

Univerza v Ljubljani
Fakulteta za farmacijo



Bor Kraljič

**RAZVOJ POSTOPKA ZA OPREDELITEV PERMEABILNOSTNIH LASTNOSTI
RAZLIČNIH "IN VITRO" MODELOV Z VELIKIM ŠTEVILOM SPOJIN V
POSAMEZNEM POSKUSU**

**DEVELOPMENT OF A PROCEDURE FOR EVALUATION OF PERMEABILITY
PROPERTIES OF DIFFERENT "IN VITRO" MODELS BY MULTIPLE
SUBSTANCES IN EACH EXPERIMENT**

DIPLOMSKA NALOGA

Ljubljana, 2011

Diplomsko delo sem opravljaj na Fakulteti za farmacijo pod pod mentorstvom doc. dr. Simona Źaklja in doc. dr. Roberta Rořkarja

Zahvalil bi se doc. dr. Simonu Źaklju in doc. dr. Robertu Rořkarju za pomoč, nasvete in vzpodbudo pri nastajanju diplomske naloge.

Zahvala gre tudi dr. Igorju Locatelliju za pomoč pri statistični analizi s SPSS programom ter osebju Katedre za biofarmacijo in farmakokinetiko za pomoč pri delu in vse konstruktivne kritike.

Hvala pa tudi družini in Tanji za podporo in vzpodbudo v času študija.

Izjava

Izjavljam, da sem diplomsko delo izdelal samostojno pod vodstvom mentorja doc. dr. Simona Źaklja in somentorja doc. dr. Roberta Rořkarja.

Bor Kraljič

Ljubljana, september 2011

Predsednik diplomske komisije: prof. dr. Samo Kreft

Član diplomske komisije: doc. dr. Tomaž Vovk

Kazalo

Kazalo.....	III
Povzetek.....	VI
Abstract.....	VII
Seznam okrajšav.....	VIII
1 Uvod.....	1
1.1 Metode preučevanja absorpcije spojin.....	3
1.1.1 Caco-2.....	3
1.1.2 Difuzijske celice.....	4
1.1.3 Test permeabilnosti s sistemom vzporednih umetnih membran (PAMPA).....	5
1.2 BCS klasifikacija.....	5
1.3 LC-MS/MS analitika.....	6
1.4 Preiskovane spojine.....	9
2 Namen dela.....	19
3 Materiali in metode.....	20
3.1 Materiali.....	20
3.1.1 Spojine.....	20
3.1.2 Topila.....	21
3.1.3 Plini.....	21
3.1.4 Tkiva in materiali za permeabilnostne poskuse.....	21
3.1.5 Druge snovi.....	21
3.1.6 Raztopine.....	21
3.1.6.1 Raztopine za poskuse.....	21
3.1.6.2 Raztopine za LC-MS/MS analizo.....	22
3.1.7 Pribor in aparature.....	23
3.2 Metode.....	24
3.2.1 Preverjanje topnosti.....	24
3.2.2 Merjenje osmolarnosti.....	24
3.2.3 Priprava osnovnih raztopin.....	24
3.2.3.1 Osnovne raztopine za pilotni set.....	25

3.2.3.2 Osnovne raztopine za set kislin.....	26
3.2.3.3 Osnovne raztopine za set baz.....	28
3.2.4 Delo z difuzijskimi celicami.....	31
3.2.4.1 Priprava elektrod za merjenje električnih parametrov.....	31
3.2.4.2 Priprava tkiva.....	31
3.2.4.3 Splošni postopek izvedbe poskusa z dvoprostornimi difuzijskimi celicami in napetostno tokovnim izvrom (VCC MC6 ali VCC MC8).....	32
3.2.4.4 Elektrofiziološki parametri.....	34
3.2.5 Poskus s Caco-2 celicami.....	35
3.2.6 PAMPA poskus.....	35
3.2.7 Analiza vzorcev.....	36
3.2.7.1 LC-MS/MS metoda za pilotni set.....	36
3.2.7.2 LC-MS/MS metoda za set kislin.....	37
3.2.7.3 LC-MS/MS metoda za set baz.....	39
3.2.8 Izračun permeabilnostnega koeficienta.....	41
3.2.8.1 Pri poskusih z difuzijskimi celicami.....	41
3.2.8.2 Pri PAMPA poskusu.....	43
3.2.9 Statistični testi.....	44
4 Rezultati in razprava.....	45
4.1 Poskusi s pilotnim setom.....	45
4.1.1 Obarjanje.....	45
4.1.2 Osmolarnost.....	45
4.1.3 Permeabilnost.....	45
4.1.3.1 Poskus permeabilnosti na podganjih črevih.....	46
4.1.3.2 Poskus permeabilnosti na Caco-2 celicah.....	47
4.2 Prehod iz pilotnega seta na razširjena seta.....	50
4.2.1 Topnost učinkovin.....	50
4.2.2 Razvoj metode LC-MS/MS.....	50
4.2.2.1 Optimizacija MS analizatorja.....	50
4.2.2.2 Razvoj kromatografske metode.....	51

4.2.2.3 Karakteristike LC-MS/MS metode.....	52
4.2.3 Priprava osnovnih raztopin.....	55
4.3 Poskusi z razširjenima setoma.....	56
4.3.1 Preliminarni poskusi z razširjenima setoma.....	56
4.3.2 Stabilnost osnovnih raztopin.....	59
4.3.3 Permeabilnostni poskusi.....	59
4.3.3.1 Poskus permeabilnost na podganjih črevih.....	59
4.3.3.2 PAMPA poskus.....	63
4.3.4 Statistična obravnava podatkov.....	66
4.3.5 Korelacija med deležem absorbirane učinkovine in in vitro permeabilnostjo..	71
4.3.5.1 Pilotni set	72
4.3.5.2 Razširjena seta.....	74
5 Sklep.....	76
6 Literatura.....	77

Povzetek

V diplomskem delu smo preverili izvedljivost meritve permeabilnosti z večjim številom učinkovin sočasno v enem poskusu. Tako lahko močno zvečamo zmogljivost sicer nizko zmogljivih *in vitro* metod za določevanje permeabilnosti. Raziskali smo kakšne rezultate daje novi postopek v primerjavi s posamezno izmerjenimi permeabilnostnimi in preverili možnost uporabe novega postopka na različnih *in vitro* modelih.

Možne ovire smo spoznali s pilotnim setom, ki je vseboval trinajst učinkovin. Tem učinkovinam smo izmerili permeabilnost s poskusu PAMPA in Caco-2 celicami pri temperaturah 37°C, 20°C in 4°C, kot primer uporabe takega postopka. Že s pilotnim setom smo lahko pokazali npr., da je vpliv temperature na permeabilnost velik. Pokazala pa se je tudi možnost obarjanja učinkovin v osnovnih in donorskih raztopinah.

Pilotni set smo razširili na dva večja seta učinkovin (set baz in set kislin) s pomočjo literarnih podatkov. Za vsakega od setov smo razvili ločeno LC-MS/MS analitsko metodo za analizo vzorcev.

Razširjena seta smo uporabili na dveh *in vitro* modelih (PAMPA in tanko črevo podgane v difuzijskih celicah) ter tako potrdili uporabnost novega postopka za različne *in vitro* modele. Dobljeni permeabilnostni koeficienti so se razlikovali od tistih pridobljenih posamezno. Vendar so bile te razlike podobne za večino spojin ter zato predvidljive. Rezultate smo uporabili tudi za nadaljnjo statistično analizo.

Tako smo statistično dokazali vpliv dodatka metanola, temperature in acido-baznega značaja učinkovine na permeabilnost pri poskusu PAMPA. Predvidevamo, da je vpliv značaja učinkovine preko zadrževanja v PAMPA filtrih, kar bi lahko bila posledica kemijske sestave le-teh. Pri poskusu z difuzijskimi celicami pa smo med drugim pokazali tudi, da je vitalnost uporabljenega tkiva nujna za doseganje dobre korelacije pridobljenih permeabilnostnih koeficientov z *in vivo* podatki.

Permeabilnostne koeficiente pridobljene iz vitalnih difuzijskih celic smo predstavili v korelaciji z literarnim podatkom za delež absorbirane učinkovine.

Abstract

In the present work the feasibility of permeability measurements with multiple drugs in a single experiment. This way, the throughput of otherwise „low throughput“ *in vitro* methods for drug permeability evaluations can be significantly increased. The results obtained by the new procedure were thoroughly investigated and its application to different *in vitro* models was tested.

We began exploring the characteristics of permeability measurements with multiple drugs on a pilot set of thirteen drugs. Permeability was measured with PAMPA systems and Caco-2 cell monolayers at 37 °C, 20 °C and 4 °C already as an example of utilisation for this type of procedure. These initial tests have, for example, revealed the influence of temperature on permeability. It was also shown that preventing the precipitation of model compounds in the complex mixture in stock and donor solutions will be essential.

The pilot set has been expanded and divided using literature data to two sets of more substances (set of bases and set of acids). For each of the sets an LC-MS/MS analytical method was developed for concurrent quantification.

Expanded sets were tested on two *in vitro* models for determination of permeability (PAMPA and rat small intestine mounted in the diffusion chambers) and thus confirmed the applicability of a the new procedure to various *in vitro* models. Permeability coefficients obtained with this procedure differed from those obtained by individual measurements. However, these differences were similar for most tested drugs and therefore predictable. The results were also used for further statistical analysis.

The additive effect of methanol, temperature and acid-base character of drugs was show to have a statistically significant influence on the permeability of substances as measured by PAMPA. We assume that the influence of acid-base character is due to the mass retention of substances in PAMPA filters, which could be due to their chemical composition. Among other things the experiment with diffusion chambers has nicely demonstrated the influence of tissue viability on the correlation of permeability coefficients with *in vivo* data.

Permeability coefficients obtained by diffusion chambers with viable rat jejunal segments were graphically presented in correlation with literature data for fraction of drug absorbed.

Seznam okrajšav

- BCS ang.: *Biopharmaceutics Classification System* = biofarmacevtski klasifikacijski sistem
- CE ang.: *Collision Energy* = kolizijska energija
- DMSO dimetilsulfonoksid
- EMA ang.: *European Agency for the Evaluation of Medical Products* = Evropska agencija za zdravila
- ESI ang.: *Electrospray Ionization* = elektrorazprševalna ionizacija
- FR fragmentator
- FDA ang.: *Food and Drug Administration* = Uprava za prehrano in zdravila
- IVIVC ang.: *In Vitro-In Vivo Correlation* = *in vitro-in vivo* korelacija
- LC-MS/MS ang.: *Liquid Chromatography–Mass Spectrometry* = tekočinska kromatografija vezana z masno spektrometrijo
- LOD ang.: *Limit Of Detection* = meja detekcije
- MF Mobilna faza
- MM molska masa
- MRM..... ang.: *Multiple Reaction Monitoring*
- MRP ang.: *Multidrug Resistance Associated Protein* = protein, povezan z rezistenco na več učinkovin
- M-S z mukozne na serozno stran
- PAMPA ang.: *Parallel Artificial Membrane Permeability Assay* = test permeabilnosti s sistemom vzporednih umetnih membran
- PBS ang.: *Phosphate Buffered Saline* = fosfatni pufer
- RT ang.: *Retention Time* = retencijski čas
- S-M s serozne na mukozno stran
- TEP Transepitelijski Električni Potencial
- TEP_{GLU} Transepitelijski potencial po dodatku glukoze na mukozno stran tkiva na koncu poskusa
- TEU Transepitelijska Električna Upornost
- UP Umeritvena Premica

1 Uvod

Najpogostejši način dajanja zdravil je peroralna aplikacija. V mnogih primerih je nova farmacevtska učinkovina lahko ekonomsko uspešna le, če jo je možno aplicirati peroralno (1). Učinkovina se mora pri tem načinu aplikacije pred absorpcijo najprej sprostiti iz farmacevtske oblike in se raztopiti (2). Tako lahko proces prehoda zdravilne učinkovine iz farmacevtske oblike v sistemski krvni obtok razdelimo na dva dela: raztapljanje in absorpcija. Teoretične osnove procesa raztapljanja so dobro pojasnjene, proces pa je možno simulirati v *in vitro* pogojih (1), medtem ko je proces absorpcije skozi sluznico prebavnega trakta težje ponazoriti v standardiziranih *in vitro* pogojih.

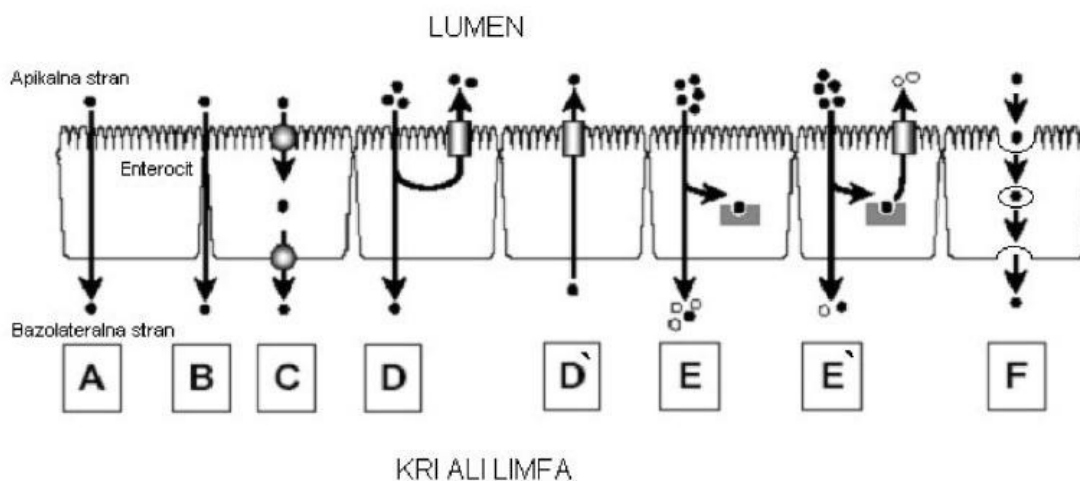
Na absorpcijo vplivajo fizikalno kemijske lastnosti (topnost, hitrost raztapljanja, molska masa, logP) in fiziološke lastnosti (vezava ali kompleksacija, intestinalna permeabilnost, metabolizem, aktivni transport) (1).

Najbolj pogost način absorpcije je pasivna difuzija, ki poteka v nasprotni smeri koncentracijskega gradienta učinkovine. Učinkovina mora biti za ta način absorpcije raztopljena in v ne-ionizirani obliki (3). Poleg pasivne difuzije obstajajo tudi drugi načini absorpcije. Slika 1 prikazuje različne poti skozi epitelij ter procese, ki vplivajo na absorpcijo (2):

- A) Pasivna difuzija učinkovine po transcelularni poti skozi celični membrani in lumen celice;
- B) Difuzija učinkovine po paracelularni poti skozi tesne stike;
- C) Transcelularni transport z absorpcijskimi prenašalnimi proteini;
- D) Transcelularna difuzija zmanjšana zaradi sekrecije z apikalnimi sekretornimi prenašalci;
- D') S sekrecijo z apikalnimi sekretornimi prenašalci se lahko izloča v lumen tudi učinkovina, ki je že bila v krvi (proces eliminacije);
- E) Znotrajcelični encimi v enterocitih lahko pretvorijo učinkovino še pred vstopom v kri ali limfo;
- E') Metaboliti učinkovine, ki nastanejo v enterocitih, so lahko substrati za apikalne

sekretorne prenašalce;

F) Transcelularna transcitoza



Slika 1: Poti učinkovin skozi epitelij tankega črevesa ter nekateri procesi, ki lahko na prehod vplivajo (2).

Hidrofilne učinkovine se zaradi manjšega porazdeljevanja v lipidno fazo v večji meri absorbirajo skozi tesne stike s pasivno difuzijo, medtem ko bolj lipofilne učinkovine lažje prehajajo v lipidni dvosloj in se posledično absorbirajo pretežno transcelularno (4). Zaradi veliko manjše površine tesnih stikov v primerjavi s celotno površino črevesne sluznice se hidrofilne učinkovine slabo absorbirajo (5).

Ključnega pomena za absorpcijo je koncentracija učinkovine ob črevesni steni (C), ter permeabilnostni koeficient (P_w), ki opredeljuje hitrost prehoda učinkovine skozi črevesno steno. Produkt obeh dejavnikov po Fickovem zakonu definira pretok učinkovine skozi črevesno steno (J_w):

$$J_w = P_w * C$$

Enačba 1

S pomočjo poznavanja raztapljanja ter permeabilnosti učinkovine lahko sklepamo na obseg absorpcije (2). Drugi faktorji, ki lahko vplivajo na absorpcijo učinkovine, so sekrecija kislin in žolča, prebavni encimi, ne-mešajoča plast, mukus in razgradnja učinkovine zaradi pogojev v prebavnem traktu ali prebavne mikroflore (3).

1.1 Metode preučevanja absorpcije spojin

Zaradi pomembnosti permeabilnosti pri napovedovanju biološke uporabnosti je bilo razvitih mnogo metod za določanje permeabilnosti (2). Na grobo jih lahko razdelimo na "*in vivo*", "*in situ*" in "*in vitro*".

Največ *in vivo* študij poteka na živalih. Večina jih meri absorpcijo na podlagi koncentracij v krvi po peroralni aplikaciji. Čeprav so študije potekale na različnih živalih in z različnimi učinkovinami se ni oblikoval noben model, ki bi podajal zanesljivo korelacijo s človeško absorpcijo za vse učinkovine (1).

In situ perfuzijske študije potekajo na živih anesteziranih živalih. Skozi segment ali skozi celo črevo je speljan tok perfuzijske tekočine. Ves čas poskusa sta prekrvavljenost in oživčenost tkiva ohranjeni (2). Meri se količino učinkovine, ki jo je prevzelo tkivo oziroma njeno izginotje iz perfuzijske tekočine. Podatki pridobljeni z *in situ* študijami imajo dobro korelacijo z absorpcijo pri človeku, vendar pa so te metode omejene na manjše laboratorijske živali (1). Razvita je bila tudi t.i. „Loc-i-gut“ metoda, ki se lahko izvaja na neanesteziranih živalih ali celo ljudeh (6). Pri metodi poskusni živali ali pa prostovoljcu peroralno vstavijo več kanalno cev. Preko cevi napolnijo dva balona, ki služita za izolacijo preiskovanega segmenta. S pomočjo ostalih cevi izoliran segment perfundirajo z medijem s preiskovano učinkovino. Permeabilnost se določi na osnovi razlike vhodne in izhodne koncentracije učinkovine iz preiskovanega segmenta (7).

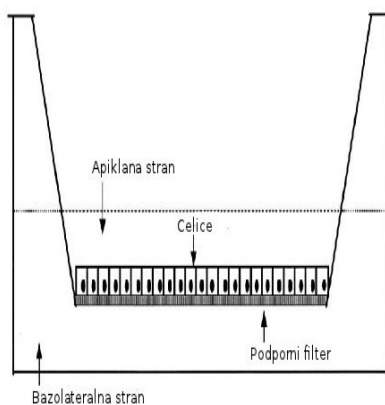
Najpogostejše so *in vitro* metode, ki jih je tudi številčno največ. Tako poznamo izolirane membranske vezikle, izolirane epiteljske celice, (obrnjene) črevesne obročke, obrnjene črevesne vrečke, celične kulture gojene v obliki enoslojnega epitelija, dvoprostorne difuzijske celice in sisteme umetnih membran (1). V naši diplomski smo uporabili celične kulture (Caco-2 celice), dvoprostorne difuzijske celice ter test permeabilnosti s sistemom vzporednih umetnih membran (PAMPA).

1.1.1 Caco-2

Kulture celic karcinoma človeškega kolona (Caco-2) so najbolj razširjen model za določanje permeabilnosti. Njihove prednosti so predvsem, da rastejo v enem sloju, in izkazujejo apikalno in bazolateralno stran. Zaradi človeškega izvora imajo večinoma

pravilno izražene prenašalne proteine in metabolne encime I. in II. stopnje (8). Njihova prednost je tudi enostavnost poskusa z minimalno potrebno opremo (9). Prav tako so pri mnogih učinkovinah ugotovili dobro korelacijo med dobljeno permeabilnostjo in deležem absorbirane učinkovine (2).

Kljub mnogim prednostim ima ta način določanja permeabilnosti tudi nekaj slabosti. Največja je, da imajo Caco-2 veliko intra in inter-laboratorijsko variabilnost v ekspresiji encimov in v permeabilnosti (9). Zaradi izvora celic iz kolona je lahko aktivnost encimov manjša od tistih v tankem črevesu. Prav tako so zaradi izvora tudi tesni stiki pri Caco-2 celicah bolj nepropustni, kot tisti v tankem črevesu (8).



Slika 2: Shema poskusa s Caco-2 celicami

1.1.2 Difuzijske celice

Difuzijske celice se za ugotavljanje permeabilnosti uporabljajo že od sredine dvajsetega stoletja. Uvedla sta jih je Hans H. Ussing in K. Zehran za proučevanje aktivnega transporta natrija skozi kožo žabe. Leta 1988 sta jih George M. Grass in Stephanie A. Sweetana modificirala posebej za eksperimente z intestinalnimi tkivi (2). V diplomu smo uporabili EasyMount™ celice, ki so izpopolnjene celice tipa Sweetana/Grass.

Tkivo je vpeto med dve pol-celici, ki sta napolnjene s pufrom. Med obe pol-celici vstavimo tkivo. Celicam neprestano vpihavamo karbogen (95% O₂/5% CO₂), da zagotovimo oskrbo tkiva s kisikom ter da mešamo raztopine. Z elektrodami spremljamo vitalnost tkiva. Z njimi lahko izmerimo tok in napetost, ki sta posledica aktivnega transporta ionov skozi

tkivo (2). Električni parametri so splošno priznani za ocenjevanje vitalnosti in integritete tkiva (8). S celicami lahko merimo permeabilnost iz mukozne na serozno stran ali iz serozne na mukozno stran.

Metoda daje dobro korelacijo med permeabilnostnim koeficientom (P_{app}) in absorpcijo, vendar ni visoko učinkovita.

1.1.3 Test permeabilnosti s sistemom vzporednih umetnih membran (PAMPA)

Kot visoko učinkovito nebiološko *in vitro* metodo so razvili test permeabilnosti s sistemom vzporednih umetnih membran. Uporablja se v zgodnjih fazah raziskovanja permeabilnostnih lastnosti. Umetne membrane zasnovane na filtru prepojenem z različnimi lipidi ali fosfolipidi izkazujejo dokaj dobro korelacijo z absorpcijo *in vivo*. Ta model seveda ne more pokazati vpliva absorpcije z aktivnim transportom ter paracelularnih poti absorpcije (9), prav to pa lahko včasih tudi izkoristimo v raziskovalne namene. Ker je ta metoda enostavna in zelo učinkovita, lahko izmerimo veliko permeabilnostnih koeficientov različnih spojin pri različnih pogojih v relativno kratkem času. Poleg tega je tudi analiza vzorcev nezahtevna, saj v vzorcih ni biološkega matriksa (2).

1.2 BCS klasifikacija

Leta 1995 so G. Amidon in sodelavci (10) objavili teoretične osnove za biofarmacevtsko klasifikacijo (BCS). Njen osnovni namen je na podlagi *in vitro* - *in vivo* korelacije zmanjšati število bioekvivalenčnih študij. Za *in vitro* podatke so vzeli test raztapljanja in koncentracije učinkovin v odvisnosti od časa. *In vitro* podatke so korelirali z deležem *in vivo* absorbirane učinkovine v odvisnosti od časa. V študiji so ugotovili da: **"Če imata dve zdravili, ki vsebujeta isto učinkovino, enaka časovna poteka koncentracije ob površini intestinalne membrane, bosta izkazovali enako hitrost absorpcije."** Za kvantitativno obravnavo predlagajo 3 števila brez enot, na podlagi katerih bi lahko opisali spojino in jo razvrstili v enega od štirih BCS razredov. Ta števila temeljijo na modelu, ki predpostavlja dobro mešanje znotraj segmenta gastro-intestinalnega trakta ter, da je hitrost potovanja neraztopljenih delcev in raztopljene učinkovine enaka (10).

$$Do = \frac{M_0/V_0}{C_s}$$

Enačba 2: število odmerka

$$Dn = t_{res} * \frac{3DC_s}{\rho r_0^2} = \frac{t_{res}}{t_{Diss}}$$

Enačba 3: število raztapljanja

$$An = \frac{P_{eff}}{R} * t_{res} = \frac{t_{res}}{t_{abs}}$$

Enačba 4: število absorpcije

Pri čemer je v enačbi 2 Do število odmerka in se izračuna s pomočjo, M_0 začetna masa učinkovine (odmerek), V_0 volumen na voljo za raztapljanje učinkovine in C_s topnosti učinkovine. V enačbi 3 je prikazan izračun števila raztapljanja (Dn). Za izračun je uporabljen: t_{res} - čas zadrževanja učinkovine, t_{Diss} - čas raztapljanja učinkovine, r_0 - polmer delcev učinkovine, D - difuzijski koeficient učinkovine ter ρ - gostota učinkovine. Pri izračunu števila absorpcije (An) pa upoštevamo permeabilnostni koeficient (P_{eff}), polmer cevi (R), ki predstavlja prebavno cev oziroma čas absorpcije (t_{abs}) in čas zadrževanja učinkovine (t_{res}).

Definicija dobre topnosti po BCS je, da se najvišji odmerek učinkovine raztopi v 250 mL ali manj vodnega medija v celotnem območju pH od 1 do 7,5 (11). Za dobro permeabilne učinkovine pa se smatra tiste, ki imajo biološko uporabnost vsaj 90% (11). Na podlagi mej lahko učinkovine enostavno razdelimo v štiri razrede, kot je predstavljeno v preglednici I.

Preglednica I: BCS klasifikacija

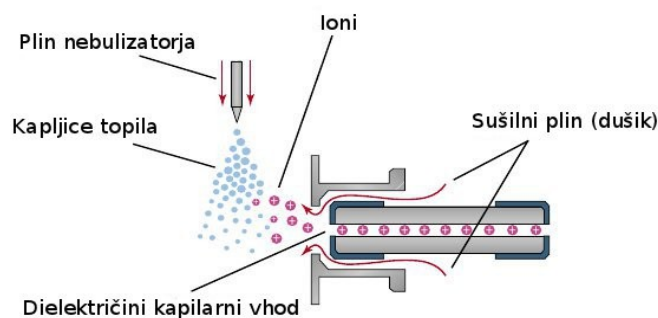
	dobra topnost	slaba topnost
dobra permeabilnost	I. razred	II. razred
slaba permeabilnost	III. razred	IV. razred

Na podlagi teoretičnih osnov lahko sklepamo, da bo dobra *in vitro-in vivo* korelacija (IVIVC) možna za spojine, ki so v razredu I, v kolikor je raztapljanje omejevalni faktor ter v razredu II. Pri razredih III in IV pa ne pričakujemo IVIVC (9).

1.3 LC-MS/MS analitika

Tekočinska kromatografija je osnovna ločevalna metoda. Je široko uporabljana in je lahko sklopljena z velikim številom različnih detektorjev (fluorescenčni, elektrokemični detektorji, UV-Vis detektorji, masni spektrometri in drugi). V okviru diplomske naloge smo uporabili tekočinsko kromatografijo sklopljeno z masno spektrometrijo.

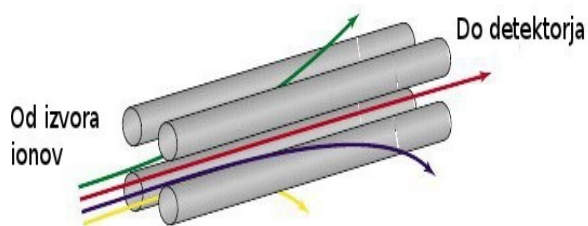
Pri tekočinski kromatografiji smo uporabili reverzno-fazno kromatografijo, kjer je mobilna faza polarna, stacionarna pa nepolarna. Vzorec nanese na kolono, ki jo potem spiramo z mobilno fazo. Spojine se zaradi različne afinitete do stacionarne faze različno dolgo zadržujejo na koloni. Tako pridejo različne spojine na detektor ob različnih retencijskih časih.



Slika 3: Slika nastankov ionov, ki potem potujejo preko kvadrupolov do detektorja (12).

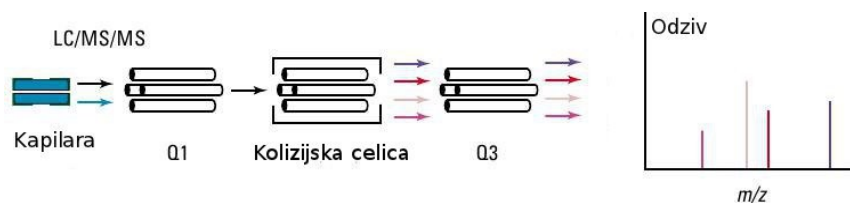
Z detektorjem zaznamo rezultat v obliki kromatografskega vrha, na podlagi katerega merimo količino učinkovine. Uporaba masne spektrometrije pri tekočinski kromatografiji je smiselna, saj je ta detektor zelo občutljiv in mnogo bolj selektiven, kot ostali detektorji (12). Masni spektrometer ima dva ključna dela: ionski izvor ter masni analizator. Pred ionizacijo molekul preiskovane spojine se odstrani mobilno fazo v kateri je spojina prišla iz tekočinskega kromatografa. Kot ionski izvor se uporabi enega od načinov ionizacije. V našem primeru smo uporabljali elektrorazprševalno ionizacijo (ESI). Pri ESI je vzorec razpršen v napetostno razliko (nekaj kilovoltov) med iglo in odprtino v masni analizator in predstavlja vir za nastanek ionov. Medtem se toploto in tok plina uporablja za odstranitev topila (13).

Po ionizaciji gredo ioni v masni analizator, v katerem je visok vakuum, da lahko nemoteno potujejo do detektorja. Analizator loči ione na podlagi razmerja med maso in nabojem (m/z). Najpogostejši tip analizatorja je kvadrupol, ki je tudi je najenostavnejši in najcenejši masni analizator. Sestavljen je iz štirih vzporednih palic. Skozi palice teče električen tok, ki ustvarja magnetno polje (12). To magnetno polje je določeno tako, da kvadrupol prečkajo le ioni z določenim m/z razmerjem (13) ostali pa se zaletijo v palice ali pa zletijo izven območja kvadrupola.



Slika 4: Shema kvadrupola in poti ionov z različnimi m/z razmerji (12).

V našem primeru smo uporabljali trojni kvadrupol sistem MS/MS. Tak sistem ima po prvem kvadrupolu s katerim se izločijo vsi ioni razen zelenega, kolizijsko celico. Celica je pri našem MS-MS sistemu (Agilent 6460 Triple Quad) podobna kot kvadrupol, le da ima šest palic in je tako pravzaprav heksapol. V celici pride do trkov ionov z inertnim plinom, kar povzroči cepitve nekaterih vezi in nastanka ionov fragmentov. Tako dobimo „MRM prehode“ z različnimi m/z (14). Ioni nadaljujejo pot do tretjega kvadrupola, ki deluje enako kot prvi kvadrupol, kot filter ionov na podlagi m/z razmerja. Tako pride do detektorja le en del molekule, ki ga potem aparat pretvori v signal. Detektor je visoko energijski dinoda detektor z elektronsko pomnoževalko. Visoka napetost preusmeri ione preko dinod do elektronske pomnoževalke, kjer se število trkov spremeni v električen signal (14). Računalnik pretvori analogni signal v digitalni, ki je v obliki kromatograma na voljo za nadaljnjo obdelavo.



Slika 5: Shema LC-MS/MS s trojnim kvadrupolom (12).

Glavni prednosti LC-MS/MS sta selektivnost in občutljivost, saj je molska masa spojine in njenih fragmentov dosti bolj specifična, kot na primer absorpcija svetlobe pri določeni valovni dolžini.

1.4 Preiskovane spojine

Spojine za pilotne kasetne poskuse smo izbrali na osnovi standardov, ki jih je predlagala FDA (15). V literaturi smo našli veliko spojin, ki smo jih nameravali vključiti v razširjena seta. Tako smo oblikovali seznam potencialnih učinkovin za uporabo v poskusu. Ko smo izločili učinkovine za katere smo na podlagi podatkov najdenih v literaturi ocenili, da ne bodo primerne, smo izoblikovali seznam učinkovin s katerimi smo začeli eksperimentalne poskuse. Nekatere fizikalno kemijske lastnosti ter farmakološko delovanje spojin so predstavljeni v preglednici II.

Preglednica II: Preiskovane spojine z njihovim farmakološkim delovanjem ter fizikalno kemijskimi lastnostmi

Spojina	ATC	Farmakološka skupina	Odmerek [mg]	BCS	Faktor absorpcije	MM [g/mol]	set	pKa ^o	logP	S [mM]
acetazolamid	S01EC01	zdravila za zdravljenje glavkoma in zdravila za zožitev zenice		4 ¹⁶	popolnoma* ¹⁷	222,25	K	7,2(-H) ¹⁸	-0,26 ¹⁹	0,45 ²¹
acetilsalicilna kislina	N02BA01	salicilna kislina in njeni derivati	500 ²²	3 ¹⁶		180,16	/	3,27(-H) ¹⁸	1,19 ¹⁹	25,53 ¹⁹
aciklovir	J05AB01	zdravila z direktnim delovanjem na viruse		3 ¹⁶	20 ²³	225,2	K	9,23(-H) / 2,27(+H) ¹⁸	-1,56 ¹⁹	44,40 ²¹
amantadin	N04BB01	dopaminergiki	100 ²⁴	1/2 ¹⁶	dobro absorbira ^{ae} ²⁵	151,249	B	10,14(+H) ¹⁸	2,41 ³⁰	17,34 ²¹
amilorid	C03DB01	antikaliuretični diuretiki (varčevalni s kalijem)	5 ²²	1 ⁶	50 ²⁶	229,627	B	8,35(+H) ¹⁸	0,09 ¹⁹	4,35 ²¹
amitriptilin	N06AA09	antidepresivi, neselektivni zaviralci prevzema monoaminov	25 ²²		100 ²⁶	277,4	B	9,48(+H) ¹⁸	4,92 ¹⁹	360,49 ²¹
amlodipin	C08CA01	selektivni zaviralci kalcijevih kanalčkov z delovanjem na žile	10 ²⁴		64-80 ^{#&} ²²	408,89	B	8,6(+H) ¹⁸	3,00 ¹⁹	0,18 ¹⁹
atenolol	C07AB03	selektiven zaviralec adrenergičnih receptorjev beta	200 ²⁴	3 ⁶	50 ²⁷	266,34	B	9,6(+H) ¹⁸	0,16 ¹⁹	99,50 ²¹
bendroflumetiazid	C03AA01	diuretiki dilucijskega segmenta, tiazidni diuretiki		1/3 ¹⁶	popolnoma* ¹⁷	421,4	K	8,46(-H) ³⁰	1,95 ³⁰	0,38 ²¹
cimetidin	A02BA01	antagonisti histaminskih receptorjev H ₂	800 ²²	3 ⁶	60 ²⁷	252,34	B	6,96(+H) ¹⁸	0,40 ¹⁹	3,96 ²¹

Spojina	ATC	Farmakološka skupina	Odmerek [mg]	BCS	Faktor absorpcije	MM [g/mol]	set	pKa ^o	logP	S [mM]
ciprofloksacin	J01MA02	kinolonska protimikrobna učinkovina	750 ²⁴	2/4 ¹⁶	69-100 ^{# 28}	331,34	B	6(-H) / 8,8(+H) ¹⁸	0,28 ¹⁹	30,18 ²¹
dapson	J04BA02	zdravila z delovanjem na bakterijo mycobacterium leprae		2 ¹⁶	skoraj popolnoma ^{ε 17}	248,23	B	2,41(+H) ¹⁹	0,97 ¹⁹	0,40 ²¹
darunavir	J05AE10	zdravila z direktnim delovanjem na viruse, zaviralci proteaz			37-82 ^{#& 22}	547,66	K	11,4(-H) / 1,75(+H) ^{β20}	2,63 ¹⁹	
deksklorfeniramin	R06AB02	antihistaminik za sistemsko uporabo	2 ²²	1/3 ¹⁶	25-50 ^{#& 17}	274,788	B	9,2(+H) ¹⁸	3,38 ¹⁹	582,27 ²¹
dezipramin	N06AA01	antidepresivi, neselektivni zaviralci prevzema monoaminov		1 ⁶	95 ²⁸	266,38	B	10,21(+H) ¹⁸	4,90 ¹⁹	0,15 ³¹
diazepam	N05BA01	anksiolitiki, benzodiazepini	10 ²⁴	1 ¹⁶	97 ²⁸	284,8	B	3,3(+H) ¹⁸	2,82 ¹⁹	0,04 ²¹
domperidon	A03FA03	propulzivi	10 ²⁴		93 ²⁹	425,91	B	7,9(+H) ¹⁸	3,90 ¹⁹	<0,01 ¹⁹
etambutol	J04AK02	druga zdravila z delovanjem na bakterijo mycobacterium tuberculosis	400 ²⁴	1 ¹⁶	75-80 ^{# 28}	204,31	/	9,5(+H) ¹⁸	-0,41 ¹⁹	489,45 ²¹
etionamid	J04AD03	zdravila z delovanjem na bakterijo mycobacterium tuberculosis			80 ²⁹	166,24	B	4,37(+H) ¹⁸	0,37 ¹⁹	18,89 ¹⁹
feksofenadin	R06AX26	antihistaminik za sistemsko uporabo	180 ²⁴	3 ⁶	spremenljivo in nepopolno ^{α *25}	501,65	K	4,4(-H)/9,4(+H) ^{β20}	2,81 ¹⁹	0,02 ¹⁹

Spojina	ATC	Farmakološka skupina	Odmerek [mg]	BCS	Faktor absorpcije	MM [g/mol]	set	pKa ^o	logP	S [mM]
felodipin	C08CA02	selektivni zaviralci kalcijevih kanalčkov z delovanjem na žile, derivati dihidropiridina			100 ²⁶	384,3	/	2,727(+H) ¹⁹	3,86 ¹⁹	0,05 ¹⁹
fenazon ^s	N02BB01	analgetiki in antipiretiki	250 ²⁴	1 ⁶	100 ²⁷	188,23	B	1,5(+H) ¹⁸	0,38 ¹⁹	275,73 ¹⁹
fenoterol	R03CC04	bronhoselektivni agonisti adrenergičnih receptorjev beta-2			60 ²⁹	303,35	B	10(-H)/8,5(+H) ¹⁸	1,22 ¹⁹	136,48 ¹⁹
fluvastatin	C10AA04	zdravila, ki spreminjajo raven lipidov, zaviralci reduktaze HMG-CoA	80 ²⁴	1 ⁶	100 ²⁸	411,46	K	4,2(-H) ¹⁹	4,85 ¹⁹	<0,01 ¹⁹
furosemid	C03CA01	diuretiki vhodnega kraka Henlejeve zanke	500 ²⁴	4 ¹⁶	65 ²⁶	330,7	K	3,9(-H)/10,63(+H) ¹⁸	2,03 ¹⁹	0,03 ²¹
glibenklamid	A10BB01	peroralni antidiabetiki, sulfonamidni antidiabetiki, derivati sečnine	10 ²⁴	2/4 ¹⁶	70-80 ^{#& 22}	494	K	5,3(-H) ¹⁸	4,79 ¹⁹	0,02 ²¹
glipizid	A10BB07	peroralni antidiabetiki, sulfonamidni antidiabetiki, derivati sečnine	10 ²⁴		100 ^{& 22}	445,5	K	5,9(-H) ¹⁸	2,58 ³⁰	0,13 ²¹
grizeofulvin	D01BA01	antimikotiki za sistemsko zdravljenje	250 ¹⁶	2 ¹⁶		352,77	K		2,18 ¹⁹	0,28 ²¹
guanabenz					75 ²⁹	231,08	B	8,1(+H) ¹⁸	1,70 ¹⁹	0,29 ¹⁹

Spojina	ATC	Farmakološka skupina	Odmerek [mg]	BCS	Faktor absorpcije	MM [g/mol]	set	pKa ^o	logP	S [mM]
haloperidol	N05AD01	antipsihotiki, derivati butirofenona	10 ²⁴	2/4 ¹⁶	60 ^{& 22}	375,86	B	8,65(+H) ¹⁸	4,30 ¹⁹	0,03 ²¹
hidroklorotiazid	C03AA03	diuretiki dilucijskega segmenta, tiazidni diuretiki	25 ²⁴	3 ⁶	67 ²⁷	297,7	K	8,6(-H) ¹⁸	-0,10 ³⁰	8,40 ²¹
ibuprofen	M01AE01	nesteroidna protivnetna in protirevmatična zdravila	800 ²⁴	2 ¹⁶	90 ^{& 22}	206,28	K	4,24(-H) ¹⁸	3,97 ¹⁹	0,05 ²¹
indinavir	J05AE02	zdravila z direktnim delovanjem na viruse, zaviralci proteaz	800 ²⁴	4 ¹⁶	63 ²⁹	613,79	B	6,8(+H) ¹⁸	3,49 ¹⁹	1629,2 ²¹
indometacin	M01AB01	nesteroidna protivnetna in protirevmatična zdravila	25 ²⁴		skoraj popolnoma ^{e 22}	357,79	K	4,3(-H)/ ¹⁸	4,27 ¹⁹	<0,01 ¹⁹
izoniazid	J04AC01	zdravila z delovanjem na bakterijo mycobacterium tuberculosis	300 ²⁴	1 ¹⁶	dobro absorbira ^{ae 25}	137,14	K	10,8(-H)/3,6(+H) ¹⁸	-0,70 ¹⁹	911,48 ²¹
karbamazepin	N03AF01	antiepileptiki	400 ²⁴	2 ⁶	100 ²⁷	236,3	K	13,94(-H) ¹⁹	2,45 ¹⁹	0,04 ²¹
ketokonazol	J02AB02	antimikotiki za sistemsko zdravljenje	400 ²⁴		15-90 ^{# 26}	531,4	/	6,2(+H) ¹⁸	4,35 ¹⁹	<0,01 ¹⁹
ketoprofen	M01AE03	nesteroidna protivnetna in protirevmatična zdravila	100 ²⁴	1 ⁶	100 ²⁸	254,28	K	3,7(-H) ¹⁸	3,12 ¹⁹	0,47 ³¹
kinidin	C01BA01	antiaritmiki skupine I _a			81 ²⁹	324,42	B	8,54(+H) ¹⁸	3,44 ¹⁹	0,43 ¹⁹
kinin	P01BC01	antimalariki, metanolkinolini		1/3 ¹⁶		324,42	/	8,34(+H) ¹⁸	3,44 ¹⁹	3,70 ²¹

Spojina	ATC	Farmakološka skupina	Odmerek [mg]	BCS	Faktor absorpcije	MM [g/mol]	set	pKa ^o	logP	S [mM]
klomipramin	N06AA04	antidepresivi, neselektivni zaviralci prevzema monoaminov	50 ²⁴	1/3 ¹⁶	popolnoma* ²²	314,9	B	9,38(+H) ¹⁸	5,19 ¹⁹	317,56 ²¹
klonidin	C02AC01	antiadrenergiki z osrednjim delovanjem	0,15 ²²		95 ²⁹	230,1	B	8,26(+H) ¹⁸	1,59 ¹⁹	59,10 ¹⁹
klorkin	P01BA01	antimalariki, aminokinolini		1 ¹⁶		319,87	/	8,4(+H) ¹⁸	4,63 ¹⁹	312,63 ²¹
klorotiazid	C03AA04	diuretiki dilucijskega segmenta, tiazidni diuretiki			13 ²⁹	295,72	K	6,85(-H) ¹⁸	-0,24 ¹⁹	0,90 ¹⁹
klorpromazin	N05AA01	antipsihotiki, fenotiazini z alifatsko stransko verigo		2/4 ¹⁶	10-69 ^{#&17}	318,86	B	9,22(+H) ¹⁸	5,41 ¹⁹	3136,1 ²¹
klorzoksazon	M03BB03	mišični relaksanti z osrednjim delovanjem			62-98 ^{#28}	169,6	K	8,3(-H) ¹⁸	2,11 ³⁰	7,12 ²¹
kofein	N06BC01	psihostimulansi in učinkovine za adhd in za obnavljanje celic čzs	65 ²⁴		100 ²⁷	194,19	B	1,22(+H) ¹⁸	-0,07 ¹⁹	111,23 ¹⁹
kumarin						146,14	/		1,39 ¹⁹	13,00 ¹⁹
lizinopril	C09AA03	zaviralci angiotenzinske konvertaze, enokomponentna zdravila	20 ²⁴	3 ⁶	25 ²³	405,48	K	2,5(-H)/10,1(+H) ¹⁸	-1,22 ¹⁹	0,03 ¹⁹
loperamid	A07DA03	antiperistaltiki	2 ²⁴		40 ²⁹	477,1	B	8,66(+H) ¹⁸	5,15 ¹⁹	0,02 ²¹
lopinavir	J05AE06	zdravila z direktnim delovanjem na viruse, zaviralci proteaz	200 ²⁴	2/4 ¹⁶		628,18	/	13,89(-H) ^{B20}	4,93 ²⁰	
metformin	A10BA02	peroralni antidiabetiki, bigvanidi	1000 ²⁴	3 ¹⁶	50-60 ^{#&22}	129,16	/	11,5(+H) ¹⁸	-2,64 ¹⁹	774,23 ²¹

Spojina	ATC	Farmakološka skupina	Odmerek [mg]	BCS	Faktor absorpcije	MM [g/mol]	set	pKa ^o	logP	S [mM]
metoklopramid	A03FA01	propulzivi	10 ²⁴	1/3 ¹⁶	100 ²⁶	299,8	B	9,71(+H) ¹⁸	2,74 ³⁰	1,26 ²¹
metoprolol	C07AB02	selektivni zaviralci adrenergičnih receptorjev beta	100 ²⁴	1 ⁶	96 ²⁷	367,36	B	9,55(+H) ¹⁸		63,10 ³¹
metronidazol	G01AF01	antimikrobna zdravila in antiseptiki brez kombinacij s kortikosteroidi	400 ²⁴	1 ¹⁶	90-100 ^{#& 22}	171,15	B	2,6(+H) ¹⁸	-0,02 ¹⁹	58,43 ²¹
nadolol	C07AA12	neselektivni zaviralci adrenergičnih receptorjev beta			35 ²⁹	309,4	B	9,67(+H) ¹⁸	0,81 ¹⁹	26,92 ¹⁹
nalidiksna kislina	J01MB02	kinolonske protimikrobne učinkovine	1000 ²⁴	2 ¹⁶		232,24	/	6,02(-H) ¹⁸	1,59 ¹⁹	0,43 ²¹
naproksen	M01AE02	nesteroidna protivnetna in protirevmatična zdravila	550 ²⁴	1 ⁶	100 ²⁷	230,26	K	4,1(-H) ¹⁸	3,18 ¹⁹	0,06 ³¹
nitrofurantoin	J01XE01	druge protimikrobne učinkovine	50 ²⁴	2 ¹⁶	dobro absorbira ^{æ 25}	238,16	K	7,2(-H) ¹⁸	-0,47 ¹⁹	0,80 ²¹
norfloksacin	J01MA06	kinolonske protimikrobne učinkovine	400 ²⁴		71 ²⁹	319,33	B	0,16(-H)/8,68(+H) ^{β20}	-1,03 ¹⁹	557,42 ¹⁹
ofloksacin	J01MA01	kinolonske protimikrobne učinkovine	400 ²²		skoraj popolnoma ^{ε 17}	361,38	B	5,19(-H)/7,37(+H) ^{β20}	-0,39 ¹⁹	78,31 ¹⁹
oksazepam	N05BA04	anksiolitiki, benzodiazepini	15 ²⁴		89 ²⁹	286,71	K	11,6(-H)/1,6(+H) ¹⁸	2,24 ¹⁹	0,07 ¹⁹
paracetamol	N02BE01	drugi analgetiki in antipiretiki	500 ²⁴	3 ¹⁶	popolnoma ^{* 22}	151,16	K	9,67(-H) ¹⁸	0,46 ¹⁹	0,66 ²¹
pindolol	C07AA03	neselektivni zaviralci adrenergičnih receptorjev beta	10 ²⁴		89 ²⁷	248,32	B	9,54(-H) ¹⁸	1,75 ¹⁹	0,20 ³¹

Spojina	ATC	Farmakološka skupina	Odmerek [mg]	BCS	Faktor absorpcije	MM [g/mol]	set	pKa ^o	logP	S [mM]
pirazinamid	J04AK01	zdravila z delovanjem na bakterijo mycobacterium tuberculosis	500 ²⁴	1 ¹⁶		123,11	/	0,5(-H) ¹⁸	-0,60 ¹⁹	121,84 ²¹
piroksikam	M01AC01	nesteroidna protivnetna in protirevmatična zdravila	20 ²²	2 ⁶	100 ²⁷	331,35	K	5,3(-H) ¹⁸	3,06 ¹⁹	<0,01 ³¹
pravastatin	C10AA03	zaviralci reduktaze HMG-CoA	40 ²⁴		34 ²⁶	424,5	K	4,7(-H) ²⁶	2,18 ¹⁹	
primakin	P01BA03	antimalariki, aminokinolini	15 ¹⁶	1 ¹⁶		259,34	/	9,99(+H) ¹⁸	3,15 ¹⁹	257,19 ²¹
prometazin	R06AD02	antihistaminiki za sistemsko zdravljenje	25 ¹⁶	3 ¹⁶	dobro absorbira ^{ae 25}	284,42	B	9,1(+H) ¹⁸	4,81 ¹⁹	3515,9 ²¹
propranolol	C07AA05	neselektivni zaviralci adrenergičnih receptorjev beta	40 ²⁴	1 ¹⁶	100 ²⁷	259,34	B	9,14(+H) ¹⁸	3,48 ¹⁹	127,25 ²¹
ranitidin	A02BA02	antagonisti histaminskih receptorjev H ₂	300 ²⁴	3 ⁶	50 ²⁷	314,4	B	8,31;2,11(+H) ³¹	0,27 ¹⁹	78,56 ¹⁹
reserpin	C02AA02	antiadrenergiki z osrednjim delovanjem	0,1 ²⁴	3 ¹⁶	50 ²⁹	608,69	/	6,6(+H) ¹⁸	3,32 ¹⁹	0,02 ²¹
risperidon	N05AX08	antipsihotiki	4 ²⁴		70 ^{& 22}	410,5	B	9,57(+H) ¹⁹	3,49 ¹⁹	0,01 ¹⁹
sakvinavir	J05AE01	zdravila z direktnim delovanjem na viruse, zaviralci proteaz	200 ²²	4 ¹⁶	4 ²⁹	670,8	/	11(-H)/6,25(+H) ^{B20}	4,70 ¹⁹	3,31 ²¹
sertralin	N06AB06	antidepresivi, selektivni zaviralci prevzema serotonina	100 ²⁴			306,24	/	9,48(+H) ¹⁸	5,29 ¹⁹	0,01 ¹⁹

Spojina	ATC	Farmakološka skupina	Odmerek [mg]	BCS	Faktor absorpcije	MM [g/mol]	set	pKa ^o	logP	S [mM]
sildenafil	G04BE03	zdravila za zdravljenje erektilne disfunkcije	100 ²⁴		25-63 ^{#& 22}	474,6	B	5,99(+H) ¹⁹	2,75 ¹⁹	
sulfadiazin	J01EC02	srednje dolgo delujoči sulfonamidi		2/4 ¹⁶	65 ²⁹	250,28	K	6,48(-H)/2,21(+H) ¹⁸	-0,09 ¹⁹	0,32 ²¹
sulfasalazin	A07EC01	zdravila s protivnetnim delovanjem v črevesju, aminosalicilna kislina in njeni derivati	500 ²⁴	2/4 ¹⁶	12-13 ^{# 28}	398,39	K	2,4(-H)/0,6(+H) ¹⁸	3,81 ¹⁹	0,03 ²¹
sulindak	M01AB02	nesteroidna protivnetna in protirevmatična zdravila			90 ²⁸	356,41	/	4,08(-H)/(+H) ³⁰	3,42 ³⁰	1,98 ²¹
sumatriptan	N02CC01	zdravila proti migreni, selektivni agonisti receptorjev 5HT ₁	100 ²⁴		67 ²⁹	295,4	B	9,5(+H) ¹⁸	0,93 ¹⁹	72,44 ¹⁹
teofilin	R03DA04	druga sistemska zdravila za obstruktivne pljučne bolezni	350 ²⁴	1 ¹⁶	96 ²⁷	180,16	B	9,07(-H)/10,37(+H) ¹⁸	-0,02 ¹⁹	5,55 ²¹
terbutalin	R03CC03	adrenergiki za sistemsko zdravljenje		3 ⁶	60-73 ^{# 28}	225,28	B	11,02;9,97;8,67(+H) ³¹	0,90 ¹⁹	945,49 ¹⁹
terfenadin	R06AX12	antihistaminiki za sistemsko zdravljenje	120 ²²		95 ²⁹	471,6	/	9,25(+H) ³⁰	5,42 ³⁰	<0,01 ²¹
tiamin	A11DA01	vitamin b ₁ , enokomponentna zdravila in v kombinaciji z vitaminoma b ₆ in b ₁₂	50 ²²	3 ¹⁶		300,81	/	9(+H) ¹⁸	-3,93 ¹⁹	1662,18 ¹⁹

Spojina	ATC	Farmakološka skupina	Odmerek [mg]	BCS	Faktor absorpcije	MM [g/mol]	set	pKa ^o	logP	S [mM]
timolol	C07AA06	neselektivni zaviralci adrenergičnih receptorjev beta			90 ²⁹	316,42	B	8,8(+H) ¹⁸	1,83 ¹⁹	8,66 ¹⁹
traneksaminska kislina	B02AA02	antifibrinolitiki			55 ²⁶	157,2	/	4,3(-H)/10,6(+H) ¹⁸	-1,90 ¹⁹	1062,3 ¹⁹
trimetoprim	J01EA01	trimetoprim in njegovi derivati	80 ²⁴	2 ¹⁶	97 ²³	290,32	B	7,12(+H) ¹⁸	0,91 ¹⁹	1,38 ²¹
valprojska kislina	N03AG01	antiepileptiki, derivati prostih maščobnih kislin	500 ²⁴	2 ¹⁶	100 ²⁸	144,21	/	4,6(-H) ¹⁸	2,75 ¹⁹	9,01 ²¹

[&] podana je biološka uporabnost namesto faktorja absorpcije, ^{*} po literarnih podatkih se popolnoma absorbira (pri interpretaciji podatkov smo privzeli 100% absorpcijo), [€] po literarnih podatkih se skoraj popolnoma absorbira (pri interpretaciji podatkov smo privzeli 90% absorpcijo), ^ˆ dobro smo prevajali well/rapidly/readily (pri interpretaciji podatkov smo privzeli 90% absorpcijo), ^ˆ po literarnih podatkih se absorbira spremenljivo in nepopolno (pri interpretaciji podatkov smo privzeli 50% absorpcijo), [#] pri interpretaciji podatkov smo privzeli vrednost intervala, ^o navedena je pKa za oddajo protona (-H) oziroma sprejem protona (+H), ^b podan pKa je izračunan, ^s antipirin

2 Namen dela

Namen diplomske naloge je razvoj postopka za opredelitev permeabilnostnih lastnosti različnih *in vitro* modelov z velikim številom spojin sočasno v posameznem poskusu ter tako zmanjšati porabo materiala in časa potrebnega za pridobitev permeabilnostnih lastnosti tolikšnega števila učinkovin.

V prvem delu diplome bomo s pomočjo pilotnega nabora trinajstih raznovrstnih učinkovin spoznali problematiko sočasnega določanja permeabilnostnih koeficientov. To bomo dosegli tako, da bomo preskusili več različnih eksperimentalnih tehnik določanja permeabilnosti. Ugotovitve pri poskusih s pilotnim naborom bomo uporabili pri zasnovi poskusov z razširjenjem naborom učinkovin.

V drugem delu diplome se bomo posvetili razširitvi pilotnega nabora na čim večje število učinkovin. Za večanje nabora bomo preiskali literaturo za najbolj primerne učinkovine. Poiskali bomo tudi literaturne podatke za fizikalno-kemijske lastnosti učinkovin. Pred preučevanjem permeabilnosti bomo preverili, da so učinkovine ustrezne za izvedbo poskusa. Ustreznost bomo vrednotili s topnostjo, stabilnostjo (tako v topilu za osnovno raztopino kot v Ringerjevem pufri) ter toksičnost učinkovin. Na podlagi vseh pridobljenih podatkov bomo določili tudi optimalno donorsko koncentracijo za vsako učinkovino posebej. Učinkovine, ki jim iz kakršnih koli razlogov ne bo možno določiti permeabilnostnega koeficienta z novim postopkom bomo iz seta izločili. Razvili bomo LC-MS/MS analizo metodo, ki jo bomo uporabili za sočasno analizo učinkovin v posameznih vzorcih.

Na koncu bomo preverili možnosti uspešne izvedbe na različnih *in vitro* modelih. Dodatno bomo ugotovili kakšna odstopanja rezultatov glede na meritve opravljene s posamičnimi učinkovinami lahko pričakujemo na splošno (za celoten set) in ali so možna večja odstopanja le pri posamičnih učinkovinah.

Preverili bomo uporabo tako pridobljenih podatkov za namene statistične analize in korelacije naših meritev s frakcijo absorbirane učinkovine pri človeku.

3 Materiali in metode

3.1 Materiali

3.1.1 Spojine

Spojine katere smo izločili na različnih stopnjah pri razvoju postopka za sočasno opredelitev permeabilnostnih lastnosti, tako da niso v nobenem od končnih setov učinkovin.

- acetilsalicilna kislina, 180,16 g/mol, Lex, 0,9977
- klorokinijev difosfat, 515,86 g/mol, Sigma, >98%
- kumarin, 146,14 g/mol, Sigma, >99%
- etambutol diklorid, 277,23 g/mol, Sigma, >99%
- felodipin, 384,3 g/mol, Sigma, >99%
- ketokonazol, 531,4 g/mol, Sequoia, p.a.
- lopinavir, 628,18 g/mol, Sequoia, p.a.
- metforminijev klorid, 165,62 g/mol, Aldrich, >97%
- nalidiksna kislina, 232,24 g/mol, Sigma-Aldrich, >98%
- primakinijev difosfat, 455,34 g/mol, Aldrich, >98%
- pirazinamid, 123,11 g/mol, Sigma, >98%
- kininijev klorid dihidrat, 396,92 g/mol, Sigma-Aldrich, >98%
- reserpin, 608,69 g/mol, Fluka, >99%
- sakvinavir, 670,8 g/mol, Sequoia, p.a.
- sertralinijev klorid, 342,69 g/mol, Sequoia, p.a.
- sulindak, 356,41 g/mol, Sigma, >98%
- terfenadin, 471,6 g/mol, Sigma, >97,5%
- tiaminov klorid, 337,27 g/mol, Sigma, >99%
- traneksaminska kislina, 157,2 g/mol, Aldrich, >97%
- natrijev valproat, 166,19 g/mol, Sigma, >98%

Dobavitelji in čistosti za spojine uporabljene v setih so navedene v preglednicah v

poglavjih za pripravo osnovnih raztopin 3.2.3.2 in 3.2.3.3 .

3.1.2 Topila

- acetonitril, za LC-MS/MS, J.T. Baker
- metanol, za LC-MS/MS, J.T. Baker
- prečiščena voda, pridobljena z Millipore Milli-Q napravo, Fakulteta za farmacijo, Ljubljana

3.1.3 Plini

- karbogen (95% kisika in 5% ogljikovega dioksida), Messer, Ruše

3.1.4 Tkiva in materiali za permeabilnostne poskuse

- tanko črevo podgane (linija: "Sprague Dawley", samci 200-350 g), Lek, Enota KK
- Caco-2 celice stare 21 dni na Transwell filtrih; vir Fakulteta za farmacijo
- sistem umetnih membran za določevanje permeabilnosti: Pre-coated PAMPA Plate System 5/cs, BD Gentest

3.1.5 Druge snovi

- D-glukoza, p.a., Kemika Zagreb, 180,16 g/mol
- dinatrijev hidrogenfosfat $\times 2\text{H}_2\text{O}$, p.a., Merck, 177,99 g/mol
- kalcijev klorid $\times 2\text{H}_2\text{O}$, p.a., Merck, 147,02 g/mol
- kalijev klorid, p.a., Merck, 136,09 g/mol
- magnezijev klorid $\times 6\text{H}_2\text{O}$, p.a., Merck, 203,30 g/mol
- manitol, Fluka, 182,18 g/mol
- natrijev dihidrogenfosfat $\times \text{H}_2\text{O}$, p.a., Merck, 137,99 g/mol
- natrijev hidrogenkarbonat, p.a., Merck, 84,01 g/mol
- natrijev klorid, Merck, 58,44 g/mol
- mravljična kislina, Merck, 98-100%, 46,03 g/mol
- amonijev acetat, Fractopur (Merck), >98%, 77,08 g/mol

3.1.6 Raztopine

3.1.6.1 Raztopine za poskuse

- Standardni Ringerjev pufer:

- Osmolarnost običajnega Ringerjevega pufra: 296,6 mOsm/L. V 1 L merilno bučo nalijemo vsaj 0,8 L prečiščene vode in v njej zaporedoma raztopimo 6,770g NaHCO₃, 0,055g NaH₂PO₄×H₂O, 6,541g NaCl, 0,373g KCl, 0,176g CaCl₂×2H₂O, 0,244g MgCl₂×6H₂O in 0,284g Na₂HPO₄×2H₂O ter dopolnimo do oznake s prečiščeno vodo. Med prepihanjem s karbogenom je pri 37°C pH vrednost tega pufra 7,4.
- Hipoosmolarni Ringerjev pufer:
 - V 1 L merilno bučo nalijemo vsaj 0,8 L prečiščene vode in v njej zaporedoma raztopimo 2,100g NaHCO₃, 0,055g NaH₂PO₄×H₂O, 3,624g NaCl, 0,373g KCl, 0,176g CaCl₂×2H₂O, 0,244g MgCl₂×6H₂O in 0,284g Na₂HPO₄×2H₂O ter dopolnimo do oznake s prečiščeno vodo. Med prepihanjem s karbogenom je pri 37°C pH vrednost tega pufra 7,4.
- 10 mM raztopina glukoze v Ringerjevem pufri:
 - 0,901 g glukoze raztopimo v Ringerjevem pufri v 500 mL bučki in dopolnimo do oznake.
- 625 mM raztopina glukoze:
 - 2,815 g glukoze raztopimo v prečiščeni vodi v 25 mL bučki in dopolnimo do oznake.
 - To raztopino dodajamo raztopinam na serozni strani tkiva v dvoprostornih difuzijskih celicah, tako da je končna koncentracija glukoze 10 mM.
- 625 mM raztopina manitola:
 - 2,850 g manitola raztopimo v prečiščeni vodi v 25 mL bučki in dopolnimo do oznake.
 - To raztopino dodajamo raztopinam na mukozni strani tkiva v dvoprostornih difuzijskih celicah, tako da je končna koncentracija manitola 10 mM.
- Fosfatni pufer pH 7,4 (PBS)
 - V 1 L merilno bučo nalijemo vsaj 0,8 L prečiščena vode in v njej zaporedoma raztopimo 8,0g NaCl, 0,2g KCl, 1,44g Na₂HPO₄×2H₂O in 0,24g KH₂PO₄. Z NaOH oziroma HCl uravnomo pH na 7,4 ter dopolnimo do oznake s prečiščeno vodo.

3.1.6.2 Raztopine za LC-MS/MS analizo

- 2mM amonijev acetat
 - V 1 L prečiščene vode raztopimo 0,154g amonijevega acetata. Pred uporabo smo

raztopino filtrirali s filtrom z velikostjo por 0,22 μm .

- 0,1% mravljična kislina

3.1.7 Pribor in aparature

- EasyMount™ difuzijske celice s pripadajočimi napetostnimi in tokovnimi elektrodami ter šest- ali osem- kanalnim potenciometrom z možnostjo vpenjanja napetosti ter toka – "Multichannel voltage-current clamp" (VCC MC6 in VCC MC8), Physiologic Instruments, Inc.
- Plošče za gojenje Caco-2 celičnih plasti TransWell™ z 12 luknjami
- Termostat za mikrotitrne plošče
- Termostat – stresalnik z možnostjo oksigenacije
- merilec osmolarnosti Knauer A0300
- centrifuga Eppendorf centrifuge 5415R
- termostatorana vodna kopel M3 LAUDA
- termostatorani stresalnik Vortemp 56EVC
- digitalni termometer DT02, Dalmacija
- tehtnica Mettler toledo AB54-S
- tehtnica Mettler H54AR
- pH meter Iskra-MA 5750
- Analitski sistem LC-MS/MS
 - Sistem za tekočinsko kromatografijo Agilent 1290 Infinity
 - Termostatiran avtomatski vzorčevalnik
 - Binarna črpalka
 - Termostat za kolono
 - kolona Agilent Eclipse Plus C18, RRHD 1,8 μm , 2.1 \times 50 mm
 - pred kolona Phenomenex C18 4x2 mm
 - Masni spektrometer
 - Masni spektrometer Agilent 6460 Triple Quad
 - JetStream Electrospray Ionization (ESI) ionski izvir

– Programska oprema MassHunter, verzija B.03.01

3.2 Metode

3.2.1 Preverjanje topnosti

Vsako učinkovino smo najprej poskušali raztopiti v etanolu v koncentraciji 10mM. V kolikor se učinkovina ni raztopila smo kot topilo zaporedoma poskusili 50% etanol, DMSO in 0,02 M HCl. Prvo topilo v katerem se je učinkovina raztopila smo določili za topilo osnovne raztopine te učinkovine. Preverili smo tudi topnost učinkovine v pufru, ki bo uporabljen v poskusih. Uporabili smo 100× redčenje, ker smo predvidevali najvišjo možno donorsko koncentracijo 100 μM.

3.2.2 Merjenje osmolarnosti

Uporabljali smo merilec osmolarnosti, ki deluje na principu merjenja znižanja tališča vode oziroma vodne raztopine.

V čisto kiveto za merjenje osmolarnosti smo prepipetirali preiskovano raztopino. Kiveto smo namestili v merilec ter jo obrisali. Merilec je nato začel hladiti kiveto, izmeril osmolarnost ter jo prikazal.

3.2.3 Priprava osnovnih raztopin

Vsak set je imel več osnovnih raztopin zaradi različnih topil (etanol, DMSO, 50% etanol, 0,02M HCl) in zaradi zmanjševanja možnosti oborine. Osnovne raztopine smo pripravili tako, da smo učinkovine razvrstili glede na topilo.

Najprej smo učinkovine natehtali. Tehtali smo približno natančno v predhodno določenih intervalih. Minimalne in maksimalne zatehte smo izračunali po enačbi 5.

$$m_{\min} = 1,1^{n-x} * V_0 * M * C_{\text{don}} * \frac{V_{\text{celice}}}{V_{\text{OR}}} * F_r$$

$$m_{\max} = 1,1^{n-x+1} * V_0 * M * C_{\text{don}} * \frac{V_{\text{celice}}}{V_{\text{OR}}} * F_r$$

Enačba 5

m_{\min} minimalna izračunana zatehta [mg]

m_{\max} maksimalna izračunana zatehta [mg]

V_0 končni volumen osnovne raztopine [mL]

n število spojin v osnovni raztopini

x zaporedna številka spojine

M molska masa učinkovine [g/mol]

C_{don} donorska koncentracija učinkovine [mol/L]

V_{celice} volumen celice uporabljene v poskusu [μ L]

V_{OR} volumen osnovne raztopine, ki ga dodajamo v volumen celice [μ L]

F_r faktor razredčitve osnovne raztopine

Ko smo imeli zatehte v izračunanih intervalih, smo s pomočjo eksperimentalnih zateht izračunali ustrezne volumne topila.

$$V_{eksp} = \frac{1}{m_{eksp}} * M * C_{don} * \frac{V_{celice}}{V_{OR}} * F_r$$

Enačba 6

V_{eksp} volumen potreben za želeno koncentracijo [mL]

m_{eksp} zatehta [mg]

M molska masa učinkovine [g/mol]

C_{don} donorska koncentracija učinkovine [mol/L]

V_{celice} volumen celice uporabljene v poskusu [μ L]

V_{OR} volumen osnovne raztopine, ki ga dodajamo v volumen celice [μ L]

F_r faktor razredčitve osnovne raztopine

Učinkovine smo raztapljali v najbolj ustreznem topilu, ki smo ga določili pri določanju topnosti. Najprej smo raztopili prvo učinkovino v topilu. Potem smo topilo s raztopljeno prvo učinkovino uporabili za drugo učinkovino in tako naprej do zadnje učinkovine. Za hitrejšo raztapljanje smo uporabili ultrazvočno kadičko.

3.2.3.1 Osnovne raztopine za pilotni set

Pilotni set je bil sestavljen iz treh osnovnih raztopin. Prve poskuse smo z vsemi učinkovinami delali z donorsko koncentracijo 50 μ M. V naslednjih poskusih smo donorske koncentracije visoko permeabilnih učinkovin zmanjšali na 25 μ M.

Preglednica III: Spojine za pilotni set razporejene v 3 osnovne raztopine

Prva osnova raztopina za pilotni set								
spojina	dobavitelj	čistost	M [g/mol]	C_{don} [μM]	topilo	zap. št.	V_{OR} [μL]	F_r
fenazon	Sigma-Aldrich	p.a.	188,23	50 ali 25	EtOH	1	25	1
karbamazepin	Sigma-Aldrich	>98%	236,3	50 ali 25	EtOH	2	25	1
natrijev fluvastatin	Sequoia	p.a.	433,46	50 ali 25	EtOH	3	25	1
ketoprofen	Sigma-Aldrich	>98%	254,28	50 ali 25	EtOH	4	25	1
kofein	Fluka	>99,0%	194,19	50	EtOH	5	25	1
Druga osnova raztopina za pilotni set								
spojina	dobavitelj	čistost	M [g/mol]	C_{don} [μM]	topilo	zap. št.	V_{OR} [μL]	F_r
atenolol	Sigma	>98%	266,34	50	EtOH:H ₂ O 1:1	1	25	1
ranitidinijev klorid	Sigma	>98%	350,86	50	EtOH:H ₂ O 1:1	2	25	1
Tretja osnova raztopina za pilotni set								
spojina	dobavitelj	čistost	M [g/mol]	C_{don} [μM]	topilo	zap. št.	V_{OR} [μL]	F_r
metoprololov tartrat	Sigma	>98%	648,81	50 ali 25	EtOH	1	25	1
naproksen	Sigma	>98,5%	230,26	50 ali 25	EtOH	2	25	1
propranololov klorid	Fluka	>98%	295,8	50 ali 25	EtOH	3	25	1
teofilin	Sigma	>99%	180,16	50 ali 25	EtOH	4	25	1
furosemid	Sigma	>98%	330,7	50	EtOH	5	25	1
hidroklorotiazid	Sigma-Aldrich	>99%	297,7	50	EtOH	6	25	1

3.2.3.2 Osnovne raztopine za set kislin

Za kisline smo izdelali štiri osnovne raztopine, na osnovi katerih smo na koncu v donorski raztopini imeli raztopljenih 27 učinkovin.

Preglednica IV: Osnovna raztopina A za kislinski set

spojina	dobavitelj	čistost	M [g/mol]	C_{don} [μM]	topilo	zap. št.	V_{OR} [μL]	F_r
izoniazid	Fluka	>99%	137,14	5	EtOH:DMSO 1:1	1	10	4
paracetamol	Sigma-Aldrich	>98%	151,16	5	EtOH:DMSO 1:1	2	10	4
ibuprofen	Sigma	>98%	206,28	5	EtOH:DMSO 1:1	3	10	4

spojina	dobavitelj	čistost	M [g/mol]	C _{don} [μM]	topilo	zap. št.	V _{OR} [μL]	F _r
klorzoksazon	Sigma	>98%	169,6	5	EtOH:DMSO 1:1	4	10	4
naproksen	Sigma	>98,5%	230,26	5	EtOH:DMSO 1:1	5	10	4
karbamazepin	Sigma-Aldrich	>98%	236,3	5	EtOH:DMSO 1:1	6	10	4
ketoprofen	Sigma-Aldrich	>98%	254,28	5	EtOH:DMSO 1:1	7	10	4
oksazepam	Sigma	>98%	286,71	5	EtOH:DMSO 1:1	8	10	4
grizeofulvin	Sigma	>97%	352,77	5	EtOH:DMSO 1:1	9	10	4
indometacin	Sequoia	p.a.	357,79	5	EtOH:DMSO 1:1	10	10	4

Zaradi nizkih donorskih koncentracij pri osnovni raztopini A za set kislin bi bile po opisanem postopku zatehte prenizke. Težavo smo rešili tako, da smo osnovno raztopino na koncu redčili 4-krat in s tem povečali zatehte nad minimalno zmogljivost tehtnice. Osnovno raztopino smo redčili z topilom v katerem smo jo tudi pripravljali.

Preglednica V: Osnovno raztopino B za set kislin

spojina	dobavitelj	čistost	M [g/mol]	C _{don} [μM]	topilo	zap. št.	V _{OR} [μL]	F _r
hidroklorotiazid	Sigma-Aldrich	>99%	297,7	10	EtOH:DMSO 1:1	1	10	1
bendroflumetiazid	Sigma	>99%	421,4	10	EtOH:DMSO 1:1	2	10	1
furosemid	Sigma	>98%	330,7	25	EtOH:DMSO 1:1	3	10	1
acetazolamid	Sigma	>99%	222,25	25	EtOH:DMSO 1:1	4	10	1
natrijev fluvastatin	Sequoia	p.a.	433,46	25	EtOH:DMSO 1:1	5	10	1
natrijev pravastatin	Sigma	>98%	446,51	25	EtOH:DMSO 1:1	6	10	1

Preglednica VI: Osnovna raztopina C za set kislin

spojina	dobavitelj	čistost	M [g/mol]	C _{don} [μM]	topilo	zap. št.	V _{OR} [μL]	F _r
klorotiazid	Sigma	>98%	295,72	5	DMSO	1	10	2
glipizid	Sigma	>96%	445,5	5	DMSO	2	10	2
piroksikam	Sigma-Aldrich	>98%	331,35	5	DMSO	3	10	2
darunavir			593,73	5	DMSO	4	10	2
nitrofurantoin	Sigma	>98%	238,16	10	DMSO	5	10	2
sulfadiazin	Sigma	>99%	250,28	10	DMSO	6	10	2

spojina	dobavitelj	čistost	M [g/mol]	C _{don} [μM]	topilo	zap. št.	V _{OR} [μL]	F _r
glibenklamid	Sigma-Aldrich	>99%	494	10	DMSO	7	10	2
sulfasalazin	Fluka	>98%	398,39	10	DMSO	8	10	2

Tako kot pri osnovni raztopini A za set kislin, so bile tudi pri osnovni raztopini C za kisline zatehte prenizke. Zaradi tega smo zvečali zatehto tako, da smo osnovno raztopino redčili na koncu 2-krat z topilom, ki smo ga uporabili za pripravo.

Preglednica VII: Osnovno raztopino D za set kislin

spojina	dobavitelj	čistost	M [g/mol]	C _{don} [μM]	topilo	zap. št.	V _{OR} [μL]	F _r
feksofenadinijev klorid	Sequoia	p.a.	538,12	5	50%EtOH	1	10	1
aciklovir	Sigma	>99%	225,2	25	50%EtOH	2	10	1
lizinopril	Sequoia	p.a.	441,52	25	50%EtOH	3	10	1

Ko smo vse osnovne raztopine A, B, C in D dodali po 10 μL v donorsko celico ($V_{\text{celice}} = 2,5\text{ml}$), smo dosegli zelene donorske koncentracije.

3.2.3.3 Osnovne raztopine za set baz

Za set baz smo izdelali tri osnovne raztopine, na osnovi katerih smo na koncu v donorski raztopini imeli raztopljenih 41 učinkovin.

Preglednica VIII: Osnovna raztopina A za set baz

spojina	dobavitelj	čistost	M [g/mol]	C _{don} [μM]	topilo	zap. št.	V _{OR} [μL]	F _r
teofilin	Sigma	>99%	180,16	12,5	EtOH:DMSO 1:1	1	12,5	2
kinidin	Aldrich	>98%	324,42	12,5	EtOH:DMSO 1:1	2	12,5	2
cimetidin	Sigma	>98%	252,34	12,5	EtOH:DMSO 1:1	3	12,5	2
klomipraminijev klorid	Sigma	>98%	351,31	12,5	EtOH:DMSO 1:1	4	12,5	2
nadolol	Fluka	p.a.	309,4	12,5	EtOH:DMSO 1:1	5	12,5	2
metoprolol lev tartrat	Sigma	>98%	648,81	12,5	EtOH:DMSO 1:1	6	12,5	2
guanabenz acetat	Sigma	p.a.	291,1	12,5	EtOH:DMSO 1:1	7	12,5	2
klonidinijev klorid	Sigma	>98%	266,55	12,5	EtOH:DMSO 1:1	8	12,5	2

Preglednica IX: Osnovna raztopina B za set baz

spojina	dobavitelj	čistost	M [g/mol]	C _{don} [μM]	topilo	zap. št.	V _{OR} [μL]	F _r
kofein	Fluka	>99,0%	194,19	12,5	EtOH:DMSO 1:1	1	12,5	2
amitriptilijev klorid	Sigma	>98%	313,86	12,5	EtOH:DMSO 1:1	2	12,5	2
propranololov klorid	Fluka	>98%	295,8	12,5	EtOH:DMSO 1:1	3	12,5	2
domperidon	Sigma	>98%	425,91	12,5	EtOH:DMSO 1:1	4	12,5	2
amiloridejev klorid	Sigma	>98%	266,1	12,5	EtOH:DMSO 1:1	5	12,5	2
fenoterolov bromid	Sigma	>98%	384,26	25	EtOH:DMSO 1:1	6	12,5	2
klorpromazinijev klorid	Sigma	>98%	355,33	25	EtOH:DMSO 1:1	7	12,5	2
amlodipinijev benzilsulfat	Sigma	>98%	567,05	25	EtOH:DMSO 1:1	8	12,5	2

Preglednica X: Osnovna raztopina C za set baz

spojina	dobavitelj	čistost	M [g/mol]	C _{don} [μM]	topilo	zap. št.	V _{OR} [μL]	F _r
metoklopramidijev klorid	Sigma	>98%	336,2	2,5	EtOH:DMSO 1:1	1	12,5	10
amantadinijev klorid	Sigma	>97%	187,7	2,5	EtOH:DMSO 1:1	2	12,5	10
risperidon	Sigma	>98%	410,5	2,5	EtOH:DMSO 1:1	3	12,5	10
etionamid	Sigma	>98%	166,24	5	EtOH:DMSO 1:1	4	12,5	10
metronidazol	Fluka	>98%	171,15	5	EtOH:DMSO 1:1	5	12,5	10
diazepam	Sigma	>98%	284,8	5	EtOH:DMSO 1:1	6	12,5	10
trimetoprim	Sigma	>98%	290,32	5	EtOH:DMSO 1:1	7	12,5	10
dapson	Sigma	>97%	248,23	5	EtOH:DMSO 1:1	8	12,5	10

Preglednica XI: Osnovna raztopina D za set baz

spojina	dobavitelj	čistost	M [g/mol]	C _{don} [μM]	topilo	zap. št.	V _{OR} [μL]	F _r
prometazinijev klorid	Sigma	>98%	320,88	5	EtOH:DMSO 1:1	1	12,5	10
fenazon	Sigma- Aldrich	p.a.	188,23	5	EtOH:DMSO 1:1	2	12,5	10
deksaklorfeniraminiev maleat	Sigma	>99%	390,86	5	EtOH:DMSO 1:1	3	12,5	10
haloperidol	Sigma	>98%	375,86	5	EtOH:DMSO 1:1	4	12,5	10
loperamidov klorid	Sigma	>98%	513,5	5	EtOH:DMSO 1:1	5	12,5	10
timololov maleat	Sigma	>98%	432,49	5	EtOH:DMSO 1:1	6	12,5	10

spojina	dobavitelj	čistost	M [g/mol]	C _{don} [μM]	topilo	zap. št.	V _{OR} [μL]	F _r
pindolol	Sigma	>98%	248,32	5	EtOH:DMSO 1:1	7	12,5	10
dezipraminijev klorid	Sequoia	p.a.	302,84	5	EtOH:DMSO 1:1	8	12,5	10

Osnovno raztopino A za baze smo združili z osnovno raztopino B za baze v razmerju 1:1. Tako smo obe osnovni raztopini redčili 2 krat. Tako združeni osnovni raztopini AB za baze smo dodali po 10% volumnov osnovnih raztopin C in D. Zaradi dodatnega redčenja z osnovnima raztopinama C in D smo dodajali skupne osnovne raztopine ABCD 20% več, kot smo upoštevali v izračunih in sicer po 15 μL na 2,5ml donorske raztopine.

Preglednica XII: Osnovna raztopina E za set baz

spojina	dobavitelj	čistost	M [g/mol]	C _{don} [μM]	topilo	zap. št.	V _{OR} [μL]	F _r
terbutalinijev polsulfat	Sigma	>98%	274,32	5	50%EtOH	1	12,5	4
sumatriptan sukcinat	Sequoia	p.a.	413,49	5	50%EtOH	2	12,5	4
ranitidinijev klorid	Sigma	>98%	350,86	12,5	50%EtOH	3	12,5	1
indinavir	Sequoia	p.a.	613,79	12,5	50%EtOH	4	12,5	1
sildenafil citrat	Sequoia	p.a.	666,7	12,5	50%EtOH	5	12,5	1
atenolol	Sigma	>98%	266,34	25	50%EtOH	6	12,5	1

Osnovno raztopino E za set baz smo po drugi učinkovini redčili 4-krat z 50% etanolom, ki je bil tudi topilo za pripravo te osnovne raztopine in potem nadaljevali z raztapljanjem nadaljnjih učinkovin.

Preglednica XIII: Osnovna raztopina F za set baz

spojina	dobavitelj	čistost	M [g/mol]	C _{don} [μM]	topilo	zap. št.	V _{OR} [μL]	F _r
ofloksacin	Sigma	>99%	361,38	12,5	HCl 0,02M	1	12,5	1
ciprofloksacin	Fluka	>98%	331,34	12,5	HCl 0,02M	2	12,5	1
norfloksacin	Fluka	>98%	319,33	12,5	HCl 0,02M	3	12,5	1

Po izdelavi smo osnovnih raztopin E in F za baze dodali po 12,5 μL na 2,5 mL donorske raztopine.

3.2.4 Delo z difuzijskimi celicami

Vsaka difuzijska celica je sestavljena iz dveh pol-komor volumna 2,5 mL z odprtini za dva para elektrod, s katerimi merimo tok in napetost ter nastavka za tkivo, katerega izpostavljena površina meri 1 cm². Pri poskusih smo uporabili set s šestimi celicami ali osmimi celicami, v katerih smo vzdrževali temperaturo medija med 36 in 37°C ter dovajali ustrezno mešanico kisika in ogljikovega dioksida za oksigenacijo tkiva in zagotavljanje mešanja.

3.2.4.1 Priprava elektrod za merjenje električnih parametrov

Dan pred poskusom pripravimo elektrode. Elektrolitski ključ je narejen iz modificiranega nastavka za 200 µL pipeto, katerega konica je odrezana tako, da se prilagaja celici.

Pripravimo si 3 M raztopino KCl v bidestilirani vodi in v vročo raztopino počasi umešamo agar. Pustimo, da se agar ohladi toliko, da se primerno zgosti. Po 100 µL tako pripravljene mase vsrkamo v nastavke in jih pustimo v raztopini KCl ter zatesnimo s parafilmom. Če so v elektrodah prisotni zračni mehurčki, ali če je prišlo do rumenega obarvanja ter razpada agarja, moramo agarjeve mostičke zamenjati. Elektrode shranjujemo v hladilniku do poskusa tako, da so konice potopljene v raztopini KCl.

Pripravljene elektrode testiramo 3 ure, kolikor časa traja poskus. Pri tem mora biti potencial elektrod konstanten in nižji od 10 mV. Sprejemljivo je, če se v tem času asimetrija ne spremeni za več kot 1 mV.

3.2.4.2 Priprava tkiva

Za poskuse z difuzijskimi celicami uporabljamo tanko črevo, odvzeto podganam, ki 18 ur pred žrtvovanjem niso imele dostopa do hrane, dostop do vode pa so imele *ad libitum*. Po humani usmrtitvi se takoj odstrani tanko črevo, ki je do poskusa shranjeno v ledeno mrzlem Ringerjevem pufri z 10mM glukozo.

Celotno tanko črevo najprej speremo. Jejunumom podgane začnemo izrezovati 25 cm od konca tankega črevesa (tako se izognemo ileumu) in nadaljujemo v smeri proti duodenumu. Izolirani segment črevesa pripravimo tako, da odrežemo 3 cm dolg košček tkiva, ki ne sme vsebovati Peyerjevih plošč. Prerežemo ga po mezenterialni meji in namestimo na vstavek za tkivo. Vstavek prenesemo v difuzijsko celico in dodamo na

serozno stran 10 mM raztopino glukoze, na mukozno pa 10 mM raztopino manitola v standardnem Ringerjevem pufri.

3.2.4.3 Splošni postopek izvedbe poskusa z dvoprostornimi difuzijskimi celicami in napetostno tokovnim izvirom (VCC MC6 ali VCC MC8)

1. Vse potenciometre na aparaturi naravnamo na 0,0 (obrnemo jih do konca v levo).
2. Celice s praznimi vstavki za tkivo pritrdimo na stojala za celice.
3. Vključimo vodno kopel in napetostno tokovni izvir ter počakamo 10 minut, da se segreje. ($T=37^{\circ}\text{C}$)
4. Elektrode speremo s prečiščeno vodo in z njimi opremimo celice. Napetostne (črne) namestimo v odprtine bližje tkiva, tokovne (bele) pa v odprtine, ki so bolj oddaljene od tkiva. Izhoda za elektrode na upravljavcu I-1 in V-1 morata biti na levi strani tkiva, I-2 ter V-2 pa na desni strani.
5. Celice napolnimo z Ringerjevim ali ustreznim modificiranim pufrom (2-3 mL v vsako polovico celice).
6. Priključimo dotok karbogena (95% O_2 in 5% CO_2).
7. Upravljalce, na katerih so izhodi za elektrode, nastavimo na OPERATE.
8. Nastavimo FUNCTION na OPEN (zelena lučka) ter METER na VOLTAGE (zelena lučka). Izmerjena napetost je posledica asimetrije med elektrodama. Če je absolutna vrednost asimetrije višja od 10 mV, takšne asimetrije ni možno kompenzirati, zato zamenjamo elektrodi. Za kompenzacijo negativne asimetrije nastavimo OFFSET na minus (-) (zelena lučka). Z OFFSET potenciometrom naravnamo napetost na 0,0 mV. Za kompenzacijo pozitivne asimetrije pa nastavimo OFFSET na plus (+) (rdeča lučka) ter OFFSET potenciometrom naravnamo napetost na 0,0 mV.
9. METER nastavimo na CURRENT (rdeča lučka) ter pritisnemo testni gumb PUSH TO ADJUST. Tok, ki ga izmerimo, mora biti stabilen, njegova vrednost pa med 60 in 68 μA . Če je tok manjši ali če pada, uporabimo novi tokovni elektrodi. Včasih pa je dovolj že, če zamenjamo levo in desno elektrodo med seboj.

10. Kompenziramo upornost raztopine tako, da nastavimo METER na VOLTAGE in med držanjem gumba PUSH TO ADJUST s potenciometrom FLUID RES COMPENSATION nastavimo vrednost na 0,0.
11. Nastavimo FUNCTION na ZERO (ne gori nobena lučka).
12. Z injekcijsko brizgo odstranimo pufer iz difuzijskih celic.
13. Izvlečemo nastavke za tkivo in nanje namestimo tkivo tako, da je z mukozno stranjo obrnjeno proti iglicam.
14. Nastavke za tkivo vstavimo nazaj v celice.
15. V celice dodamo ustrezne raztopine:
 - a) Na mukozno stran (leva polovica celice) damo 2,5 mL 10mM raztopine manitola v standardnem ali modificiranem Ringerjevem pufru in na serozno stran (desna polovica celice) damo 2,5 mL 10 mM raztopine glukoze v standardnem ali modificiranem Ringerjevem pufru.
 - b) Počakamo najmanj 15 minut, da se sistem uravnoteži.
 - c) S pipeto dodamo toliko osnovne raztopine na donorsko stran celice (z mukozne strani, če želimo spremljati prehod v smeri M→S, oziroma s serozne, če želimo spremljati prehod v nasprotni smeri), da bo v donorski pol-celici ustrezna koncentracija preiskovane spojine.
16. Nastavimo FUNCTION na OPEN ter METER na VOLTAGE, da odčitamo TEP.
17. Nastavimo FUNCTION na CLAMP ter METER na CURRENT, da odčitamo kratkostični tok I_{sc} .
18. Vsakih 25 minut (ali drug izbran časovni interval) jemljemo vzorce (250 μ L) z akceptorske strani (s serozne strani, če želimo spremljati prehod v smeri M→S, oziroma z mukozne, če želimo spremljati prehod v nasprotni smeri) in vračamo enak volumen 10 mM raztopine manitola na mukozno stran oz. 10 mM raztopine glukoze na serozno stran. Odčitavamo tudi električne parametre, kot je opisano v točkah 16 in 17.
19. Ob koncu poskusa dodamo 100 μ L 625 mM raztopine glukoze na mukozno stran in še

10 minut spremljamo električne parametre. Zapišemo najvišjo absolutno vrednost TEP, ki ga v tem času doseže izolirano tkivo - to je TEP_{GLU} .

20. Iz celic odstranimo pufer. Nastavimo FUNCTION na ZERO in odstranimo elektrode. Na koncu poskusa izmerimo asimetrijo elektrod v ustreznem pufru, potem pa jih speremo in shranimo v 3 M KCl v hladilniku.

21. Z nastavkov odstranimo tkivo, celice in nastavke pa očistimo v ultrazvočni kadički. Spiramo jih s prečiščeno vodo, sušimo jih na sobni temperaturi.

3.2.4.4 Elektrofiziološki parametri

Vitalnost izoliranega segmenta podganjega črevesja ocenjujemo s pomočjo elektrofizioloških parametrov (transepitelijska napetost TEP, transepitelijska upornost TEU in kratkostični tok I_{SC}).

Zaradi polarizacije membrane enterocitov se nekateri prenašalci nahajajo le na apikalni strani (Na^+ /glukoza, Na^+ /aminokislina), drugi pa na bazolateralni strani (Na^+ / K^+ -ATP-aza). To daje celicam sposobnost transporta prebitka ionov z ene na drugo stran. Apikalna stran je zaradi absorpcije kationov in/ali sekrecije anionov negativno nabita napram bazolateralni strani, ki je med poskusom ozemljena, zaradi česar se na apikalni strani ustvarja negativen transepitelijski potencial (TEP), ki ga s parom napetostnih elektrod izmerimo in mora biti tekom poskusa najmanj -1 mV, saj le vitalna celica s produkcijo ATP-ja omogoča delovanje prenašalcev.

Transepitelijska električna upornost (TEU) predstavlja upornost tkiva proti pasivnemu pretoku ionov skozi pore v tesnih stikih med epitelijskimi celicami. S TEU ovrednotimo vitalnost tkiva. TEU mora do konca poskusa znašati najmanj $20 \Omega cm^2$.

Kratkostični tok (I_{SC}) je tok, ki je potreben za spremembo transepitelijskega potenciala iz prvotne vrednosti na vrednost nič. Nizke vrednosti I_{SC} , ki je pretežno odvisen od delovanja Na^+ / K^+ -ATP-aze, pomenijo tudi nizko vitalnost tkiva. I_{SC} močno poraste, če na mukozno stran dodamo substrate za ko-prenašalec za natrij in glukozo (SGLT1), kot je npr. glukoza. Zato smo na koncu poskusa vitalnost tkiva preverili z dodatkom glukoze. Če je prišlo do porasta I_{SC} , je bil to znak dobrega delovanja Na^+ / K^+ -ATP-aze ter s tem dobre vitalnosti. Hkrati s porastom I_{SC} pa je pri sprejemljivi vitalnosti prišlo tudi do znižanja TEP vsaj za

0,3 mV. Tkivo smo opredelili kot vitalno tedaj, kadar sta bila izpolnjena vsaj dva pogoja; porast napetosti po dodatku glukoze mora biti najmanj 0,3 mV, napetost med poskusom mora biti vsaj -1 mV, povprečni upor v času poskusa mora biti vsaj $20 \Omega\text{cm}^2$. V nasprotnem primeru meritev nismo upoštevali.

3.2.5 Poskus s Caco-2 celicami

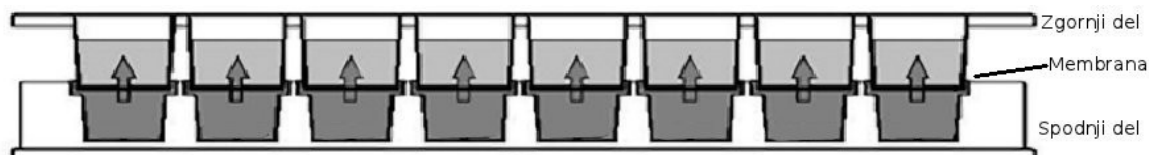
Uporabili smo Caco-2 celice, ki so rasle na Transwell insertih s polikarbonatno membrano (premer 12 mm in velikost por $0,4 \mu\text{m}$). Po treh tednih smo jim zmerili upornost. Če so bile vrednosti transepitelijskega upora (TEU) v območju $400 - 750 \Omega\text{cm}^2$, smo Caco-2 celice uporabili za poskus permeabilnosti.

Pred začetkom poskusa smo odstranili medij. V zgornji del inserta (apikalna stran) smo pipetirali 0,5 mL donorske raztopine, ki smo jo predčasno pripravili v Ringerjevem pufru. V luknjo mikrotitrne plošče (bazolateralna stran) smo dali 1,5 mL akceptorske raztopine. Vzorčili smo vsakih 20 minut po 150 μL ter vračali enak volumen akceptorske raztopine. Celicam smo pred in po poskusu izmerili upornost. Ta je ob dobri vitalnosti monosloja Caco-2 celic ob začetku poskusa znašala vsaj $400 \Omega\text{cm}^2$ in je bila po koncu poskusa v območju $300 - 750 \Omega\text{cm}^2$. Če nista bila izpolnjena ta dva pogoja, meritev nismo upoštevali pri izračunu permeabilnosti.

3.2.6 PAMPA poskus

Uporabili smo zamrznjen pred pripravljen PAMPA sistem s filtri, ki jih proizvajalec po zaščitenem postopku impregnira na način, ki omogoča kar se da tanko plast lipidne impregnacije. Dan pred poskusom smo odrezali želeno število filtrov. Za izvedbo smo sledili navodilom proizvajalca (32). Na dan poskusa smo pripravljene filtre vzeli iz zamrzovalnika in jih pustili najmanj 30 min na sobni temperaturi. Medtem smo pripravili donorske raztopine, in sicer tako da smo preiskovane spojine raztopljene v osnovnih raztopinah razredčili v fosfatnem pufru (PBS) oziroma 10% raztopini etanola v fosfatnem pufru. Tako pripravljene 300 μL donorske raztopine smo prepipetirali v spodnji del plošče za poskus. Za akceptorsko raztopino smo uporabili 200 μL PBS ne glede na sestavo donorske raztopine. Akceptorska raztopina se je nahajala nad filtri PAMPA sistema. Poskus smo začeli s prestavitvijo PAMPA akceptorskih celic v donorske raztopine. Poskus je trajal

3 ali 5 ur. Med poskusom smo imeli plošče termostatirane na želeni temperaturi. Po končanem poskusu smo ločili PAMPA celice ter odpipetirali akceptorske in donorske raztopine v mikrotitrsko ploščico za analizo. Pri analizi z LC-MS-MS je bil volumen injiciranja donorskih raztopin 5-krat manjši od akceptorskih raztopin.



Slika 6: Shema PAMPA poskusa. V spodnjem delu je donorska raztopina v zgornjem akceptorska. S puščico je ponazorjen tok učinkovine (33).

3.2.7 Analiza vzorcev

Vzorci smo analizirali v najkrajšem možnem času po poskusu. Do analize so bili vzorci shranjeni v hladilniku. Pri vsakem poskusu smo naredili tudi umeritveno premico, ki je obsegala 10 točk v območju 1/5000 do 1/5 donorske koncentracije. Pogoji analize so bili odvisni od uporabljenega seta spojin v poskusu.

3.2.7.1 LC-MS/MS metoda za pilotni set

Vzorci so bili v času analize na 4°C v avtomatskem vzorčevalniku. Ta je na kolono (Agilent Eclipse Plus C18, RRHD 1,8 μm, 2.1×50 mm s predkolono Phenomenex C18 4×2 mm) apliciral 3 μL vzorca. Kolona je bila termostatirana na 40°C. Zunanost igle smo spirali 10 sekund z 80% metanolom. Mobilno fazo (MF) smo na kolono črpali z binarno črpalko. MF A je predstavljal 2 mM amonijev acetat, MF B je predstavljal acetonitril LC-MS čistosti. Sestava mobilne faze med gradientno analizo je bila:

- 0-2 min: od 2 do 10 % MF B
- 2-5 min: od 10 do 40 % MF B
- 5-6 min: od 40 do 90 % MF B
- 6-6,5 min: 90 % MF B
- 6,5-6,6 min: od 90 do 2 % MF B

Med analizo je bil pretok mobilne faze 0,3 mL/min. Mobilno fazo pred 2,3 min smo vodili v odpad. Od 2,3 min in do konca metode (8 min) smo mobilno fazo iz kolone vodili na MS/MS detektor. Pri tem smo uporabili nastavitve masnega analizatorja:

- sušilni plin: 300 °C, 5 L/min
- nebulizacijski plin: 45 psi
- kolizijski plin: 320 °C, 11 L/min
- napetost na kapilari: 3500 V (+), 4000 V (-)
- ščitek pred vstopom v kapilaro: 500V
- EMV: 200V (+), 300V (-)

Retencijski časi, način ionizacije, fragmentator (FR), kolizijska energija (CE) in MRM prehodov so predstavljeni v preglednici XIV.

Preglednica XIV: Podatki o detekciji in retencijskih časih za spojine v pilotnem setu

Učinkovina	RT [min]	način ionizacije	MRM prehod	FR [V]	CE [eV]
atenolol	2,592	+	267,2-145,0	96	24
fenazon	3,864	+	189,1-56,0	131	32
fluvastatin	5,096	-	410,2-348,0	139	4
furosemid	4,005	-	329,0-284,8	83	4
hidroklorotiazid	2,990	-	295,9-268,8	144	4
karbamazepin	4,914	+	237,1-193,9	103	12
ketoprofen	4,249	-	253,1-208,9	70	0
kofein	3,330	+	195,1-138,0	101	16
metoprolol	4,102	+	268,2-116,0	96	12
naproksen	4,258	-	229,1-168,9	70	24
propranolol	4,736	+	260,2-116,0	96	12
ranitidin	3,244	+	315,2-175,9	83	12
teofilin	2,637	+	181,1-124,0	83	16

3.2.7.2 LC-MS/MS metoda za set kislin

Vzorci so bili v času analize na 4°C v avtomatskem vzorčevalniku. Ta je na kolono (Agilent Eclipse Plus C18, RRHD 1,8 µm, 2.1 × 50 mm s predkolono Phenomenex C18 4×2 mm) apliciral 3 µL vzorca. Kolona je bila termostatorirana na 50°C. Zunanost igle smo spirali 10 sekund z 80% metanolom. Mobilno fazo (MF) smo na kolono črpali z binarno črpalko. MF A je predstavljal 2 mM amonijev acetat, MF B je predstavljal metanol LC-MS čistosti. Sestava mobilne faze med gradientno analizo je bila:

- 0-0,95 min pri pretoku 0,3 mL/min: 2 % MF B
- 0,95-1 min pri pretoku 0,3-0,4 mL/min: 2 % MF B
- 1-2 min pri pretoku 0,4 mL/min: od 2 do 50 % MF B
- 2-3 min pri pretoku 0,4 mL/min: od 50 do 60 % MF B
- 3-4 min pri pretoku 0,4 mL/min: od 60 do 95 % MF B
- 4-4,05 min pri pretoku 0,4-0,5 mL/min: 95 % MF B
- 4,05-4,4 min pri pretoku 0,5 mL/min: 95 % MF B
- 4,4-4,45 min pri pretoku 0,5 mL/min; od 95 do 2 % MF B

Med časoma 0,8 in 4,9 min smo vodili mobilno fazo iz kolone na MS/MS detektor. Kar je bilo izven tega intervala smo vodili v odpad. Celoten čas analize je bil 5,2 min. Pri tem smo uporabili nastavitve masnega analizatorja:

- sušilni plin: 300 °C, 5 L/min
- nebulizacijski plin: 45 psi
- kolizijski plin: 320 °C, 11 L/min
- napetost na kapilari: 3500 V (+), 4000 V (-)
- ščitek pred vstopom v kapilaro: 500V
- EMV: 200V (+), 300V (-)

Retencijski časi, način ionizacije, fragmentator (FR), kolizijska energija (CE) in MRM prehodov so predstavljeni v preglednici XV.

Preglednica XV: Podatki o detekciji in retencijskih časih za spojine v setu kislin

Učinkovina	RT [min]	način ionizacije	MRM prehod	FR [V]	CE [eV]
acetazolamid	2,038	+	223,0-180,9	63	12
aciklovir	1,358	+	226,1-152,0	55	8
bendroflumetiazid	3,116	-	420,0-288,9	205	16
darunavir	3,751	+	548,2-392,2	111	8
feksofenadin	3,545	+	502,3-466,2	195	28
fluvastatin	4,138	-	410,2-348,0	139	4
furosemid	2,693	-	329,0-284,8	83	4
glibenklamid	4,046	+	494,2-369,0	116	8

Učinkovina	RT [min]	način ionizacije	MRM prehod	FR [V]	CE [eV]
glipizid	3,330	+	446,2-321,1	108	8
grizeofulvin	3,636	+	353,1-165,0	131	16
hidroklorotiazid	2,046	-	295,9-268,8	144	4
ibuprofen	3,932	-	205,1-161,1	55	0
indometacin	3,902	-	356,1-312,0	83	0
izoniazid	1,087	+	138,1-121,0	93	8
karbamazepin	3,458	+	237,1-193,9	103	12
ketoprofen	3,119	-	253,1-208,9	70	0
klorotiazid	1,877	-	293,9-213,9	192	28
klorzoksazon	3,204	-	168,0-131,9	103	16
lizinopril	2,335	+	406,2-84,1	134	32
naproksen	3,107	-	229,1-168,9	70	24
nitrofurantoin	2,379	-	237,0-152,0	70	8
oksazepam	3,750	+	287,1-241,0	126	20
paracetamol	2,080	+	152,1-110,0	88	12
piroksikam	2,838	+	332,1-95,1	121	16
pravastatin	3,236	-	423,2-321,1	167	4
sulfadiazin	2,053	+	251,1-155,9	103	12
sulfasalazin	2,911	+	399,1-381	144	16

3.2.7.3 LC-MS/MS metoda za set baz

Vzorci so bili v času analize na 4°C v avtomatskem vzorčevalniku. Ta je na kolono (Agilent Eclipse Plus C18, RRHD 1,8 µm, 2.1 × 50 mm s predkolono Phenomenex C18 4×2 mm) apliciral 1 µL vzorca. Kolona je bila termostatorirana na 50°C. Zunanost igle smo spirali 10 sekund z 80% metanolom. Mobilno fazo (MF) smo na kolono črpali z binarno črpalko. MF A je predstavljala 0,1% mravljična kislina, MF B je predstavljala acetonitril LC-MS čistosti. Sestava mobilne faze med gradientno analizo je bila:

- 0-2 min pri pretoku 0,5 mL/min: od 2 do 20 % MF B
- 2-3 min pri pretoku 0,5 mL/min: od 20 do 75 % MF B
- 3-3,1 min pri pretoku 0,5 mL/min: od 75 do 95 % MF B
- 3,1-3,6 min pri pretoku 0,5 mL/min: 95 % MF B
- 3,6-3,65 min pri pretoku 0,5-0,7 mL/min: od 95 do 2 % MF B

Med časoma 0,8 in 4,2 min smo vodili na MS/MS detektor. Kar je bilo izven tega intervala, smo vodili v odpad. Celoten čas analize je bil 4,2 min. Pri tem smo uporabili nastavitve masnega analizatorja:

- sušilni plin: 300 °C, 5 L/min
- nebulizacijski plin: 45 psi
- kolizijski plin: 320 °C, 11 L/min
- napetost na kapilari: 3500 V (+)
- ščitek pred vstopom v kapilaro: 500V
- EMV: 100V (+)

Retencijski časi, način ionizacije, fragmentator (FR), kolizijska energija (CE) in MRM prehodov so predstavljeni v preglednici XVI.

Preglednica XVI: Podatki o detekciji in retencijskih časih (RT) za spojine v setu baz

učinkovina	RT [min]	način ionizacije	MRM prehod	FR [V]	CE [eV]
amantadin	1,84	+	152,1-135,0	88	16
amilorid	1,166	+	230,1-170,9	63	16
amitriptilin	2,997	+	278,2-91,0	103	24
amlodipin	2,967	+	409,2-238,0	103	4
atenolol	1,192	+	267,2-145,0	96	24
cimetidin	1,127	+	253,1-159,0	60	8
ciprofloksacin	1,992	+	332,1-314,1	134	16
dapson	2,379	+	249,1-155,9	126	8
dekslorfeniramin	2,716	+	275,1-230,0	103	12
dezipramin	2,958	+	267,2-72,1	98	12
diazepam	3,377	+	285,1-193,0	159	32
domperidon	2,785	+	426,2-175,0	172	28
etionamid	1,101	+	167,1-140,0	93	16
fenazon	2,361	+	189,1-56,0	131	32
fenoterol	1,423	+	304,2-107,0	63	36
guanabenz	2,524	+	231,0-213,9	91	12
haloperidol	2,929	+	376,2-165,0	126	21
indinavir	2,889	+	614,4-421,2	205	32
kinidin	2,003	+	325,2-307,1	154	20

učinkovina	RT [min]	način ionizacije	MRM prehod	FR [V]	CE [eV]
klomipramin	3,055	+	315,2-86,1	106	16
klonidin	1,35	+	230,0-212,9	136	24
klorpromazin	3,03	+	319,1-86,1	103	16
kofein	1,775	+	195,1-138,0	101	16
loperamid	3,106	+	477,2-266,1	159	24
metoklopramid	2,133	+	300,2-227,0	83	16
metoprolol	2,385	+	268,2-116,0	96	12
metronidazol	1,207	+	172,1-128,0	93	8
nadolol	1,829	+	310,2-254,1	63	12
norfloksacin	1,918	+	320,1-302,1	134	16
ofloksacin	1,943	+	362,2-318,1	144	16
pindolol	1,375	+	249,2-172,0	93	16
prometazin	2,93	+	285,1-86,1	55	12
propranolol	2,826	+	260,2-116,0	96	12
ranitidin	1,206	+	315,2-175,9	83	12
risperidon	2,752	+	411,2-191,1	159	28
sildenafil	2,892	+	475,2-58,1	195	40
sumatriptan	1,455	+	296,2-58,1	101	16
teofilin	1,387	+	181,1-124	83	16
terbutalin	1,049	+	226,1-152,0	60	12
timolol	2,277	+	317,2-261,0	116	12
trimetoprim	1,803	+	291,2-230,0	164	20

3.2.8 Izračun permeabilnostnega koeficienta

3.2.8.1 Pri poskusih z difuzijskimi celicami

Da določimo permeabilnosti koeficient (P_{app}) skozi tkivo za določeno spojino, moramo najprej izračunati pretok te spojine skozi. Za spojine, ki pasivno difundirajo skozi tkivo, velja, da je P_{app} neodvisen od koncentracije te spojine na donorski strani, medtem ko je za spojine, ki aktivno prehajajo skozi tkivo, P_{app} odvisen od koncentracije te spojine na donorski strani. P_{app} izračunamo po enačbi 7:

$$P_{app} = \frac{J}{C_d}$$

Enačba 7

P_{app} (navidezni) permeabilnostni koeficient [cm/s]

J pretok učinkovine (fluks) [mol/h·cm²]

C_d začetna koncentracija spojine na donorski strani [mol/L]

Pretok je definiran kot množina snovi, ki difundira skozi 1 cm² membrane v eni uri in ga izračunamo po enačbi 8:

$$J = \frac{k_d}{A}$$

Enačba 8

k_d konstanta difuzije [mol/h]

A površina tkiva, skozi katero snov prehaja [cm²]

Hitrost difuzije opisuje enačba 9:

$$\frac{dQ}{dt} = k(C_d - C_a)$$

Enačba 9

$\frac{dQ}{dt}$ hitrost difuzije [mol/h]

k hitrost difuzije na enoto koncentracije [L/h]

C_a koncentracija spojine na akceptorski strani [mol/L]

Člen ($C_d - C_a$) se med poskusom zanemarljivo malo spreminja, saj velja $C_d \gg C_a$, zato privzamemo, da ves čas poskusa velja:

$$k_d = k * C_d$$

Enačba 10

Tako za konstanto difuzije k_d velja enačba 11, iz katere lahko preko enačbe 12 izpeljemo enačbo linearne premice 13:

$$\frac{dQ}{dt} = k_d$$

Enačba 11

$$\int_0^{Q(t)} dQ = k_d \int_0^t dt$$

Enačba 12

$$dQ = k_d t + n$$

Enačba 13

$Q(t)$ množina spojine, ki je difundirala v času t [mol]

Množino spojine, ki je v času t difundirala skozi tkivo oziroma membrano, izračunamo s pomočjo enačbe 14:

$$Q(t) = \left(\sum_{i=1}^{N-1} V_v C_i \right) + V_t C_c$$

Enačba 14

V_v volumen vzorca

C_i koncentracija spojine na akceptorski strani v predhodnih vzorcih [mol/L]

C_t koncentracija spojine na akceptorski strani v času t , ko vzamemo vzorec [mol/L]

V_c volumen tekočine na akceptorski strani celice

Konstanto difuzije k_d izračunamo s pomočjo linearne regresije po enačbi (13). Pearsonov koeficient (R) nam poda moč povezave. Ko poznamo konstanto difuzije, lahko najprej izračunamo pretok snovi skozi tkivo in nato permeabilnostni koeficient.

3.2.8.2 Pri PAMPA poskusu

Pri poskusih s PAMPA smo permeabilnost izračunali po enačbi (15):

$$P_{eff} = \frac{-\ln \left[1 - \frac{C_a(t)}{C_{equilibrium}} \right]}{A * \left(\frac{1}{V_D} + \frac{1}{V_A} \right) * t}$$

Enačba 15: Enačba za izračun permeabilnosti pri PAMPA poskusu (32)

In zadrževanja učinkovine po enačbi 16:

$$R = 1 - \frac{C_D(t) * V_D + C_A(t) * V_A}{C_0 * V_D}$$

Enačba 16: Izračun zadrževanja učinkovine (32)

C_0 začetna koncentracija učinkovine v donorski celici [mM]

$C_D(t)$ koncentracija učinkovine na donorski strani ob času t [mM]

$C_A(t)$ koncentracija učinkovine na akceptorski strani ob času t [mM]

V_D volumen donorske strani (0,3 ml) [mL]

V_A volumen akceptorske strani (0,2 ml) [mL]

A površina filtra (0,3 cm²) [cm²]

t čas poskusa [s]

$C_{equilibrium}$... koncentracija v ravnotežju izračunana po enačbi 17:

$$C_{equilibrium} = \frac{C_D(t) * V_D + C_A(t) * V_A}{V_D + V_A}$$

Enačba 17: Koncentracija v ravnotežju (32)

3.2.9 Statistični testi

Statistično obdelavo podatkov smo izvedli v programu SPSS. Testiranje smo izvedli tako, da smo testirali hipotezo o (ne)enakosti aritmetični sredini za dva neodvisna vzorca s pomočjo multivariacijske analize (ANOVA). Za ničelno hipotezo (H_0) smo vzeli, da se parametri ne razlikujejo, za alternativno hipotezo (H_1) pa da se parametri razlikujejo. Mejo za signifikantnost smo vzeli $p < 0,0005$.

4 Rezultati in razprava

4.1 Poskusi s pilotnim setom

Da bi predvideli obnašanje spojin sočasno v enem poskusu, smo se najprej lotili pilotnih poskusov s 13 učinkovinami. Učinkovine so bile izbrane na podlagi FDA smernic za industrijo (15), permeabilnostni koeficienti vseh teh spojin pa so bili v laboratorijih FFA že predhodno izmerjeni v posamičnih poskusih.

4.1.1 Obarjanje

Učinkovine pilotnega seta smo imeli razdeljene v treh osnovnih raztopinah. Ko smo poskusili narediti eno osnovno raztopino z vsemi trinajstimi učinkovinami, se je pojavila oborina. Tako smo vedeli, da bo obarjanje eden večjih problemov pri pripravljanju osnovnih raztopin. Zaradi nevarnosti obarjanja smo se odločili, da je smiselno pri večanju števila spojin v enem poskusu razdeliti učinkovine na kisline in baze. Tako smo se izognili morebitnim interakcijam med kisljinami in bazami ter njihovim morebitnim nizkim topnostnim produktom.

4.1.2 Osmolarnost

Zaradi večje količine učinkovin v poskusu smo preverili tudi osmolarnost raztopin z našimi učinkovinami. Vendar smo ugotovili, da naša naprava za merjenje osmolarnosti ni najbolj primerna. Naš merilec osmolarnosti meri znižanje tališča raztopine. Na to lastnost pa zelo vplivajo dodatki sotopil, kot je na primer etanol. Ker so bile naše raztopine predhodno raztopljene v osnovnih raztopinah z etanolom, je ta močno vplival na meritve osmolarnosti. Tako smo dobili veliko razliko med samim Ringerjevim pufrom (280 mOsmol/kg) ter Ringerjevim pufrom z dodatkom 2,5 % etanola (povprečje treh meritev je bilo 814 mOsmol/kg). Izbrali smo 2,5 % etanola, ker je ta količina ustrezala enaki vsebnosti etanola, kot ga je bilo v naši donorski raztopini. Ugotovili smo, da učinkovine v uporabljenih koncentracijah signifikantno ne vplivajo na izmerjeno osmolarnost, saj smo donorski raztopini izmerili povprečno osmolarnost 812,3 mOsmol/kg.

4.1.3 Permeabilnost

Permeabilnost za pilotni set smo izmerili na podganjem črevesju v smeri M-S in S-M pri

37°C z izoosmolarnim in hipoosmolarnim Ringerjevim pufrom ter na Caco-2 celicah samo v smeri iz apikalne na bazolateralno stran pri temperaturah 4°C, 20°C in 37°C.

4.1.3.1 Poskus permeabilnosti na podganjih črevih

Pri poskusu je bila koncentracija v donorskih celicah vseh učinkovin 50µM. Imeli smo 7 vzorčenj z intervalom 25 minut.

Preglednica XVII: Parametri vitalnosti pri poskusu. Celice 1, 3, 5 in 7 smo merili v smeri M-S in celice 2, 4, 6 in 8 v smeri S-M.

	1	2	3	4	5	6	7	8
TEP ₁₇₅ [mV]	-1,2	-2,9	-1,7	-1,7	-1	-26,3	-1,6	-1,6
TEU ₂₅₋₁₇₅ [Ωcm ²]	39	15	33	25	33	88	27	30
Δ TEP _{GLU} [mV]	-0,4	-1,2	-1,2	-3,6	-0,6	-2,9	-3,8	-3,2
Vitalnost	DA	NE	DA	DA	DA	DA	DA	DA

Na podlagi parametrov vitalnosti smo izločili rezultate celice 2. Ta je imela prenizko transktivno električno upornost.

Preglednica XVIII: Pregled rezultatov permeabilnosti s pilotnim setom na podganjih črevih (n - število paralel)

spojina	M-S			S-M		
	n	P _{app} [×10 ⁻⁶ cm/s]	SD [×10 ⁻⁶ cm/s]	n	P _{app} [×10 ⁻⁶ cm/s]	SD [×10 ⁻⁶ cm/s]
atenolol	4	6,5	2,2	3	7,6	0,7
fenazon	4	34,1	4,3	3	33,0	4,4
fluvastatin	4	4,9	1,8	3	19,6	4,6
furosemid	4	5,7	1,7	3	10,4	1,5
hidroklortiazid	4	8,4	2,0	3	12,6	1,2
karbamazepin	4	42,1	4,3	3	37,7	7,7
ketoprofen	4	15,2	6,9	3	16,4	3,2
kofein	4	57,9	9,8	3	47,6	9,1
metoprolol	4	16,3	1,6	3	18,7	1,6
naproksen	4	19,4	6,6	3	18,3	5,0
propranolol	4	18,1	3,5	3	20,5	2,8
ranitidin	4	6,5	1,5	3	12,8	1,2
teofilin	4	18,5	3,5	3	24,0	2,8

Ugotovili smo, da so rezultati večinoma primerljivi s tistimi, ki so pridobljeni s poskusi s

samo eno učinkovino. Na podlagi predhodno opravljenih poskusih v permeabilnostnem laboratoriju FFA smo pri nekaterih učinkovinah opazili manjše zvečanje P_{app} v smeri M-S, kot tudi zmanjšanje razlike med smerjo M-S ter S-M, kot pri posameznih poskusih. Iz tega smo sklepali na manjšo aktivnost aktivnega transporta. To je potrdil tudi poskus s hipoosmolarnim pufrom, ki naj bi zvečal aktivni transport predvsem s prenašalci iz skupine MRP, vendar se permeabilnosti izmerjene s hipoosmolarnim Ringerjevim pufrom niso razlikovale od tistih v izoosmolarnem puftru. Tako smo sklenili, da bomo za potrebe razvoja postopka spremljali le smer iz mukozne na serozno stran, tako bomo tudi pridobili na številu paralel v enem poskusu.

Na podlagi visokih koncentracij v akceptorskih raztopinah in posledično visokih odzivov na LC-MS/MS inštrumentu smo se odločili, da bomo v naslednjih poskusih zmanjšali koncentracije visoko permeabilnih učinkovin.

4.1.3.2 Poskus permeabilnosti na Caco-2 celicah

Na podlagi rezultatov prejšnjega poskusa smo zmanjšali koncentracije fenazona, kofeina, karbamazepina, ketoprofena, metoprolola, naproksena, propranolola in teofilina na 25 μM . Donorske koncentracije ostalih učinkovin (fluvastatin, atenolol, ranitidin, furosemid in hidrokortiazid) smo pustili na 50 μM .

Preglednica XIX: Upornosti Caco-2 celic pred in po poskusu permeabilnosti

Poskus pri 4°C								
	1	2	3	4	5	6*	7	8
TEU _{pred} [Ωcm^2]	421	414	427	440	418	375	418	433
TEU _{po} [Ωcm^2]	357	341	350	363	330	306	340	365
Poskus pri 20°C								
	1	2	3	4	5	6	7*	8
TEU _{pred} [Ωcm^2]	440	440	440	438	420	418	440	410
TEU _{po} [Ωcm^2]	460	580	570	450	530	550	870	570
Poskus pri 37°C								
	1	2*	3	4	5	6	7	8
TEU _{pred} [Ωcm^2]	470	400	423	410	450	450	455	425
TEU _{po} [Ωcm^2]	350	290	310	300	320	300	310	340

* Filtri, izločeni zaradi slabe vitalnosti Caco-2 celic

Na Caco-2 celicah smo naredili tri poskuse pri različnih temperaturah (4°C, 20°C in 37°C). Pri poskusih smo vzorčili samo na akceptorski strani v intervalu 20 minut.

Zaradi prenizke upornosti ob začetku poskusa smo izločili celico 6 pri poskusu na 4°C. Pri poskusu na 20°C smo izločili celico 7, ker je imela ob koncu poskusa previsoko upornost. Prenizka upornost je bila tudi pri celici 2 pri poskusu na 37°C. Tako smo imeli pri vseh pogojih po 7 paralel.

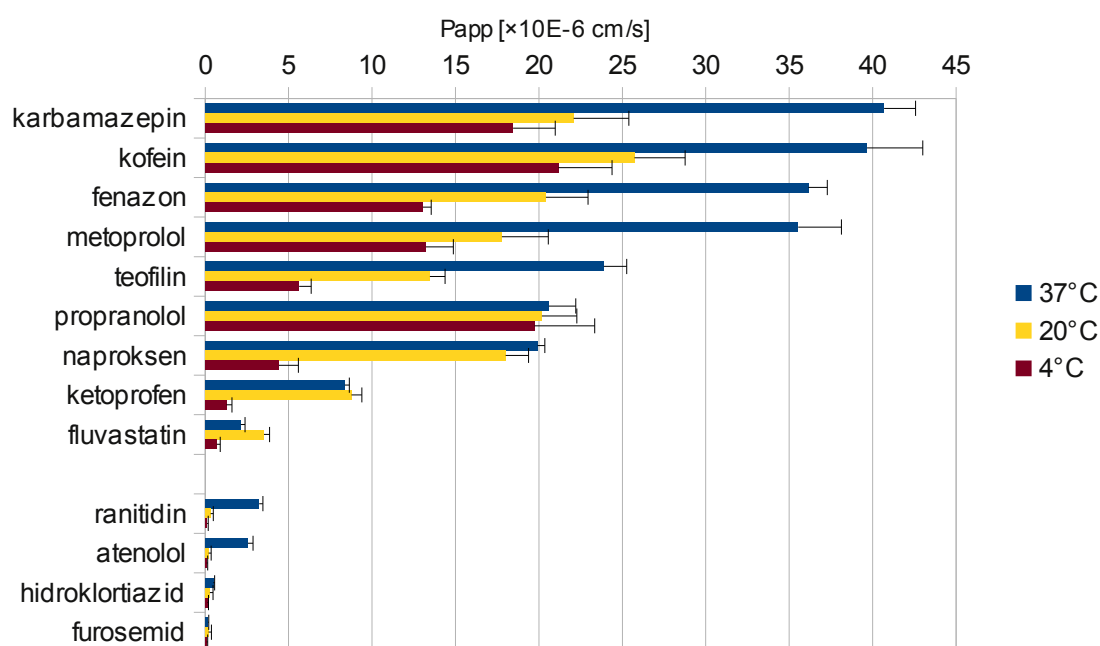
Preglednica XX: Pregled permeabilnostnih koeficientov izmerjenih s pomočjo Caco-2 celic pri različnih temperaturah izraženih v 10^{-6} cm/s

Učinkovina	37°C		20°C		4°C		$\frac{P_{app} 20^{\circ} C}{P_{app} 37^{\circ} C}$ [%]	$\frac{P_{app} 4^{\circ} C}{P_{app} 37^{\circ} C}$ [%]
	P_{app}	SD	P_{app}	SD	P_{app}	SD		
atenolol	2,6	0,3	0,20	0,16	0,09	0,06	8%	3%
fenazon	36,1	1,1	20,42	2,53	13,05	0,48	56%	36%
fluvastatin	2,13	0,27	3,52	0,35	0,70	0,20	165%	33%
furosemid	0,2	0,1	0,2	0,2	0,1	0,1	123%	55%
hidroklortiazid	0,5	0,1	0,3	0,2	0,1	0,1	56%	27%
karbamazepin	40,7	1,9	22,1	3,3	18,4	2,5	54%	45%
ketoprofen	8,37	0,26	8,77	0,61	1,27	0,33	105%	15%
kofein	39,7	3,3	25,7	3,0	21,2	3,2	65%	53%
metoprolol	35,5	2,6	17,8	2,8	13,2	1,7	50%	37%
naproksen	19,9	0,4	18,0	1,4	4,4	1,2	90%	22%
propranolol	20,6	1,6	20,2	2,1	19,7	3,6	98%	96%
ranitidin	3,2	0,2	0,3	0,2	0,1	0,1	10%	4%
teofilin	23,9	1,4	13,5	0,9	5,6	0,7	56%	24%

Pri 37°C, torej pri standardnih pogojih za merjenje permeabilnosti na Caco-2 celicah, smo jasno ločimo med *in vitro* slabo permeabilnimi učinkovinami s P_{app} nižjimi od 5×10^{-6} ter *in vitro* dobro permeabilnimi učinkovinami s P_{app} višjimi od 20×10^{-6} .

Postopek z večjim številom učinkovin v posameznem poskusu razvijamo, da bi lahko raziskali vplive različnih parametrov na *in vitro* permeabilnost različnih učinkovin v razmeroma kratkem času. Eden izmed teh parametrov je tudi temperatura. Zato smo že z pilotnim setom izmerili permeabilnost na Caco-2 celicah pri različnih temperaturah.

Iz rezultatov je razvidno, da so permeabilnostni koeficienti močno odvisni od temperature. To temperaturno odvisnost se lepo vidi na grafu 1. Permeabilnosti pri 20°C dosega le največ 70% permeabilnosti pri 37°C. Izstopajo naproksen, fluvastatin, furosemid, ketoprofen ter propranolol. Razlika permeabilnosti med 37°C in 4°C je dosti bolj očitna, in vse učinkovine dosega največ 55% permeabilnosti pri 37°C. Izjema pri tem je le propranolol, katerega permeabilnost ima zelo majhno odvisnost od temperature, kar so ugotovili tudi drugi raziskovalci (34). Vpliv temperature pri *in vitro* poskusih je še slabo raziskano področje. Tako lahko nakažemo le, da je predvsem za absorpcijo visoko permeabilnih spojin temperatura zelo pomembna. Ne vemo še v kolikšni meri je osnova mehanizma sprememba aktivnega transporta in koliko k temu vplivu prispeva sprememba fluidnosti membran ali morda česa tretjega.



Graf 1: P_{app} pri različnih temperaturah izmerjen z osnovnim setom na Caco-2 celicah

Za iskanje zakonitosti vpliva temperature, ali kakšnega drugega parametra, je potrebno pridobiti rezultate čim večjega števila učinkovin. Z možnostjo pridobitve bolj signifikantnih rezultatov smo raziskave o vplivu temperatur, kot primerom uporabe, nadaljevali tudi z razširjenim setom učinkovin.

4.2 Prehod iz pilotnega seta na razširjena seta

Pri povečevanju števila spojin smo najprej preiskali literaturo (6, 16, 18, 19, 21, 23, 26, 27, 28, 29, 30 in 31). V literaturi smo iskali učinkovine katerim je že bila izmerjena permeabilnost s katerokoli *in vitro* metodo in učinkovine, predhodno klasificirane v BCS klasifikacijo. Tako smo ustvarili podatkovno bazo približno 200 učinkovin, ki je poleg permeabilnostnih lastnosti vsebovala tudi farmakološko delovanje, fizikalno kemijske lastnosti učinkovin ter ceno.

Zaradi varnostnega vidika pri delu smo kot neprimerne najprej označili vse citotoksične in preveč toksične. Prav tako smo izločili nestabilne (na podlagi strukture), predrage in nedostopne učinkovine. Ostalo je 88 primernih učinkovin, ki smo jih zaradi nevarnosti tvorjenja slabo topnih soli na podlagi literaturnih podatkov za pKa (18, 19, 20, 23, 26, 30 in 31) razdelili v dva seta (set kislin in set baz). Nato smo jim začeli preverjati topnost.

4.2.1 Topnost učinkovin

Preverili smo topnost učinkovin v posameznih topilih za osnovno raztopino. Vsem učinkovinah smo po postopku opisanem v poglavju o metodah izbrali najprimernejše topilo. Potem smo preverili obnašanje učinkovin v Ringerjevem pufri. Na tej stopnji smo morali izločiti le reserpin, saj se je že samostojno oboril po redčenju osnovne raztopine z Ringerjevim pufrom.

4.2.2 Razvoj metode LC-MS/MS

4.2.2.1 Optimizacija MS analizatorja

Za optimizacijo detektorja smo pripravili približne koncentracije učinkovine 1 mg/L v 50% acetonitrilu. Tako pripravljene učinkovine smo prepipetirali na mikrotitersko ploščo. Programska oprema MassHunter (Optimizer) nam je omogočila avtomatsko optimizacijo ključnih nastavitvev masnega analizatorja. Izmed predlaganih nastavitvev za način ionizacije (pozitivni/negativni), MRM prehod, fragmentator ter kolizijsko energijo smo izbrali tisto kombinacijo parametrov, ki je imela najvišji odziv za posamezno spojino. Izbrane nastavitve za učinkovine uporabljene v permeabilnostnih poskusih so predstavljene v preglednici XV za set kislin in v preglednici XVI za set baz. Ostale nastavitve MS analizatorja so bile izbrane na osnovi predhodnih izkušnjah dela z večjim številom

različnih spojin.

Po pričakovanjih je bilo iz tako velikega nabora nekaj učinkovin z zelo nizkim odzivom. S tem razlogom smo izločili acetilsalicilno kislino, kumarin, primakinin, pirazinamid, sulidak in tiamin. Prav tako smo izločili kinidin, ki je stereoizomer kinina. Ker se njuni strukturi razlikujeta le v prostorski razporeditvi imata enako molsko maso ter MRM prehod in ju posledično ne moremo ločiti izbrano kromatografijo in/ali masno spektrometrijo.

4.2.2.2 Razvoj kromatografske metode

Za razvoj kromatografske metode smo pripravili mešanico vseh učinkovin v setu kislin v eni raztopini ter vseh učinkovin v setu baz v drugi raztopini. Kot topilo smo uporabili 25% acetonitril, koncentracije pa so bile v velikostnem razredu najvišjih pričakovanih akceptorskih koncentracij.

Za začetek razvoja LC-MS/MS analizne metode za set baz smo prevzeli način spiranja kolone, kot pri analizni metodi pilotnega seta, ki je bila že predhodno razvita. Prav tako smo začeli z enako mobilno fazo sestavljeno iz 2 mM amonijevega acetata ter acetonitril. S pomočjo prilagajanja razmerja med amonijevem acetatom in acetonitrirom v različnih intervalih smo dobili nekatere lepo oblikovane kromatografske vrhove. 2 mM amonijev acetat smo poskusili zamenjati še z 2 mM amonijevem acetatom s pH 4. Vendar taka kombinacija mobilnih faz ni izboljšala rezultatov. Poskusili smo tudi kombinacijo acetonitrila in 0,1% raztopina mravljične kisline. Na osnovi občutljivosti metode smo izbrali mobilno fazo za set baz s 0,1% raztopina mravljične kisline ter acetonitril, saj je zaradi nižjega pH-ja omogočila boljšo pozitivno ionizacijo spojin.

Tudi pri setu kislin smo začeli razvoj kromatografske metode z načinom spiranja enakim kot pri LC-MS/MS metodi za pilotni set ter mobilno fazo amonijevega acetata in acetonitrila. Vendar ta kombinacija ni dala tako lepih vrhov. Zato smo iskali boljšo kombinacijo mobilne faze. Tako smo preskusili 2 mM amonijev acetat s pH 4 ter acetonitril, 0,1% mravljično kislino in acetonitril. Na koncu smo pa še zamenjali organsko komponento (acetonitril) mobilne faze za metanol ter ga preskusili v kombinaciji z 2 mM amonijevim acetatom, 2 mM amonijevim acetatom s pH 4 in 0,1 % mravljično kislino. Obe kombinaciji s mravljično kislino sta podajale slabšo občutljivost spojin, ki jih masni

analizator negativno ionizira. Izmed ostalih kombinacij pa je najlepše kromatografske vrhove dala kombinacija 2 mM amonijevega acetata in metanola, ki pa smo jih še izboljšali s prilagajanjem sheme spiranja kolone.

Kljub temu, da smo uporabili dve različni kombinaciji mobilnih faz, se pričakovano nekatere močno polarne učinkovine niso zadržale na koloni. Zato smo izločili etambutol, metformin, naldiksično kislino, traneksaminsko kislino ter valprojsko kislino. Izločili smo tudi klorkinin, ker je bil njegov kromatografski vrh preveč popačen.

4.2.2.3 Karakteristike LC-MS/MS metode

Za vse učinkovine smo poleg poskusov na črevih naredili tudi umeritveno premico $y=kx+n$ v kateri je y odziv detektorja in x koncentracije učinkovin. Umeritveno premico smo vrednotili s Pearsonovim koeficientom (R). Z njim smo pokazali, da smo pri obeh setih v linearnem območju. Večina Pearsonovih koeficientov je višjih od 0,99 kar kaže na linearnost umeritvenih premic. Nekaj učinkovin ima nižji Pearsonov koeficient kar kaže da smo pri učinkovini z umeritveno premico tudi v nelinearnem območja. Razlog za to pri nekaterih učinkovinah je, da smo bili pod mejo kvantifikacije z nekaterimi nižjimi točkami umeritvene premice.

Preverjali smo tudi ponovljivost analitske metod, ki smo jo vrednotili z RSD večkratnega (4-8) injiciranja. Od 63 od 68 učinkovin ima manjši RSD od 7%. Kar pomeni, da ima naša metoda dobro ponovljivost.

$$LOD = \frac{3,3 \times \sigma}{S}$$

Enačba 18

LOD meja detekcije

σ standardna deviacija odziva

S naklon umeritvene premice

Prav tako smo kot karakteristiko računali mejo detekcije (LOD) po enačbi 18, ki smo jo prevzeli po ICH smernici za validacijo analitskih metod Q2(R1) (35).

Pri izračunu permeabilnostnega koeficienta smo upoštevali le tiste točke v območju katerih so bili naši vzorci. Tako se pri večini učinkovin izboljšal tudi Pearsanov koeficient. V

našem primeru je uporaba analitske metode zelo specifična. Saj smo jo uporabili za analizo vzorcev pridobljenih s pomočjo živega tkiva. Pri takih vzorcih je variabilnost zelo velika in analitska napaka ne vpliva dosti na končni rezultat.

Preglednica XXI: Pregled naklona, odseka in Pearsonovega koeficienta umeritvene premice, ponovljivosti večkratnega injiciranja ter izračunana meja detekcije

učinkovina	naklon UP (k) [$\times 10^{-9}$]	odsek UP (n)	Pearsonov koeficient UP (R)	RSD večkratnega injiciranja	LOD [nmol/L]
acetazolamid	20,1	-189	0,9999	2,5%	23,7
aciklovir	66,0	-68	1,0000	1,3%	13,0
amantadin	306,8	948	0,9994	3,9%	7,1
amilorid	80,7	12229	0,9606 (0,9993*)	1,7%	304,4
amitriptilin	42,8	-2254	0,9970	5,2%	81,2
amlodipin	64,6	-13968	0,9716 (0,9898*)	3,3%	512,6
atenolol	70,4	9846	0,9956	1,7%	197,1
bendroflumetiazid	272,2	9219	0,9970	1,0%	65,8
cimetidin	78,5	7541	0,9865 (0,9967*)	2,8%	175,0
ciprofloksacin	85,5	-550	0,9999	2,9%	17,6
dapson	101,1	1584	0,9967	3,4%	34,5
darunavir	1611,1	-46521	0,9865 (0,9900*)	1,2%	69,9
deksklorfeniramin	620,1	1641	0,9995	2,0%	12,7
dezipramin	493,4	391	0,9991	2,3%	17,8
diazepam	129,4	-87	0,9998	6,5%	8,2
domperidon	57,0	-15161	0,9507 (0,9789*)	NP**	626,9
etionamid	125,5	-605	0,9954	NP**	74,4
feksofenadin	4401,5	-170779	0,9760 (0,9853*)	1,2%	94,0
fenazon	60,3	461	0,9991	1,7%	18,3
fenoterol	36,1	3434	0,9969	2,9%	165,1
fluvastatin	64,6	-13636	0,9712 (0,9853*)	1,9%	516,1
furosemid	72,4	-2642	0,9991	1,3%	91,4
glibenklamid	1415,9	-36514	0,9986	1,1%	44,3
glipizid	1265,8	-3068	1,0000	0,4%	3,6
grizeofulvin	615,8	-5191	0,9990	1,6%	18,9
guanabenz	128,8	3593	0,9978	3,5%	69,5
haloperidol	471,8	-7748	0,9985	3,9%	23,2

učinkovina	naklon UP (k) [$\times 10^{-9}$]	odsek UP (n)	Pearsonov koeficient UP (R)	RSD večkratnega inijiciranja	LOD [nmol/L]
hidroklorotiazid	39,8	-403	0,9997	2,0%	21,4
ibuprofen	58,9	5829	0,9998	4,9%	8,4
indinavir	42,1	-388	0,9954	NP**	357,0
indometacin	237,9	-3316	0,9981	0,7%	26,2
izoniazid	138,2	1373	0,9994	0,7%	14,8
karbamazepin	1454,0	10249	0,9996	0,6%	12,6
ketoprofen	266,9	744	1,0000	1,4%	3,3
kinidin	40,7	3240	0,9883 (0,9949*)	2,5%	162,3
klomipramin	31,7	-3527	0,9891	2,7%	201,7
klonidin	20,9	279	0,9996	5,9%	29,0
klorotiazid	342,8	-817	1,0000	6,1%	4,0
klorpromazin	9,3	-2970	0,9803 (0,9916*)	3,4%	641,8
klorzoksazon	121,1	1033	0,9992	2,6%	16,8
kofein	35,9	836	0,9988	4,8%	52,5
lizinopril	239,0	-16313	0,9957	0,9%	196,8
loperamid	368,8	-46454	0,9321 (0,97285*)	NP**	163,6
metoklopramid	760,1	447	0,9999	1,4%	3,3
metoprolol	142,0	6705	0,9962	2,3%	92,5
metronidazol	87,7	1127	0,9976	2,5%	29,0
nadolol	184,2	10182	0,9966	0,8%	86,9
naproksen	177,7	490	0,9995	3,0%	12,8
nitrofurantoin	55,1	464	0,9995	0,4%	27,3
norfloksacin	65,8	220	0,9993	2,4%	39,9
ofloksacin	167,2	13538	0,9888 (0,9995*)	1,9%	158,4
oksazepam	177,9	100	0,9999	1,2%	4,8
paracetamol	92,0	224	0,9999	1,8%	4,8
pindolol	94,1	1291	0,9971	3,6%	32,1
piroksikam	606,5	-559	1,0000	0,8%	1,8
pravastatin	34,3	1180	0,9992	1,3%	85,8
prometazin	153,8	-5022	0,9930	11,6%	50,2
propranolol	120,2	2794	0,9983	2,0%	62,3
ranitidin	141,6	13440	0,9845 (0,9988*)	1,6%	187,1
risperidon	1200,1	-11208	0,9962	5,0%	18,5
sildenafil	45,3	-2252	0,9970	11,1%	81,5

učinkovina	naklon UP (k) [$\times 10^{-9}$]	odsek UP (n)	Pearsonov koeficient UP (R)	RSD večkratnega injeciranja	LOD [nmol/L]
sulfadiazin	123,8	191	1,0000	1,7%	5,7
sulfasalazin	296,4	2504	0,9995	0,6%	26,8
sumatriptan	257,9	5960	0,9934	2,5%	48,6
teofilin	20,7	214	0,9997	2,2%	26,3
terbutalin	206,4	2231	0,9954	2,7%	40,7
timolol	358,2	5275	0,9965	1,7%	35,5
trimetoprim	170,3	4027	0,9921	4,1%	53,3

* R uporabljenega odseka umeritvene premice, ** ni podatka

4.2.3 Priprava osnovnih raztopin

Pred permeabilnostnim poskusom je bilo treba pripraviti osnovne raztopine. Učinkovine smo razporedili glede na izbrana topila za osnovno raztopino. Nato smo spojine razvrstili glede na donorsko koncentracijo ter razpoložljivo količino. Tako smo zagotovili najbolj racionalno porabo učinkovin.

Zaradi težav z obarjanjem pri pripravi osnovnih raztopin za set baz smo topilo etanol nadomestili z mešanico etanola in DMSO v razmerju 1:1. Kljub spremembi so se nekatere učinkovine po dodatku osnovnih raztopin v Ringerjev pufer oborile. Da bi ugotovili katere učinkovine so se oborile, smo oborjeno raztopino v Ringerjevem pufru centrifugirali 10 minut pri 10.000 obratih ter supernatant redčili v 50% acetonitrilu. Za primerjavo smo vzeli osnovno raztopino v acetonitrilu v katerem se ni pojavila oborina. Obe raztopini smo redčili v 50% acetonitrilu ter jih analizirali z LC-MS/MS metode. Na podlagi razlike vsebnosti učinkovin smo sklepali na sestavo oborine, saj so bile vsebnosti nekaterih učinkovin v raztopini z Ringerjevim pufrom zaradi oborine več kot 50% manjše, kot tiste v raztopini s 50% acetonitrilom. Zaradi tega razloga smo izločili felodipin, ketokonazol, sakvinavir, sertralin in terfenadin.

Brez izločenih učinkovin se pri pripravi donorske raztopine ni pojavila oborina in lahko smo začeli s permeabilnostnimi poskusi.

4.3 Poskusi z razširjenima setoma

4.3.1 Preliminarni poskusi z razširjenima setoma

Donorske koncentracije za prve preliminarne poskuse smo določili tudi glede na morebitne gastrointestinalne stranske učinke spojin in s tem glede na njihovo predvideno toksičnost za tkivo v *in vitro* pogojih. Preliminarne poskuse permeabilnosti smo delali na črevih z difuzijskimi celicami in PAMPA sistemu. Poskuse smo izvajali na majhnem številu paralel.

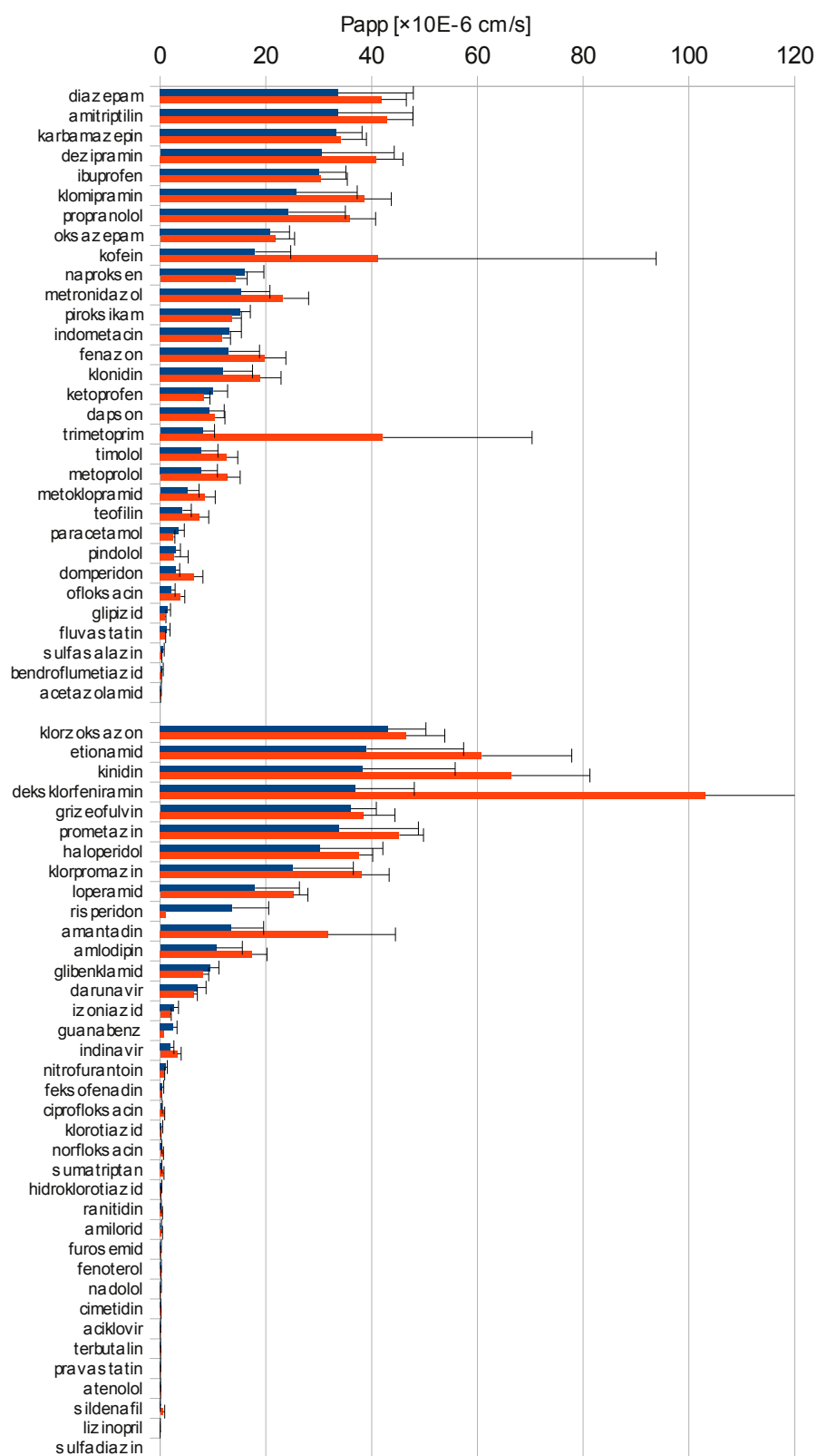
Pri poskusih z difuzijskimi celicami je bila vitalnost tkiva slaba. Permeabilnost nizko permeabilnih učinkovin je bila od 2-5 krat višja od predhodno posamezno izmerjenih vrednosti v permeabilnostnem laboratoriju FFA. Kljub temu so bili rezultati dovolj dobri, da so nakazali območje permeabilnostnih koeficientov ter koncentracij akceptorskih raztopin. S temi rezultati smo lahko preverili, da so koncentracije učinkovin v akceptorskih raztopinah v ustreznem območju analizne metode. Na podlagi dobljenih podatkov smo lahko ponovno prilagodili donorske koncentracije. Predvsem smo dodatno znižali donorske koncentracije visoko permeabilnim učinkovinam, ki so tudi v analizi dajale visoke odzive.

Zaradi slabe vitalnosti tkiv smo preverili vitalnost tkiva po dodatku posameznih delnih osnovnih raztopin (A, B, C, D za set kislin in A, B, C, D, E, F za set baz). Vitalnost tkiva smo spremljali pred dodatkom posameznih osnovnih in po dodatku osnovne raztopine ter 15 minut po dodatku. V teh časovnih točkah smo odčitali TEP in KST. V kolikor je bila vitalnost dobra, smo po zadnjem odčitavanju podatkov dodali naslednjo delno osnovno raztopino ter tako zvečali količino spojin v donorski raztopini. Po nekaj ponovitvah smo imeli v donorski raztopini vse učinkovine.

S poskusi optimizacije vitalnosti nismo mogli določiti posamezne učinkovine oziroma posamezne osnovne raztopine, ki bi bila vzrok za slabo vitalnost tkiva. V sklopu poskusa vitalnosti smo tudi preverjali vpliv učinkovin v topilu osnovne raztopine v primerjavi s topilom osnovne raztopine. S tem poskusom smo lahko določili v kolikšni meri je za slabo vitalnost odgovorno samo topilo in koliko učinkovine. Ugotovili smo, da na vitalnost v večji meri kot učinkovine vpliva vsebnost DMSO v donorski raztopini. Zaradi tega smo se odločili za zmanjšanje volumna osnovne raztopine, ki ga dodamo v donorsko raztopino. Tako se bo zmanjšala tudi vsebnost DMSO v donorski raztopini. Koncentracije učinkovin

v osnovni raztopini smo ustrezno povečali tako, da se končna koncentracija učinkovin v donorski raztopini ni spremenila.

Poleg poskusov na črevih podgan smo izvedli tudi PAMPA poskus. Tudi ti rezultati so nam služili za orientacijo. Poskus smo izvajali 3 ure v 4 paralelah. Preskusili smo tudi dve različni sestavi donorske raztopine (PBS in 10% metanol v PBS). Rezultati so predstavljeni na grafu 2. Z modro barvo so označeni rezultati pridobljeni z donorsko raztopino na osnovi PBS, z rdečo barvo pa rezultati pridobljeni z donorsko raztopino s PBS z 10 % metanolom. Slednja kombinacija se standardno uporablja za določanje PAMPA permeabilnosti slabo topnih učinkovin. Učinkovinam katerim je bil izmerjen permeabilnostni koeficient nad 20×10^{-6} cm/s smo v nadaljevanju zmanjšali donorske koncentracije. Na grafu 2 so učinkovine razdeljene tudi na dve skupini. In sicer v prvi zvrha so učinkovine katerih je literaturni delež absorbirane učinkovine nad 85%, v drugi skupini pa so učinkovine z literaturnim deležem absorbirane učinkovine pod 85%. Meritve za sulfasalazin na grafu 2 manjkajo zaradi težav pri analizi.



Graf 2: Permeabilnost pridobljena s PAMPA poskusom. Modro so označene permeabilnosti z uporabo PBS, rdeče pa 10% MeOH v PBS

4.3.2 Stabilnost osnovnih raztopin

Preverjali smo tudi vsebnost učinkovin v osnovnih raztopinah skozi čas. S staro osnovno raztopino smo pripravili tri raztopine, ki so imele koncentracije treh točk umeritvene premice. Tako smo primerjali raztopine nominalno enakih koncentracij pripravljene z osnovnimi raztopinami starimi nekaj tednov in tiste pripravljene s svežimi osnovnimi raztopinami. Zmanjšanje odziva za nekatere učinkovine smo pripisali razpadu. Ugotovili smo, da je razpad vseh učinkovin manjši od 20% po sedmih dneh. In ker smo pri vsakem poskusu pripravili umeritveno premico na dan poskusa smo zaključili, da lahko brez pomislekov pripravljamo osnovno raztopino dan ali dva pred poskusom. To je zelo pomembno že zaradi časa potrebnega za pripravo osnovne raztopine, v prihodnje pa bo seveda zaradi učinkovitosti dela smiselno, zaradi ustrezne stabilnosti pa možno, opraviti tudi serije poskusov z istimi osnovnimi raztopinami.

4.3.3 Permeabilnostni poskusi

Po določitvi optimalnih donorskih koncentracij na podlagi preliminarnih poskusov smo merili permeabilnost na večjem številu paralel. S tema dvema ukrepoma smo izboljšali vitalnost ter tako izboljšati kvaliteto dobljenih permeabilnostnih koeficientov.

4.3.3.1 Poskus permeabilnost na podganjih črevih

Z zmanjšanjem donorskih koncentracij smo dosegli sprejemljivo vitalnost tkiva in pridobili uporabne meritve. Tako smo pri setu baz na podlagi vitalnosti, ki je predstavljena v preglednici XXI, imeli 11 vitalnih paralel. Pri setu kislin pa na podlagi vitalnosti, ki je predstavljena v preglednici XXII, opredelili 9 paralel z dobro vitalnostjo. Ob tem je seveda potrebno omeniti, da le redko ob koncu poskusa vse uporabljene segmente tkiva ocenimo kot ustrezne glede vitalnosti in integritete in da zaradi same narave dela z živim tkivom v *in vitro* pogojih nimamo možnosti za zagotavljanje vitalnosti in integritete, ampak je potrebno ta dva parametra nadzorovati ter se o ustreznosti meritev odločati po poskusu. Običajno se trudimo s poskusi oziroma s serijo poskusov zagotoviti vsaj 3 do 4 meritve na segmentih tkiva z ustrezno vitalnostjo in integriteto. Celic z vitalnim tkivom je bilo v tem poskusu torej več kot dovolj za zanesljiv in statistično močen izračun permeabilnostnega koeficienta.

Preglednica XXII: Vitalnost seta baz

	C1/6	C2/6	C3/6	C4/6	C5/6	C6/6	C1/8	C2/8	C3/8	C4/8	C5/8	C6/8	C7/8	C8/8
$\overline{\text{TEP}}_{140}$ [mV]	-2,1	-1,5	-0,5	-1	-1,7	-3,9	-3,4	-1,3	-2,1	/	-2	-2,1	-1,4	-0,8
$\overline{\text{TEU}}_{20-140}$ [Ωcm^2]	44	35	/	53	52	47	51	24	44	/	35	32	32	22
$\Delta\text{TEP}_{\text{GLU}}$ [mV]	-0,6	-0,2	/	-2,3	-2,5	-2,3	-0,7	-0,7	-0,1	/	-0,4	-0,8	-0,2	-0,2
Vitalnost	DA	DA	NE	DA	DA	DA	DA	DA	DA	NE	DA	DA	DA	NE

Preglednica XXIII: Vitalnost seta kislin

	C1/8	C2/8	C3/8	C4/8	C5/8	C6/8	C7/8	C8/8	C1/6	C2/6	C3/6	C4/6	C5/6	C6/6
$\overline{\text{TEP}}_{140}$ [mV]	-1	0,2	-0,5	-0,2	-1	-0,3	-0,4	-0,2	-1,6	-2,5	-1,5	-2,1	-0,6	-1,1
$\overline{\text{TEU}}_{20-140}$ [Ωcm^2]	31	9	24	/	36	23	12	/	40	39	48	45	28	29
$\Delta\text{TEP}_{\text{GLU}}$ [mV]	-3,5	-3,2	-0,8	-0,1	-0,4	-0,2	-0,4	-1,2	-0,5	-1,2	-0,3	-0,9	-2	-1
Vitalnost	DA	NE	DA	NE	DA	NE	NE	NE	DA	DA	DA	DA	DA	DA

Izračunali smo tudi masno bilanco vseh učinkovin v poskusu. Masne bilance nekaterih spojin so nizke (pod 50%). Med njimi najdemo amitriptilin (22%), amlodipin (38%), dezipramin (46%), haloperidol (34%), klomipramin (16%), klorpromazin (15%) in loperamid (35%). Nizka masna bilanca je lahko posledica metabolizma učinkovine, razpada učinkovine ali vezave učinkovine na laboratorijski pribor. Vsekakor pa je pri novi zasnovi poskusa z velikim številom spojin z zelo nizko donorsko koncentracijo bilo moč pričakovati, da se bo nizka masna bilanca pridružila faktorjem na osnovi katerih bomo morali nekatere učinkovine izločiti iz nadaljnje uporabe v testnem setu.

Kljub dobri vitalnosti uporabljenih segmentov tkiva, so mnogi izmerjeni permeabilnostni koeficienti višji v primerjavi s predhodno izmerjenimi permeabilnostnimi koeficienti. Ti so bili v preteklosti izmerjeni v permeabilnostnem laboratoriju FFA za vsako učinkovino posamezno in so podani v preglednici XXIV. Pojav višanja permeabilnosti pri poskusih z večjim številom učinkovinami naenkrat so opazili tudi nekateri drugi raziskovalci (36). Pri njih je bil povprečen faktor zvišanja permeabilnosti 1,4 pri poskusu s sedmimi učinkovinami hkrati.

Iz preglednice je razvidno tudi, da se nekateri P_{app} ujemajo s tistimi, ki so bili izmerjeni posamezno. To velja za aciklovir, furosemid, naproksen, norfloksacin, ofloksacin,

paracetamol in pravastatin. Zaradi dejstva, da so absolutne vrednosti permeabilnostnih koeficientov določenih učinkovinam v setih lahko drugačne, kot tiste dobljene v posamičnih meritvah, vsaj trenutno, ko pojava še ne razumemo in ponovljivosti rezultatov med poskusi ne poznamo, postopka ne uporabimo za biofarmacevtsko klasifikacijo teh učinkovin. Ob ustrezni ponovljivosti dobljenih permeabilnostnih koeficientov pri enakih pogojih dela, pa to nikakor ne zmanjša uporabnosti na novo postavljenega postopka za raziskovanje lastnosti *in vitro* modelov za določanje permeabilnosti in zunanjih dejavnikov, ki na permeabilnost vplivajo. Ker je smer pomika vrednosti P_{app} spojin, ki jim v sočasnih meritvah določimo drugačne vrednosti vedno enaka – torej proti višjim vrednostim, tudi možnosti hitre biofarmacevtske klasifikacije na osnovi tovrstnih poskusov ne smemo vnaprej izločiti. Vsekakor pa bo potrebno na novo določiti referenčne mejne vrednosti na osnovi meritev pridobljenih na ta način. Zelo dobro bi bilo tudi poznati variabilnost med posameznimi poskusi. Ta se bo zelo hitro ocenila z nadaljnjim delom z razvitim postopkom.

Preglednica XXIV: Pregled permeabilnostnih koeficientov, njihove variabilnosti, masne bilance učinkovin ter permeabilnostni koeficienti pridobljeni predhodno v našem laboratoriju

Učinkovina	Število paralel	P_{app} [$\times 10^{-6}$ cm/s]	SD [$\times 10^{-6}$ cm/s]	Masna bilanca [%]	P_{app} posamezno [$\times 10^{-6}$ cm/s]
acetazolamid	9	9,8	3,3	92%	
aciklovir	9	10,1	5,0	93%	5,5
amantadin	11	39,9	9,2	100%	
amilorid	11	7,8	2,1	102%	
amitriptilin	11	11,8	5,6	23%	
amlodipin	11	10,6	4,7	38%	
atenolol	11	6,6	1,9	102%	3,7
bendroflumetiazid	9	3,6	1,5	63%	
cimetidin	11	9,0	2,0	105%	2,1
ciprofloksacin	11	8,1	3,1	99%	3,7
dapson	11	30,4	5,9	102%	
darunavir	9	6,9	2,9	80%	
deksklorfeniramin	11	27,2	7,2	61%	

Učinkovina	Število paralel	P_{app} [$\times 10^{-6}$ cm/s]	SD [$\times 10^{-6}$ cm/s]	Masna bilanca [%]	P_{app} posamezno [$\times 10^{-6}$ cm/s]
dezipramin	11	11,7	4,4	46%	
diazepam	11	34,6	6,5	61%	
domperidon	11	37,6	18,6	61%	
etionamid	11	39,0	8,3	89%	
feksofenadin	9	13,7	7,4	86%	
fenazon	11	40,9	7,2	102%	24,7
fenoterol	11	8,3	4,1	103%	
fluvastatin	9	17,9	5,0	87%	4,3
furosemid	9	8,6	4,0	88%	5,9
glibenklamid	9	6,5	1,9	85%	
glipizid	9	8,6	2,5	89%	
grizeofulvin	9	36,7	9,2	75%	
guanabenz	11	30,8	8,1	80%	10,1
haloperidol	11	5,0	1,7	34%	
hidroklorotiazid	9	19,8	9,0	88%	4,4
ibuprofen	9	42,2	10,7	94%	32
indinavir	11	7,6	1,8	83%	
indometacin	9	20,3	4,7	85%	11,8
izoniazid	9	6,8	1,9	74%	
karbamazepin	9	48,6	11,1	86%	15,8
ketoprofen	9	30,5	8,9	97%	18,5
kinidin	11	33,2	6,6	89%	15,3
klomipramin	11	10,4	5,5	18%	
klonidin	11	59,2	10,2	104%	
klorotiazid	9	7,2	2,7	88%	
klorpromazin	11	10,1	5,5	18%	
klorzoksazon	9	88,3	21,4	81%	
kofein	11	54,8	9,5	107%	24
lizinopril	9	5,0	2,4	90%	
loperamid	11	20,3	9,7	35%	
metoklopramid	11	37,4	9,1	97%	
metoprolol	11	34,9	6,7	105%	18,4
metronidazol	11	33,0	7,1	105%	
nadolol	11	5,5	2,2	105%	
naproksen	9	34,2	11,4	92%	37,3
nitrofurantoin	9	4,5	1,9	88%	

Učinkovina	Število paralel	P_{app} [$\times 10^{-6}$ cm/s]	SD [$\times 10^{-6}$ cm/s]	Masna bilanca [%]	P_{app} posamezno [$\times 10^{-6}$ cm/s]
norfloksacin	11	7,9	3,4	100%	6,6
ofloksacin	11	11,9	2,3	101%	9,6
oksazepam	9	27,9	7,3	76%	
paracetamol	9	20,0	4,0	83%	21
pindolol	11	30,0	7,5	100%	
piroksikam	9	26,8	9,1	91%	
pravastatin	9	5,4	2,2	92%	2,5
prometazin	11	14,4	6,3	20%	
propranolol	11	26,3	6,4	80%	11,1
ranitidin	11	7,7	2,3	102%	4
risperidon	11	39,0	9,5	82%	
sildenafil	11	34,6	4,4	83%	
sulfadiazin	9	13,3	3,2	90%	
sulfasalazin	9	4,1	1,6	87%	
sumatriptan	11	9,1	3,0	101%	
teofilin	11	26,6	4,9	102%	15,5
terbutalin	11	7,6	3,3	100%	
timolol	11	27,5	5,3	102%	9,2
trimetoprim	11	24,9	4,3	103%	

Tako smo z novo razvitim postopkom pridobili veliko število permeabilnostnih koeficientov zelo različnih učinkovin v zelo kratkem času. Višanje zmogljivosti *in vitro* nizko zmogljivim metodam je prav gotovo največja prednost razvitega postopka. Ker so vse učinkovine v enem poskusu, se izognemo tudi vsem morebitnim variabilnostim, ki jih prinesejo različna tkiva, v različnih poskusih, v različnem časovnem okviru. Tako je ta postopek zelo dober za preverjanje različnih vplivov na permeabilnost, saj s tem, da so vse učinkovine v enem poskusu zagotovimo, da so vse izpostavljene popolnoma enakim pogojem.

Moč postopka in uporabnost se bo gotovo pokazala v nadaljnjih raziskavah na različnih *in vitro* modelih za določanje permeabilnosti ter nadaljnjo uporabo.

4.3.3.2 PAMPA poskus

Tako kot za pilotni set smo tudi za razširjen set učinkovin preverili uporabo postopka ter s pomočjo PAMPA poskusa raziskali odvisnosti permeabilnosti od temperature. Poleg tega

smo ugotavljali tudi vpliv 10% metanola kot priporočenega sotopila v poskusih s PAMPA modelom. Vsi numerični rezultati so predstavljeni v tabeli XXV.

Preglednica XXV: Permeabilnostni koeficienti pridobljeni s PAMPA poskusom pri različnih temperaturah

Učinkovina	37 °C				20 °C				4 °C			
	PBS		10 % MeOH PBS		PBS		10 % MeOH PBS		PBS		10 % MeOH PBS	
	P _{app}	SD	P _{app}	SD	P _{app}	SD	P _{app}	SD	P _{app}	SD	P _{app}	SD
ibuprofen	36,5	5,4	31,1	3,1	20,4	1,8	25,8	2,6	3,60	3,56	12,6	4,7
karbamazepin	31,1	2,3	30,2	1,4	21,1	1,3	26,6	1,5	3,90	4,33	14,6	3,8
oksazepam	31,1	3,6	30,2	2,3	16,7	1,1	23,5	2,2	2,18	2,53	11,3	4,0
kofein	30,3	5,6	22,5	4,0	22,0	2,7	27,4	1,4	11,3	4,5	7,06	3,07
propranolol	29,9	4,1	21,5	2,9	20,1	2,6	23,8	1,2	8,97	3,70	6,51	2,41
amantadin	27,6	5,4	19,0	3,3	13,9	1,7	16,0	1,4	8,42	3,97	3,71	2,62
dezipramin	26,9	3,0	20,1	2,2	20,7	3,1	23,7	1,3	8,80	2,83	7,97	2,21
diazepam	25,8	2,9	18,9	1,9	19,3	2,8	23,6	1,3	7,48	1,79	7,58	1,79
klonidin	21,7	3,2	15,9	2,4	14,0	1,5	15,7	1,0	8,60	4,04	4,25	2,55
prometazin	21,0	2,0	16,3	1,6	16,9	2,5	21,0	0,9	9,21	2,29	9,61	2,29
amitriptilin	20,4	2,0	15,6	1,4	17,0	2,1	19,6	1,0	9,03	1,98	8,79	1,66
klomipramin	19,3	2,3	14,4	1,5	13,9	1,8	18,6	1,5	7,83	1,74	8,78	1,99
naproksen	18,0	1,8	14,4	1,7	9,8	0,8	11,6	1,4	2,78	3,48	9,01	4,17
piroksikam	16,7	1,2	12,9	1,0	10,1	0,6	10,2	0,8	2,37	2,85	7,63	3,37
fenazon	16,4	2,8	11,9	2,2	11,4	0,9	12,9	1,0	8,91	4,31	4,35	2,89
metronidazol	15,5	3,2	11,4	1,9	8,94	0,71	9,87	0,72	9,28	3,59	4,59	2,84
metoprolol	15,0	2,5	11,0	1,6	7,26	0,47	8,08	0,61	7,14	3,70	2,75	2,17
timolol	14,8	2,4	10,9	1,7	7,56	0,49	8,54	0,75	7,15	3,68	2,76	2,14
indometacin	13,1	1,0	10,6	1,2	6,80	0,55	7,84	0,97	1,59	1,90	7,61	3,51
metoklopramid	11,3	2,3	7,72	1,49	5,57	0,41	6,10	0,61	5,88	3,32	2,05	1,89
ketoprofen	10,5	0,7	7,98	0,96	4,93	0,60	5,52	0,78	2,87	3,70	7,79	4,03
dapson	9,89	1,9	6,77	1,1	5,92	0,25	5,76	0,43	10,8	4,6	5,37	3,46
trimetoprim	9,49	1,75	6,94	1,22	5,26	0,29	5,39	0,56	8,47	3,60	3,55	2,45
pindolol	7,97	1,45	5,77	0,90	3,35	0,17	3,60	0,35	7,69	3,70	2,94	2,42
domperidon	7,71	1,46	5,38	0,87	2,47	0,28	3,37	0,65	3,86	2,02	2,70	2,12
teofilin	7,19	1,42	5,79	1,09	3,88	0,21	4,69	0,39	10,6	4,7	4,47	3,52

	37 °C				20 °C				4 °C			
	PBS		10 % MeOH PBS		PBS		10 % MeOH PBS		PBS		10 % MeOH PBS	
paracetamol	4,39	0,32	3,60	0,40	1,62	0,26	1,86	0,31	3,59	4,44	9,58	4,43
nitrofurantoin	3,83	0,52	3,11	0,48	1,53	0,38	1,78	0,38	4,66	5,42	12,2	5,0
izoniazid	3,34	0,34	3,07	0,41	1,37	0,24	1,66	0,32	3,04	3,72	7,65	3,49
ofloksacin	3,25	0,69	2,54	0,51	1,12	0,16	1,25	0,23	6,43	2,91	2,60	1,90
glipizid	2,42	0,22	1,67	0,24	0,67	0,14	0,66	0,14	1,43	2,01	4,08	2,72
fluvastatin	2,31	0,25	2,33	0,44	0,44	0,16	0,91	0,31	0,90	1,03	6,56	2,96
bendroflumetiazid	1,94	0,44	2,12	0,54	0,13	0,12	0,54	0,28	1,03	1,25	7,44	3,17
feksofenadin	0,61	0,14	0,58	0,16	0,07	0,05	0,12	0,05	1,79	2,41	5,22	2,93
sulfasalazin	0,17	0,07	0,17	0,08	0,13	0,11	0,27	0,13	1,62	1,86	7,95	3,61
acetazolamid	0,11	0,03	0,09	0,03	0,07	0,03	0,10	0,04	2,48	3,18	7,24	4,42
klorpromazin	64,4	20,8	34,8	5,0	31,6	5,5	55,2	14,4	14,0	3,5	18,9	4,9
klorzoksazon	62,2	10,6	72,7	9,9	36,0	2,8	60,6	6,8	6,78	7,26	28,4	6,4
etionamid	42,7	8,8	28,8	4,7	31,1	3,4	38,4	3,4	14,4	5,3	10,2	3,7
kinidin	29,7	3,3	22,7	2,7	22,3	1,8	25,5	1,6	10,1	3,1	7,13	1,92
grizeofulvin	29,1	2,5	28,7	1,4	18,8	1,4	24,7	1,3	2,39	2,68	12,3	3,6
deksklorfeniramin	25,1	2,4	19,5	1,8	22,7	2,8	25,0	1,5	10,4	3,8	8,14	2,31
guanabenz	23,6	4,1	16,6	2,7	14,1	1,3	15,8	0,9	10,7	4,5	6,06	3,26
sildenafil	20,7	3,2	13,9	2,2	12,9	1,6	17,1	1,8	4,62	1,81	3,87	1,28
haloperidol	20,3	1,6	16,3	1,3	17,6	1,7	19,3	1,3	8,48	2,18	7,74	1,46
risperidon	17,0	1,8	12,6	1,2	15,4	1,1	17,3	2,1	7,70	3,60	4,91	2,07
loperamid	17,0	2,5	11,1	1,6	11,1	1,7	14,9	1,7	3,74	1,79	3,53	1,46
amlodipin	16,2	3,2	10,2	1,6	7,37	1,40	11,0	0,9	1,32	0,74	1,57	1,03
glibenklamid	13,4	0,9	10,7	1,0	7,17	0,45	7,61	0,78	1,63	2,01	6,80	3,05
darunavir	11,1	0,6	9,06	1,13	4,01	0,42	4,92	0,67	1,13	1,44	5,12	2,80
indinavir	3,21	0,74	1,99	0,44	0,92	0,10	1,04	0,24	2,60	1,89	0,67	0,87
sulfadiazin	1,06	0,11	0,96	0,16	0,36	0,11	0,37	0,10	1,59	2,10	4,31	2,53
sumatriptan	0,67	0,19	0,55	0,14	0,16	0,07	0,19	0,07	8,12	3,53	3,28	2,50
ranitidin	0,57	0,18	0,48	0,12	0,13	0,07	0,15	0,06	8,08	3,33	3,39	2,38
amilorid	0,39	0,17	0,35	0,14	0,34	0,21	0,39	0,20	16,2	4,2	9,17	3,87
ciprofloksacin	0,37	0,11	0,29	0,07	0,08	0,03	0,08	0,02	4,33	2,56	1,35	1,48
cimetidin	0,29	0,09	0,25	0,06	0,08	0,06	0,08	0,04	8,76	3,70	3,65	2,45
norfloksacin	0,26	0,08	0,21	0,06	0,06	0,03	0,07	0,02	3,58	1,84	1,21	1,13

	37 °C				20 °C				4 °C			
	PBS		10 % MeOH PBS		PBS		10 % MeOH PBS		PBS		10 % MeOH PBS	
nadolol	0,23	0,07	0,18	0,05	0,04	0,02	0,04	0,02	6,25	3,31	2,08	1,92
atenolol	0,16	0,06	0,13	0,04	0,07	0,05	0,07	0,04	8,04	3,98	2,90	2,48
hidroklorotiazid	0,15	0,06	0,14	0,06	0,13	0,08	0,21	0,09	3,25	3,99	9,41	4,23
klorotiazid	0,09	0,03	0,07	0,03	0,08	0,05	0,11	0,05	2,22	2,64	6,15	2,29
furosemid	0,08	0,03	0,06	0,03	0,07	0,05	0,10	0,05	2,01	2,62	6,66	4,24
terbutalin	0,07	0,03	0,06	0,02	0,05	0,03	0,05	0,03	6,06	2,53	2,28	1,68
aciklovir	0,05	0,02	0,04	0,02	0,04	0,03	0,05	0,03	1,93	2,46	5,39	2,76
pravastatin	0,04	0,01	0,03	0,01	0,02	0,02	0,03	0,01	1,96	2,68	4,75	2,86
fenoterol	0,02	0,01	0,02	0,01	0,02	0,01	0,02	0,01	2,29	0,90	1,04	0,64
lizinopril	0,006	0,004	0,005	0,003	0,006	0,005	0,007	0,004	0,83	1,18	2,42	1,96

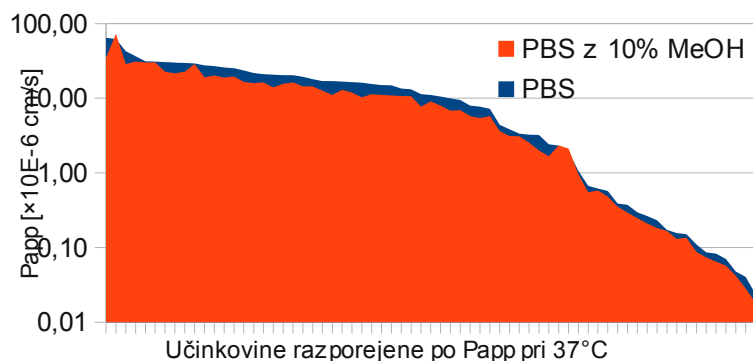
Postopek z velikim številom spojin v posameznem poskusu se je v prvem poskusu uporabe dobro izkazal. Tako smo v kratkem času na najbolj enostavni *in vitro* metodi ocenili vpliv temperature na permeabilnost. Ker je PAMPA poskus visoko zmogljiv, morda nismo toliko prihranili na času potrebnem za analizo, smo pa več prihranili pri materialu in kar je najpomembnejše, ostala nam je možnost primerjave vseh spojin s posamičnimi meritvami v nadaljevanju preizkušanja novega postopka. Tudi zmanjšanje porabe materiala je pomembna prednost postopka z velikim številom spojin. To bo pomembno prispevalo predvsem pri *in vitro* testih z uporabo živega tkiva. V svetu vidimo trend želje zmanjševanja poskusov na živalih in živalskem tkivu zaradi stroškov in pritiskov javnosti (1). S tem postopkom to porabo močno znižamo, hkrati pa obdržimo glavne lastnosti živega tkiva.

4.3.4 Statistična obravnava podatkov

Da bi prikazali resnično moč postopka in podatkov pridobljenih s postopkom smo uporabili ANOVO za obdelavo podatkov. Tako smo gledali vpliv značaja učinkovine (kislina ali baza), metanola, temperature, kombinacije značaja učinkovine in temperature, kombinacije značaja učinkovine in metanola, kombinacije metanola in temperature na logaritmirano permeabilnost. Ugotovili smo da je vpliv vseh signifikanten ($p < 0,0005$), razen kombinacije značaja učinkovine in temperature.

Vpliv metanola kot dodatek PBS je prikazan na grafu 3. Vidimo da metanol vpliva na

skoraj vse učinkovine na enak način. Čeprav je razlika dejansko zelo majhna, se kaže kot statistično pomembna, zaradi konsistentnosti in zelo velikega vzorca.



Graf 3: Vpliv metanola na izmerjeno permeabilnost pri 37°C pri PAMPA poskusu

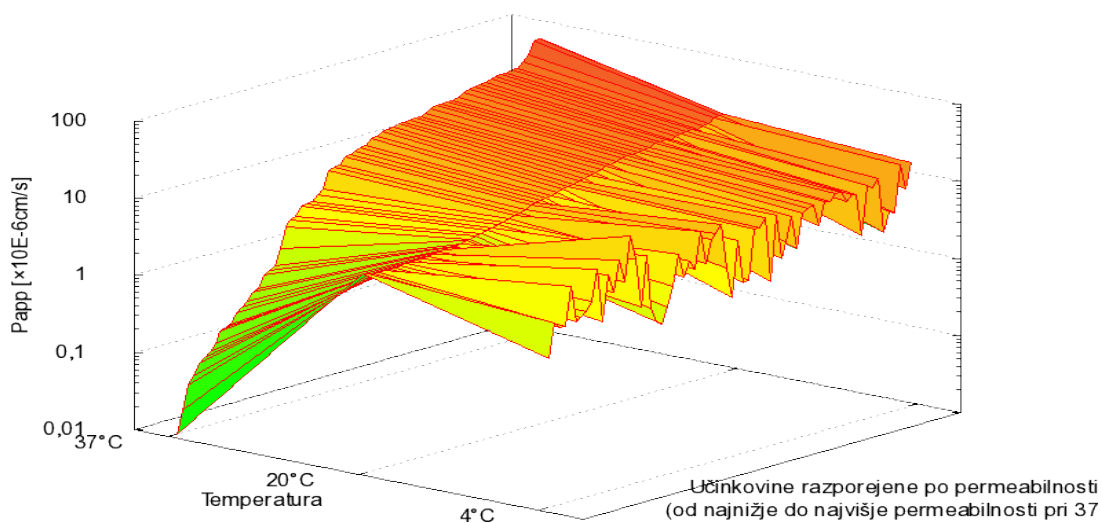
Pri nižjih temperaturah je vpliv metanola večji. Kljub temu da je vpliv metanola pri 20°C večji kot pri 37°C. Dodatek metanola posamične spojine pravzaprav ne moti, ker je njegov vpliv majhen in predvidljiv. Vse kar še potrebujemo za zanesljivost tovrstnih meritev so referenčne vrednosti dobljene pri enakih pogojih.

Drugi dejavnik, ki kot po pričakovanjih signifikantno vpliva na izmerjene permeabilnostne koeficiente je temperatura. Ti podatki so predstavljeni na grafu 4. Rezultati, tako kot pri poskusu s pilotnim setom na Caco-2 celicah, kažejo na veliko odvisnost permeabilnostnih koeficientov od temperature.

Poraba energije in aktivni transport sta minimalna pri nizkih temperaturah (0-4°C). Kar pripelje do domneve, da je za absorpcijo učinkovine, ki se absorbira dobro pri 37° ne pa pri 4°C, pomemben predvsem aktivni transport (37). Ne smemo pa pozabiti, da je tudi pasivno prehajanje membrane lahko odvisno od temperature zaradi spremembe fluidnosti biološke membrane (34). To, da je pasivno prehajanje membrane odvisno od temperature so pokazali tudi naši rezultati poskusa PAMPA, ki se dobro ujemajo s predhodnimi rezultati drugih raziskovalcev (34). Umetne membrane PAMPA modela nimajo proteinskih prenašalnih sistemov, ki bi lahko opravljali aktiven transport. Tako da z njimi vsekakor merimo le pasivno prehajanje učinkovin. Kljub temu, da smo uporabili PAMPA model z najtanjšim lipidnim slojem na tržišču, moramo upoštevati dejstvo, da je debelina tovrstnih

modelov prevelika za tvorbo lipidnega dvosloja (38).

Opazimo pa lahko še nenavadno značilnost PAMPA modela. Nizko permeabilnim spojinam pri nizki temperaturi (4°C) določimo povišan permeabilnostni koeficient za razliko od tistih, ki imajo pri 37°C visoke permeabilnostne koeficiente, ki pa se z meritvami pri nižjih temperaturah znižajo. Vsekakor gre za deviacijo PAMPA modela tako od pričakovanih rezultatov, kot tudi od rezultatov dobljenih z biološkimi modeli. Ta deviacija je dodatno zanimiva zato, ker so prav PAMPA model v literaturi že večkrat uporabili za demonstracijo vpliva temperature na aktivni transport (37) pri čemer so različni avtorji zaključili, da meritve permeabilnosti pri različnih temperaturah niso najbolj primeren pokazatelj aktivnega transporta, nihče pa še ni posumil na neprimernost uporabljenega modela za tovrstne raziskave, saj ponovitve poskusov z biološkimi modeli in dovolj velikim številom spojin niso bile možne.



Graf 4: Prikaz permeabilnosti pridobljenih s PAMPA poskusom (PBS) pri različnih temperaturah na logaritemski skali.

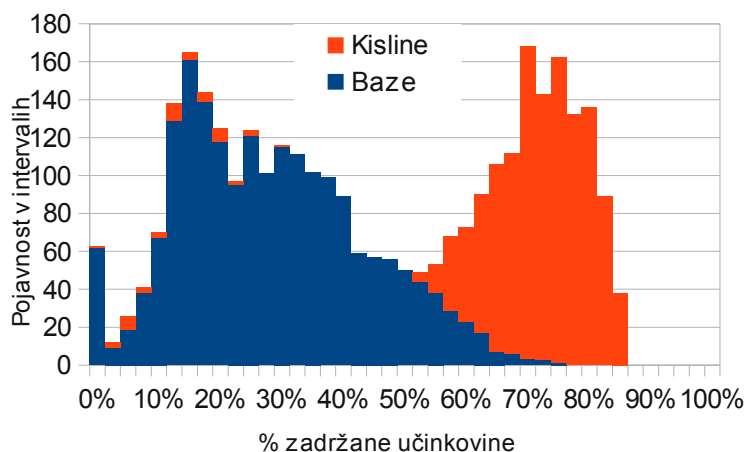
Dobro se ta nepravilnost delovanja PAMPA modela kaže na grafu 4 na katerem so permeabilnosti prikazane na semilogaritemski skali. Tu se dobro vidi nesorazmernost

nižjih temperatur pri nizko permeabilnih učinkovinah.

Možno je, da pri tem veljajo zakonitosti, ki jih bo možno še nadalje raziskati z razvitim postopkom na različnih modelih za določanje permeabilnosti in pri večjem številu različnih temperatur.

Zanimiv je tudi signifikanten vpliv drugih faktorjev. Predvsem vpliv značaja učinkovine na permeabilnost. Da bi raziskali, to zanimiv signifikanten vpliv smo izvedli tudi ANOVO v kateri smo gledali vpliv različnih parametrov na zadrževanje učinkovine

Tako smo preverjali vpliv temperature, *in vivo* klasificirana permeabilnost, značaja učinkovine (kislina ali baza), metanola, kombinacije temperature in *in vivo* klasificirane permeabilnosti, kombinacije metanola in značaja učinkovine, kombinacije temperature in značaja učinkovine, kombinacije *in vivo* klasificirane permeabilnosti in metanola ter kombinacije temperature in metanola na zadrževanje učinkovin. Ugotovili smo nesignifikantnost ($p > 0.0005$) vpliva metanola, kombinacije temperature in *in vivo* klasificirane permeabilnosti, kombinacije *in vivo* klasificirane permeabilnosti in metanola, kombinacije temperature in metanola na zadrževanje učinkovin. Vsi ostali vplivi so bili signifikantni ($p < 0.0005$).



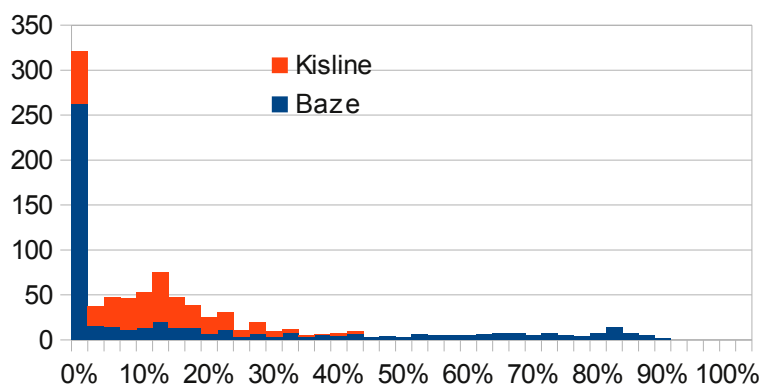
Graf 5: Zadrževanje učinkovin v PAMPA filterih

Pri PAMPA poskusu smo opazili tudi zelo različno zadrževanje učinkovin glede na set. Pri kislinah je dosti smo večkrat zabeležili visoko zadrževanje učinkovin kot pri bazah kar je prikazano na grafu 5. Sklepamo da je to posledica sestave umetnih membran v PAMPA

filtrih. Torej značaj učinkovine vpliva na zadrževanje v membranah in posledično na izmerjeno permeabilnost učinkovine.

Podobno analizo smo naredili tudi s podatki poskusa na podganjih črevih. Vpliv značaja učinkovine je bil še vedno signifikanten vendar ne tako izrazit. Prikaz zadrževanja učinkovin pri poskusu na črevih je prikazan na grafu 6.

Poleg značaja učinkovine na zadrževanje smo preverili tudi vpliv *in vivo* klasificirane permeabilnosti ter kombinacije *in vivo* klasificirane permeabilnosti in značaja učinkovine. Pri obeh možnostih ni bilo signifikantnega vpliva ($p > 0,0005$).



Graf 6: Zadrževanje učinkovin pri poskusu na podganjem črevesu

Poleg vplivov parametrov na zadrževanje učinkovine smo preverili tudi vpliv raznih parametrov na permeabilnost učinkovin. Ugotovili smo da *in vivo* klasificirana permeabilnost vpliva na pridobljeno permeabilnost pri vitalnih celicah. Medtem ko na pridobljeno permeabilnost pri ne-vitalnih celicah ne vpliva signifikantno. S tem lahko utemeljimo smiselnost izločanja pridobljenih permeabilnosti na podlagi elektrofizioloških podatkov saj s tem zagotovimo boljši končni rezultat. Pri vitalnih za razliko od ne-vitalnih celicah je signifikanten tudi vpliv značaja učinkovine, ki bi ga morda lahko razlagali podobno kot pri PAMPA modelu vendar je razvidnost vpliva dosti manjša (graf 6).

V okviru diplome smo preverili le nekaj najbolj očitnih vplivov na permeabilnost. Ter tako z nekakšno vzorčno statistično analizo smo dokazali, da s postopkom v katerim uporabimo več učinkovin v posameznem poskusu, pridobimo dovolj dobre podatke, ki jih lahko uporabimo za statistično analizo posameznih vplivov na permeabilnost za kar tudi namen

postopka. Tako si lahko s tem postopkom obetamo statistično obdelavo tudi pri *in vitro* poskusih pri katerih sedaj ni bilo dovolj podatkov za naprednejšo statistično obdelavo.

4.3.5 Korelacija med deležem absorbirane učinkovine in *in vitro* permeabilnostjo

Vse *in vitro* dobljene permeabilnosti smo poskusili korelirati z *in vivo* podatki najdenimi v literaturi. Mejo za „minimalno dobro permeabilnost“ smo pri povzeli o WHO smernicah pri 85% deležu absorbirane učinkovine v *in vivo* pogojih (človek) (39) in pri 10×10^{-6} cm/s *in vitro* pridobljene rezultate za pilotni set. *In vitro* meja je interni dogovor za klasifikacijo v permeabilnostnem laboratoriju FFA in je določena na osnovi večletnih meritev različnih spojin v postopkih s po eno spojino v poskusu. Tako so nad rdečo vodoravno črto na grafih 7, 8 in 9 učinkovine, ki so *in vivo* dobro permeabilne. Pod vodoravno rdečo črto lahko učinkovine klasificiramo kot *in vivo* slabo permeabilne. Meja med dobro in slabo *in vitro* permeabilnostjo je na grafu prikazana z navpično rdečo črto. Desno od te meje so učinkovine, ki smo jim *in vitro* določili visoko permeabilnost, levo pa učinkovine z nizko *in vitro* permeabilnostjo. Tako se oblikujeta dve območji (levo spodaj ter desno zgoraj), ki kažeta na dobro *in vitro-in vivo* korelacijo.

Desno spodaj so učinkovine, ki smo jim *in vitro* izmerili dobro permeabilnost *in vivo* pa izkazujejo slabo permeabilnost. Med razlogi za to je lahko slaba *in vivo* topnost kar onemogoča dobro absorpcijo ali pa tudi velik obseg metabolizma prvega prehoda. Vzroki so seveda možni tudi na strani *in vitro* meritev, kot npr. neizražanje proteinov za aktivni transport iz serozne na mukozno stran, vendar je tovrstna napaka pri meritvah permeabilnostnih koeficientov posamičnim spojinam ni značilna in je celo izredno redka (5). Povsem možno je, da za novo razviti postopek to ne bo veljalo, zaradi nepredvidljivih navzkrižnih inhibicij različnih prenašalnih sistemov – tudi tistih, ki prenašajo substrate v eliminativni smeri in so sicer v *in vitro* pogojih običajno pretirano izraženi.

Levo zgoraj so na grafih predstavljene učinkovine, katerim smo z *in vitro* poskusom izmerili prenizko permeabilnost. To je običajen pojav tudi pri posamičnih meritvah v primeru *in vitro* določanja permeabilnosti spojin, ki z mukozne na serozno stran prehajajo z aktivnim transportom, seveda pa so možni tudi drugi razlogi.

Pri vseh grafih (7, 8 in 9) je boljše predstavo prikazana tudi Hillova korelacijska krivulja. Deleža absorbirane učinkovine (%FA) za Hillovo krivuljo smo računali po enačbi 19, pri čemer smo za %FA_{max} vedno uporabili 100. Druga dva koeficienta (θ in P_{app}^{50}) pa smo izračunali za vsak niz rezultatov posebej, s pomočjo Excellovega reševalnika in sicer tako, da smo minimizirali vsoto kvadratov razlik med izračunani deleži absorbirane in literaturni podatki. Krivuljo smo prilagodili tudi, da je potekala skozi presečišče *in vitro* in *in vivo* meje za dobro permeabilnost. Tako da gre pri grafih 7 in 8 skozi točko 10×10^{-6} cm/s, 85% in pri grafu 9 pa skozi točko 15×10^{-6} cm/s, 85%.

$$\%FA = \frac{\%FA_{max} * (P_{app})^{\theta}}{P_{app}^{50} + (P_{app})^{\theta}}$$

Enačba 19: Enačba Hillove krivulje

%FA_{max} maksimalni delež absorbirane učinkovine

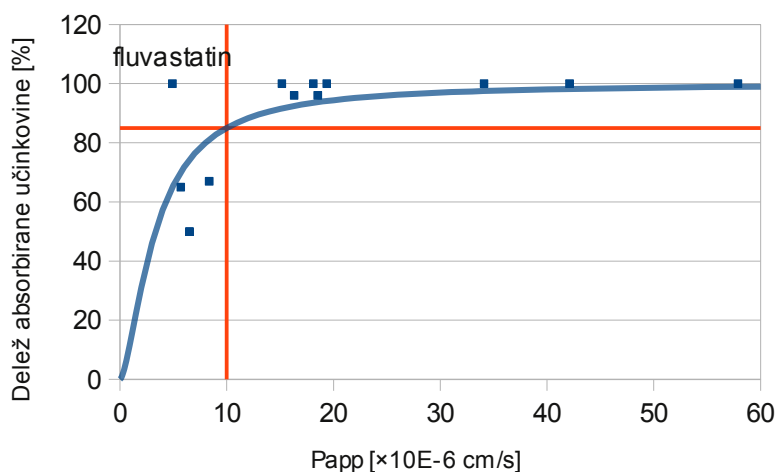
P_{app}^{50} P_{app} pri %FA=50%

θ koeficient Hillove krivulje

P_{app} permeabilnostni koeficient

4.3.5.1 Pilotni set

S pilotnim setom smo merili permeabilnost trinajstim učinkovinam. Te meritve še niso kazale razlik P_{app} s posamezno izmerjenimi P_{app} . Pri meritvah na podganjem črevesju izkazujejo skoraj vse učinkovine dobro *in vitro-in vivo* korelacijo, ki je predstavljena na grafu 7. Le fluvastatin za smo *in vitro* določili prenizko permeabilnost glede na njegovo *in vivo* biološko uporabnost.



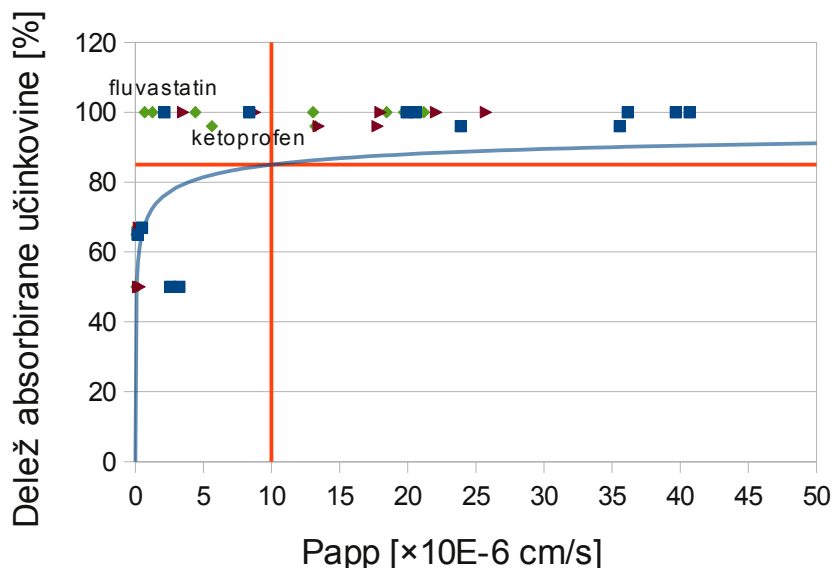
Graf 7: Odvisnost deleža absorbirane učinkovine od *in vitro* permeabilnosti za pilotni set na podganjem črevesju (Koeficienti Hillove krivulje: $P_{app}^{50}=6,610$ $\theta=1,574$)

Korelacija pilotnega seta na Caco-2 celicah pri 37°C (modri kvadratici na grafu 8) je tudi dobra in je predstavljena z modro črto na grafu 8. Vendar se je tu bolj levo (proti nižji permeabilnosti) k fluvastatinu premaknil ketoprofen. Tako smo mu *in vitro* izmerili (pre)nižko permeabilnost. Za obe učinkovini lahko v literaturi najdemo dokaze o aktivni absorpciji (40).

Zmanjšanje permeabilnosti ketoprofena je verjetno tudi posledica odsotnosti mukusa na površini Caco-2 celic, ki je prisoten pri višjih delih gastrointestinalnega trakta (36). Ketoprofen kaže na odvisnost permeabilnosti od pH-ja na površini enterocitov (41). Ta je pri Caco-2 celicah zaradi odsotnosti mukusa višji. Zaradi tega razloga so nekateri raziskovalci na Caco-2 celicah izmerili permeabilnost z nižjim pH medija (5,5), ki je bila višja kot pri višjem pH (7,4) (36). Prav gotovo bi lahko bil merjenje permeabilnosti pri različnih pH-jih eden od naslednjih korakov pri uporabi in evalvaciji postopka z razširjenim številom učinkovin.

Pri nižjih temperaturah so vsi permeabilnostni koeficienti zaradi manjšega aktivnega transporta in manjše fluidnosti membrane nižje. Tudi v primeru pilotnega seta na Caco-2 celicah lahko vidimo značilno večji vpliv temperature na sicer visoko permeabilne učinkovine – podobno, kot smo opazili pri PAMPA sistemu. Na grafu 8 so z rdečo

predstavljeni rezultati pridobljeni pri 20°C in z zeleno podatki pridobljeni pri 4°C



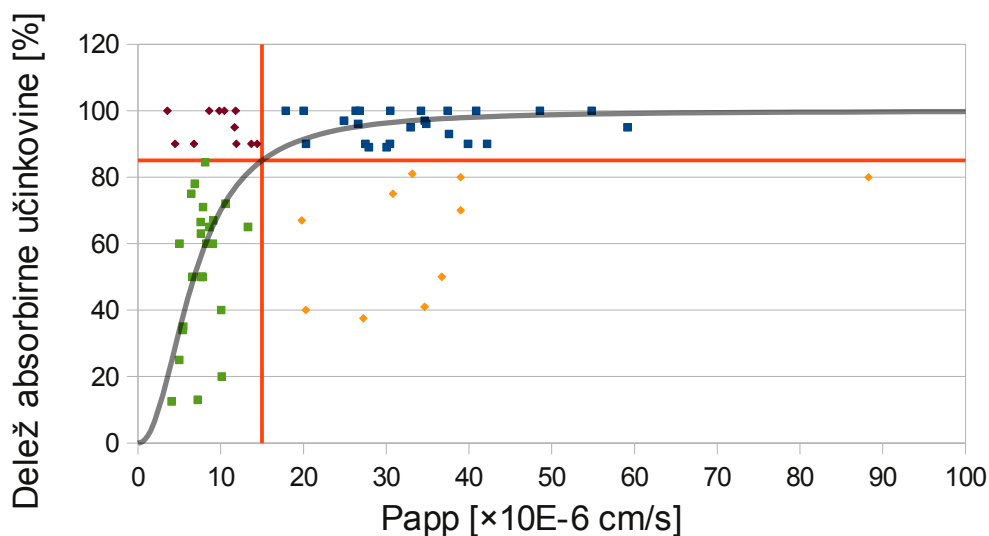
Graf 8 Odvisnost deleža absorbirane učinkovine od *in vitro* permeabilnosti za pilotni set na Caco-2 celicah (Koeficienti Hillove krivulje: $P_{app}^{50}=0,4131$ in $\theta=0,3694$)

4.3.5.2 Razširjena seta

Kljub temu, da postopek ni bil prvotno temu namenjen, smo dobili dovolj dobre permeabilnostne koeficiente dobljene s poskusoma na podganjem črevesju, da smo te podatke lahko vsaj v demonstracijski namen prikazali na grafu 9 skupaj z *in vivo* podatki. Mejo za dobro *in vitro* permeabilnost smo malo zvišali na 15×10^{-6} cm/s, ker je pri tej vrednosti jasen razmak med učinkovinami. Tako smo določili novo bolj primerno mejo za permeabilnostne koeficiente določene v novem postopku.

Korelacija daje jasno predstavo o združevanju dobro permeabilnih (na grafu 9 prikazani z modro barvo) in slabo permeabilnih (na grafu 9 prikazani z zeleno barvo) učinkovin.

Tako je v levem zgornjem delu (rdeče obarvane točke na grafu 9), kjer smo izmerili „prenizko“ *in vitro* permeabilnost enajstim učinkovinam. Te učinkovine so acetazolamid, amitriptilin, bendroflumetiazid, klomipramin, dezipramin, feksofenadin, glipizid, izoniazid, nitrofurantoin, ofloksacin in prometazin.



Graf 9: Odvisnost deleža absorbirane učinkovine od *in vitro* permeabilnosti izmerjene na podganjem črevesu (Koeficienti Hillove krivulje: $P_{app}^{50}=66,13$ $\theta=2,188$)

Deset učinkovinam smo določili previsoko *in vitro* permeabilnost (oranžno označene učinkovine na grafu 9). Te so: deksklorfeniramin, etionamid, guanabenz, grizeofulvin, hidroklorotiazid, kinidin, klorzoksazon, loperamid, risperidon in sildenafil.

Izjeme v področju visoke biološke uporabnosti in nizkih izmerjenih permeabilnostnih koeficientov so pričakovane tudi pri posamičnih meritvah zaradi že omenjenih intrinzičnih lastnosti *in vitro* permeabilnosti. Glede mehanizma, ki pripelje do odstopanj, v spodnjem desnem kvadrantu grafa 9, na tej stopnji razvoja novega postopka še ne moremo špekulirati, bo pa smiselno pojav v prihodnosti raziskati, saj bi razumevanje tega pojava še izboljšalo uporabnost novega postopka določanja permeabilnostnih koeficientov.

Kljub opaženim odstopanjem velika večina *in vitro* permeabilnostnih koeficientov učinkovin, pridobljenih z novim postopkom, dobro korelira z *in vivo* deležem absorpcije. Takih učinkovin je kar 47 od 68. Izmed teh 47 učinkovin je 24 *in vivo* dobro permeabilnih katerim smo določili tudi *in vitro* visoko permeabilnost in 23 *in vivo* slabo permeabilnih, ki smo jim določili *in vitro* nizko permeabilnost.

5 Sklep

V diplomu smo razvili nov postopek za opredelitev permeabilnostnih lastnosti različnih *in vitro* modelov z velikim številom spojin v posameznem poskusu in LC-MS/MS metodo za analizo pridobljenih vzorcev. Ugotovili smo, da je izvedba postopka dovolj enostavna za nadaljnjo uporabo in raziskovanje. Pri razvoju je bila problematična le topnost učinkovin in obarjanje le teh v osnovnih in v donorskih raztopinah. Problem topnosti smo rešili z razdelitvijo učinkovin v dva seta ter z izločitvijo nekaterih problematičnih učinkovin. Prav izbor najprimernejših učinkovin in njihovih koncentracij je bil osnova razvoja novega postopka.

Permeabilnosti izmerjene s postopkom z večjimi številom učinkovin v enem poskus se razlikujejo od tistih izmerjenih posamezno. Vendar so te razlike predvidljive in dovolj majhne, da je postopek uporaben za analizo vplivov na permeabilnost.

Uporabnost modela smo v okviru diplome nakazali z nekaj meritvami permeabilnosti na različnih *in vitro* modelih. Raziskali smo tudi vpliv temperature, ki ima velik vpliv na izmerjeno permeabilnost. Zakonitosti pa iz rezultatov pilotnega seta na Caco-2 celicah ter razširjenih setov s PAMPA poskusom še ne moremo določiti. Torej je to bil torej začetek daljše študije.

Z razvojem postopka za opredelitev permeabilnostnih lastnosti različnih *in vitro* modelov z velikim številom spojin v posameznem poskusu smo postavili temelje tudi za izvedbo zgoraj omenjene študije. Nov postopek omogoča pridobitev permeabilnostnih koeficientov za velikega števila različnih učinkovin tudi na sistemih nizke zmogljivosti in višje kompleksnosti. Tako pridobljeno dovolj veliko količino podatkov lahko uporabimo za statistično analizo v obsegu, ki poprej ni bil mogoč.

Potencial postopka se bo gotovo pokazal v nadaljnji uporabi na različnih *in vitro* metodah. Morda bodo potrebni še manjši popravki, kot so prilagoditev donorske koncentracije kakšne učinkovine in morda izločitev še kakšne učinkovine zaradi nizke masne bilance. To se bo pokazalo šele z izkušnjami pridobljenimi v nadaljnji uporabi postopka, z različnimi modeli pri različnih eksperimentalnih pogojih.

6 Literatura

- 1 Grass GM. Simulation models to predict oral drug absorption from *in vitro* data. *Adv Drug Deliv Rev* 1997; 23: 199-217.
- 2 Žakelj S. Permeabilnost nekaterih spojin skozi tanko črevo podgane v različnih pogojih »in vitro«. Doktorska dizertacija, Univerza v Ljubljani, Fakulteta za farmacijo, 2006.
- 3 Welling PG. Pharmacokinetics – Processes, Mathematics and Application. ACS Washington, DC 1997: 11-18, 43-62, 75-94.
- 4 Ungell AL, Nylander S, Bergstrand S et al. Membrane transport of drugs regions of the intestinal tract of the rat. *J Pharm Sci* 1998; 8.3: 360-366.
- 5 Lennernas, H., Human intestinal permeability. *J Pharm Sci* 1998, 87 (4), 403-410.
- 6 Lennernäs H. Animal data: The contributions of the Ussing Chamber and perfusion systems to predicting human oral drug delivery *in vivo*. *Adv Drug Deliv Rev* 2007; 59: 1103-1120.
- 7 Knutson T, Fridblom P, Ahlström H et al. Increased understanding of intestinal drug permeability determined by the LOC-I-GUT approach using multislice computed tomography. *Mol Pharm* 2009; 6.1: 2-10.
- 8 Tukker JJ, Lennernäs H. In vitro methods for assesment of permability, Animal perfusion studies. In: Oral drug absorption. New York & Basel: marcel Dekker, Inc.,2000: 51-72.
- 9 Panchagnula R, et al. Biopharmaceutical Classification System: A Scientific Framework for Pharmacokinetic Optimazation in Drug Research, *Curr D Metab.* 2004 ; 5; 375-388.
- 10 Amidon GL, Lennernäs H, Shah VP et al. A theoretical basis for a biopharmaceutical drug classification: The correlation of in vitro drug product dissolution and *in vivo* bioavailability. *Pharm Res* 1995; 12: 413-420.
- 11 Yu LX, Amidon GL, Polli JE et al. Biopharmaceutical Classification System: The Scientific Basis for Biowaiver Extensions. *Pharm Res.* 2002; 19.7; 921-925.
- 12 Basics of LC/MS. Agilent Technologies 2001:
(www.chem.agilent.com/Library/Support/Documents/a05296.pdf april 2011)

- 13 http://www.jeolusa.com/DesktopModules/Bring2mind/DMX/Download.aspx?EntryId=284&Command=Core_Download&PortalId=2&TabId=337 (Ionization Methods Organic Mass Spectrometry), april 2011.
- 14 Ion optics innovations for increased sensitivity in hybrid MS systems, Technical Overview, Agilent Technologies, Oktober 2007.
- 15 Guidance for Industry: Waiver of *In Vivo* Bioavailability and Bioequivalence Studies for Immediate-Release Solid Oral Dosage Forms Based on a Biopharmaceutics Classification System
<http://www.fda.gov/downloads/Drugs/GuidanceComplianceRegulatoryInformation/Guidances/UCM070246.pdf> , pridobljeno s svetovnega spleta 2.2.2010.
- 16 Lindenberg M, Kopp S, Dressman JB. Classification of orally administered drugs on the World Health Organization Model list of Essential Medicines according to the biopharmaceutics classification system. *Eur J of Pharm and Biopharm* 2004; 2: 265-278.
- 17 Povzetek temeljnih značilnosti zdravila z vsebovano učinkovino (pridobljeno iz <http://eudrapharm.eu/eudrapharm/> marec 2011)
- 18 Brittain HG: Profiles of Drug Substances, Excipients, and Related Methodology. Volume 33. Elsevier Inc., 2007.
- 19 PhysProp database: <http://www.syrres.com/what-we-do/databaseforms.aspx?id=386> (dostopano marec 2011)
- 20 ChEMBL database: <https://www.ebi.ac.uk/chembl/db/index.php> (dostopano marec 2011)
- 21 Amidon GL, Lennernäs H, Shah VP, et al. Molecular Properties of WHO Essential Drugs and Provisional Biopharmaceutical Classification. *Mol Pharm* 2003; 1.1; 85-96.
- 22 Povzetek temeljnih značilnosti zdravila z vsebovano učinkovino (pridobljeno iz www.zdravila.net marec 2011)
- 23 Polli JWm Ayrton AD, Shah N et al. Biopharmaceutics Classification System: Validation and Learnings of an in Vitro Permeability Assay. *Mol Pharm* 2008; 6.1: 11-18.
- 24 Register zdravil RS, IVZ, (<http://www.ivz.si/register/> dostopano marec 2011)

- 25 Martindale The Complete Drug Reference, 36th Edition (amantadin 792-794, griseofulvin 535-536, fexofenadin 579-580, izoniazid 288-290, nitrofurantoin 308-309)
- 26 Zaki NM, Artursson P, Bergström CA. A Modified Physiological BCS for Prediction of Intestinal Absorption in Drug Discovery. *Mol Pharm* 2010; 7 (5): 1478-1487.
- 27 Kim JS, Mitchell S, Kijek P et al. The Suitability of an in Situ Perfusion Model for Permeability Determinations: Utility for BCS Class I Biowaiver Requests. *Mol Pharm* 2006; 6: 686-694.
- 28 Abraham MH, Le J, Zhao YH et al. Evaluation of human intestinal absorption data and subsequent derivation of a quantitative structure–activity relationship (QSAR) with the Abraham descriptors. *J Pharm Sci*; 90.6; 749-784.
- 29 Skolnik S, Lin X, Wang J et al. Towards prediction of *in vivo* intestinal absorption using a 96-well Caco-2 assay. *J Pharm Sci* 2010; 99: 3249-3265.
- 30 Karlén A, Ungnell AL, Lennernäs H et al. Presentation of a Structurally Diverse and Commercially Available Drug Data Set for Correlation and Benchmarking Studies. *J Med Chem* 2006; 49: 6660-6671.
- 31 Avdeef A: Absorption and Drug Development - Solubility, Permeability, and Charge State. John Wiley & Sons, Inc., Hoboken, New Jersey. 2003.
- 32 BD Gentest™ Pre-coated PAMPA Plate System, Catalog number 353015, Guidelines for Use, ZDA.
- 33 Ruel JA and Avdeef A: Absorption Screening Using the PAMPA Approach. In: Yan Z and Cadwell GW *Methods in Pharmacology and Toxicology Optimization in Drug Discovery: In Vitro Methods*. Humana Press Inc., Totowa, NJ, 2004, 37-64.
- 34 Poirier A, Lave T, Portmann R, et al. Design, Data Analysis, and Simulation of the in Vitro Drug Transport Kinetic Experiments Using a Mechanistic in Vitro Model. *Drug Metab Dispos* 2008; 36.12: 2434-2444.
- 35 Validation of analytical procedures: Text and Methodology Q2(R1): http://www.ich.org/fileadmin/Public_Web_Site/ICH_Products/Guidelines/Quality/Q2_R1/Step4/Q2_R1_Guideline.pdf (avgust 2011)
- 36 Laitinen L, Kangas H, Kaukonen AM et al. N-in-One Permeability Studies of

- Heterogeneous Sets of Compounds Across Caco-2 Cell Monolayers. *Pharm Res* 2009; 20.2; 187-197.
- 37 Sugano K, Kansy M, Artursson P, et al. Coexistence of passive and carrier-mediated processes in drug transport. *Nat Rev* 2010; 9; 597-614.
- 38 Chen, X.; Murawski, A.; Patel, K.; Crespi, C. L.; Balimane, P. V., A novel design of artificial membrane for improving the PAMPA model. *Pharm Res* 2008, 25 (7), 1511-20.
- 39 Gupta E, Barend DM, Yamashita E et al. Review of global regulations concerning biowaivers for immediate release solid oral dosage forms. *Eur J Pharm Sci* 2006; 29; 315-324.
- 40 Kopplow, K.; Letschert, K.; Konig, J.; Walter, B.; Keppler, D., Human hepatobiliary transport of organic anions analyzed by quadruple-transfected cells. *Mol Pharmacol* 2005, 68 (4), 1031-8.
- 41 Kristl A, Legan I. pH and energy dependent transport of ketoprofen across rat jejunum in vitro. *Eur J Pharm Biopharm* 2003; 56; 87-94.