogenous and exogenous compounds. *Cell Biology and Toxicology* 2002; 18: 221-233
59. Šturm K: Vpliv različnih eksperimentalnih pogojev na prehod ciprofloksacina skozi črevo podgane in vitro. Diplomsko delo, Fakulteta za farmacijo, Ljubljana, 2004
60. Javitt NB: Hep G2 cells as a resource for metabolic studies: lipoprotein, cholesterol and bile acids, *The FASEB Journal*, 1990, 4: 161-168
61. Transwell Permeable Support, Inclouding Snapwell and Netwell Inserts. Instructions for Use, Corning Incorporated, Life Science 2007
62. Sekar V, Kestenas D, Spinosa-Guzman S, Pauw M, Paepe E, Vangeneugden T, Lefebvre E, Hoetelmans RMW: The effect of different meal types on the pharmacokinetics of darunavir (TMC114)/Ritonavir in HIV-negative healthy volunteers, *The Jurnal of Clinical Pharmacology*, 2007, 47: 479-484.
63. Musat AI, Sattler CA, Sattler GL, Pitot HC: Reestablishment of cell polarity of rat hepatocytes in primary culture. *Hepatology* 1993; 18: 198-205
64. Pridobljeno: maj 2011. <http://std.emedtv.com/saquinavir/saquinavir-dosing.html> , <http://std.emedtv.com/darunavir/darunavir-dosing.html>
65. Jiezhong C, Kenneth R: The role of CYP3A4 and p-glycoprotein in food-drug and herb-drug interactions. *Pharmacist*, 2006, 25: 732-738
66. Yumoto R, Murakami T, Nakamoto Y, Hasegawa R, Nagai J, Takano M: Transport of rhodamine 123, a P-glycoprotein substrate, across rat intestine and Caco-2 cell monolayers in the presence of cytochrome P-450 3A-related compounds. *The Jurnal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 1999; 289: 149-55

67. Leader JP, O'Donnell MJ: Transepithelial transport of fluorescent p-glycoprotein and MRP2 substrates by insect Malpighian tubules: confocal microscopic analysis of secreted fluid droplets. The Jurnal of Experimental Biology 2005.

68. Pridobljeno maj 2011:

<http://www.csc.mrc.ac.uk/Research/Groups/Publications/MembraneTransportProteinsDisease>

<http://biochemistry.utoronto.ca/clarke/bch.html> /