

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO

ANA TRIPAR

DIPLOMSKA NALOGA

UNIVERZITETNI ŠTUDIJ FARMACIJE

Ljubljana, 2011

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO

ANA TRIPAR

**VREDNOTENJE DVEH RAZLIČNIH OZNAČEVALCEV
PARACELULARNEGA PREHODA PRI POSKUSIH
PERMEABILNOSTI NA IZOLIRANEM ČREVESJU
PODGANE**

**EVALUATION OF TWO DIFFERENT MARKERS OF
PARACELLULAR TRANSPORT IN PERMEABILITY
STUDIES ON ISOLATED RAT SMALL INTESTINE**

DIPLOMSKA NALOGA

Ljubljana, 2011

Diplomsko delo sem opravljala v farmacevtski družbi Lek d.d. pod mentorstvom doc. dr. Igorja Legna, mag. farm. in somentorstvom dr. Luka Peternela, mag. farm.

Zahvaljujem se mentorjema, doc. dr. Igorju Legnu in somentorju dr. Luki Peternelu za vso strokovno pomoč ob izdelavi diplomskega dela. Zahvaljujem se tudi Petri Dujmovič, ki mi je praktično delo mnogokrat olajšala. Hvala družini, ki mi je skozi celotno šolanje stala ob strani in mi pomagala po svojih močeh. Hvala prijateljem za nepozabna študijska leta.

Izjava

Izjavljam, da sem diplomsko nalogo samostojno izdelala pod mentorstvom doc. dr. Igorja Legna in somentorstvom dr. Luka Peternela.

Ljubljana, november 2011

Predsednik diplomske komisije: izr. prof. dr. Aleš Obreza

Član diplomske komisije: asis. dr. Jurij Trontelj

VSEBINA

1	POVZETEK	1
2	SEZNAM OKRAJŠAV	2
3	UVOD.....	4
3.1	EPITELIJI.....	4
3.1.1	Značilnosti epitelija	4
3.1.2	Epiteliji kot mesto absorpcije učinkovin	6
3.1.3	Elektrofiziološki parametri	7
3.2	TESNI STIK (zonula occludens).....	8
3.2.1	Organiziranost tesnih stikov	8
3.2.2	Funkcija	8
3.2.3	Zgradba.....	9
3.3	REGULACIJA TESNIH STIKOV	11
3.3.1	Fiziološka regulacija.....	11
3.3.2	Regulacija na celičnem in molekularnem nivoju	14
3.4	MODULACIJA TESNIH STIKOV S PPE	15
3.4.1	Pospeševalci paracelularnega prehoda (PPE).....	15
3.4.2	Mehanizem delovanja PPE.....	18
3.4.3	Sistemska toksičnost PPE.....	21
3.5	7-CIKLOHEKSILHEPTIL-4-O-ALFA-D-GLUKOPIRANOZIL-BETA-D- GLUKOPIRANOZID (CYMAL-7)	21
3.6	TRIMETIL-HITOSAN (TMC).....	22
3.7	OZNAČEVALCI PARACELULARNEGA PREHODA	22
4	NAMEN DELA	24
5	MATERIALI IN METODE	26
5.1	Reagenti	26
5.2	Raztopine	26
5.2.1	Osnovne raztopine	26
5.2.2	Raztopine za pripravo donorskih in akceptorskih raztopin	27
5.2.3	Donorske in akceptorske raztopine pri poskusih z LY	28
5.2.4	Donorske in akceptorske raztopine pri poskusih s FITC-dekstranom.....	29
5.2.5	Raztopine za pripravo elektrod.....	29
5.3	Aparature	29
5.4	Metode	30
5.4.1	Princip.....	30
5.4.2	Priprava in vzdrževanje elektrod	31
5.4.3	Priprava difuzijskih celic	31
5.4.4	Priprava tkiva.....	32
5.4.5	Poskus.....	33
5.4.6	Ocenjevanje vitalnosti in integritete tkiva	34
5.4.7	Analiza označevalcev paracelularnega prehoda	35
5.4.8	Izračun navideznega permeabilnostnega koeficienta	35
5.4.9	Statistični testi	37
6	REZULTATI	40
6.1	Poskusi z LY	40
6.2	Poskusi z LY in Cymal-7	41
6.3	Poskusi z LY in TMC	43
6.4	Poskusi s FITC-dekstranom.....	45

6.5	Poskusi s FITC-dekstranom in Cymal-7.....	46
6.6	Poskusi s FITC-dekstranom in TMC.....	48
6.7	Primerjava vpliva Cymal-7 in TMC na permeabilnost označevalcev paracelularnega prehoda.....	49
6.8	Primerjava lastnosti vitalnih in mrtvih tkiv za LY in FITC-dekstran.....	50
7	RAZPRAVA.....	51
8	SKLEP.....	55
9	LITERATURA.....	56
10	PRILOGA.....	60
10.1	Poskus 1: LY.....	60
10.2	Poskus 2: LY - M \rightarrow S in S \rightarrow M.....	60
10.3	Poskus 3: LY - M \rightarrow S in S \rightarrow M.....	61
10.4	Poskus 4: LY in 0,3 % in 0,03 % Cymal-7.....	62
10.5	Poskus 5: LY in 3 % in 0,3 % Cymal-7.....	63
10.6	Poskus 6: LY in 0,03 % Cymal-7.....	63
10.7	Poskus 7: LY in 0,3 % Cymal-7.....	64
10.8	Poskus 8: LY in 3 % Cymal-7.....	65
10.9	Poskus 9: LY in 10 % Cymal-7 in 3 % TMC.....	65
10.10	Poskus 10: LY in 0,3 % TMC.....	66
10.11	Poskus 11: LY in 0,03 % TMC.....	67
10.12	Poskus 12: LY in 0,03 % TMC.....	68
10.13	Poskus 13: LY in 0,3 % TMC.....	68
10.14	Poskus 14: LY in FITC-dekstran.....	69
10.15	Poskus 15: FITC-dekstran - M \rightarrow S in S \rightarrow M.....	70
10.16	Poskus 16: FITC-dekstran in 0,3 % CYMAL-7.....	71
10.17	Poskus 17: FITC-dekstran in 0,3 % TMC.....	71

1 POVZETEK

Lucifer Yellow in fluoresceinizotiocianat-dekstran sta spojini, ki na podlagi literaturnih podatkov pridobljenih na Caco-2 celični liniji, prehajata črevesni epitelij s pasivno difuzijo preko tesnih stikov. Njuna detekcija je hitra in enostavna, saj se analizirata s pomočjo fluorescenčne spektrometrije. Zaradi teh lastnosti jih znanstveniki uporabljajo v študijah permeabilnosti kot označevalca paracelularnega prehoda.

Na Caco-2 celični liniji je bilo narejenih veliko poskusov z uporabo LY in FITC-dekstrana, kot označevalca paracelularnega prehoda. Na modelu izoliranega črevesja podgane pa nismo našli literaturnih podatkov, ki bi vrednotili permeabilnost LY in FITC-dekstrana v poskusih s pospeševalci paracelularnega prehoda, zato smo to hoteli preveriti v diplomski nalogi. Želeli smo ovrednotiti primernost LY in FITC-dekstrana, kot indikatorja paracelularnega prehoda v poskusih na izoliranem črevesju podgane. Na permeabilnost LY in FITC-dekstrana smo želeli vplivati z uporabo pospeševalcev absorpcije Cymal-7 in TMC, saj na podlagi literaturnih podatkov, pridobljenih na monosloju Caco-2 celic, značilno povečata prehod spojin, ki epitelij prehajajo s pasivno difuzijo. Pri tem smo uporabljali sistem difuzijskih celic *Easy Mount*[®] s pripadajočimi elektrodami in napravo za merjenje električnih parametrov (*voltage - current clamp*).

Izvajali smo poskuse samo z označevalci paracelularnega prehoda, ki smo jim v drugem sklopu poskusov dodajali pospeševalce paracelularnega prehoda Cymal-7 in TMC.

Dokazali smo, da LY in FITC-dekstran prehajata črevesno membrano le s pasivno difuzijo. Pospeševalci paracelularnega prehoda nimajo na permeabilnost označevalcev nobenega vpliva z izjemo 0,3 % Cymal-7, ki značilno poveča permeabilnost FITC-dekstrana.

Ugotovili smo, da je FITC-dekstran bolj primeren za poskuse permeabilnosti na izoliranem črevesju podgane v primerjavi z LY, saj: 1) ima nižje vrednosti P_{app} ; 2) je bolj občutljiv na vpliv pospeševalcev absorpcije; 3) ima večji razpon med P_{app} za mrtvo in vitalno tkivo in 4) izkazuje boljše elektrofiziološke parametre na tkivu.

Iz ugotovljenega lahko sklepamo, da je črevesni epitelij podgane bolj prepusten za LY kot pa monosloj Caco-2 celic, saj LY verjetno prosto prehaja črevesni epitelij. Vrednosti P_{app} za LY so na meji z vrednostmi P_{app} dobro permeabilnih spojin.

Ugotovili smo tudi, da je Cymal-7 boljši pospeševalec paracelularnega prehoda kot TMC.

2 SEZNAM OKRAJŠAV

ATP	adenozin 5'-trifosfat
cAMP	ciklični adenozin 3',5'-monofosfat
CD	gruča za določitev (<i>cluster of differentiation, cluster of determinants, cluster of designations</i>)
c-Yes	citoplazemska nереceptorska tirozin kinaza, ki jo kodira v-YES-1 yamaguchi sarkom virusni onkogen (<i>v-YES-1 yamaguchi sarcoma viral oncogene</i>)
Cymal-7	7-cikloheksilheptil-4-O-alfa-D-glukopiranozil-beta-D-glukopiranozid
DAG	diacilglicerol
EDTA	dinatrijeva sol etilendiamintetraocetne kisline
EGF	epidermalni rastni faktor
FITC-dekstran	fluoresceinizotiocianat-dekstran
HGF	hepatocitni rastni faktor (<i>epidermal growth factor</i>)
IF γ	interferon γ
IL	interlevkini
INN	mednarodno nelastniško ime
IP ₃	inozitol 1,4,5-trifosfat
JAM	stična povezovalna molekula (<i>junction adhesion molecule</i>)
LY	dinatrijeva sol Lucifer Yellow
MLC	lahka veriga miozina
MLCK	kinaza lahke verige miozina (<i>miozin light chain kinase</i>)
M \rightarrow S	prehod spojine iz mukozne na serozno stran tkiva
NHE3	Na ⁺ /H ⁺ izmenjevalec 3 (<i>Na⁺/H⁺ Exchanger-3</i>)
PAS	površinsko aktivna snov
Pd	transepitelijski električni potencial
PDR	količnik permeabilnosti med prehodom M do S in S do M (<i>permeability directional ratio</i>)
PKA	protein kinaza A
PKC	protein kinaza C
PLC	fosfolipaza C

PPE	pospeševalci paracelularnega prehoda
SGLT-1	Na ⁺ -glukoza kotransporter 1 (<i>Na⁺-Dependent Glucose Transporter-1</i>)
S → M	prehod spojne iz serozne na mukozno stran tkiva
TEER	transepitelijska električna upornost
TGF β1	transformirajoči rastni faktor β1
TJAP	proteini, povezani s tesnim stikom (<i>tight - junction - associated proteins</i>)
TMC	trimetil hitosan
TNFα	tumorje nekrotizirajoči faktor α
VAP-33	33 kDa velik protein, povezan z VAMP (<i>VAMP associated protein of 33 kDa</i>)
ZO	zonula occludens

3 UVOD

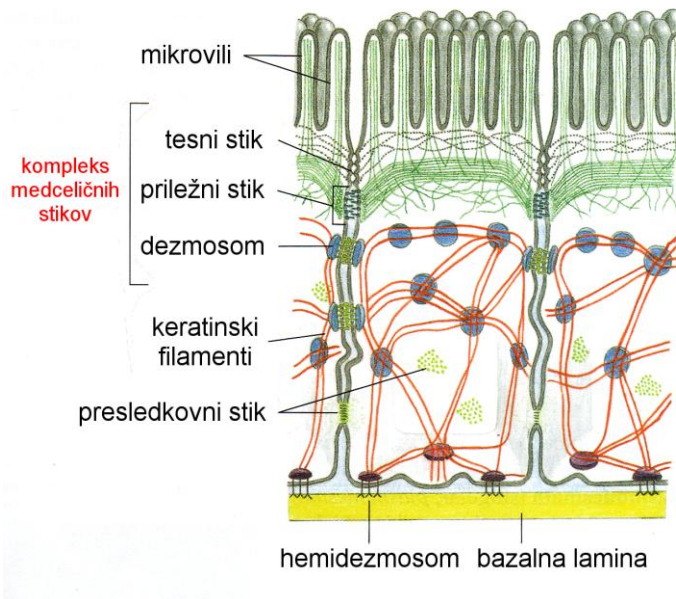
3.1 EPITELIJI

Mejo med telesom in zunanjim okoljem predstavlja površina sestavljena iz sosednje ležečih celic, ki ji pravimo epitelij. Epitelij pokriva vse proste površine telesa, to so zunanja plast kože, notranja površina prebavnih in dihalnih votlin, notranja površina srca in krvnih žil, zunanje in notranje stene notranjih organov ter vodi eksokrinih žlez. Izmenjava snovi (hranila, plini, izločki) in informacij (občutki, vonj, okus, svetloba) med telesom in zunanjim okoljem tako poteka le preko te meje.

Epitelij služi kot zaščitna in hkrati komunikacijska plast med telesom in zunanjim okoljem. Zgradba in funkcija epitelija morata na različnih površinah telesa to zagotavljati. Tako kožo pokriva večskladni epitelij (celice so naložene v več skladih, kar omogoča mehansko zaščito), prebavne cevi pa pokriva visokoprizmatični enoskladni epitelij (celice so naložene v enem skladu, kar omogoča hitro izmenjavo snovi) (1).

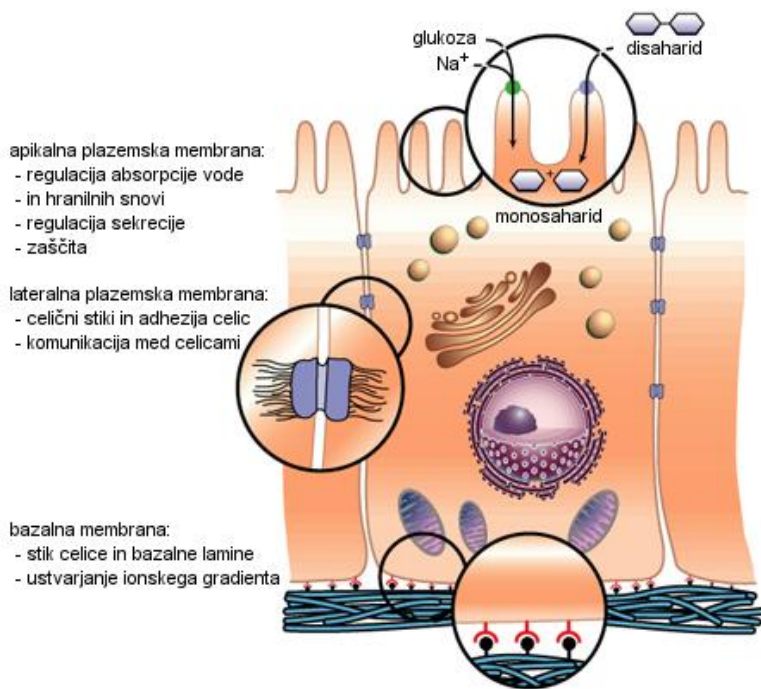
3.1.1 Značilnosti epitelija

1. Epitelij predstavlja povezana plast celic.
2. Epitelijske celice so povezane med sabo v bližini apikalne membrane z različnimi medceličnimi stiki (Slika 1); to so:
 - priležni stik (*adhering junction*, *zonula adherens*) daje celici mehansko oporo; primer je dezmosom;
 - tesni stik (*occluding junction*, *tight junction*, *zonula occludens*) ovira difuzijo snovi in pomaga ohranjati integriteto notranjega okolja telesa;
 - presledkovni stik (*gap junction* ali *nexus junction*) omogoča izmenjavo hranil, ionov in signalov med citoplazmami sosednjih celic brez prehoda skozi medcelični prostor.



Slika 1: Kompleks medceličnih stikov pri epiteliju črevesja (2)

3. Medcelični prostori v epiteliju so majhni. Od zunanjega okolja so ločeni z medceličnimi stiki. V primerjavi z vezivnim tkivom, epitelij vsebuje zelo malo intersticijske tekočine.
4. Epitelij je polariziran.
 - Prosta površina v stiku z zunanjim okoljem je apikalna membrana. Na drugi strani celice je bazalna membrana, ki je pritrjena na bazalno lamino. Bazalna lamina ločuje epiteljske celice od spodaj ležečega vezivnega tkiva. Lateralna membrana je z medceličnimi stiki povezana s sosednjo celico (Slika 2).
 - Sestava in lokalizacija membranskih proteinov je različna med apikalno, lateralno in bazalno membrano zaradi različnih vlog posamezne membrane.
 - Zgradba epiteljske celice in polarna razporeditev celičnih organelov je predvsem vidna v sekretornih in absorpcijskih celicah, kjer razporeditev odraža smer prenašanja snovi (1).



Slika 2: Epitelijska celica tankega črevesja (3)

3.1.2 Epiteliji kot mesto absorpcije učinkovin

Epitelij deluje kot pregrada, ki ločuje telo od zunanjega okolja in različne dele telesa med sabo. To doseže s prisotnostjo celične membrane in membranskih prenašalcev, znotrajceličnih encimov in stičnih kompleksov. Pasivno prehajanje ionov skozi membrano je omejeno in povzroči nastanek električnega potenciala preko epitelija. Hkrati pa se ioni s pomočjo specifičnih prenašalcev aktivno prenašajo preko membrane.

Molekule prehajajo skozi črevesni epitelij v krvni obtok na več različnih načinov:

- s pasivno difuzijo med dvema sosednjima celicama (paracelularni prehod);
- s pasivno difuzijo skozi celično membrano (transcelularni prehod);
- z aktivnim transportom s prenašalci (transcelularni prehod s prenašalci);
- s pinocitozo (endocitoza z eksocitozo).

Lipofilne molekule največkrat prehajajo skozi celično membrano s transcelularno difuzijo. V nasprotju z njimi pa hidrofilne molekule, ki jih prenašalci ne prepoznajo, ne morejo prodreti skozi lipidni dvosloj in se pretežno prenašajo po paracelularni poti; možen je tudi določen transcelularni prehod. Prehajanje molekul po paracelularni poti omejuje prisotnost tesnih stikov, ki delujejo kot pregrada (4, 5).

3.1.3 Elektrofiziološki parametri

Transport nabitih molekul preko epitelija ustvarjajo in vzdržujejo črpalke v membrani (najpomembnejša je Na^+/K^+ ATP-azna črpalka). Ta transport se odraža v obliki transepitelijskega potenciala (Pd). Na^+/K^+ ATP-azna črpalka ustvarja potencial tako, da v enem ciklu transportira dva K^+ iona v celico in tri Na^+ ione iz nje. Zaradi razlike v količini prenesenih ionov se ustvari elektrokemični potencial, ki ga lahko merimo.

V membrani obstajajo tudi črpalke, ki za svojo dejavnost uporabljajo elektrokemični gradient Na^+ . Kadar ne izločajo Na^+ enako nabitih ionov, prispevajo k elektrokemičnemu potencialu, saj spreminjajo razmerje ionov v celici in zunaj nje. Primer take črpalke je SGLT-1, ki transportira glikozo skupaj z Na^+ .

Količino ionov, ki se transportira skozi epitelij, merimo s kratkostičnim tokom (I_{SC}). Kratkostični tok je definiran kot tok, ki mora steči skozi tkivo, da začetna Pd vrednost pade na vrednost nič (6). Ta tok je enak vsoti vseh transportiranih ionov (Enačba 1).

$$I_{SC} = \sum_{i=1}^n z_i \cdot F \cdot J_i \quad \text{Enačba 1}$$

z_i ... valenca iona i

F ... Faradayeva konstanta

J_i ... pretok iona i preko epitelija z aktivnim transportom

V tankem črevesu sesalcev je kratkostični tok sestavljen iz absorpcije Cl^- in Na^+ ionov ter iz sekrecije HCO_3^- ionov (7).

Upornost tkiva pasivnemu pretoku ionov skozi pore v tkivu predstavlja transepitelijska električna upornost (TEER). TEER je sestavljena iz celičnega upora in upora tesnih stikov, ki sta med seboj vezana vzporedno (6). TEER izračunamo kot produkt ohmske upornosti in površine tkiva v difuzijski celici (Enačba 2).

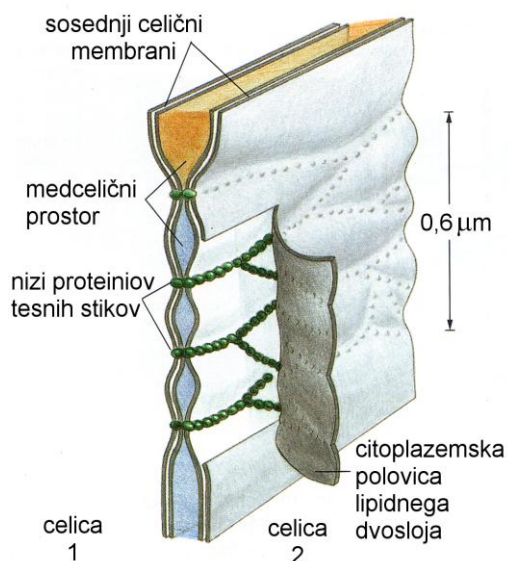
$$TEER = \frac{PD}{I_{SC}} \cdot A \quad \text{Enačba 2}$$

$TEER$... transepitelijska električna upornost [$\text{m}\Omega\text{cm}^2$]

- PD ... transepitelijski potencial [mV]
 I_{sc} ... kratkostični tok [μA]
 A ... površina tkiva v difuzijski celici (1cm^2)

3.2 TESNI STIK (zonula occludens)

3.2.1 Organiziranost tesnih stikov



Tesni stiki so organizirani v nize. Ti se med seboj prepletajo in tvorijo mrežo, ki povsem obkroža epitelijsko celico (8). Ti nizi se povezujejo z nizi v sosednji celici v stičnih točkah oziroma t. i. "kissing sites" (9). Število teh nizov je odvisno od vrste epitelijske celice in določa vrednost TEER; odnos med številom teh nizov in vrednostjo TEER je logaritemski. Zelo prepustni endoteliji na koncu kapilar tako nimajo tesnih stikov, neprepustni (hematoencefalna bariera) pa jih imajo veliko (10). Prav tako je prepustnost tesnih stikov vzdolž prebavnega trakta različna. Tanko črevo je na primer veliko bolj prepustno kot debelo črevo, saj ima debelo črevo večje število tesnih stikov (46).

Slika 3: Model organiziranosti tesnih stikov (3)

3.2.2 Funkcija

Tesni stik opravlja več funkcij, ki med seboj niso direktno povezane. Te funkcije so:

- **vrata:** dopušča prehod manjšim hidrofilnim molekulam, ne prepušča pa ionov in večjih hidrofilnih molekul, katerih molekulska masa presega vrednost 400–500 g/mol; poleg molekulske mase vpliva na prehod še fleksibilnost molekule, ki omogoča prehod večjim molekulam (9);
- **pregrada:** ne dopušča mešanja snovi iz bazolateralne strani s snovmi iz apikalne; prav tako ne dopušča mešanja prenašalcev oziroma elementov iz bazolateralne membrane v apikalno membrano in obratno in tako omogoča ohranjanje polarnosti epitelijskih celic (5, 11);

- **prenos signalov med sosednjima celicama:** proteini TJAP oziroma ZO sodelujejo v prenosu signalov s površine celice v jedro; ti signali so pomembni pri regulaciji proliferacije in diferenciacije celic (9).

3.2.3 Zgradba

Tesni stiki so zgrajeni iz transmembranskih in citosolnih proteinov, ki niso povezani samo med seboj, ampak tudi s citoskeletom in z membrano.

Transmembranski proteini

- Prvi identificirani transmembranski protein je bil **okludin**. Ta opravlja dvojno vlogo; daje strukturno trdnost tesnim stikom in uravnava funkcijo pregrade (11–13). Pred kratkim so odkrili, da opravlja še eno pomembno nalogo, in sicer regulacijo nastanka paracelularnih kanalov tesnih stikov (11) (*paracellular tight junction channels* ali PTJC). Paracelularni kanali tesnih stikov so ionski kanali, specifični za naboj in velikost, ki potekajo vzporedno ob lateralni membrani in pripomorejo pri paracelularnem prehajanju ionov (14–17). Strukturno je okludin transmembranski protein, ki štirikrat prebada membrano. N-terminalni in ekstracelularni del molekule sta pomembna pri dajanju strukturne trdnosti tesnim stikom (tvori dimer z okludinom v membrani sosednje epitelijske celice), C-terminalni del proteina pa uravnava tesnost tesnih stikov s povezavo s proteini TJAP. Ti so povezani s citoskeletom (5) ali pa direktno na F-aktin (to je veriga aktinskih molekul, ki sestavlja aktinski filament) (9). Poleg povezave s proteini TJAP so pomembnejše še povezave z regulatornimi proteini, kot so VAP-33, c-Yes, PKC- ζ in drugi, ki preko različnih signalnih poti modulirajo tesne stike (11).
- **Klavdini** so naslednja skupina transmembranskih proteinov, ki do sedaj šteje štiriindvajset članov. Različni klavdini sestavljajo različne epitelijske in endotelije z različnimi TEER in različno ionsko selektivnostjo (9). Klavdini imajo primarno vlogo pri reguliranju organiziranja proteinov tesnih stikov v nize. Poleg tega imajo še pomembno strukturno vlogo (5), pregradno vlogo (11) in vlogo vrat (9). Strukturno je klavdin tako kot okludin sestavljen iz štirih transmembranskih domen (11). Klavdini tvorijo dimer, ki se nato poveže s klavdinskim dimerom na sosednji membrani (8). Klavdini tvorijo tudi paracelularne kanale tesnih stikov, ki so

specifični za posamezen naboj (9, 11, 14–17). Na citoplazemski C-terminalni del okludina se vežejo proteini TJAP, ki povezujejo klavdine s citoskeletom (11).

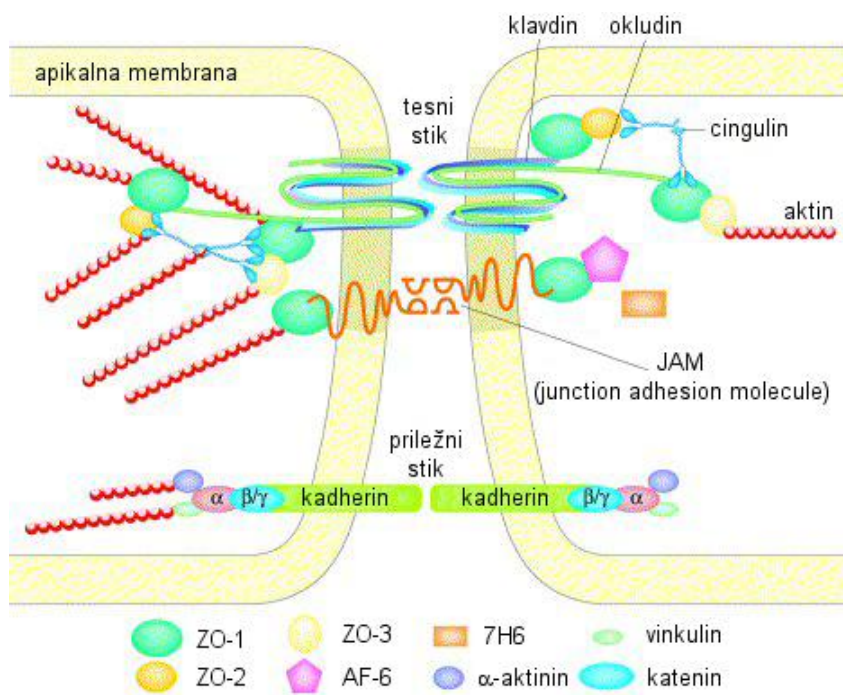
- **JAM** so transmembranski proteini, ki le enkrat prebadajo membrano. Lokalizirani so ob tesnih stikih. JAM tvori dimer, ki se poveže z dimerom molekul JAM v sosednji membrani (9). Skupino JAM sestavljajo JAM-1, JAM-2 in JAM-3. Spadajo v skupino imunoglobulinov in sodelujejo pri prehajanju levkocitov skozi paracelularne prostore epitelijev in endotelijev (8, 13, 18). JAM-1 je povezan z aktinom v citosolu ter z ZO-1, AF-6 in ASIP (11).

Citosolni proteini

- Trije citosolni fosfoproteini, ki jim pravimo **proteini TJAP** oziroma **ZO**, imajo primarno vlogo v povezavi okludina, klavdina in tesnostičnih fibril s citoskeletom. Poleg te primarne vloge imajo proteini TJAP še vlogo v regulaciji celične rasti in diferenciaciji celic. V zadnjih letih so ugotovili, da morda spadajo med močne tumor supresorje. Proteine TJAP sestavljajo proteini ZO-1, ZO-2 in ZO-3. Proteini ZO spadajo v skupino MAGUK (*membrane - associated guanylate kinase - like proteins*) proteinov (13). ZO-1 je prvi identificirani protein TJAP. Njegov N-terminalni del je povezan s C-terminalnim repom okludina ali klavdina, C-terminalni del pa interagira z F-aktinom citoskeleta. ZO-2 je prav tako povezan s C-terminalnim delom okludina ali klavdina in z N-terminalnim delom ZO-1. ZO-3 je povezan s proteinom ZO-1 in okludinom ali klavdinom, ne pa tudi z ZO-2. Govorimo o kompleksih ZO-1 in ZO-2 in kompleksih ZO-1 in ZO-3 (5, 11).
- **AF-6** je citosolni protein, ki je povezan s proteinom ZO-1 in regulira celične stike (8, 11). **Cingulin** je novoodkriti citosolni protein. Sestavljen je iz dveh peptidov, ki sta med seboj prepletena kot dvojna vijačnica (*coiled coil*) (13, 19). Povezuje ostale citosolne proteine (proteini ZO in AF6) in molekule JAM s citoskeletom (11). **Antigen 7H6** ali **barmotin** je fosfoprotein (19), ki je pomemben dejavnik za vzdrževanje pregradne funkcije tesnih stikov (9). **Simplekin** je prisoten le v epiteljskih tesnih stikih, kjer opravlja strukturno vlogo (11, 20).

Citoskeletna proteina **aktin** in **miozin** tvorita ob apikalni membrani pod tesnimi stiki gost obroč, ki se imenuje obšični aktinsko miozinski obroč (*perijunctional actin - myosin ring* ali PAMR). Ta obroč je povezan z aktinskimi filamentami, ki segajo v tesne in priležne stike

(10, 19). Osnovni protein citoskeleta aktin ima znana vezavna mesta na vseh proteinih TJAP, prav tako tudi na klavdinu in okludinu. Aktinski filamenti imajo v celici dinamično in strukturno vlogo. Mnoge študije so dokazale, da je integriteta tesnih stikov povezana z organiziranostjo aktina in da snovi, ki prekinajo aktinske povezave med celicami (citohalazin D, citokini in faloidin), spremenijo strukturo tesnih stikov in tako motijo njihovo funkcijo (8, 21).



Slika 4: Predlagane interakcije med proteini tesnih stikov in priležnih stikov pri hematoencefalni barieri (9).

3.3 REGULACIJA TESNIH STIKOV

3.3.1 Fiziološka regulacija

Fiziološka regulacija tesnih stikov je odvisna od funkcije posameznega epitelija. Tesnost intestinalnega epitelija se zmanjša po obroku, kar omogoča lažji prehod hidrofilnih hranilnih snovi (na primer glukoze in aminokislin) skozi paracelularni prostor. Raziskovalci predvidevajo, da predstavlja t. i. "vlek topila" (*solvent drag*), pomemben delež absorpcije hranil glede na transport s prenašalci. Solvent drag je mehanizem, po katerem topilo, kot je voda, s prehajanjem skozi epitelij zaradi osmoze lahko prenese s seboj topljence (22).

Zmanjšanje tesnosti intestinalnega epitelija po obroku je posledica absorpcije glukoze. Glukoza se absorbira v celico intestinalnega epitelija z Na^+ -kotransportom s SGLT-1. Po danes veljavni hipotezi naj bi Na^+ -glukoza kotransport sprožil aktivacijo Na^+/H^+ -izmenjevalca NHE3 na mukozni membrani, kar povzroči blago alkalizacijo citoplazme. To naj bi privedlo do fosforilacije lahkih verig miozina in posledično do kontrakcije obšičnega aktinsko miozinskega obroča. Kontrakcija obšičnega aktinsko miozinskega obroča pa potegne citoskeletna vlakna, ki so povezana s tesnimi stiki, tako se tesni stiki odprejo (5, 12, 23).

Na paracelularno permeabilnost vplivajo tudi različni endogeni dejavniki. **Hormoni** in **nevrottransmiterji**, kot so vazopresin, angiotenzin II in adrenalin, večajo paracelularno permeabilnost v hepatocitih. Tudi **mediatorji vnetja** oziroma **citokini**, kot so IL, TNF α , IF γ in **rastni faktorji** kot so HGF in drugi, delujejo na epiteljsko permeabilnost, tako da vplivajo na tesne stike (5).

Preglednica I: Vplivanje nekaterih citokinov in rastnih faktorjev na permeabilnost (2, 11, 23, 24, 25, 26)

	Ime	Mesto nastanka	Delovanje	Učinek na permeabilnost	Mehanizem delovanja
CITOKINI	IL-4	Aktivirani limfociti T_H2	Stimulira proliferacijo in dozorevanje limfocitov B in produkcijo IgE.	Poveča.	Aktivira tirozinsko kinazo.
	IF γ	Aktivirani limfociti T_H1 in naravne ubijalke	Aktivira makrofage in MHC gen v nekaterih celicah.	Poveča.	Povzroča premik okludina, proteinov JAM, ZO-1 in ZO-2 stran od tesnih stikov. Povzroča rušenje strukture aktinskega citoskeleta.
	TNF α	Mononuklearne celice	Vpliva na rast, diferenciacijo, vitalnost in fiziološko delovanje različnih tkiv.	Poveča.	Povzroča apoptozo, depolimerizacijo F-aktinskih filamentov, premik molekule JAM od tesnih stikov ter aktivira tirozin kinazo in protein kinazo A.

Nadaljevanje preglednice I

	Ime	Mesto nastanka	Delovanje	Učinek na permeabilnost	Mehanizem delovanja
RASTNI FAKTORJI	HGF	Mezenhimske celice	Uravnava rast, razvoj in delovanje ledvic in je pomemben pri obnovi renalnega epitelija po poškodbi.	Poveča.	Veže se na tirozin kinazni receptor <i>c-met</i> , kar povzroča fosforilacijo β -katenina in posledično zmanjša povezavo z E-kadherinom. Posledica vezave je tudi drugačna fosforilacija aminokislinskih ostankov E-kadherina kot pri normalnem delovanju.
	EGF	Različne celice v telesu (največ ga nastaja v žlezah slinavkah in ledvicah)	Stimulira rast različnih tkiv in je pomemben v embrionalnem razvoju.	Ni znano.	Veže se na tirozin kinazni EGF receptor, kar povzroča fosforiliranje tirozinskih ostankov ZO-1 in ZO-2 in povzroča redistribucijo aktina.
	TGF β 1	Trombociti, limfociti, makrofagi in endotelijske celice	Regulira proliferacijo in diferenciacijo epiteljskih celic, deluje protivnetno ...	Zmanjša.	Veže se na receptor, ki je lahko povezan s serin/treonin kinazo, kar povzroča zmanjšanje učinkov IF γ , IL-4 in IL-10 in stimuliranje formiranja tesnih stikov in priležnih stikov.

Skozi medcelične prostore lahko preko endotelijev in epitelijev prehajajo levkociti tako med normalnim delovanjem imunskega sistema kot med vnetnimi reakcijami. Razlike med prehajanjem skozi endotelij in epitelij so velike (že sama smer prehajanja je obratna). Za prehod levkocitov pri normalnem delovanju velja, da je to hiter proces in da ne poškoduje integritete monosloja. Pri takšnem prehodu imajo odločilno vlogo interakcije med receptorji epitelija in levkocitov (levkocit β_2 integrin CD11b/CD18 receptor in CD47 receptor), ki aktivirajo signalne poti in s tem povzročijo hitro odprtje in kasnejše zaprtje tesnih stikov (27). Pri vnetju pa je zbiranje in prehajanje levkocitov ter odpiranje prehodov med celicami povezano tudi z delovanjem pro-vnetnih citokinov, ki že sami povečajo permeabilnost (IL, IF γ ...). Povečan prehod levkocitov spremeni strukturo tesnih stikov (fosforilacija MLC povzroči skrčenje obstičnega aktinsko miozinskega obroča in posledično odprtje tesnih stikov, tirozinska fosforilacija proteinov tesnih stikov pa

povzroči ločitev ZO-1 od okludina in reorganizacijo aktinskega citoskeleta). Normalno prehajanje levkocitov naj ne bi vplivalo na paracelularno permeabilnost (10).

3.3.2 Regulacija na celičnem in molekularnem nivoju

Okludin in proteini TJAP naj ne bi le povezovali tesnih stikov z membrano in citoskeletom, ampak tudi uravnavali delovanje tesnih stikov. Tudi mnogi znani sekundarni prenašalci in protein kinaze signalnih poti sodelujejo v procesu regulacije delovanja tesnih stikov. PKC, tirozin kinaza in Ca^{2+} tako vplivajo na nastanek oziroma izgradnjo tesnih stikov in njihove pregradne lastnosti. Končni učinek vplivanja na te signalne poti je fosforilacija proteinov tesnih stikov ali premestitev (skrčenje ali relaksacija) obstečnega aktinsko miozinskega obroča. Tako na primer fosforilacija serinskih ostankov okludina pospeši izgradnjo tesnih stikov, medtem ko fosforilacija tirozinskih ostankov proteina ZO-1 povzroči razgradnjo struktur tesnih stikov (12).

Fosforilacija delov tesnih stikov je pomemben korak v uravnavanju delovanja le-teh. Regulatorni proteini tesnih stikov (okludin in proteini TJAP) so fosfoproteini. Fosforilacija okludina bi bila lahko povezana tudi z izgradnjo tesnih stikov.

Preglednica II: Vpliv nekaterih učinkovin na encime (12)

Encim	Učinkovina	Vpliv na encim	Vpliv na tesne stike
Serinska/treoninska fosfataza	Okadaična kislina	Zavira.	Moti delovanje tesnih stikov.
Serinska/treoninska kinaza	H7, H8 in stavrosporin	Zavira.	Stabilizira delovanje tesnih stikov.
Tirozinska fosfataza	Pervanadat in fenilarzinski oksid	Zavira.	Moti delovanje tesnih stikov.

Iste signalne poti, ki povzročijo fosforilacijo proteinov tesnih stikov, naj bi uravnavale aktinski citoskelet, ki povezuje tesne in priležne stike. Poskusi na ileumu hrčka so pokazali povezavo med razdorom aktinskega citoskeleta s citohalazinom D in povečanim prehodom Na^+ in manitola, kar naj bi kazalo na pomembnost strukturne trdnosti citoskeleta za uravnavanje funkcije tesnih stikov (5).

Ca^{2+} vpliva na aktivnost tesnih stikov tako znotrajcelično kot zunajcelično. Zunajcelični Ca^{2+} je nujen za E-kadherinske povezave; če ga odstranimo, pride do padca TEER in porasta permeabilnosti. Znotrajcelični Ca^{2+} je pomemben za stike med sosednjima celicama, za povečanje TEER, za migracijo proteina ZO-1 na citoplazemsko membrano in za izgradnjo tesnih stikov (8). Porast znotrajceličnega Ca^{2+} (v prvi fazi se sprosti Ca^{2+} iz notranjih zalog, v drugi fazi pa se odprejo kationski kanali v celični membrani) pa je povezan s povečano paracelularno permeabilnostjo (28).

Izoencimi **PKC** so pomembni regulatorji tvorbe in uravnavanja delovanja tesnih stikov. PKC ima veliko učinkov, med katerimi je pomembna migracija proteina ZO-1 na citoplazemsko membrano medceličnih stikov. Splošno gledano naj bi aktivacija izoencimov PKC povečala prepustnost tesnih stikov v epiteliju, vendar pa so sami mehanizmi in učinki zapleteni in različni, saj obstaja veliko izoform encima PKC (29).

Sekundarni prenašalec **cAMP** in **PKA** (od cAMP odvisna protein kinaza) sta udeležena v veliko signalnih poteh. Med drugim sta udeležena tudi v regulaciji paracelularne permeabilnosti, kjer so opazili različne učinke. Na kulturi endotelijskih celic možganov (hematoencefalna bariera) povzroči stimulacija s cAMP reverzibilno povečanje TEER. To naj bi kazalo na obstoj tesnostičnega proteina oziroma proteinov, ki se fosforilirajo s PKA (cAMP odvisna protein kinaza). Ti proteini naj bi glede na svoje fosforilacijsko stanje regulirali interakcije med citoskeletom in plazemsko membrano (8, 29) in tako kontrolirali permeabilnost. Za razliko od endotelijskih celic možganov pa stimulacija endotelijskih celic s cAMP povzroči fosforilacijo MLC, kar vpliva na nastanek prostorov med endotelijskimi celicami in posledično povečano permeabilnost (30).

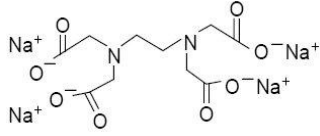
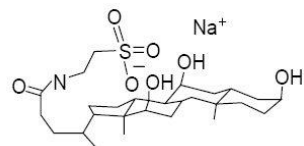
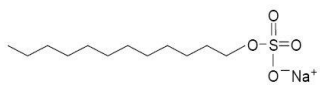
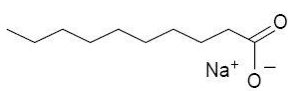
3.4 MODULACIJA TESNIH STIKOV S PPE

3.4.1 Pospeševalci paracelularnega prehoda (PPE)

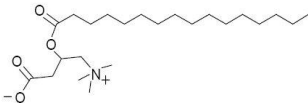
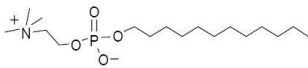
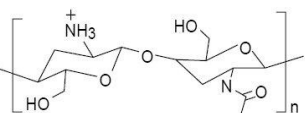
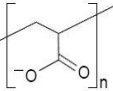
Prisotnost tesnih stikov močno omejuje prehajanje hidrofilnih molekul skozi intestinalni epitelij. Zato raziskovalci poskušajo razviti pospeševalce absorpcije, s katerimi bi lahko varno in učinkovito kontrolirali prepustnost tesnih stikov.

Znano je, da več eksogenih spojin, kot so kelatorji Ca^{2+} , PAS in kationski polimeri, povečuje paracelularno permeabilnost. Vendar pa za večino PPE točen mehanizem delovanja še ni popolnoma znan.

Preglednica III: Predstavniki skupin PPE in njihov vpliv na pospešitev paracelularnega prehoda v celicah Caco-2 (5, 18, 31)

Skupina	Ime in struktura predstavnika	Učinkovita koncentracija	Učinek pri tej koncentraciji	Mehanizem delovanja
Ca ²⁺ kelatorji	EDTA 	1 mM	6-krat poveča prehod fluoresceinizotiocianat-dekstana.	Kelira zunajcelični Ca ²⁺ , moti stike med celicami in povzroča s tem povezane znotrajcelične dogodke.
žolčne soli	natrijev tavroholat 	20 mM	5-krat poveča prehod manitola.	Vriva se v membrano (spremeni njeno fluidnost), poveča znotrajcelični Ca ²⁺ in povzroči razpustitev verig aktina.
anionski PAS	natrijev dodecilsulfat 	0,4 mM	4-krat poveča prehod manitola.	Vriva se v membrano, poveča znotrajcelični Ca ²⁺ in povzroči znižanje znotrajcelične koncentracije ATP.
srednje dolge maščobne kisline	natrijev kaprat 	10 mM	8-krat poveča prehod manitola.	Poveča znotrajcelični Ca ²⁺ , povzroči znižanje znotrajcelične koncentracije ATP in deluje preko PLC.

Nadaljevanje Preglednice III

Skupina	Ime in struktura predstavnika	Učinkovita koncentracija	Učinek pri tej koncentraciji	Mehanizem delovanja
estri maščobnih kislin	palmitoilkarnitin 	0,2 mM	10-krat poveča prehod manitola.	Vriva se v membrano in povzroči znižanje znotrajcelične koncentracije ATP.
fosfatni estri	dodecilsfosfolin 	0,75 mM	10-krat poveča prehod manitola.	Zavira PLC.
kationski polimeri	hitosan 	0,3 μM	8-krat poveča prehod manitola pri pH=5,5.	Poveča permeabilnost apikalnih delov membrane, depolimerizira aktin in povzroči mukoadhezijo in spremembe v lokalizaciji proteina ZO-1.
polikarbofili	karbomer 	1 % (m/v) Carbopol® 934P	11-krat poveča prehod manitola.	Kelira zunajcelični Ca ²⁺ in povzroči mukoadhezijo.

Za večino PPE velja, da imajo zelo ozek razpon med citotoksičnostjo in sposobnostjo povečanja paracelularne permeabilnosti (učinkovitostjo). Učinkovitost in citotoksičnost PPE, kot so SDS, palmitoilkarnitin in drugi, se razlikujeta manj kot za faktor 2. S strukturnimi spremembami so uspeli razviti nekatere sintezne fosfolipide, ki imajo razmerje med citotoksičnostjo in učinkovitostjo 3. Čeprav je razmerje majhno, pa sposobnost povečanja paracelularne permeabilnosti pri mnogih PPE ni direktno posledica njihove citotoksičnosti. Tak primer je palmitoilkarnitin, ki poveča permeabilnost na račun rušenja integritete tesnih stikov, medtem ko je njegova citotoksičnost posledica liziranja apikalne membrane (5).

Zbrani podatki vpliva pospeševalcev paracelularnega prehoda na označevalce paracelularnega prehoda pričajo o tem, da so Caco-2 celice zelo občutljive na vpliv PPE. Caco-2 je celična linija, ki je pridobljena iz celic karcinoma kolona človeškega izvora. Tesni stiki Caco-2 celic so zato številni in zelo tesni. TEER vrednosti Caco-2 celic so za približno faktor deset večje kot TEER vrednosti tankega črevesja podgane (38). Ker je epitelij zelo tesen, lahko že nizke koncentracije PEE, ki odpirajo tesne stike, značilno vplivajo na permeabilnost spojin, ki prehajajo epitelij pasivno paracelularno. Ta občutljivost Caco-2 celic na vpliv PPE je ena izmed slabosti, kadar napovedujemo vpliv PPE na tanko črevesje podgane oziroma na človeško črevesje glede na podatke pridobljene na Caco-2 celicah. Pomanjkanje *in vivo* študij na tem področju pa natančno napovedovanje vpliva PPE na človeka še dodatno zaplete.

3.4.2 Mehanizem delovanja PPE

3.4.2.1 PLC signalna pot

Aktivacija signalne poti PLC je povezana z izgradnjo, regulacijo in pregradnimi lastnostmi tesnih stikov. Signalna pot se začne s PLC-pretvorbo fosfatidil-inozitol (4,5)-bifosfonata v IP_3 in DAG. IP_3 se sprosti v citosol, kjer se veže na IP_3 -receptor na endoplazmatskem retikulumu in ga aktivira. Aktivacija IP_3 -receptorja povzroči sprostitvev Ca^{2+} iz endoplazmatskega retikuluma. Povečana citosolna koncentracija DAG in Ca^{2+} povzroči aktivacijo PKC. Povečan znotrajcelični Ca^{2+} povzroči z aktivacijo Ca^{2+} /kalmodulin odvisnih kinaz aktivacijo MLCK. MLCK fosforilira lahke verige miozina. Posledica tega pa je kontrakcija obstičnega aktinsko miozinskega obroča. Posledica skrčitve obroča je odprtje tesnih stikov (5, 28).

Vpliv DAG in posledične aktivacije PKC na paracelularno permeabilnost pa še ni povsem razjasnjen, saj si rezultati različnih raziskav medsebojno nasprotujejo (5). Tako je aktivacija različnih izoform PKC povezana z izgradnjo in razgradnjo tesnih stikov (11) in s fosforilacijo proteinov priležnih stikov, kar vodi v izgubo pregradne funkcije priležnih stikov (28).

V zadnjih letih so prišli do dokazov, da zaviranje določenih izoform encima PLC (PLC- β in PLC- γ) poveča permeabilnost paracelularnega prehoda, kar dodatno zaplete situacijo. Tako je zaviranje PLC- β povezana s povečano permeabilnostjo in zmanjšanjem TEER. Pri tem so opazili disorganizacijo aktinskih filamentov. Tudi zaviranje PLC- γ je povezana s povečano permeabilnostjo, vendar pa je učinek na aktinske filamente drugačen (21).

3.4.2.2 Znižanje znotrajcelične koncentracije ATP

Znižanje znotrajcelične koncentracije ATP je zelo učinkovit način za povečanje paracelularne permeabilnosti. Tako zaviralci glikolize in oksidativne fosforilacije povzročijo padec TEER in povečanje paracelularnega prehoda. Z odvzemom ATP spremenimo delež fosforiliranih regulatornih proteinov tesnih stikov, saj z znižanjem znotrajcelične koncentracije ATP kinazam odvezamo substrat, potreben za fosforilacijo teh proteinov. Fosforilacija proteinov tesnih stikov je pomembna za regulacijo tesnosti tesnih stikov in za njihovo strukturo.

Znižanje znotrajcelične koncentracije ATP povzroči tudi rušenje aktinskega citoskeleta, kar dodatno poveča paracelularni prehod (8). Vendar z znižanjem znotrajcelične koncentracije ATP odvezamo celicam vir energije in tako povzročimo citotoksičnost (5).

3.4.2.3 Tirozin kinaza-fosfataza signalna pot

Neselektivni zaviralci fosfataz, kot sta npr. natrijev vanadat(V) in H_2O_2 , zmanjšajo vrednosti TEER in povzročijo premik TJAP-proteina ZO-1 v strukturi tesnih stikov. Podobno kot neselektivni zaviralci fosfataz tudi selektivni zaviralci, kot je npr. fenilarginin oksid, zmanjšajo vrednosti TEER in povečajo tirozinsko fosforilacijo proteinov ZO-1 in ZO-2. Vendar pa citotoksičnost teh spojin še ni povsem raziskana (5).

3.4.2.4 Znižanje koncentracije zunajceličnega Ca^{2+}

Povezave med strukturami priležnih stikov v epiteliju sosednjih celic vzdržujejo njihovo adhezijo in tako tudi paracelularni prostor. Mehanizem delovanja Ca^{2+} kelatorjev, kot je npr. EDTA, je morda ravno oslabitev teh povezav. Ca^{2+} kelatorji vežejo zunajcelični Ca^{2+} , ki je potreben za povezavo struktur priležnih stikov. Zato lahko v tem primeru govorimo o fizični oslabitvi adhezije med sosednjima celicama.

Vezava zunajceličnega Ca^{2+} bi lahko aktivirala tudi znotrajcelične protein kinaze, ki povzročijo rušenje stičnih struktur. Tako povzročena povečana paracelularna permeabilnost je reverzibilen proces. Ta proces lahko obrnemo z zaviranjem proteinskih kinaz.

Ca^{2+} kelatorji lahko delujejo tudi preko aktivacije tirozin kinaze in posledično povečajo paracelularno permeabilnost zaradi fosforiliranja tirozinskih ostankov β -katenina in E-kadherina, ki sta najpomembnejša proteina priležnih stikov. Ugotovili so, da tirozinska fosforilacija proteinov priležnih stikov povzroči disociacijo teh stikov in posledično njihov

razpad. Posledica razpada priležnih stikov pa je razpad tesnih stikov (32). Keliranje zunajceličnega Ca^{2+} je povezano z aktivacijo MLC kinaze, ki fosforilira lahke verige miozina; to je prvi korak v procesu kontrakcije aktinskih in miozinskih filametrov citoskeleta. Kontrakcija citoskeleta povzroči odprtje tesnih stikov (33). Tako morda kelatorji ne delujejo le preko fizične prekinitve adhezije med sosednjima celicama, ampak tudi na signalne poti, ki regulirajo strukturno integriteto tesnih stikov (5).

3.4.2.5 Mehanizem delovanja polimernih PPE

Polimerni PPE, kot so hitosani, se vežejo na površino epitelija. Vezava na površino povzroči redistribucijo F-aktina v citoskeletu in premik TJAP proteina ZO-1 v strukturi tesnih stikov. Rezultat tega je večja paracelularna prepustnost za hidrofilne molekule različnih molekulskih mas.

Učinkovitost hitosanov je pogojena z njihovim pozitivnim nabojem. Površina epitelnih celic je prekrita z glikokaliksom, kjer je veliko sialične kisline in je zaradi tega negativno nabita. Med hitosani, ki so v kislem pH pozitivno nabiti in negativno nabito površino epitelija pride do močnega privlaka zaradi naboja. Mukozni sloj, ki prekriva črevesno tkivo, pa vezavo hitosana na površino epitelija ovira (5).

3.4.2.6 Vezava na proteine tesnih stikov

V zadnjem času so odkrili novo skupino PPE, ki naj bi delovali po povsem drugačnem mehanizmu. Selektivno naj bi interagirali z zunanji deli proteinov tesnih stikov ali pa bi se nanje vezali. Primer take snovi je C-terminalni del CPE (*Clostridium perfringens* enterotoksin), ki naj bi s svojim delovanjem povzročil delokalizacijo proteina ZO-1. Ta učinek je posledica vezave na klavdina 3 in 4, pri čemer se porušijo homofobne interakcije proteinov tesnih stikov (11). Pri tej skupini je presenetljivo to, da proteini s tako visoko molekulsko maso vplivajo na paracelularno permeabilnost z direktnimi interakcijami z zunanji deli proteinov tesnih stikov, saj tako velike molekule naj ne bi prehajale skozi paracelularni prostor (5).

3.4.2.7 Endocitoza proteinov tesnih in priležnih stikov

V zadnjih letih so različni raziskovalci odkrili, da obstaja nov mehanizem regulacije tesnih stikov in posledično paracelularne permeabilnosti (11). To je endocitoza proteinov tesnih in priležnih stikov. Sam mehanizem še ni povsem razkrit, vendar pa obstajajo dokazi, da v

tem procesu sodelujejo različne signalne poti (na primer keliranje zunajceličnega Ca^{2+} , aktivacija PKC in regulacija aktinskega citoskeleta) (11).

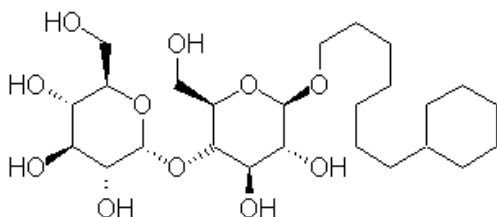
3.4.3 Sistemska toksičnost PPE

Funkcija tesnih stikov kot pregrade je fiziološko zelo pomembna, saj organizem tako vzdržuje elektrolitski gradient in membransko polarnost, poleg tega pa tudi zadržuje makromolekule in bakterije zunaj telesa.

Dokazano je, da je sindrom črevesnega vnetja (IBS) povezan s povečano paracelularno permeabilnostjo. Fragmenti bakterij prodirajo zaradi "netesnjelj" epitelija kolona iz lumna v področja pod epitelijem. To privede do vnetne reakcije, v kateri so udeleženi makrofagi in monociti iz lamine propriae. Zato obstaja bojazen, da bi PPE lahko povzročili vnetne reakcije, podobne IBS. Vendar bodo potrebne dodatne raziskave, ki bi potrdile oziroma zavrgle te domneve (5).

3.5 7-CIKLOHEKSILHEPTIL-4-O-ALFA-D-GLUKOPIRANOZIL-BETA-D-GLUKOPIRANOZID (CYMAL-7)

Cymal-7 je predstavnik alkilglikozidov, družine neionskih surfaktantov. Je maltozid sestavljen iz sladkornega dela (maltoza) in nesladkornega dela (7-cikloheksilheptil) (Slika 5).

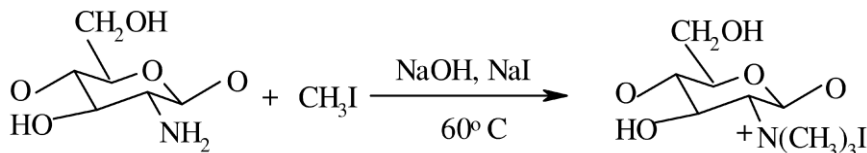


Slika 5: Kemijska struktura Cymal-7 (34)

Alkilglikozidi delujejo tako, da povečajo paracelularni in transcelularni prehod skozi membrano. Interagirajo z membrano na ta način, da spremenijo urejenost strukture lipidnega dvosloja (35).

3.6 TRIMETIL-HITOSAN (TMC)

TMC je predstavnik polimernih pospeševalcev paracelularnega prehoda. Je derivatiziran hitosan. Amino skupina na C-2 je metilirana. Pripravljen je s kemijsko sintezo iz nesubstituiranega hitosana (Slika 6).



Slika 6 : Shema sinteze N,N,N-trimetilhitosanijevega klorida (36)

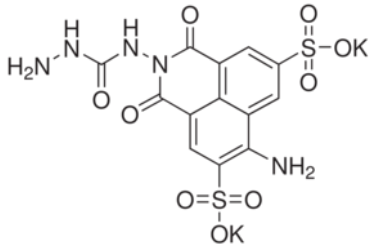
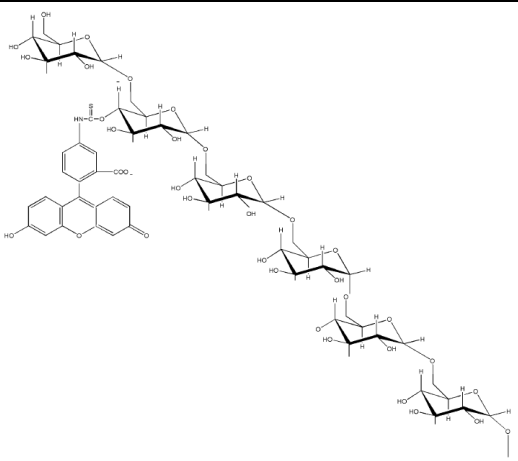
Deluje tako da se veže na površino epitelija in povzroči redistribucijo F-aktina v citoskeletu in premik TJAP proteina ZO-1 v strukturi tesnih stikov

3.7 OZNAČEVALCI PARACELULARNEGA PREHODA

Označevalci paracelularnega prehoda so spojine, ki prehajajo skozi črevesni epitelij po paracelularni poti. Mi smo uporabili LY in FITC-dekstran, ki v normalnih fizioloških pogojih prehajata skozi črevesni epitelij pasivno paracelularno (37, 38).

V zadnjih letih raziskovalci pogosto uporabljajo tudi označevalce, označene z radioaktivnimi izotopi. Najpogosteje uporabljeni označevalec iz te skupine je [³H] manitol.

Preglednica IV: Fizikalno - kemijski podatki za LY in FITC-dekstran (39, 40, 41)

		
INN ime	Lucifer yellow	Fluoresceinizotiocianat-dekstran
Kemijsko ime	Kalijeva sol 6-amino-2-[(hidrazinkarbonil)amino]-2,3-dihidro-1,3-diokso-1H-benzo[d,e]izokinolin-5,8-disulfonske kisline	Fluoresceinizotiocianat-dekstran (0.002–0.020 mol fluorescein izotiocianata/mol glukoze)
Molekulska masa [g/mol]	521.56	Povprečna molekulska masa: 3000–5000
Izgled	Rdeč prah	Rumeno oranžen prah
Topnost v vodi	1 mg/mL	50 mg/mL

4 NAMEN DELA

Raziskovalci so se v zadnjih letih veliko posvečali preučevanju paracelularnega prehoda spojin. Veliko hidrofilnih učinkovin (npr. peptidi, proteini, bifosfonati) se slabo absorbira iz prebavnega trakta zaradi slabe permeabilnosti preko črevesnega epitelija. Absorpcijo in s tem večjo biološko uporabnost teh spojin lahko povečamo z istočasno uporabo pospeševalcev paracelularnega prehoda. Pri tem se permeabilnost hidrofilnih učinkovin poveča zaradi povečanega paracelularnega prehoda skozi črevesni epitelij.

Namen diplomske naloge bo preučevanje primernosti Lucifer Yellow (LY) in Fluorescein izotiocianat-dekstrana (FITC-dekstrana), kot indikatorjev paracelularnega prehoda v poskusih na izoliranem črevesju podgane. Na permeabilnost LY in FITC-dekstrana bomo vplivali z uporabo pospeševalcev paracelularnega prehoda (PPE) Cymal-7 in TMC, saj na podlagi literaturnih podatkov, pridobljenih na Caco-2 celični liniji, značilno povečata prehod spojin, ki črevesni epitelij prehajajo s pasivno difuzijo preko tesnih stikov. Na podlagi podatkov, ki jih bomo pridobili, bomo vrednotili učinkovitost uporabljenih pospeševalcev absorpcije Cymal-7 in TMC na izoliranem črevesju podgane. Poskuse permeabilnosti bomo izvajali s pomočjo sistema difuzijskih celic *Easy Mount*[®]. Pri tem bomo merili elektrofiziološke parametre, s katerimi bomo vrednotili vitalnost in integriteto izoliranega tkiva. Koncentracije označevalcev paracelularnega prehoda bomo merili s čitalcem mikrotitrskih ploščic Tecan Safire na podlagi fluorimetrične spektrometrije.

V prvem delu bomo preučevali permeabilnost LY skozi izoliranim segment črevesja podgane. Nato bomo s pomočjo pospeševalcev paracelularnega prehoda, Cymal-7 in trimetil-hitosana (TMC), vrednotili vpliv le-teh na permeabilnost LY. Skušali bomo potrditi predpostavko, da Cymal-7 in TMC povečata permeabilnost LY, saj odpirata tesne stike.

V drugem delu bomo preučevali permeabilnost FITC-dekstrana skozi segment črevesja podgane in rezultate primerjali z rezultati, ki jih bomo pridobili z LY. Nato bomo vrednotili vpliv Cymal-7 in TMC na permeabilnost FITC-dekstrana. Tako kot pri LY pričakujemo, da bodo pospeševalci paracelularnega prehoda povečali permeabilnost FITC-dekstrana.

V zadnjem delu bomo na podlagi vseh pridobljenih podatkov, tako navideznih permeabilnostnih koeficientov, kot elektrofizioloških parametrov skušali ovrednotiti, kateri izmed testiranih označevalcev paracelularnega prehoda je primernejši za poskuse permeabilnosti na izoliranem črevesju podgane.

5 MATERIALI IN METODE

5.1 Reagenti

- D-manitol
- alfa-D-(+)-glukoza
- natrijev klorid
- kalijev klorid
- magnezijev klorid heksahidrat
- kalcijev klorid dihidrat
- natrijev dihidrogenfosfat monohidrat
- dinatrijev hidrogenfosfat dihidrat
- natrijev hidrogenkarbonat
- kalijev dihidrogenfosfat
- agar-agar, v prahu
- dinatrijeva sol Lucifer Yellow CH, Sigma
- fluoresceinizotiocianat–dekstran, Sigma
- Cymal[®]-7 Anagrade[®], Anatrace, Affymetrix
- trimetil-hitosan, sintetiziran na Kemijskem inštitutu v Ljubljani

5.2 Raztopine

5.2.1 Osnovne raztopine

Za pripravo osnovnih raztopin smo uporabili raztopine Ringerjevih pufrov z različnimi vrednostmi pH. Raztopine smo pripravili, tako da smo dvolitrsko bučo napolnili z ohlajeno demineralizirano vodo do približno 75 % volumna in nato postopoma dodajali zatehtane soli, tako da smo naslednjo sol dodali šele, ko se je predhodna popolnoma raztopila.

Preglednica V: Sestava raztopin Ringerjevih pufrov

Reagenti	Ringerjev pufer	
	pH = 7,45	pH = 7,85
NaHCO ₃	1,260 g	4,200 g
NaH ₂ PO ₄ × H ₂ O	0,110 g	0,110 g
NaCl	15,125 g	13,080 g
KCl	0,746 g	0,746 g
CaCl ₂ × 2H ₂ O	0,352 g	0,352 g
MgCl ₂ × 6H ₂ O	0,488 g	0,488 g
Na ₂ HPO ₄ × 2H ₂ O	0,570 g	0,570 g

5.2.2 Raztopine za pripravo donorskih in akceptorskih raztopin

625 mM raztopina glukoze

5,63 g glukoze raztopimo z Ringerjevim pufrom pH = 7,85 v 50 mL bučki.

625 mM raztopina manitola

5,693 g manitola raztopimo z Ringerjevim pufrom pH = 7,45 v 50 mL bučki.

5 mM raztopina Lucifer Yellow

Pripravimo bolj koncentrirano raztopino LY, tako da približno 2,6mg LY raztopimo v približno 1000 µL Ringerjevega pufra pH = 7,45 tako, da dobimo raztopino ustrezne koncentracije.

20 µM raztopina Lucifer Yellow

200 µL 5 mM raztopine LY redčimo z Ringerjevim pufrom pH = 7,45 do 50 mL.

0,2 mg/mL raztopina FITC-dekstrana

5 mg FITC-dekstrana raztopimo z Ringerjevim pufrom pH = 7,45 v 25 mL bučki.

10 mM raztopina glukoze

800 µL 625 mM raztopine glukoze redčimo z Ringerjevim pufrom pH = 7,85 do 50 mL.

10 mM raztopina manitola

800 µL 625 mM raztopine manitola redčimo z Ringerjevim pufrom pH = 7,45 do 50 mL.

10 mM raztopina glukoze za prenos

4 mL 625 mM raztopine glukoze redčimo z Ringerjevim pufrom pH = 7,85 do 250 mL.

Akceptorska raztopina

To je 10 mM raztopina glukoze v Ringerjevem pufru pH = 7,85. Pripravimo jo med poskusom, tako da v komoro, po vstavitvi tkiva, na serozno stran odpipetiramo 2460 μ L Ringerjevega pufru pH = 7,85 in 40 μ L 625 mM raztopine glukoze.

5.2.3 Donorske in akceptorske raztopine pri poskusih z LY**0,03 % (m/v %) donorska raztopina Cymal-7 in TMC**

To je 10 mM raztopina manitola, 20 μ M raztopina LY in 0,03 % raztopina Cymal-7 oz. TMC v Ringerjevem pufru pH = 7,45. Najprej pripravimo raztopino brez manitola tako, da 7,5 mg Cymal-7 oz. TMC raztopimo z 20 μ M raztopino LY v 25 mL bučki. Nato, med poskusom, po stabilizaciji tkiva, na serozno stran odpipetiramo 2460 μ L tako pripravljene raztopine in 40 μ L 625 mM raztopine manitola.

0,3 % (m/v %) donorska raztopina Cymal-7 in TMC

To je 10 mM raztopina manitola, 20 μ M raztopina LY in 0,3 % raztopina Cymal-7 oz. TMC v Ringerjevem pufru pH = 7,45. Najprej pripravimo raztopino brez manitola tako, da 75 mg Cymal-7 oz. TMC raztopimo z 20 μ M raztopino LY v 25 mL bučki. Nato, med poskusom, po stabilizaciji tkiva, na serozno stran odpipetiramo 2460 μ L tako pripravljene raztopine in 40 μ L 625 mM raztopine manitola.

3 % (m/v %) donorska raztopina Cymal-7 in TMC

To je 10 mM raztopina manitola, 20 μ M raztopina LY in 3 % raztopina Cymal-7 oz. TMC v Ringerjevem pufru pH = 7,45. Najprej pripravimo raztopino brez manitola tako, da 750 mg Cymal-7 oz. TMC raztopimo z 20 μ M raztopino LY v 25 mL bučki. Nato, med poskusom, po stabilizaciji tkiva, na serozno stran odpipetiramo 2460 μ L tako pripravljene raztopine in 40 μ L 625 mM raztopine manitola.

10 % (m/v %) donorska raztopina Cymal-7

To je 10 mM raztopina manitola, 20 μ M raztopina LY in 10 % raztopina Cymal-7 v Ringerjevem pufru pH = 7,45. Najprej pripravimo raztopino brez manitola tako, da

2500 mg Cymal-7 raztopimo z 20 μ M raztopino LY v 25 mL bučki. Nato, med poskusom, po stabilizaciji tkiva, na serozno stran odpipetiramo 2460 μ L tako pripravljene raztopine in 40 μ L 625 mM raztopine manitola.

5.2.4 Donorske in akceptorske raztopine pri poskusih s FITC-dekstranom

0,3 % (m/v %) donorska raztopina Cymal-7 in TMC

To je 10 mM raztopina manitola, 0,2 mg/mL raztopina FITC-dekstrana in 0,3 % raztopina Cymal-7 oz. TMC v Ringerjevem pufri pH = 7,45. Najprej pripravimo raztopino brez manitola tako, da 75 mg Cymal-7 oz. TMC raztopimo z 0,2 mg/mL raztopino FITC-dekstrana v 25 mL bučki. Nato, med poskusom, po stabilizaciji tkiva, na serozno stran odpipetiramo 2460 μ L tako pripravljene raztopine in 40 μ L 625 mM raztopine manitola.

5.2.5 Raztopine za pripravo elektrod

3M raztopina KCl

111,8 g KCl raztopimo v 500 mL demineralizirane vode.

3-4 % raztopina agarja v 3M KCl

100 mL 3 M KCl segrevamo v erlenmajerici na vodni kopeli, dodamo 3,5 g agarja in počasi mešamo, da ne vmešamo mehurčkov zraka.

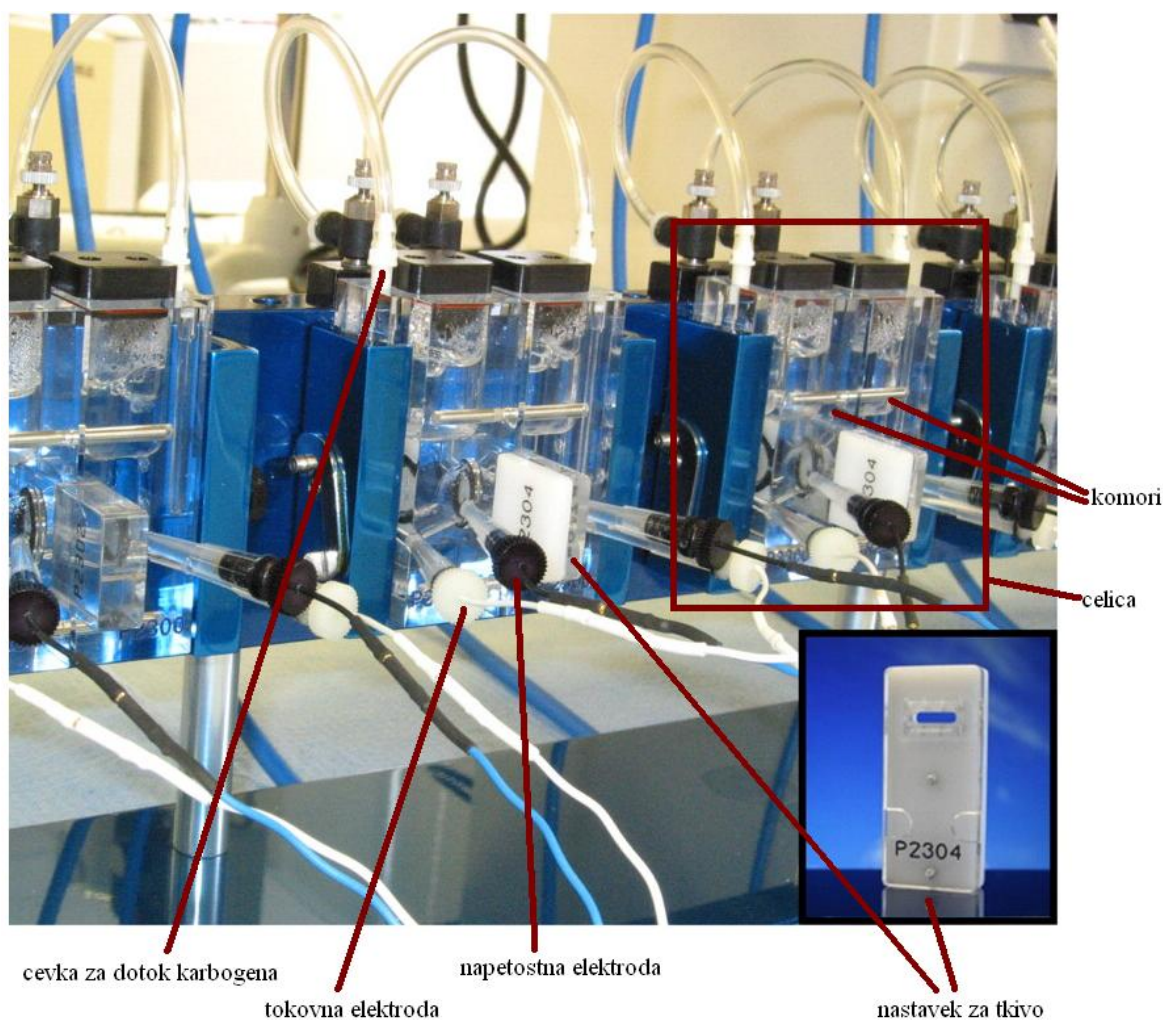
5.3 Aparature

- Difuzijske celice *Easy Mount*[®] s pripadajočimi elektrodami in naprava za merjenje električnih parametrov (*voltage-current clamp*) z računalniškim pretvornikom signala, Physiologic Instruments Inc.,
- Osebni računalnik s programsko opremo "Clamp",
- pH meter, Mettler Toledo,
- Termostatirana vodna kopel, Lauda,
- Termostatirana vodna kopel, GFL,
- Analitska tehtnica, Mettler Toledo,
- Precizna tehtnica, Mettler Toledo,
- Vodoodporni digitalni termometer z vbodno sondo, Dostmann
- Čitalec mikrotitrskih ploščic Tecan Safire.

5.4 Metode

5.4.1 Princip

Poskuse permeabilnosti na črevesju podgane smo izvajali s pomočjo sistema difuzijskih celic *Easy Mount*[®]. Uporabljali smo sistem z osmimi celicami, ki so vpete v termostatisirano stojalo. Vsaka celica je sestavljena iz dveh komor volumna 2,5 mL, med kateri vstavimo nastavek s tkivom (črevo podgane) s površino 1 cm². Vsaka komora ima na sredi dve odprtini za elektrode, s katerimi merimo elektrofiziološke parametre opazovanega tkiva in odprtino na vrhu za dovajanje plinov (Slika 7).



Slika 7: Difuzijske celice *Easy Mount*, Physiologic Instruments Inc.

V vsaki komori je prisoten pufer ustrezne pH vrednosti, ki je v stiku s tkivom. Da preprečimo odmiranje tkiva, moramo tkivu neprestano dovajati kisik, tako da pufer v komorah neprestano prepihujemo s karbogenom (95 % kisika in 5 % ogljikovega

dioksida). Pri tem se zaradi raztapljanja ogljikovega dioksida v pufrih zniža vrednost pH le-teh. pH Ringerjevega pufra na mukozni strani se zniža iz 7,45 na 7,0; pH Ringerjevega pufra na serozni strani se zniža iz 7,85 na 7,4. Prav tako moramo med poskusom zagotoviti stalno temperaturo med 36,0 °C in 37,0 °C kar nam omogoča termostatorano stojalo, ki je povezano z vodno kopeljo. Za prehranjevanje tkiva je na serozno stran difuzijske celice dodana glukoza. Na mukozno stran je dodan manitol, da zagotovimo osmotsko ravnotežje. Vsaka celica je opremljena s parom tokovnih (zunanjih) in napetostnih (notranjih) elektrod. S pomočjo izmerjenih elektrofizioloških parametrov (TEER, sprememba transepiteljskega potenciala) lahko vrednotimo vitalnost tkiva med poskusom.

5.4.2 Priprava in vzdrževanje elektrod

Za merjenje kratkostičnega toka in spremembe električnega potenciala med poskusom smo uporabljali Ag/AgCl elektrode. Elektrolitski ključ je bil 3–4% raztopina agarja v 3 M raztopini KCl, s katero je elektroda bila v stiku. Pripravili smo ga tako, da smo v plastično ohišje elektrolitskega ključa (modificirani pipetni nastavek s konico odrezano kod kotom) s pipeto potegnili približno 110 μ L 3–4 % agarja v KCl. Paziti smo morali, da nismo v nastavek potegnili zračnih mehurčkov. Konico nastavka smo očistili, nastavek pa do vrha napolnili s 3 M raztopino KCl in vstavili elektrodo. Stik ohišja in elektrode smo zatesnili s parafilmom. Elektrode smo shranili v hladilniku, tako da so bile konice potopljene v 3 M raztopin KCl. Dan pred poskusom smo elektrode vzeli iz hladilnika, da so se segrele na sobno temperaturo. Pred poskusom smo elektrode testirali. Uporabili smo elektrode, ki so izkazovale stabilno asimetrijo napetosti ≤ 10 mV.

5.4.3 Priprava difuzijskih celic

1. Vključimo obe termostatorani vodni kopeli in računalniški vmesnik.
2. Ringerjev pufer pH = 7,85 damo segrevati v vodno kopel in ga hkrati začnemo preprihovati s karbogenom.
3. Zaženemo programsko opremo "Clamp". V zavihku "Options" obkljukamo COMT 1. Kliknemo ikono "Chamber definition" in obkljukamo prvih šest celic (celice 1–6). Še enkrat zaženemo programsko opremo "Clamp" in v zavihku "Options" obkljukamo COMT 2. Kliknemo ikono "Chamber definition" in obkljukamo prvi dve celici (celici 7 in 8).

4. Elektrode speremo s demineralizirano vodo in jih ustavimo v ustrezne odprtine v komorah. Črne, napetostne elektrode vstavimo v odprtine bližje tkivu, tako da so s konico obrnjene proti tkivu. Bele, tokovne elektrode vstavimo v odprtine ob straneh, tako da so s konico obrnjene proti tkivu.
5. V vsako komoro odpipetiramo 5000 μL prepihanega Ringerjevega pufra $\text{pH} = 7,85$ in priključimo dotok karbonega.
6. V programski opremi "Clamp" pritisnemo na ikono Rf/dPe. Prikažejo se vrednosti upornosti pufra in razlike potenciala, ki ga elektrode izkazujejo v pufu. Upornost pufra mora biti med 30–60 Ω .
7. Pritisnemo na zeleni gumb. Na ta način kompenziramo asimetrijo elektrod in upornost pufra. Začne se kontinuirano merjenje razlike potencialov, kratkostičnega toka in upornosti.

5.4.4 Priprava tkiva

Poskuse smo izvajali s Sprague-Dawley samicami podgan (180–250 g), ki so bile predhodno stradale 18 ur. Za pridobitev tankega čreva, smo podgane žrtvovali v skladu z Evropsko konvencijo o varovanju živali. Odločba Veterinarske uprave Republike Slovenije št. 34401-37/2010/3 z dne 3.11.2010, da je Lek d.d. registrirana kot vzrejna in uporabniška organizacija, je bila izdana na podlagi mnenja Etične komisije

1. 10 mM raztopino glukoze za prenos ohladimo na ledu in prepihamo s karbogenom.
2. Žrtvujemo podgano, ji čimprej odvzamemo črevo od želodca do cekuma in ga shranimo v pripravljeno 10 mM raztopino glukoze.
3. Odstranimo del črevesa približno 15 cm od cekuma.
4. Črevo speremo z 10 mM raztopino glukoze, da odstranimo ostanke hrane.
5. Črevo postopoma razrežemo na segmente primerne velikosti za odprtine v nastavkih za tkivo. Segmente režemo v smeri od konca črevesa do želodca, pri čemer se izogibamo Peyerjevim ploščam.
6. Segment čreva prerežemo po dolžini po mezenterični meji in ga še enkrat speremo z 10 mM raztopino glukoze. Preostalo črevo postavimo na led v čašo z 10 mM raztopino glukoze, ki jo prepihujemo s karbogenom.

5.4.5 Poskus

1. V programski opremi "Clamp" pritisnemo rdeči gumb, s čimer ustavimo merjenje električnih parametrov.
2. Z injekcijsko iglo posesamo pufer iz celic.
3. Izvlečemo nastavek za tkivo.
4. Na nastavek namestimo tkivo, ki smo ga pripravili tako, kot je opisano pod točko 1.4.4. Pazimo, da je mukozna stran tkiva vedno obrnjena proti iglicam, s čimer se izognemo možnosti zamenjave strani.
5. Tako pripravljen nastavek s tkivom vstavimo v celico.
6. Na vsako stran tkiva odpipetiramo 2460 μL Ringerjevega pufera $\text{pH} = 7,85$ in:
 - na mukozno stran 40 μL 625 mM raztopine manitola
 - na serozno stran 40 μL 625 mM raztopine glukoze.
7. V programski opremi "Clamp" pritisnemo zeleni gumb.
8. Počakamo 15 minut, da se sistem stabilizira.
9. V programski opremi "Clamp" pritisnemo rdeči gumb. Z injekcijsko iglo posesamo pufer na mukozni (donorski) strani tkiva ter odpipetiramo 2500 μL ustrezne donorske raztopine in 40 μL 625 mM raztopine manitola.
10. V programski opremi "Clamp" pritisnemo zeleni gumb in začnemo meriti čas poskusa. Poskus traja 180 minut.
11. Vzorčenje na akceptorski strani poteka vsakih 30 minut. Pri tem odvezamo 150 μL vzorca, ki ga nadomestimo z 10 mM raztopino glukoze. Na donorski strani vzorčimo 10 μL raztopine ob časovnih točkah: 0 min, 90 min in 180 min.
12. Po končanem zadnjem vzorčenju dodamo na mukozno stran 100 μL 625 mM raztopine glukoze, s čimer preverimo vitalnost tkiva.
13. Po končanem poskusu v programski opremi "Clamp" pritisnemo rdeči gumb. Celice izpraznimo in odstranimo elektrode.
14. Elektrode speremo z demineralizirano vodo in jih potopimo v 3 M raztopino KCl. V programski opremi "Clamp" pritisnemo zeleni gumb in izmerimo asimetrijo elektrod. V programski opremi "Clamp" pritisnemo rdeči gumb, elektrode pa shranimo v hladilniku.
15. Z nastavkov odstranimo tkivo. Celice in nastavke očistimo v ultrazvočni kadički, jih speremo z demineralizirano vodo in posušimo.

5.4.6 Ocenjevanje vitalnosti in integritete tkiva

Vitalnost in integriteto tkiva smo opredelili s pomočjo spremljanja elektrofizioloških parametrov.

Vitalnost tkiva je pomemben parameter, saj je hitrost pasivnega prehoda spojin skozi manj vitalno tkivo zaradi zmanjšanje integritete tkiva večja kot skozi vitalno tkivo. Poleg dobre vitalnosti je tudi integriteta tkiva pomemben parameter, saj je slaba integriteta tkiva lahko posledica poškodbe tkiva zaradi rokovanja od njegove izolacije do vstavitve v difuzijske celice.

Spremljali smo tudi vrednosti elektrofizioloških parametrov pred začetkom poskusa, s katerimi smo ocenili ali je tkivo preživelo postopek priprave za poskus.

Integriteto smo preverjali na dva načina:

- s spremljanjem TEER; za slabo integriteto tkiva ja značilna nizka vrednost TEER ($\leq 12 \Omega$)
- s spremljanjem prehoda označevalca paracelularnega prehoda; za slabo integriteto tkiva so značilne visoke vrednosti P_{app} (za LY približno 11×10^{-06} cm/s; za FITC-dekstran približno 4×10^{-06} m/s)

Tkivo smo ocenili kot vitalno, ko so bili izpolnjeni spodnji pogoji:

- absolutna vrednost transepitelijskega potenciala pred začetkom poskusa vsaj $\leq -0,8$ mV; to je po stabilizaciji sistema (korak 8 v poglavju 5.4.5. Poskus), preden smo dodali donorsko raztopino)
- TEER pred začetkom poskusa vsaj $\geq 20 \Omega$; to je po stabilizaciji sistema (korak 8 v poglavju 5.4.5. Poskus), preden smo dodali donorsko raztopino)
- pri poskusih brez pospeševalcev absorpcije: sprememba transepitelijskega električnega potenciala po dodatku 100 μ L 625 mM raztopine glukoze na koncu poskusa za vsaj $\leq -0,3$ mV
- pri poskusih brez pospeševalcev absorpcije: sprememba transepitelijskega električnega potenciala po dodatku 100 μ L 625 mM raztopine glukoze na koncu poskusa za vsaj $\leq -0,2$ mV
- TEER po koncu poskusa vsaj $\geq 12 \Omega$.

Če pogoji niso bili izpolnjeni, rezultatov za P_{app} nismo upoštevali.

5.4.7 Analiza označevalcev paracelularnega prehoda

Vzorci, ki smo jih odvzeli med poskusom smo odpipetirali direktno na mikrotitrsko ploščo pripravljeno za fluorimetrično analizo označevalcev paracelularnega prehoda. Vzorcev odvzetih na akceptorski strani ni bilo potrebno dodatno redčiti, medtem, ko smo vzorce odvzete na donorski strani redčili za faktor 15. Povprečje izračunanih koncentracij raztopin na donorski strani smo uporabili pri izračunu navideznega permeabilnostnega koeficienta. Za vsak poskus smo pripravili raztopine označevalcev v koncentracijskem območju od 1×10^{-6} M do $1,56 \times 10^{-8}$ M za LY in od 10×10^{-3} M do $1,56 \times 10^{-4}$ M za FITC-dekstran. Raztopine ustreznih koncentracij smo pripravili direktno na mikrotitrski ploščici, tako da smo v prvi jamici pripravili dvajsetkrat redčeno donorsko raztopino, ki smo jo nato postopoma redčili vsakokrat za faktor dve. Iz rezultatov izmerjenih koncentracij smo nato izrisali umeritveno krivuljo.

Preučevana označevalca sta primerna za fluorimetrično analizo, ki smo jo izvajali na mikrotitrskem čitalcu Tecan Sapphire. Pogoji merjenja so bili:

- za LY: ekscitacijska valovna dolžina je bila 430 nm
emisijška valovna dolžina je bila 540 nm
- za FITC-dekstran: ekscitacijska valovna dolžina je bila 495 nm
emisijška valovna dolžina je bila 515 nm

5.4.8 Izračun navideznega permeabilnostnega koeficienta

Hitrost prehoda definiramo kot množino spojine, ki difundira skozi 1 cm^2 membrane na časovno enoto. Iz koncentracij spojine v vzorcih, odvzetih na akceptorski strani med poskusom, izračunamo s pomočjo Enačbe 3 množino spojine, ki je prešla v določenem času preko epitelija - tkiva.

$$Q_t = \left(\sum_{i=1}^{n-1} V_v \cdot C_i \right) + C_t \cdot V_c \quad \text{Enačba 3}$$

Q_t ... množina spojine, ki je difundirala v času t [mol]

V_v ... volumen vzorca [L]

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

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

V_c ... volumen tekočine na akceptorski strani celice [L]

Hitrost difuzije opredeljuje Enačba 4:

$$\frac{dQ}{dt} = k \cdot (C_d - C_a) \quad \text{Enačba 4}$$

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

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

C_a ... koncentracija spojine na akceptorski strani [mol/L]

Med poskusom je ves čas $C_a \ll C_d$; tako se člen $(C_d - C_a)$ le zanemarljivo spreminja in ga lahko vključimo v konstanto difuzije – k_d .

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

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

$$Q_t = k_d \cdot t + n \quad \text{Enačba 5}$$

k_d konstanta difuzije – hitrost naraščanja koncentracije učinkovine na akceptorski strani

Q_t izračunamo s pomočjo Enačbe 5. Z linearno regresijo dobimo konstanto difuzije.

Hitrost prehoda $J \left[\frac{\text{nmol}}{\text{h} \cdot \text{cm}^2} \right]$ izračunamo s pomočjo Enačbe 6:

$$J = \frac{k_d}{A} \quad \text{Enačba 6}$$

A ... površina tkiva, skozi katero poteka difuzija spojine

Za spojine, ki pasivno difundirajo skozi tkivo, je navidezni permeabilnostni koeficient P_{app} neodvisen od koncentracije na donorski strani. Izračunamo ga po Enačbi 7:

$$P_{app} = \frac{J}{C_d} = \frac{k_d}{A \cdot C} \quad \text{Enačba 7}$$

C_d ... povprečna koncentracija spojine na donorski strani [mol/L]

5.4.9 Statistični testi

Za statistično obdelavo smo uporabili paket Analiza podatkov v programu Microsoft Excel.

Preizkušali smo parametrično hipotezo o aritmetični sredini za dva neodvisna vzorca. Da bi lahko primerjali dva vzorca s Studentovim t-testom, smo morali najprej ugotoviti, ali sta varianci obeh vzorcev enaki ali različni. To ugotovimo s F-testom.

Varianco za posamezen vzorec izračunamo po Enačbi 8.

$$s^2 = \frac{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2}{n-1} \quad \text{Enačba 8}$$

s^2 ... varianca vzorca

x_i ... posamezna meritev znotraj vzorca

\bar{x} ... srednja vrednost meritev

n ... število meritev

Postavimo ničelno hipotezo:

$$H_0 : \sigma_x^2 = \sigma_y^2$$

in njej nasprotno alternativno hipotezo:

$$H_1 : \sigma_x^2 \neq \sigma_y^2,$$

ki jo bomo sprejeli, če bomo zavrnilo ničelno hipotezo.

F-test:

$$F_{eks} = \frac{s_x^2}{s_y^2} \quad \text{Enačba 9}$$

F_{eks} ... eksperimentalna vrednost F

F_{tab} ... tabelarična vrednost F

Če ugotovimo, da je $F_{eks} < F_{tab}$ ($p > \alpha$), potem ničelne hipoteze ne zavrnemo. V tem primeru privzamemo dejstvo, da sta varianci dveh vzorcev enaki, zato za primerjavo teh dveh vzorcev uporabimo dvostranski t - test za vzorca z enakima variancama (Enačba 10).

$$t = \frac{\bar{x} - \bar{y}}{s_s} \cdot \sqrt{\frac{m \cdot n}{m + n}} \quad \text{Enačba 10}$$

\bar{x} ... povprečna vrednost meritev v prvem vzorcu

\bar{y} ... povprečna vrednost meritev v drugem vzorcu

s_s ... skupna standardna deviacija

m ... število meritev v prvem vzorcu

n ... število meritev v drugem vzorcu

α ... stopnja tveganja

f ... stopinje prostosti ($f = m + n - 2$)

Če je $F_{\text{eks}} > F_{\text{tab}}$ ($p < \alpha$), potem zavrnemo ničelno hipotezo in sprejmemo alternativno hipotezo. Vzorca tokrat primerjamo z dvostranskim t-testom za vzorca z različnima variancama (Enačba 11):

$$t = \frac{\bar{x} - \bar{y}}{\sqrt{\frac{s_1^2}{m} + \frac{s_2^2}{n}}} \quad \text{Enačba 11}$$

s_1^2 ... standardna deviacija v prvem vzorcu

s_2^2 ... standardna deviacija v drugem vzorcu

Razliko med vzorcema označimo kot neznačilno (nz), če je t_{eks} , ki ga izračunamo po Enačbi 10 oziroma 11, manjši od $t_{\text{tab}}(\alpha, f)$. Pri tem je $p > \alpha$. Če je izračunani t_{eks} večji od $t_{\text{tab}}(p < \alpha)$, je razlika značilna (z).

V primeru primerjave več kot dveh skupin smo uporabili test analize varianc ANOVA z Dunnettovim "post hoc" testom.

Pri ANOVA testu celotno variiranje vrednosti, merjeno s povprečnim kvadratnim odklonom vrednosti od aritmetične sredine, razdelimo na variiranje vrednosti zaradi razlik znotraj vzorcev in na variiranje vrednosti zaradi razlik med vzorci. Obe sestavini variance nato primerjamo med seboj.

Postavimo ničelno hipotezo:

$$H_0 : \sigma_x^2 = \sigma_y^2 = \sigma_z^2$$

in njej nasprotno alternativno hipotezo:

$$H_1 : \sigma_x^2 \neq \sigma_y^2 \neq \sigma_z^2,$$

ki jo bomo sprejeli, če bomo zavrnili ničelno hipotezo.

Kadar sprejmemo alternativno hipotezo ($p < \alpha$), nas zanima, katere skupine podatkov se med seboj značilno razlikujejo, zato opravimo dodatno analizo, ki se imenuje "post hoc" test. Mi smo uporabili Dunnettov "post hoc" test, pri katerem skupine vzorcev primerjamo glede na kontrolno skupino (0 % pospeševalca absorpcije).

6 REZULTATI

Rezultate smo razdelili v osem sklopov. Prvi trije so namenjeni predstavitvi rezultatov poskusov z uporabo LY kot označevalca paracelularnega prehoda. Drugi trije sklopi so namenjeni predstavitvi rezultatov poskusov z uporabo FITC-dekstrana kot označevalca paracelularnega prehoda. V zadnjih dveh sklopih pa so združeni rezultati poskusov z namenom primerjanja vpliva pospeševalcev absorpcije na prehod LY in FITC-dekstrana ter primerjanja lastnosti tkiv, ki so bila izpostavljena samo LY ali samo FITC-dekstranu.

6.1 Poskusi z LY

Začetni poskusi so bili namenjeni vrednotenju osnovnih permeabilnostnih lastnosti LY, ki smo ga želeli uporabiti kot označevalca paracelularnega prehoda pri poskusih na izoliranem črevesju podgane. V prvih treh poskusih smo ugotavljali ali LY prehaja le pasivno skozi črevesni epitelij. Vrednotili smo, ali LY prehaja iz mukozne na serozno stran v enaki meri kot iz serozne na mukozno stran tkiva. V ta namen smo priredili shemo poskusa tako, da smo donorsko raztopino aplicirali tako na mukozno kot na serozno stran tkiva in vzorčili akceptorsko raztopino na serozni oziroma mukozni strani tkiva.

Izvedli smo tri poskuse, pri katerih smo donorsko raztopino aplicirali na mukozno ali serozno stran tkiva.

Donorska raztopina je bila:

- na mukozni strani - 10 mM raztopina manitola in 20 μ M raztopina LY v Ringerjevem pufri pH = 7,45;
- na serozni strani - 10 mM raztopina glukoze in 20 μ M raztopina LY v Ringerjevem pufri pH = 7,85.

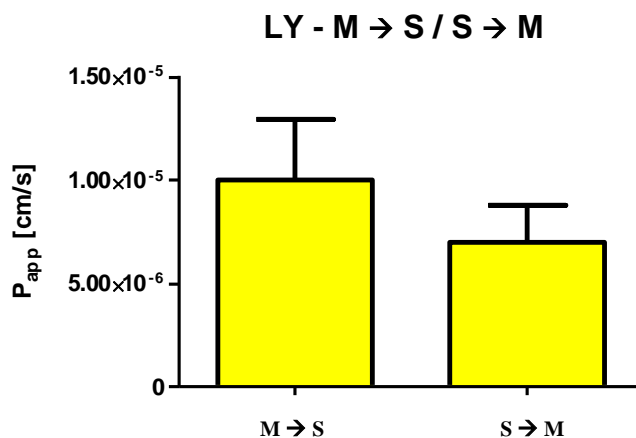
Akceptorska raztopina je bila:

- na serozni strani - 10 mM raztopina glukoze v Ringerjevem pufri pH = 7,85;
- na mukozni strani - 10 mM raztopina manitola v Ringerjevem pufri pH = 7,45.

Navidezne permeabilnostne koeficiente LY smo združili in jih v obliki povprečnih vrednosti in njihovih standardnih deviacij prikazali v Preglednici VI in na Sliki 8. Rezultati posameznih poskusov so v Prilogi.

Preglednica VI: Združeni rezultati poskusov 1–3

	LY - M → S	LY - S → M
P_{app} [cm/s]	9,98E-06	7,03E-06
SD	2,95E-06	1,73E-06
n	6	3
t-test ($\alpha = 0,05$)	nz	
$P_{app} S \rightarrow M / P_{app} M \rightarrow S^1$	0,70	

**Slika 8:** Stolpni grafikon povprečnih vrednosti navideznih permeabilnostnih koeficientov skupaj s standardno deviacijo za LY

Razlika v P_{app} za LY je verjetno posledica inter individualne razlike med testiranimi tkivi, saj so prikazani rezultati bili pridobljeni s tremi poskusi na treh različnih podganah. Sheme posameznih poskusov so prikazane v Prilogi (poskusi 1–3).

6.2 Poskusi z LY in Cymal-7

V drugem sklopu poskusov smo želeli potrditi ustreznost LY kot označevalca paracelularnega prehoda v poskusih permeabilnosti na izoliranem črevesju podgane. V ta namen smo donorski raztopini dodali dva pospeševalca paracelularnega prehoda (Cymal-7 in TMC) v različnih koncentracijah. Pri tem smo ugotavljali kakšen vpliv imata Cymal-7 in TMC na permeabilnost LY. Pri določanju vitalnosti tkiva smo opazili, da višje

¹ Količnik med $P_{app} S \rightarrow M$ in $P_{app} M \rightarrow S$ je definiran kot PDR - permeability directional ratio in se uporablja za napovedovanje potencialnih interakcij preučevanih učinkovin s celičnimi efluksnimi prenašalci.

koncentracije pospeševalcev paracelularnega prehoda delujejo toksično na izolirane segmente črevesja podgane.

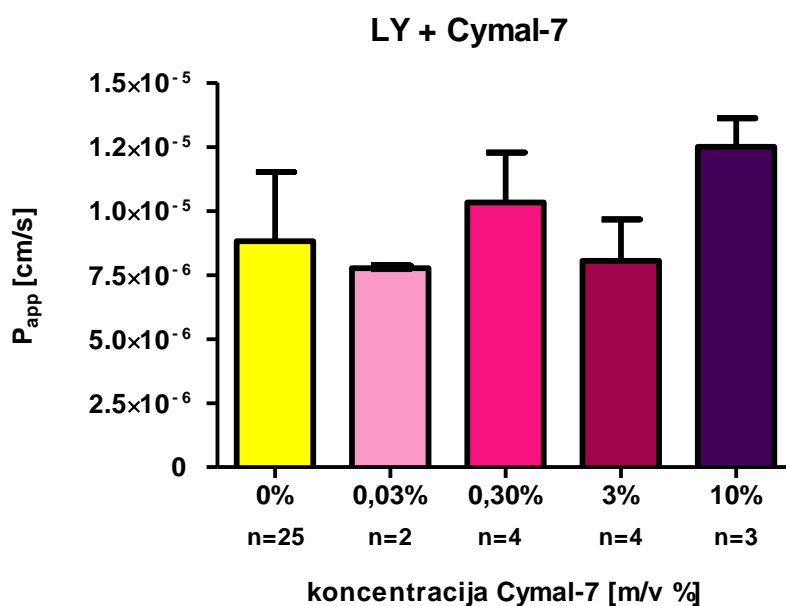
Izvedli smo šest poskusov, pri katerih smo na donorsko (mukozno) stran dodali različne koncentracije Cymal-7. Začeli smo s koncentracijo 0,03 %, ki smo jo postopoma povečevali do 10 %. Učinek posamezne koncentracije Cymal-7 na permeabilnost LY smo primerjali s podatki tkiv, ki jim nismo v donorsko raztopino dodali Cymal-7.

Navidezne permeabilnostne koeficiente LY smo združili in jih v obliki povprečnih vrednosti in njihovih standardnih deviacij prikazali v Preglednici VII in na Sliki 9. Rezultati posameznih poskusov so v Prilogi.

Preglednica VII: Združeni rezultati poskusov 4–9

c (Cymal-7) [m/v %]	0 %	0,03 %	0,30 %	3 %	10 %
P_{app} [cm/s]	8,82E-06	7,77E-06	1,03E-05	8,06E-06	1,25E-05
SD	2,70E-06	3,76E-08	1,95E-06	1,61E-06	1,11E-06
n	25	2	4	4	3
ANOVA in Dunnetov "post hoc" test ($\alpha = 0,05$)	/	nz	nz	nz	nz
$P_{app} x \% / P_{app} 0 \% ^2$	/	0,88	1,17	0,91	1,42
$Pd_{zač} \pm SD$ [mV]	$-2 \pm 1,1$	$-1,9 \pm 0,0$	$-1,5 \pm 0,8$	$-3,0 \pm 0,9$	Mrtvo tkivo
$TEER_{zač} \pm SD$ [Ω]	39 ± 14	43 ± 8	34 ± 10	61 ± 13	
$Pd_{kon} \pm SD$ [mV]	$-1,3 \pm 0,8$	$-1,9 \pm 0,8$	$-0,6 \pm 0,4$	$-0,8 \pm 0,6$	
$TEER_{kon} \pm SD$ [Ω]	21 ± 9	24 ± 3	16 ± 5	32 ± 7	
$\Delta Pd_{glu - kon} \pm SD$ [mV]	$1,2 \pm 0,7$	$1,2 \pm 0,3$	$0,3 \pm 0,1$	$0,1 \pm 0,0$	

² Količnik med $P_{app} x \%$ (x je testirana koncentracija pospeševalca absorpcije) in $P_{app} 0 \%$ (to je P_{app} označevalca brez dodanih pospeševalcev absorpcije) predstavlja spremembo povprečnega permeabilnostnega koeficienta označevalca na tkivu, testiranim s pospeševalcem absorpcije glede na tkivo, testiranim brez pospeševalca absorpcije.



Slika 9: Stolpčni grafikon povprečnih vrednosti navideznih permeabilnostnih koeficientov skupaj s standardno deviacijo za LY

6.3 Poskusi z LY in TMC

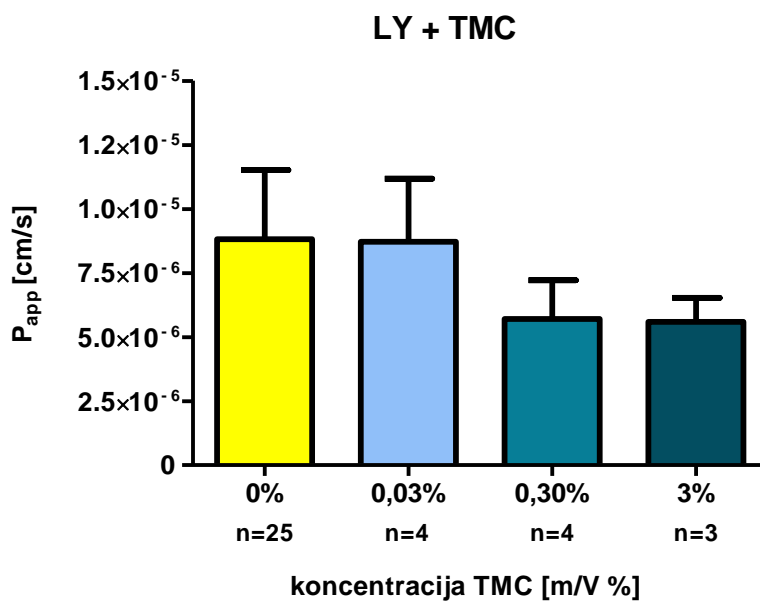
Izvedli smo pet poskusov, pri katerih smo na donorsko (mukozno) stran dodali različne koncentracije TMC. Začeli smo s koncentracijo 0,03 %, ki smo jo postopoma povečevali do 3 %. Učinek posamezne koncentracije TMC na permeabilnost LY smo primerjali s podatki tkiv, ki jim nismo v donorsko raztopino dodali TMC.

Navidezne permeabilnostne koeficiente LY smo združili in jih v obliki povprečnih vrednosti in njihovih standardnih deviacij prikazali v Preglednici VIII in na Sliki 10. Rezultati posameznih poskusov so v Prilogi.

Preglednica VIII: Združeni rezultati poskusov 9-13

c (TMC) [m/v %]	0%	0,03%	0,30%	3%
P_{app} [cm/s]	8,82E-06	8,72E-06	5,7E-06	5,59E-06
SD	2,70E-06	2,46E-06	1,52E-06	9,48E-07
n	25	4	4	3
ANOVA in Dunnettov "post hoc" test ($\alpha=0,05$)	/	nz	nz	nz
$P_{app} \times \% / P_{app} 0 \%$	/	0,99	0,65	0,63
$Pd_{zač} \pm SD$ [mV]	$-2 \pm 1,1$	$-1,6 \pm 1,6$	$-1,4 \pm 0,5$	Mrtvo tkivo
$TEER_{zač} \pm SD$ [Ω]	39 ± 14	45 ± 10	39 ± 4	
$Pd_{kon} \pm SD$ [mV]	$-1,3 \pm 0,8$	$-0,8 \pm 0,4$	$-0,3 \pm 0,4$	
$TEER_{kon} \pm SD$ [Ω]	21 ± 9	17 ± 5	17 ± 2	
$\Delta Pd_{glu-kon} \pm SD$ [mV]	$1,2 \pm 0,7$	$0,6 \pm 0,3$	$0,4 \pm 0,3$	

ANOVA je pokazala značilno razliko med analiziranimi skupinami ($p < \alpha$), vendar smo nato z Dunnettovim "post hoc" testom dokazali neznačilne razlike med skupinami.



Slika 10: Stolpčni grafikon povprečnih vrednosti navidezni permeabilnosti skupaj s standardno deviacijo za LY

6.4 Poskusi s FITC-dekstranom

V tretjem sklopu poskusov smo kot označevalca paracelularnega prehoda uporabili FITC-dekstran. Podobno kot za LY smo najprej želeli ugotoviti ali FITC-dekstran prehaja črevesni epitelij le pasivno. Shemo poskusa smo priredili enako kot pri vrednotenju LY.

Izvedli smo dva poskusa, pri katerih smo donorsko raztopino aplicirali na mukozno ali serozno stran tkiva.

Donorska raztopina je bila:

- na mukozni strani - 10 mM raztopina manitola in 0,2 mg/mL raztopina FITC-dekstrana v Ringerjevem pufri pH = 7,45;
- na serozni strani - 10 mM raztopina glukoze in 0,2 mg/mL raztopina FITC-dekstrana v Ringerjevem pufri pH = 7,85.

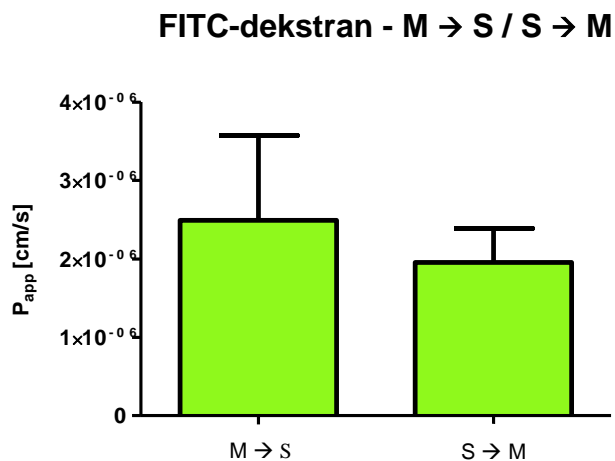
Akceptorska raztopina je bila:

- na serozni strani - 10 mM raztopina glukoze v Ringerjevem pufri pH = 7,85;
- na mukozni strani - 10 mM raztopina manitola v Ringerjevem pufri pH = 7,45.

Navidezne permeabilnostne koeficiente FITC-dekstrana smo združili in jih v obliki povprečnih vrednosti in njihovih standardnih deviacij prikazali v Preglednici IX in na Sliki 11. Rezultati posameznih poskusov so v Prilogi.

Preglednica IX: Združeni rezultati poskusov 14 in 15

	FITC-dekstran - M → S	FITC-dekstran - S → M
P_{app} [cm/s]	2,49E-06	2,00E-06
SD	1,08E-06	5,18E-07
n	6	4
t-test ($\alpha = 0,05$)	nz	
$P_{app} S \rightarrow M / P_{app} M \rightarrow S$	0,80	



Slika 11: Stolpčni grafikon povprečnih vrednosti navideznih permeabilnostnih koeficientov skupaj s standardno deviacijo za FITC-dekstran

6.5 Poskusi s FITC-dekstranom in Cymal-7

V četrtem sklopu poskusov smo na donorsko stran dodali Cymal-7 in TMC kot pospeševalce paracelularnega prehoda in vrednotili njun vpliv na permeabilnost FITC-dekstrana.

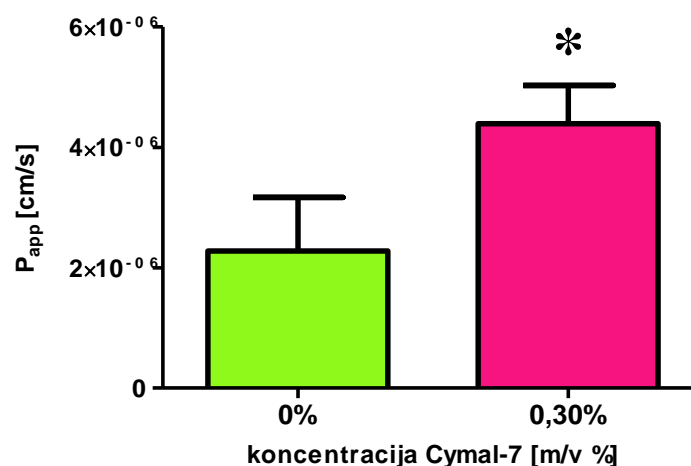
Izvedli smo poskus, pri katerem smo na donorsko (mukozno) stran dodali 0,3 % koncentracije Cymal-7. Učinek 0,3 % koncentracije Cymal-7 na permeabilnost FITC-dekstrana smo primerjali s podatki tkiv, ki jim nismo v donorsko raztopino dodali Cymal-7.

Navidezne permeabilnostne koeficiente FITC-dekstrana smo združili in jih v obliki povprečnih vrednosti in njihovih standardnih deviacij prikazali v Preglednici X in na Sliki 12. Rezultati poskusa so v Prilogi.

Preglednica X : Rezultati poskusa 16

c (Cymal-7) [m/v %]	0 %	0,3 %
P_{app} [cm/s]	2,28E-06	4,39E-06
SD	8,89E-07	6,34E-07
n	10	3
t-test ($\alpha = 0,05$)	z	
$P_{app} 0,3 \% / P_{app} 0 \%$	1,93	
$Pd_{zač} \pm SD$ [mV]	$-2,61 \pm 1,7$	$-3,9 \pm 0,6$
$TEER_{zač} \pm SD$ [Ω]	38 ± 9	35 ± 3
$Pd_{kon} \pm SD$ [mV]	$-1,9 \pm 1,0$	$-2,6 \pm 0,7$
$TEER_{kon} \pm SD$ [Ω]	22 ± 9	21 ± 12
$\Delta Pd_{glu - kon} \pm SD$ [mV]	$2,4 \pm 1,4$	$0,3 \pm 0,1$

FITC-dekstran + Cymal-7



Slika 12: Stolpčni grafikon povprečnih vrednosti navideznih permeabilnostnih koeficientov skupaj s standardno deviacijo za FITC-dekstran. * označuje značilno razliko glede na kontrolno skupino ($p < 0,05$).

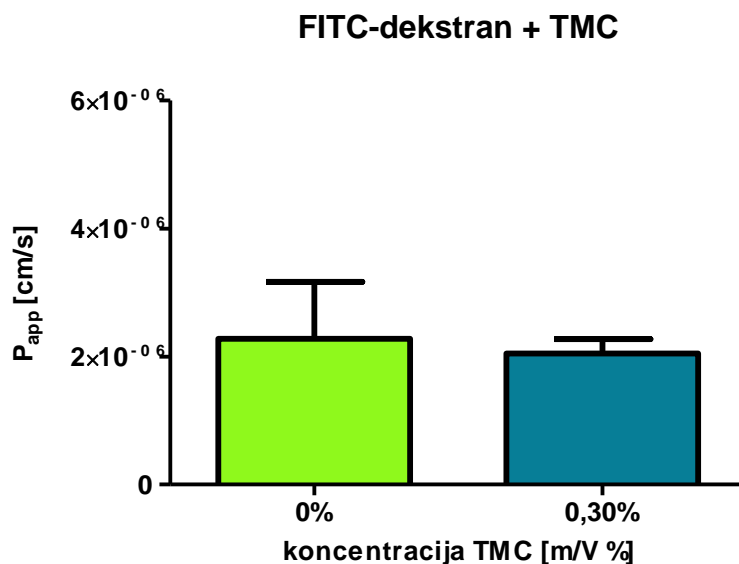
6.6 Poskusi s FITC-dekstranom in TMC

Izvedli smo poskus, pri katerem smo na donorsko (mukozno) stran dodali 0,3 % koncentracije TMC. Učinek 0,3 % koncentracije TMC na permeabilnost FITC-dekstrana smo primerjali s podatki tkiv, ki jim nismo v donorsko raztopino dodali TMC.

Navidezne permeabilnostne koeficiente FITC-dekstrana smo združili in jih v obliki povprečnih vrednosti in njihovih standardnih deviacij prikazali v Preglednici XI in na Sliki 13. Rezultati poskusa so v Prilogi.

Preglednica XI: Rezultati poskusa 17

c (TMC) [m/v %]	0 %	0,3 %
P_{app} [cm/s]	2,28E-06	2,05E-06
SD	8,89E-07	2,21E-07
n	10	6
t-test ($\alpha = 0,05$)	nz	
$P_{app} 0,03 \% / P_{app} 0 \%$	0,90	
$Pd_{zач} \pm SD$ [mV]	$-2,61 \pm 1,7$	$-2,6 \pm 0,6$
$TEER_{zач} \pm SD$ [Ω]	38 ± 9	39 ± 6
$Pd_{kon} \pm SD$ [mV]	$-1,9 \pm 1,0$	$-1,1 \pm 0,4$
$TEER_{kon} \pm SD$ [Ω]	22 ± 9	21 ± 4
$\Delta Pd_{glu - kon} \pm SD$ [mV]	$2,4 \pm 1,4$	$0,7 \pm 0,2$



Slika 13: Stolpčni grafikon povprečnih vrednosti navideznih permeabilnostnih koeficientov skupaj s standardno deviacijo za FITC-dekstran.

6.7 Primerjava vpliva Cymal-7 in TMC na permeabilnost označevalcev paracelularnega prehoda

Na koncu smo primerjali vpliv Cymal-7 in TMC na permeabilnost označevalcev paracelularnega prehoda LY in FITC-dekstran. S tem smo želeli ovrednotiti vpliv Cymal-7 in TMC na pospešitev paracelularnega prehoda skozi podganje črevo.

Iz zbranih podatkov poskusov 1–17 smo naredili primerjavo vpliva Cymal-7 in TMC na permeabilnost označevalcev paracelularnega prehoda.

Podatke iz poskusa LY in 3 % TMC ter LY in 10 % Cymal-7 smo vključili za boljši pregled, kljub temu, da ob koncu obeh poskus ni bilo vitalno nobeno tkivo.

Izračunana razmerja $P_{app\ x\ \%} / P_{app\ 0\ \%}$ smo predstavili v Preglednici XII.

Preglednica XII: Primerjava razmerij $P_{app\ x\ \%} / P_{app\ 0\ \%}$ za LY in FITC-dekstran

koncentracija pospeševalca [m/V %]	$P_{app\ x\ \%} / P_{app\ 0\ \%}$			
	LY + Cymal-7	LY + TMC	FITC-Dekstran + Cymal-7	FITC-Dekstran + TMC
0,03%	↓ 0,88	↘ 0,99	/	/
0,30%	↘ 1,17	↓ 0,65	↑ 1,93	↓ 0,9
3%	↓ 0,91	↓ 0,63	/	/
10%	↘ 1,42	/	/	/



najnižja vrednost
 $P_{app\ x\ \%} / P_{app\ 0\ \%}$

najvišja vrednost
 $P_{app\ x\ \%} / P_{app\ 0\ \%}$

6.8 Primerjava lastnosti vitalnih in mrtvih tkiv za LY in FITC-dekstran

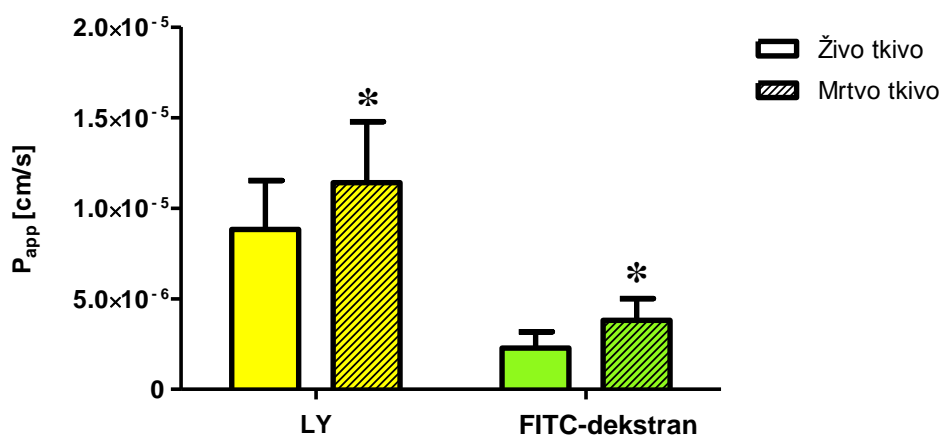
Iz zbranih podatkov poskusov 1–17 smo naredili primerjavo navideznih permeabilnostnih koeficientov in elektrofizioloških parametrov vitalnih in mrtvih tkiv v poskusih z LY in FITC-dekstranom. Za mrtvo tkivo smo definirali tkivo, ki na podlagi pogojev opisanih v poglavju 5.4.6 ni bilo vitalno.

Podatke smo podali kot povprečne vrednosti in njihove standardne deviacije. Izračunali smo tudi razmerje med P_{app} mrtvo / P_{app} vitalno, ki predstavlja spremembo povprečnega permeabilnostnega koeficienta označevalca na mrtvem tkivu glede na vitalno tkivo.

Rezultate smo predstavili v Preglednici XIV in na Sliki 14.

Preglednica XIII: Primerjava navideznih permeabilnostnih koeficientov in elektrofizioloških parametrov za vitalna in mrtva tkiva v poskusih z LY in FITC-dekstranom

	LY		FITC-dekstran	
	VITALNO TKIVO	MRTVO TKIVO	VITALNO TKIVO	MRTVO TKIVO
$P_{app} \pm SD$ [$\times 10^{-6}$ cm/s]	8,82 \pm 2,70	11,4 \pm 3,37	2,28 \pm 0,89	3,80 \pm 1,21
n	25	31	10	5
t-test ($\alpha = 0,05$)	z		z	
P_{app} mrtvo / P_{app} vitalno	1,29		1,67	
$Pd_{zač} \pm SD$ [mV]	-2 \pm 1,1	-1,1 \pm 0,8	-2,61 \pm 1,7	-0,6 \pm 0,3
TEER _{zač} \pm SD [Ω]	39 \pm 14	40 \pm 13	38 \pm 9	27 \pm 13
$Pd_{kon} \pm SD$ [mV]	-1,3 \pm 0,8	0 \pm 0,9	-1,9 \pm 1,0	-0,1 \pm 0,6
TEER _{kon} \pm SD [Ω]	21 \pm 9	12 \pm 7	22 \pm 9	11 \pm 3
$\Delta Pd_{glu-kon} \pm SD$ [mV]	1,2 \pm 0,7	0,1 \pm 0,1	2,4 \pm 1,4	0,1 \pm 0,1



Slika 14: Stolpčni grafikon povprečnih vrednosti navideznih permeabilnostnih koeficientov skupaj s standardno deviacijo za LY in FITC-dekstran. * označuje značilno razliko glede na vitalno tkivo ($p < 0,05$).

7 RAZPRAVA

Označevalec paracelularnega prehoda je vedno spojina, ki črevesni epitelij prehaja le pasivno preko tesnih stikov. Spojine, ki prehajajo membrane le s pasivno difuzijo, naj bi imele PDR (permeability directional ratio) vrednosti okoli 1 (42). Prednost pri izvedbi poskusov z označevalci paracelularnega prehoda je tudi detekcija označevalca v testiranih vzorcih, ki mora biti hitra in enostavna.

S poskusi z LY smo želeli potrditi ustreznost le-tega kot označevalca paracelularnega prehoda pri poskusih na izoliranem črevesju podgane. Dokazali smo, da LY prehaja pasivno skozi črevo podgane, saj je bil izračunani PDR za LY 0,7.

Nato smo vrednotili vpliv Cymal-7 in TMC na P_{app} LY. Dokazali smo, da izbrana pospeševalca absorpcije ne povečujeta permeabilnosti LY v koncentracijah, ki smo jih testirali (0,03 %; 0,3 %; 3,0 % in 10 % le za Cymal-7). Na podlagi poskusov s Caco-2 celicami, pridobljenimi iz literature, bi Cymal-7 in TMC morala povečati permeabilnost LY. Iz ugotovljenega lahko sklepamo, da je črevesni epitelij podgane veliko bolj prepusten za LY kot Caco-2 celice. Dejstvo je, da so Caco-2 celice veliko bolj občutljive na vpliv PPE, kot črevesni epitelij podgane zaradi številnejših tesnih stikov. Zaradi tega, je napovedovanje vpliva PPE na permeabilnost spojin na črevesje podgane ali človeka na podlagi rezultatov pridobljenih na Caco-2 celicah, lahko zavajajoče.

Pri vplivu TMC na permeabilnost LY lahko opazimo trend zmanjševanja P_{app} LY. Tak učinek je lahko posledica interakcije med LY in TMC zaradi naboja. LY ima pK_a približno $< 0,7$ (49), kar pomeni, da je pri testiranih pH negativno nabit. TMC je zaradiaminske skupine, ki je kvaternizirana, pri testiranih pH pozitivno nabit. Zaradi tega lahko pride med LY in TMC do interakcij, ki preprečujejo mukoadhezijo TMC in s tem vpliv na povečanje permeabilnosti. P_{app} LY se zmanjšuje z večanjem koncentracije TMC. Sklepamo lahko, da se z večanjem koncentracije TMC, povečujejo interakcije med LY in TMC, kar zmanjšuje koncentracijo LY na donorski strani in s tem povezan prehod preko črevesnega epitelija podgane, kar se kaže v nižji vrednostih P_{app} LY.

Pri pregledu elektrofizioloških parametrov smo opazili trend zniževanja vrednosti $\Delta P_{d_{glu-kon}}$ v odvisnosti od koncentracije pospeševalca. Manjša odzivnost tkiva na glukozo je posledica slabše vitalnosti, ki je bolj izrazita pri poskusih s Cymal-7.

S poskusi s FITC-dekstranom smo prav tako kot pri LY želeli potrditi njegovo ustreznost kot pospeševalca paracelularnega prehoda. Dokazali smo, da FITC-dekstran prehaja črevesni epitelij podgane le pasivno, saj je bil izračunani PDR 0,8.

Pri poskusih s pospeševalci smo uporabili samo srednje koncentracije Cymal-7 in TMC. Ugotovili smo, da 0,3 % Cymal-7 značilno poveča permeabilnost FITC-dekstrana, in sicer za faktor 1,93, medtem ko 0,3 % TMC ne vpliva na permeabilnost FITC-dekstrana. Enako kot pri LY smo pri pregledu elektrofizioloških parametrov opazili, da je vrednost $\Delta P_{d_{glu-kon}}$ bistveno manjša pri poskusih s pospeševalci, kot pri poskusih brez pospeševalcev. Razlika je, enako kot pri poskusih z LY, večja za Cymal-7, kar kaže na to, da je Cymal-7 za črevesje podgane bolj toksičen kot TMC.

Na podlagi zbranih literaturnih podatkov smo pričakovali, da bosta Cymal-7 in TMC povečala paracelularni prehod označevalcev. Za Cymal-7 nismo našli literaturnih podatkov glede vpliva na permeabilnost. Raziskovalci poročajo o sorodnih predstavnikih družine alkilglikozidov, kot je na primer tetradecilmaltozid (TDM). Pri poskusih permeabilnosti na Caco-2³ celični liniji je 0,25 % TDM povečal permeabilnost ¹⁴C manitola približno za faktor 10 in permeabilnost enoksaparina približno za faktor 13 (43). Eley in sodelavci so v raziskavi s trinajstimi različnimi predstavniki družine alkilglikozidov dokazali, da njihovo delovanje (vpliv na permeabilizacijo membrane in s tem pospešitev paracelularnega prehoda) ni odvisno od njihove strukture. Daljša alkilna veriga nesladkornega dela alkilglikozida ne vodi v večji vpliv na permeabilnost membrane (44), iz česar lahko sklepamo, da Cymal-7 prav tako pospeši paracelularni prehod spojin, ki prehajajo epitelij paracelularno s pasivno difuzijo.

TMC je pri poskusih permeabilnosti na Caco-2 celični liniji močno povečal permeabilnost označevalcev paracelularnega prehoda. 1,5–2,5 % TMC je pri pH = 6.7 povečal permeabilnost ¹⁴C manitola 32–60 krat in FITC-dekstrana 167–373 krat (36).

Rezultati, ki smo jih dobili pri poskusih na izoliranem črevesju podgane, niso skladni z rezultati poskusov na Caco-2 celični liniji. Razlika v vplivu pospeševalcev na Caco-2 celice in na izolirano črevo podgane lahko izhaja iz dejstva, da je učinek pospeševalcev

³ Caco-2 celice so rakaste celice karcinoma kolona človeškega izvora, ki v *in vitro* pogojih gojenja tvorijo polariziran monosloj diferenciranih celic s tesnimi stiki in z visokimi TEER vrednostmi.

absorpcije veliko bolj izražen na Caco-2 celicah kot pri naravnih tkivih. Absorpcija je tako pri Caco-2 celicah povečana pri veliko nižjih koncentracijah pospeševalcev v primerjavi z naravnimi tkivi, zato Caco-2 celice ne morejo primerno odražati vpliva, ki ga bodo pospeševalci absorpcije imeli na tkivo (45). Da bi lahko resnično ovrednotili vpliv PPE na npr. človeško črevo na podlagi rezultatov pridobljenih na Caco-2 celični liniji, bi morali izvesti *in vivo* študije.

Nadalje, Caco-2 celična linija je model, ki bolje predstavlja debelo črevo kot tanko črevo, saj je pridobljena iz celic karcinoma debelega čreva človeškega izvora. Tesnih stikov je v Caco-2 celicah veliko več, kot jih je v tankem črevu podgane ter človeka in le-ti so zelo tesni (46). Vrednosti TEER za Caco-2 celice so za faktor 10 večje od vrednosti TEER podganjega in človeškega črevesja, ki pa so podobne ($TEER_{Caco.2} > TEER_{podgana} \sim TEER_{\text{človek}}$) (38, 50). Iz navedenega lahko sklepamo, da Caco-2 celična linija ni primeren model za poskuse s PPE, saj slabo napoveduje vpliv, ki ga bodo PPE imeli na naravna tkiva.

Permeabilnost preko paracelularne poti je omejena na velikost por med celicami epitelija in je odvisna od molekulske mase in radija spojine, ki prehaja epitelij (47). FITC-dekstran je približno 10 krat večji kot LY glede na to, da ima uporabljeni FITC-dekstran molsko maso okrog 5000. Kljub temu, da tesni stiki niso popolnoma togi, večje molekule težje prehajajo membrano, kot majhne. To je razlog, zakaj ima LY, ki je majhen, večji P_{app} kot FITC-dekstran. Alsenz in sodelavci navajajo, da je $P_{app} > 10 \times 10^{-06}$ cm/s, izmerjen na Caco-2 celični liniji, lastnost spojin, ki so dobro permeabilne (48). LY ima $P_{app} 8,82 \pm 2,70 \times 10^{-06}$ cm/s, kar ni značilno za slabo permeabilne spojine. Glede na to, da tudi Cymal-7 in TMC nista vplivala na permeabilnost LY, lahko predpostavljamo, da LY prosto prehaja črevesni epitelij podgane. FITC-dekstran ima $P_{app} 2,28 \pm 0,89 \times 10^{-06}$ cm/s, ki je bistveno manjši od P_{app} LY. FITC-dekstran zaradi svoje velikosti verjetno zelo slabo prehaja črevesni epitelij. Prav tako je LY v primerjavi s FITC-dekstranom manj občutljiv na vpliv pospeševalcev absorpcije. 0,3 % Cymal-7 poveča paracelularni prehod FITC-dekstrana 1,93 krat, medtem ko na paracelularni prehod LY ne vpliva značilno.

Pri poskusih permeabilnosti je integriteta tkiva, ki je tudi kazalec vitalnosti, pomemben parameter. Označevalci paracelularnega prehoda nam velikokrat služijo za preverjanje integritete tkiva. Za oba označevalca smo dokazali, da je razlika med P_{app} za vitalna tkiva in P_{app} za mrtva tkiva, značilna. Če primerjamo vrednosti količnika P_{app} mrtvo / P_{app} vitalno 1,29 za LY in 1,67 za FITC-dekstran, ugotovimo, da je ta razlika večja za FITC-dekstran.

Tudi parameter $\Delta Pd_{\text{glu} - \text{kon}}$ je za FITC-dekstran večji, kar pomeni, da se tkiva v stiku s FITC-dekstranom ob koncu poskusa bolje odzivajo na glukozo kot tista, ki so v stiku z LY.

Iz podatkov zbranih iz literature in praktičnega dela diplomske naloge, lahko sklepamo, da je FITC-dekstran boljši označevalec paracelularnega prehoda pri poskusih permeabilnosti na izoliranem črevesju podgane kot LY.

Na podlagi rezultatov pridobljenih s Cymal-7 in TMC lahko trdimo, da je Cymal-7 boljši pospeševalec paracelularnega prehoda kot TMC. V Preglednici XII, kjer smo primerjali razmerje $P_{\text{app } x \%} / P_{\text{app } 0 \%}$ za vse uporabljene koncentracije Cymal-7 in TMC opazimo bolj zeleno obarvanje za Cymal-7, kar pomeni da je razmerje $P_{\text{app } x \%} / P_{\text{app } 0 \%}$ večje v primerjavi s TMC. Razmerje $P_{\text{app } x \%} / P_{\text{app } 0 \%}$ pa je kazalec učinkovitosti pospeševalca absorpcije.

Cymal-7 je hkrati tudi bolj toksičen za tkivo kot TMC. Pri pregledu elektrofizioloških parametrov smo opazili, da je vrednost $\Delta Pd_{\text{glu} - \text{kon}}$ bistveno manjša pri poskusih s pospeševalci, kot pri poskusih brez pospeševalcev. Razliko, ki je večja za Cymal-7 kot za TMC, smo opazili tako pri poskusih z LY kot pri poskusih s FITC-dekstranom.

8 SKLEP

- Ugotovili smo, da LY in FITC-dekstran prehajata epitelij tankega črevesja s pasivno difuzijo. Statistična analiza ni pokazala nobene razlike med prehodom M do S in S do M.
- Pri poskusih z LY pospeševalca absorpcije Cymal-7 in TMC ne povečata permeabilnosti LY. Z naraščajočo koncentracijo pospeševalcev pada parameter $\Delta Pd_{\text{glu - kon}}$, ki je kazalec vitalnosti tkiva. Le-ta je slabša pri poskusih s Cymal-7. Pri poskusih s TMC lahko opazimo trend zmanjševanja P_{app} z naraščajočo koncentracijo TMC. Učinek lahko pripišemo morebitni interakciji med negativno nabitim LY in pozitivno nabitim TMC, kar vodi v zmanjšanje P_{app} LY.
- Pri poskusih s FITC-dekstranom, 0,3 % Cymal-7 značilno poveča permeabilnost FITC-dekstrana 1,93 krat, medtem ko 0,3 % TMC ne vpliva na P_{app} FITC-dekstrana. Parameter $\Delta Pd_{\text{glu - kon}}$ je manjši pri poskusu s Cymal-7 iz česar lahko sklepamo, da je bolj toksičen za tkivo kot TMC.
- Razlike v vplivu Cymal-7 in TMC na povečanje prehoda LY in FITC-dekstrana med modelom Caco-2 celic in izoliranim črevesjem podgane lahko pripišemo ugotovitvi, da je Caco-2 celična linija neprimeren model za napovedovanje vpliva PPE na naravna tkiva.
- FITC-dekstran je bolj občutljiv na vpliv pospeševalcev paracelularnega prehoda kot LY, iz česar lahko sklepamo, da bo Cymal-7 pospešil paracelularni prehod učinkovinam, ki so zelo slabo permeabilne in ne srednje permeabilne kot LY ($P_{\text{app}} = 8,82 \pm 2,70 \times 10^{-06}$ cm/s). Ugotovili smo, da je Cymal-7 boljši pospeševalec paracelularnega prehoda, kot TMC.
- Z namenom testiranja integritete in vitalnosti tkiva se je FITC-dekstran pokazal kot boljši označevalec v primerjavi z LY. FITC-dekstran izkazuje večji količnik P_{app} mrtvo / P_{app} vitalno, večje razlike v elektrofizioloških parametrih med vitalnim in mrtvim tkivom ter večjo razliko električnega potenciala po dodatku glukoze na koncu poskusa.

9 LITERATURA

1. <http://www.siumed.edu/~dking2/intro/epith.htm> (29.9.2011)
2. Alberts B, Bray D, Lewis J, Raff M, Roberts K in Watson J D: Molecular biology of the cell, 3. izdaja, Garland Publishing, New York, 1994: 949–1010
3. <http://www.uic.edu/classes/bios/bios100/lectf03am/lect07.htm> (29.9.2011)
4. Levine R R: Intestinal absorption. V: Rabinowitz J L in Myerson R M: Topics in Medicinal Chemistry, Volume 4.: Absorption phenomena, Wiley - Interscience, New York, 1971: 28–95
5. Ward P D, Tippin T K in Thakker D R: Enhancing paracellular permeability by modulating epithelial tight junctions. *Pharm Sci Technol Today* 2000; 3(10):346–358
6. Lewis S A: Epithelial electrophysiology. V: Wills N K, Reuss L in Lewis S A: Epithelial transport. A guide to methods and experimental analysis, Chapman & Hall, London, 1996: 93–117
7. Armstrong W Mc D, Garcia-Diaz J F: Electrical phenomena and ion transport in the small intestine. V: Csáky T Z (ed.): Pharmacology of the intestinal permeation I, Springer-Verlag, Berlin, 1984: 309–380
8. Huber J D, Egleton R D in Davis T P: Molecular physiology and pathophysiology of tight junctions in blood - brain barrier. *Trends Neurosci* 2001; 24(12): 719–725
9. González-Mariscal L, Betanzos A, Nava P in Jaramillo B E: Tight junction proteins. *Prog Biophys Mol Biol* 2003; 81(1): 1–44
10. Edens H A in Parkos C A: Modulation of epithelial and endothelial paracellular permeability by leukocytes. *Adv Drug Deliv Rev* 2000; 41(3): 315–328
11. Harhaj N S in Antonetti D A: Regulation of tight junctions and loss of barrier function in pathophysiology. *Int J Biochem Cell Biol* 2004; 36(7): 1206–1237
12. Daugherty A L in Mrsny R J: Regulation of the intestinal epithelial paracellular barrier. *Pharm Sci Technol Today* 1999; 2(7):281–287
13. Vorbrodt A W in Dobrogowska D H: Molecular anatomy of intercellular junctions in brain endothelial and epithelial barriers: electron microscopist's view. *Brain Res Brain Res Rev* 2003; 42(3): 221–242
14. Tang V W in Goodenough D A: Paracellular ion channel at the tight junction. *Biophys J* 2003; 84(3): 1660–1673

15. Anderson J M in Van Itallie C M: Tight junctions: closing in on the seal. *Curr Biol* 1999; 9(24): R922–R924
16. Colegio O R, Van Itallie C M, McCrea H J, Rahner C in Anderson J M: Claudins create charge-selective channels in the paracellular pathway between epithelial cells. *Am J Physiol Cell Physiol* 2002; 283(1): C142–C147
17. Schneeberger E E: Claudins form ion-selective channels in the paracellular pathway. Focus on "Claudin extracellular domains determine paracellular charge selectively and resistance but not tight junction fibril architecture". *Am J Physiol Cell Physiol* 2003; 284(6): C1331–C1333
18. Kerec M, Švigelj V, Bogataj M in Mrhar A: The enhancement of pipemidic acid permeation into the pig urinary bladder wall. *Int J Pharm* 2002;240 (1–2): 33–36
19. Citi S in Cordenonsi M: Tight junction proteins. *Biochim Biophys Acta* 1998; 1448(1): 1–11
20. Lampugnani M G in Dejana E: Interendothelial junctions: structure, signalling and functional roles. *Curr Opin Cell Biol* 1997; 9(5): 674–682
21. Ward P D, Ouyang H in Thakker D R: Role of phospholipase C- β in the modulation of epithelial tight junction permeability. *J Pharmacol Exp Ther* 2003; 304(2): 689–698
22. Brunton V G, MacPherson I R J in Frame M C: Cell adhesion receptors, tyrosine kinases and actin modulators: a complex three-way circuitry. *Biochim Biophys Acta* 2004; 1692(2–3): 121–144
23. Nusrat A, Turner J R in Madara J L: Molecular Physiology and Pathophysiology of Tight Junctions IV. Regulation of tight junctions by extracellular stimuli: nutrients, cytokines, and immune cells. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2000; 279(5): G851–G857
24. Walsh S V, Hopkins A M in Nusrat A: Modulation of tight junction structure and function by cytokines. *Adv Drug Deliv Rev* 2000; 41(3): 303–313
25. Goetz F W, Planas J V in MacKenzie S: Tumor necrosis factors. *Dev Comp Immunol* 2004; 28(5):487–497
26. Kaiser P, Rothwell L, Avery S in Balu S: Evolution of the interleukins. *Dev Comp Immunol* 2004; 28(5): 375–394
27. Zen K in Parkos C A: Leukocyte-epithelial interactions. *Curr Opin Cell Biol* 2003; 15(5): 557–564

28. Tiruppathi C, Minshall R D, Paria B C, Vogel S M in Malik A B: Role of Ca^{2+} signaling in the regulation of endothelial permeability. *Vascul Pharmacol* 2002; 39(4–5): 173–185
29. Karczewski J in Groot J: *Molecular Physiology and Pathophysiology of Tight Junctions III*. Tight junction regulation by intracellular messengers: differences in response within and between epithelia. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2000; 279(4): G660–G665
30. Turner J R, Rill B K, Carlson S L, Carnes D, Kerner R, Mrsny R J in Madara J L: Physiological regulation of epithelial tight junction is associated with myosin light-chain phosphorylation. *Am J Physiol* 1997; 273(4 Pt 1): C1378–C1385
31. Borchard G, Lueßen H L, de Boer A G, Coos Verhoef J, Lehr C M in Junginger H E: The potential of mucoadhesive polymers in enhancing intestinal peptide drug absorption. III: Effects of chitosan - glutamate and carbomer on epithelial tight junctions in vitro. *J Control Release* 1996; 39(2–3): 131–138
32. Behrens J, Vakaet L, Friis R, Winterhager E, Van Roy F, Mareel M M in Birchmeier W: Loss of Epithelial Differentiation and Gain of Invasiveness Correlates with Tyrosine Phosphorylation of the E-Cadherin/ β -Catenin Complex in Cells Transformed with a Temperature-sensitive v-SRC Gene. *J Cell Biol* 1993; 120(3): 757–766
33. Ma T Y, Tran D, Hoa N, Nguyen D, Merryfield M in Tarnawski A: Mechanism of extracellular calcium regulation of intestinal epithelial tight junction permeability: Role of cytoskeletal involvement. *Microsc Res Tech* 2000; 51(2): 156–168
34. http://www.chemicalbook.com/ProductChemicalPropertiesCB6511315_EN.htm
(30.9.2011)
35. Aungst B J: Intestinal Permeation Enhancers. *J Pharm Sci* 2000; 89(4): 429–442
36. Thanou M, Verhoef J C, Junginger H E: Chitosans and its derivatives as intestinal absorption enhancers. *Advanced Drug Delivery Reviews* 2001; 50: 91–101
37. Konsoula R, Barile F A: Correlation of in vitro cytotoxicity with paracellular permeability in Caco-2 cells. *Toxicology in Vitro* 2005; 19: 675–684
38. Hidalgo I J, Raub T J, Borchardt R T: Characterization of the human colon carcinoma cell line (Caco-2) as a model system for intestinal epithelial permeability. *Gastroenterology* 1989; 96(3): 736–49

39. http://www.sigmaaldrich.com/catalog/ProductDetail.do?D7=0&N5=SEARCH_CONCAT_PNO|BRAND_KEY&N4=62649|FLUKA&N25=0&QS=ON&F=SPEC
(30.9.2011)
40. http://www.sigmaaldrich.com/catalog/ProductDetail.do?lang=en&N4=FD4|SIGMA&N5=SEARCH_CONCAT_PNO|BRAND_KEY&F=SPEC (30.9.2011)
41. http://www.chemicalbook.com/ChemicalProductProperty_EN_CB2452630.htm
(30.9.2011)
42. Merkle H P, Ditzinger G, Lang S R, Peter H, Schmidt M C: In vitro cell models to study nasal mucosal permeability and metabolism. *Advanced Drug Delivery Reviews* 1998; 29(1-2): 51–79
43. Yang T, Arnold J J, Ahsan F: Tetradecylmaltoside (TDM) enhances *in vitro* and *in vivo* intestinal absorption of enoxaparin, a low molecular weight heparin. *Journal of Drug Targeting* 2005; 13(1): 29–38
44. Eley J G, Triumalashetty P P: In vitro assessment of alkylglycosides as permeability enhancers. *AAPS Pharmsci Tech* 2001; 2(3): 19 (1–7)
45. Legen I, Salobir M, Kerč J: Comparison of different intestinal epithelia as models for absorption enhancement studies. *Int J Pharm* 2005; 291: 183–188
46. Hillgren K M, Kato A, Borchardt R T: *In vitro* systems for studying intestinal drug absorption. *Medicinal Research Reviews* 1995; 15(2): 83–109
47. Triumalashetty P P, Eley J G: Permeability enhancing effects of the alkylglycoside, octylglucoside, on insulin permeation across epithelial membrane *in vitro*. *J Pharm Pharmaceut Sci* 2006; 9(1): 32–39
48. Alsenz J, Haenel E: Development of a 7-day, 96-well Caco-2 permeability assay with high-throughput direct UV compound analysis
49. Oparka K J, Murat E A, Weight K M, Prior D A M, Harris N: The drug probenecid its the vacuolar accumulation of fluorescent anions in onion epidermal cells. *J Cell Sci* 1991; 99: 557–563
50. Haslam I S, O'Reilly D A, Sherlock D J, Kauser A, Womack C, Coleman T: Pancreatoduodenectomy as a source of human small intestine for Ussing chamber investigations and comparative studies with rat tissue. *Biopharm Drug Dispos* 2011; 32: 210–221.

10 PRILOGA

V prilogi so zbrani rezultati vseh poskusov.

10.1 Poskus 1: LY

Poskus smo izvedli po postopku opisanem v poglavju Materiali in metode.

Rezultati so zbrani v Preglednicah XIV in XV.

Preglednica XIV: Izračun navideznih permeabilnostnih koeficientov za LY

	LY - M → S							
	celica 1	celica 2	celica 3	celica 4	celica 5	celica 6	celica 7	celica 8
kd [mol/h]	3,96E-10	3,18E-10	9,50E-10	5,44E-10	6,62E-10	4,64E-10	4,74E-10	5,93E-10
J [nmol/hcm ²]	3,96E-01	3,18E-01	9,50E-01	5,44E-01	6,62E-01	4,64E-01	4,74E-01	5,93E-01
P _{app} [cm/s]	9,45E-06	6,89E-06	2,25E-05	1,14E-05	1,41E-05	1,07E-05	1,01E-05	1,28E-05

Preglednica XV: Elektrofiziološki parametri

	celica 1		celica 2		celica 3		celica 4		celica 5		celica 6		celica 7		celica 8	
	Pd [mV]	TEER [Ω]	Pd [mV]	TEER [Ω]	Pd [mV]	TEER [Ω]	Pd [mV]	TEER [Ω]	Pd [mV]	TEER [Ω]	Pd [mV]	TEER [Ω]	Pd [mV]	TEER [Ω]	Pd [mV]	TEER [Ω]
pred začetkom	-1,3	34	-1,4	43	0,0	32	-1,4	46	-0,6	23	-0,4	24	-1,6	42	-1,0	44
začetek	-0,9	40	-1,0	42	0,6	28	-1,0	45	-0,1	30	-0,2	26	-1,0	40	-0,3	43
konec	-1,0	27	-0,8	35	0,4	10	-1,8	18	0,4	1	2,5	8	-0,5	13	0,2	15
glukoza	-2,7	27	-2,8	35	0,3	13	-2,1	17	0,4	1	2,6	11	-0,7	13	0,2	14
asimetrija	0,0		0,8		-0,2		-1,5		-0,7		3,6		0,0		0,4	

Na podlagi kriterijev za ocenjevanje vitalnosti smo ugotovili:

- tkiva v celicah 3, 5 in 6 niso preživela postopka priprave tkiva za poskus in jih zato v končnih rezultatih nismo upoštevali;
- tkivi v celicah 7 in 8 ob koncu poskusa nista bili vitalni, zato ju v končnih rezultatih nismo upoštevali.

10.2 Poskus 2: LY - M → S in S → M

Poskus smo izvedli po postopku opisanem v poglavju Materiali in metode. Razlika je bila v tem, da smo v 4 celicah kot donorsko stran uporabili serozno stran tkiva. Preučili smo prehod označevalca paracelularnega prehoda bodisi iz mukozne na serozno stran, bodisi iz serozne na mukozno stran tkiva. S tako shemo poskusa smo želeli potrditi, da LY skozi črevo podgane prehaja le pasivno.

Rezultati so zbrani v Preglednicah XVI in XVII.

Preglednica XVI: Izračun navideznih permeabilnostnih koeficientov za LY

	LY - M → S				LY - S → M			
	celica 1	celica 3	celica 5	celica 7	celica 2	celica 4	celica 6	celica 8
kd [mol/h]	3,91E-10	1,01E-09	6,50E-10	5,38E-10	4,88E-10	9,82E-10	5,80E-10	1,10E-09
J [nmol/hcm ²]	3,91E-01	1,01E+00	6,50E-01	5,38E-01	4,88E-01	9,82E-01	5,80E-01	1,10E+00
P _{app} [cm/s]	7,25E-06	1,67E-05	1,29E-05	9,99E-06	7,49E-06	1,51E-05	8,48E-06	1,51E-05

Preglednica XVII: Elektrofiziološki parametri

	celica 1		celica 2		celica 3		celica 4		celica 5		celica 6		celica 7		celica 8	
	Pd [mV]	TEER [Ω]	Pd [mV]	TEER [Ω]	Pd [mV]	TEER [Ω]	Pd [mV]	TEER [Ω]	Pd [mV]	TEER [Ω]	Pd [mV]	TEER [Ω]	Pd [mV]	TEER [Ω]	Pd [mV]	TEER [Ω]
pred začetkom	-1,8	43	-2,5	41	-0,9	37	-0,2	32	-0,6	32	-1,7	45	-3,8	52	-1,6	41
začetek	-1,4	39	-2,3	39	-1,0	34	-0,1	19	-0,4	21	-1,6	40	-3,5	55	-1,8	40
konec	-1,4	13	-1,4	15	-0,2	16	-1,8	6	-0,2	4	0,0	20	-1,6	20	-0,3	9
glukoza	-2,2	14	-2,7	15	-0,3	23	-2,1	5	-0,2	6	-0,3	20	-2,4	29	-0,3	9
asimetrija	-0,1		-0,4		0,0		-2,1		0,2		1,0		0,1		0,1	

Na podlagi kriterijev za ocenjevanje vitalnosti smo ugotovili:

- tkivi v celicah 4 in 5 nista preživeli postopka priprave tkiva za poskus in ju zato v končnih rezultatih nismo upoštevali;
- tkivi v celicah 3 in 8 ob koncu poskusa nista bili vitalni, zato ju v končnih rezultatih nismo upoštevali.

10.3 Poskus 3: LY - M → S in S → M

Poskus smo izvedli po postopku opisanem v poglavju Materiali in metode. Razlika je bila v tem, da smo v 4 celicah kot donorsko stran uporabili serozno stran tkiva. Preučili smo prehod označevalca paracelularnega prehoda bodisi iz mukozne na serozno stran, bodisi iz serozne na mukozno stran tkiva. S tako shemo poskusa smo želeli potrditi, da LY skozi črevo podgane prehaja le pasivno.

Rezultati so zbrani v Preglednicah XVIII in XIX.

Preglednica XVIII: Izračun navideznih permeabilnostnih koeficientov za LY

	LY - M → S				LY - S → M			
	celica 1	celica 3	celica 5	celica 7	celica 2	celica 4	celica 6	celica 8
kd [mol/h]	1,05E-09	5,80E-10	1,03E-09	7,02E-10	1,26E-09	4,58E-10	1,18E-09	7,67E-10
J [nmol/hcm ²]	1,05E+00	5,80E-01	1,03E+00	7,02E-01	1,26E+00	4,58E-01	1,18E+00	7,67E-01
P _{app} [cm/s]	1,49E-05	7,51E-06	1,49E-05	1,10E-05	1,48E-05	5,12E-06	1,49E-05	9,95E-06

Preglednica XIX: Elektrofiziološki parametri

	celica 1		celica 2		celica 3		celica 4		celica 5		celica 6		celica 7		celica 8	
	Pd [mV]	TEER [Ω]	Pd [mV]	TEER [Ω]	Pd [mV]	TEER [Ω]	Pd [mV]	TEER [Ω]	Pd [mV]	TEER [Ω]	Pd [mV]	TEER [Ω]	Pd [mV]	TEER [Ω]	Pd [mV]	TEER [Ω]
pred začetkom	-1	30	-0,6	26	-1,8	43	-2,4	60	-2,1	33	-0,8	37	-2,1	46	-1,8	32
začetek	-1	33	-0,7	28	-1,7	50	-2,6	73	-2,0	35	-0,5	39	-2,1	48	-1,9	43
konec	-3,3	15	-0,8	10	-0,4	16	-1,5	29	-1,4	12	2,7	7	-0,5	6	-0,3	7
glukoza	-3,8	14	-0,9	12	-0,5	16	-1,7	28	-1,5	3	2,8	7	-0,5	8	-0,4	9
asimetrija	-3,2		0,0		0,1		-0,2		-0,3		3,4		0,0		0,4	

Na podlagi kriterijev za ocenjevanje vitalnosti smo ugotovili:

- tkivo v celici 2 ni preživelo postopka priprave tkiva za poskus in ga zato v končnih rezultatih nismo upoštevali;
- tkiva v celicah 3, 5, 6, 7 in 8 ob koncu poskusa niso bila vitalna, zato jih v končnih rezultatih nismo upoštevali.

10.4 Poskus 4: LY in 0,3 % in 0,03 % Cymal-7

Poskus smo izvedli po postopku opisanem v poglavju Materiali in metode.

Rezultati so zbrani v Preglednicah XX in XXI.

Preglednica XX: Izračun navideznih permeabilnostnih koeficientov za LY

	0,3 % CYMAL-7		0,03 % CYMAL-7			LY		
	celica 1	celica 3	celica 4	celica 5	celica 8	celica 2	celica 6	celica 7
kd [mol/h]	4,87E-10	4,58E-10	5,70E-10	6,82E-10	7,09E-10	6,79E-10	5,62E-10	7,36E-10
J [nmol/hcm ²]	4,87E-01	4,58E-01	5,70E-01	6,82E-01	7,09E-01	6,79E-01	5,62E-01	7,36E-01
P _{app} [cm/s]	1,22E-05	1,58E-05	1,46E-05	1,43E-05	1,40E-05	1,19E-05	7,56E-06	1,46E-05

Preglednica XXI: Elektrofiziološki parametri

	celica 1		celica 2		celica 3		celica 4		celica 5		celica 6		celica 7		celica 8	
	Pd [mV]	TEER [Ω]	Pd [mV]	TEER [Ω]	Pd [mV]	TEER [Ω]	Pd [mV]	TEER [Ω]	Pd [mV]	TEER [Ω]	Pd [mV]	TEER [Ω]	Pd [mV]	TEER [Ω]	Pd [mV]	TEER [Ω]
pred začetkom	-2,5	42	-2,2	35	-2,9	56	-3,5	61	-0,9	30	-3,2	36	-2,5	48	-1,9	36
začetek	-1,9	41	-1,8	35	-1,9	59	-1,9	59	-0,3	34	-3,4	37	-2,3	48	-1,6	40
konec	-0,8	15	-0,5	19	0,0	29	-0,7	19	0,1	11	-0,9	45	-0,3	12	0,0	22
glukoza	-0,9	15	-0,8	35	-0,1	31	-0,8	19	0,0	11	-2,8	34	-0,4	12	0,0	22
asimetrija	0,0		0,0		-0,1		-0,2		-0,1		0,0		0,3		-0,1	

Na podlagi kriterijev za ocenjevanje vitalnosti smo ugotovili:

- vsa tkiva v celicah so preživele postopek priprave tkiva za poskus;

- tkiva v celicah 1, 3, 4, 5, 7 in 8 ob koncu poskusa niso bila vitalna, zato jih v končnih rezultatih nismo upoštevali.

10.5 Poskus 5: LY in 3 % in 0,3 % Cymal-7

Poskus smo izvedli po postopku opisanem v poglavju Materiali in metode.

Rezultati so zbrani v Preglednicah XXII in XXIII.

Preglednica XXII: Izračun navideznih permeabilnostnih koeficientov za LY

	3 % CYMAL-7			0,3 % CYMAL-7			LY	
	celica 2	celica 5	celica 8	celica 3	celica 4	celica 7	celica 1	celica 6
kd [mol/h]	5,48E-10	5,13E-10	8,66E-10	7,37E-10	5,29E-10	4,47E-10	8,34E-10	4,84E-10
J [nmol/hcm ²]	5,48E-01	5,13E-01	8,66E-01	7,37E-01	5,29E-01	4,47E-01	8,34E-01	4,84E-01
P _{app} [cm/s]	1,16E-05	1,06E-05	1,75E-05	1,70E-05	1,01E-05	1,02E-05	1,54E-05	1,54E-05

Preglednica XXIII: Elektrofiziološki parametri

	celica 1		celica 2		celica 3		celica 4		celica 5		celica 6		celica 7		celica 8	
	Pd [mV]	TEER [Ω]	Pd [mV]	TEER [Ω]	Pd [mV]	TEER [Ω]	Pd [mV]	TEER [Ω]	Pd [mV]	TEER [Ω]	Pd [mV]	TEER [Ω]	Pd [mV]	TEER [Ω]	Pd [mV]	TEER [Ω]
pred začetkom	-0,6	23	-0,4	28	-1,3	16	-2,5	44	-1,3	44	-3,9	54	-2,7	37	-0,2	32
začetek	-0,4	24	-0,2	34	-0,9	15	-2,7	53	-0,7	54	-2,1	59	-1,0	41	0,0	36
konec	0,2	8	0,1	15	0,4	19	-0,5	19	0,3	17	-0,2	14	-0,2	12	0,7	7
glukoza	0,2	5	0,0	18	0,4	29	-0,4	16	0,2	13	-0,1	14	-0,2	10	0,8	5
asimetrija	-0,1		0,0		0,0		-0,3		0,4		-0,1		0,3		0,4	

Na podlagi kriterijev za ocenjevanje vitalnosti smo ugotovili:

- tkiva v celicah 1, 2 in 8 niso preživela postopka priprave tkiva za poskus in jih zato v končnih rezultatih nismo upoštevali;
- tkiva v celicah 3, 4, 5, 6 in 7 ob koncu poskusa niso bila vitalna, zato jih v končnih rezultatih nismo upoštevali.

10.6 Poskus 6: LY in 0,03 % Cymal-7

Poskus smo izvedli po postopku opisanem v poglavju Materiali in metode.

Rezultati so zbrani v Preglednicah XXIV in XXV.

Preglednica XXIV: Izračun navideznih permeabilnostnih koeficientov za LY

	LY				0,03 % CYMAL-7			
	celica 1	celica 3	celica 5	celica 7	celica 2	celica 4	celica 6	celica 8
kd [mol/h]	3,19E-10	3,74E-10	2,01E-10	3,25E-10	3,42E-10	3,48E-10	3,55E-10	3,94E-10
J [nmol/hcm ²]	3,19E-01	3,74E-01	2,01E-01	3,25E-01	3,42E-01	3,48E-01	3,55E-01	3,94E-01
P _{app} [cm/s]	5,95E-06	7,63E-06	3,83E-06	5,79E-06	7,74E-06	7,79E-06	8,73E-06	8,71E-06

Preglednica XXV: Elektrofiziološki parametri

	celica 1		celica 2		celica 3		celica 4		celica 5		Celica 6		celica 7		celica 8	
	Pd [mV]	TEER [Ω]	Pd [mV]	TEER [Ω]	Pd [mV]	TEER [Ω]	Pd [mV]	TEER [Ω]	Pd [mV]	TEER [Ω]	Pd [mV]	TEER [Ω]	Pd [mV]	TEER [Ω]	Pd [mV]	TEER [Ω]
pred začetkom	-2,4	30	-2,0	34	-2,2	49	-1,8	49	-2,7	65	-3,2	54	-4,4	57	-5,1	62
začetek	-2,1	25	-1,9	37	-1,9	51	-1,9	48	-2,6	67	-3,4	45	-3,4	62	-3,9	54
konec	-2,3	13	-2,4	22	-1,9	28	-1,3	26	-0,4	38	-0,5	24	-0,1	18	-0,2	17
glukoza	-4,8	11	-3,8	20	-4,3	26	-2,3	24	-0,4	38	-0,6	25	-0,1	18	-0,1	17
asimetrija	-0,9		0,5		0,0		-0,1		0,8		0,2		0,3		0,3	

Na podlagi kriterijev za ocenjevanje vitalnosti smo ugotovili:

- vsa tkiva v celicah so preživela postopek priprave tkiva za poskus;
- tkiva v celicah 5, 6, 7 in 8 ob koncu poskusa niso bila vitalna, zato jih v končnih rezultatih nismo upoštevali.

10.7 Poskus 7: LY in 0,3 % Cymal-7

Poskus smo izvedli po postopku opisanem v poglavju Materiali in metode.

Rezultati so zbrani v Preglednicah XXVI in XXVII.

Preglednica XXVI: Izračun navideznih permeabilnostnih koeficientov za LY

	0,3 % CYMAL-7					LY		
	celica 3	celica 4	celica 5	celica 7	celica 8	Celica 1	celica 2	celica 6
kd [mol/h]	3,09E-10	4,27E-10	5,55E-10	4,78E-10	5,62E-10	3,98E-10	8,33E-10	5,73E-10
J [nmol/hcm ²]	3,09E-01	4,27E-01	5,55E-01	4,78E-01	5,62E-01	3,98E-01	8,33E-01	5,73E-01
P _{app} [cm/s]	7,63E-06	1,06E-05	1,23E-05	1,08E-05	1,27E-05	7,77E-06	1,52E-05	1,14E-05

Preglednica XXVII: Elektrofiziološki parametri

	celica 1		celica 2		celica 3		celica 4		celica 5		celica 6		celica 7		celica 8	
	Pd [mV]	TEER [Ω]	Pd [mV]	TEER [Ω]	Pd [mV]	TEER [Ω]	Pd [mV]	TEER [Ω]	Pd [mV]	TEER [Ω]	Pd [mV]	TEER [Ω]	Pd [mV]	TEER [Ω]	Pd [mV]	TEER [Ω]
pred začetkom	-1,9	1	-0,8	28	-2,6	41	-2,0	34	-0,8	22	-0,9	26	-1,1	25	-1,2	38
začetek	-1,8	1	-0,5	30	-2,5	42	-1,8	40	-0,7	35	-1,0	30	-0,9	19	-1,2	41
konec	-0,7	1	-0,4	26	-0,9	22	-0,7	12	0,0	18	-0,4	13	-0,6	13	0,0	15
glukoza	-1,7	1	-1,2	26	-1,1	20	-1,0	10	-0,3	17	-1,5	13	-0,8	13	-0,1	16
asimetrija	-0,1		0,3		-0,1		-0,1		0,4		0,3		0,3		0,0	

Na podlagi kriterijev za ocenjevanje vitalnosti smo ugotovili:

- vse tkiva v celicah so preživela postopek priprave tkiva za poskus;
- tkivo v celici 8 ob koncu poskusa ni bilo vitalno, zato ga v končnih rezultatih nismo upoštevali.

10.8 Poskus 8: LY in 3 % Cymal-7

Poskus smo izvedli po postopku opisanem v poglavju Materiali in metode.

Rezultati so zbrani v Preglednicah XXVIII in XXIX.

Preglednica XXVIII: Izračun navideznih permeabilnostnih koeficientov za LY

	3 % CYMAL-7					LY		
	celica 2	celica 4	celica 5	celica 6	celica 8	celica 1	celica 3	celica 7
kd [mol/h]	2,81E-10	5,81E-10	2,95E-10	2,24E-10	3,84E-10	5,32E-10	5,46E-10	6,43E-10
J [nmol/hcm ²]	2,81E-01	5,81E-01	2,95E-01	2,24E-01	3,84E-01	5,32E-01	5,46E-01	6,43E-01
P _{app} [cm/s]	8,51E-06	1,63E-05	8,63E-06	5,72E-06	9,38E-06	9,33E-06	9,92E-06	1,25E-05

Preglednica XXIX: Elektrofiziološki parametri

	celica 1		celica 2		celica 3		celica 4		celica 5		celica 6		celica 7		celica 8	
	Pd [mV]	TEER [Ω]	Pd [mV]	TEER [Ω]	Pd [mV]	TEER [Ω]	Pd [mV]	TEER [Ω]	Pd [mV]	TEER [Ω]	Pd [mV]	TEER [Ω]	Pd [mV]	TEER [Ω]	Pd [mV]	TEER [Ω]
pred začetkom	-1,0	33	-3,2	52	-1,5	34	-1,0	28	-3,1	53	-3,6	63	-1,0	33	-2,2	62
začetek	-1,1	33	-1,8	42	-1,4	39	-1,4	32	-3,0	65	-3,9	72	-0,7	29	-3,4	66
konec	-1,0	22	-0,4	30	-1,3	18	0,0	10	-0,8	30	-1,6	41	0,0	9	-0,2	25
glukoza	-2,5	22	-0,5	31	-2,7	19	-0,1	9	-0,9	19	-1,7	41	-0,1	9	-0,3	25
asimetrija	0,0		0,1		-0,2		-0,9		0,8		0,6		0,2		0,1	

Na podlagi kriterijev za ocenjevanje vitalnosti smo ugotovili:

- vse tkiva v celicah so preživela postopek priprave tkiva za poskus;
- tkivi v celicah 4 in 7 ob koncu poskusa nista bili vitalni, zato ju v končnih rezultatih nismo upoštevali;
- tkiva v celicah 2, 5, 6 in 8 smo kljub slabi odzivnosti na glukozo ob koncu poskusa upoštevali v končnih rezultatih

10.9 Poskus 9: LY in 10 % Cymal-7 in 3 % TMC

Poskus smo izvedli po postopku opisanem v poglavju Materiali in metode.

Rezultati so zbrani v Preglednicah XXX in XXXI.

Preglednica XXX: Izračun navideznih permeabilnostnih koeficientov za LY

	CYMAL 10 %			TMC 3 %			LY	
	celica 2	celica 4	celica 7	celica 3	celica 5	celica 8	celica 1	celica 6
kd [mol/h]	4,12E-10	3,56E-10	4,54E-10	2,59E-10	1,85E-10	2,52E-10	4,36E-10	4,22E-10
J [nmol/hcm ²]	4,12E-01	3,56E-01	4,54E-01	2,59E-01	1,85E-01	2,52E-01	4,36E-01	4,22E-01
P _{app} [cm/s]	1,37E-05	1,15E-05	1,23E-05	6,27E-06	4,51E-06	5,99E-06	1,13E-05	9,33E-06

Preglednica XXXI: Elektrofiziološki parametri

	celica 1		celica 2		celica 3		celica 4		celica 5		celica 6		celica 7		celica 8	
	Pd [mV]	TEER [Ω]	Pd [mV]	TEER [Ω]	Pd [mV]	TEER [Ω]	Pd [mV]	TEER [Ω]	Pd [mV]	TEER [Ω]	Pd [mV]	TEER [Ω]	Pd [mV]	TEER [Ω]	Pd [mV]	TEER [Ω]
pred začetkom	-1,1	35	-0,6	36	-0,4	27	-1,6	/	-2,2	27	-1,4	47	-1,3	41	-2,0	37
začetek	-0,7	34	-0,5	37	1,3	27	-1,4	/	0,2	42	-0,9	16	-1,0	44	0,4	32
konec	-0,5	13	34,3	36	1,9	2	62,3	44	0,6	27	-0,2	10	0,0	14	2,7	10
glukoza	-0,5	17	34,8	33	1,9	3	63,1	41	0,8	34	-0,2	26	-0,1	15	2,7	11
asimetrija	-0,1		36,1		-0,2		-64,7		0,1		-0,1		0,3		-0,2	

Na podlagi kriterijev za ocenjevanje vitalnosti smo ugotovili:

- tkivi v celicah 2 in 3 nista preživeli postopka priprave tkiva za poskus in ju zato v končnih rezultatih nismo upoštevali;
- tkiva v celici 4 v končnih rezultatih nismo upoštevali, saj zaradi nestabilnih elektrod v celici nismo mogli oceniti njegove vitalnosti;
- tkiva v celicah 1, 5, 6, 7 in 8 ob koncu poskusa niso bila vitalna, zato jih v končnih rezultatih nismo upoštevali.

10.10 Poskus 10: LY in 0,3 % TMC

Poskus smo izvedli po postopku opisanem v poglavju Materiali in metode.

Rezultati so zbrani v Preglednicah XXXII in XXXIII.

Preglednica XXXII: Izračun navideznih permeabilnostnih koeficientov za LY

	0,3 % TMC					LY			
	celica 1	celica 2	celica 3	celica 5	celica 7	celica 4	celica 6	celica 8	
kd [mol/h]	5,46E-10	2,80E-10	3,00E-10	4,92E-10	4,35E-10	5,82E-10	2,89E-10	3,46E-10	
J [nmol/hcm ²]	5,46E-01	2,80E-01	3,00E-01	4,92E-01	4,35E-01	5,82E-01	2,89E-01	3,46E-01	
P _{app} [cm/s]	8,87E-06	4,22E-06	4,60E-06	7,67E-06	7,29E-06	9,36E-06	5,05E-06	4,82E-06	

Preglednica XXXIII: Elektrofiziološki parametri

	celica 1		celica 2		celica 3		celica 4		celica 5		celica 6		celica 7		celica 8	
	Pd [mV]	TEER [Ω]	Pd [mV]	TEER [Ω]	Pd [mV]	TEER [Ω]	Pd [mV]	TEER [Ω]	Pd [mV]	TEER [Ω]	Pd [mV]	TEER [Ω]	Pd [mV]	TEER [Ω]	Pd [mV]	TEER [Ω]
pred začetkom	-2,3	62	-1,6	35	-2,8	44	-2,5	65	-1,9	47	-3,8	45	-2,0	38	-4,6	52
začetek	-1,6	50	-1,5	34	-2,1	42	-1,8	61	-1,1	44	-4,8	51	-1,3	40	-4,7	62
konec	-0,3	15	-0,6	17	-0,4	14	0,5	19	0,1	4	-1,5	23	-0,5	18	-3,3	34
glukoza	-0,4	18	-1,4	17	-0,7	14	0,4	21	0,1	5	-3,9	20	-0,8	18	-4,3	31
asimetrija	-0,4		0,3		-0,1		0,5		0,0		0,0		0,3		-0,3	

Na podlagi kriterijev za ocenjevanje vitalnosti smo ugotovili:

- vse tkiva v celicah so preživela postopek priprave tkiva za poskus;
- tkiva v celicah 1, 4 in 5 ob koncu poskusa niso bila vitalna, zato jih v končnih rezultatih nismo upoštevali.

10.11 Poskus 11: LY in 0,03 % TMC

Poskus smo izvedli po postopku opisanem v poglavju Materiali in metode.

Rezultati so zbrani v Preglednicah XXXIV in XXXV.

Preglednica XXXIV: Izračun navideznih permeabilnostnih koeficientov za LY

	0,03 % TMC					LY		
	celica 2	celica 3	celica 4	celica 6	celica 7	celica 1	celica 5	celica 8
kd [mol/h]	2,59E-10	3,59E-10	5,53E-10	4,47E-10	6,43E-10	4,00E-10	4,42E-10	4,46E-10
J [nmol/hcm ²]	2,59E-01	3,59E-01	5,53E-01	4,47E-01	6,43E-01	4,00E-01	4,42E-01	4,46E-01
P _{app} [cm/s]	5,16E-06	8,99E-06	1,57E-05	1,11E-05	1,24E-05	9,91E-06	1,17E-05	8,82E-06

Preglednica XXXV: Elektrofiziološki parametri

	celica 1		celica 2		celica 3		celica 4		celica 5		celica 6		celica 7		celica 8	
	Pd [mV]	TEER [Ω]	Pd [mV]	TEER [Ω]	Pd [mV]	TEER [Ω]	Pd [mV]	TEER [Ω]	Pd [mV]	TEER [Ω]	Pd [mV]	TEER [Ω]	Pd [mV]	TEER [Ω]	Pd [mV]	TEER [Ω]
pred začetkom	-1,3	34	-3,5	59	-0,8	36	-0,8	40	-1,1	49	-1,0	42	-0,8	33	-0,7	47
začetek	-2,0	34	-4,0	59	-0,6	36	-0,2	40	-0,7	49	-0,5	42	-0,3	32	-0,2	42
konec	-0,5	18	-1,2	21	-1,1	22	0,2	13	0,1	12	0,1	16	0,1	5	0,4	5
glukoza	-0,9	18	-1,5	21	-2,1	21	0,2	14	0,2	15	0,1	16	0,1	6	0,3	6
asimetrija	-0,5		-0,7		0,0		0,1		0,5		0,6		0,3		-0,3	

Na podlagi kriterijev za ocenjevanje vitalnosti smo ugotovili:

- tkivo v celici 8 ni preživelo postopka priprave tkiva za poskus in ga zato v končnih rezultatih nismo upoštevali;

- tkiva v celicah 4, 5, 6 in 7 ob koncu poskusa niso bila vitalna, zato jih v končnih rezultatih nismo upoštevali.

10.12 Poskus 12: LY in 0,03 % TMC

Poskus smo izvedli po postopku opisanem v poglavju Materiali in metode.

Rezultati so zbrani v Preglednicah XXXVI in XXXVII.

Preglednica XXXVI: Izračun navideznih permeabilnostnih koeficientov za LY

	0,03 % TMC					LY		
	celica 1	celica 3	celica 5	celica 6	celica 8	celica 2	celica 4	celica 7
kd [mol/h]	3,78E-10	4,27E-10	3,69E-10	4,49E-10	5,78E-10	3,51E-10	4,82E-10	6,10E-10
J [nmol/hcm ²]	3,78E-01	4,27E-01	3,69E-01	4,49E-01	5,78E-01	3,51E-01	4,82E-01	6,10E-01
P _{app} [cm/s]	8,92E-06	1,03E-05	8,53E-06	1,04E-05	1,42E-05	7,55E-06	9,45E-06	1,33E-05

Preglednica XXXVII: Elektrofiziološki parametri

	celica 1		celica 2		celica 3		celica 4		celica 5		celica 6		celica 7		celica 8	
	Pd [mV]	TEER [Ω]	Pd [mV]	TEER [Ω]	Pd [mV]	TEER [Ω]	Pd [mV]	TEER [Ω]	Pd [mV]	TEER [Ω]	Pd [mV]	TEER [Ω]	Pd [mV]	TEER [Ω]	Pd [mV]	TEER [Ω]
pred začetkom	0,0	59	-2,8	44	-1,1	46	-1,1	42	0,9	48	-1,6	50	-0,6	48	-0,1	27
začetek	0,2	53	-3,2	55	-0,7	44	-0,6	50	1,7	51	-1,0	42	-0,5	60	-0,2	33
konec	1,3	19	-1,7	29	-0,5	11	0,4	13	6,0	15	-0,4	15	-0,1	20	0,1	9
glukoza	1,4	19	-3,7	29	-0,8	10	0,4	14	6,0	15	-1,0	15	-0,1	22	0,1	9
asimetrija	1,6		-0,1		-0,3		-0,6		6,6		0,4		-0,2		0,2	

Na podlagi kriterijev za ocenjevanje vitalnosti smo ugotovili:

- tkiva v celicah 1, 5, 7 in 8 niso preživela postopka priprave tkiva za poskus in jih zato v končnih rezultatih nismo upoštevali;
- tkivo v celici 4 ob koncu poskusa ni bilo vitalno, zato ga v končnih rezultatih nismo upoštevali.

10.13 Poskus 13: LY in 0,3 % TMC

Poskus smo izvedli po postopku opisanem v poglavju Materiali in metode.

Rezultati so zbrani v Preglednicah XXXVIII in XXXIX.

Preglednica XXXVIII: Izračun navideznih permeabilnostnih koeficientov za LY

	0,3 % TMC					LY		
	celica 1	celica 2	celica 4	celica 5	celica 6	celica 3	celica 7	celica 8
kd [mol/h]	2,47E-10	1,25E-10	2,82E-10	2,82E-10	3,89E-10	4,30E-10	5,36E-10	3,28E-10
J [nmol/hcm ²]	2,47E-01	1,25E-01	2,82E-01	2,82E-01	3,89E-01	4,30E-01	5,36E-01	3,28E-01
P _{app} [cm/s]	6,70E-06	3,60E-06	8,08E-06	8,48E-06	1,12E-05	1,00E-05	1,03E-05	5,83E-06

Preglednica XXXIX: Elektrofiziološki parametri

	celica 1		celica 2		celica 3		celica 4		celica 5		celica 6		celica 7		celica 8	
	Pd [mV]	TEER [Ω]	Pd [mV]	TEER [Ω]	Pd [mV]	TEER [Ω]	Pd [mV]	TEER [Ω]	Pd [mV]	TEER [Ω]	Pd [mV]	TEER [Ω]	Pd [mV]	TEER [Ω]	Pd [mV]	TEER [Ω]
pred začetkom	-0,8	30	-1,2	35	-1,1	29	-0,2	37	-0,4	31	-0,1	1	-0,8	41	-0,8	39
začetek	-0,8	41	-0,3	35	-1,0	37	0,3	37	0,0	31	0,4	1	-0,8	47	-0,8	44
konec	0,2	17	-0,2	22	-1,1	17	1,9	16	0,6	8	0,1	1	-0,4	21	-0,6	15
glukoza	0,0	13	-0,3	25	-2,2	11	1,9	16	0,5	9	0,1	1	-0,4	21	-0,7	15
asimetrija	0,7		-0,6		0,4		1,6		0,2		-0,1		-0,1		0,0	

Na podlagi kriterijev za ocenjevanje vitalnosti smo ugotovili:

- tkiva v celicah 4, 5 in 6 niso preživela postopka priprave tkiva za poskus in jih zato v končnih rezultatih nismo upoštevali;
- tkiva v celicah 2, 7 in 8 ob koncu poskusa niso bila vitalna, zato jih v končnih rezultatih nismo upoštevali.

10.14 Poskus 14: LY in FITC-dekstran

Poskus smo izvedli po postopku opisanem v poglavju Materiali in metode.

Rezultati so zbrani v Preglednicah XL in XLI.

Preglednica XL: Izračun navideznih permeabilnostnih koeficientov za LY in FITC-dekstran

	LY				FITC-dekstran			
	celica 2	celica 4	celica 5	celica 8	celica 1	celica 3	celica 6	celica 7
kd [mol/h]	4,20E-10	4,07E-10	5,20E-10	7,39E-10	2,01E-06	1,52E-06	2,05E-06	2,43E-06
J [nmol/hcm ²]	4,20E-01	4,07E-01	5,20E-01	7,39E-01	2,01E+03	1,52E+03	2,05E+03	2,43E+03
P _{app} [cm/s]	8,13E-06	7,50E-06	1,14E-05	1,30E-05	3,46E-06	3,23E-06	3,66E-06	4,48E-06

Preglednica XLI: Elektrofiziološki parametri

	celica 1		celica 2		celica 3		celica 4		celica 5		celica 6		celica 7		celica 8	
	Pd [mV]	TEER [Ω]	Pd [mV]	TEER [Ω]	Pd [mV]	TEER [Ω]	Pd [mV]	TEER [Ω]	Pd [mV]	TEER [Ω]	Pd [mV]	TEER [Ω]	Pd [mV]	TEER [Ω]	Pd [mV]	TEER [Ω]
pred začetkom	-1,4	42	-1,2	21	-0,8	34	-1,4	24	-0,5	24	-0,9	34	-0,6	33	-0,6	29
začetek	-0,8	42	-1,8	23	-0,8	33	-2,1	26	-0,5	29	-0,7	33	-0,5	38	-0,6	29
konec	0,0	11	-1,4	16	-0,4	12	-0,8	14	0,0	8	-0,8	10	-0,3	7	0,3	6
glukoza	0,0	13	-3,2	16	-0,5	13	-1,7	14	-0,2	11	-0,8	15	-0,3	7	0,2	6
asimetrija	0,0		0,0		-0,2		0,5		0,1		0,0		0,2		0,2	

Na podlagi kriterijev za ocenjevanje vitalnosti smo ugotovili:

- tkiva v celicah 5, 7 in 8 niso preživela postopka priprave tkiva za poskus in jih zato v končnih rezultatih nismo upoštevali;
- tkiva v celicah 1, 3 in 6 ob koncu poskusa niso bila vitalna, zato jih v končnih rezultatih nismo upoštevali.

10.15 Poskus 15: FITC-dekstran - M \rightarrow S in S \rightarrow M

Poskus smo izvedli po postopku opisanem v poglavju Materiali in metode.

Rezultati so zbrani v Preglednicah XLII in XLIII.

Preglednica XLII: Izračun navideznih permeabilnostnih koeficientov za FITC-dekstran

	FITC-dekstran - S \rightarrow M				FITC-dekstran - M \rightarrow S			
	celica 1	celica 2	celica 3	celica 4	celica 5	celica 6	celica 7	celica 8
kd [mol/h]	6,60E+03	4,18E+03	6,02E+03	5,16E+03	6,74E+03	6,42E+03	7,40E+03	7,25E+03
J [nmol/hcm ²]	6,60E+12	4,18E+12	6,02E+12	5,16E+12	6,74E+12	6,42E+12	7,40E+12	7,25E+12
P _{app} [cm/s]	2,40E-06	1,41E-06	2,18E-06	1,83E-06	1,74E-06	1,81E-06	1,87E-06	2,02E-06

Preglednica XLIII: Elektrofiziološki parametri

	celica 1		celica 2		celica 3		celica 4		celica 5		celica 6		celica 7		celica 8	
	Pd [mV]	TEER [Ω]	Pd [mV]	TEER [Ω]	Pd [mV]	TEER [Ω]	Pd [mV]	TEER [Ω]	Pd [mV]	TEER [Ω]	Pd [mV]	TEER [Ω]	Pd [mV]	TEER [Ω]	Pd [mV]	TEER [Ω]
pred začetkom	-2,6	20	-3,3	36	-1,8	33	-2,3	43	-6,3	41	-1,7	34	-1,9	45	-2,7	27
začetek	-2,4	21	-3,2	38	-2,0	33	-2,5	47	-7,0	49	-2,3	41	-2,2	48	-2,8	34
konec	-2,3	15	-2,8	12	-2,3	30	-1,9	33	-3,6	31	-1,7	22	-1,8	32	-0,7	19
glukoza	-6,0	12	-7,4	13	-5,0	18	-5,0	29	-6,8	27	-4,0	22	-3,5	27	-1,2	17
asimetrija	-0,2		-0,2		-0,4		0,0		-0,9		0,0		0,1		0,3	

Na podlagi kriterijev za ocenjevanje vitalnosti smo ugotovili:

- vse tkiva v celicah so preživela postopek priprave tkiva za poskus;
- vsa tkiva v celicah ob koncu poskusa so bila vitalna.

10.16 Poskus 16: FITC-dekstran in 0,3 % CYMAL-7

Poskus smo izvedli po postopku opisanem v poglavju Materiali in metode.

Rezultati so zbrani v Preglednicah XLIV in XLV.

Preglednica XLIV: Izračun navideznih permeabilnostnih koeficientov za FITC-dekstran

	FITC-dekstran			FITC-dekstran+ 0,3 % Cymal-7				
	celica 2	celica 5	celica 6	celica 1	celica 3	celica 4	celica 7	celica 8
kd [mol/h]	1,37E-06	1,83E-06	3,85E-06	1,69E-06	2,09E-06	1,44E-06	1,23E-06	1,74E-06
J [nmol/hcm ²]	1,37E+03	1,83E+03	3,85E+03	1,69E+03	2,09E+03	1,44E+03	1,23E+03	1,74E+03
P _{app} [cm/s]	2,78E-06	3,02E-06	5,88E-06	4,60E-06	4,69E-06	3,22E-06	3,66E-06	4,82E-06

Preglednica XLV: Elektrofiziološki parametri

	celica 1		celica 2		celica 3		celica 4		celica 5		celica 6		celica 7		celica 8	
	Pd [mV]	TEER [Ω]	Pd [mV]	TEER [Ω]	Pd [mV]	TEER [Ω]	Pd [mV]	TEER [Ω]	Pd [mV]	TEER [Ω]	Pd [mV]	TEER [Ω]	Pd [mV]	TEER [Ω]	Pd [mV]	TEER [Ω]
pred začetkom	1,1	34	-1,1	29	-3,7	32	-1,2	19	-1,2	30	-0,1	18	-3,4	30	-4,2	30
začetek	0,6	34	-0,2	29	-3,2	32	-1,2	27	-1,5	26	-0,4	18	-4,1	37	-4,3	37
konec	1,7	34	-0,2	14	-2	17	-0,3	13	-1,2	16	0,8	6	-2,5	35	-3,4	12
glukoza	1,7	38	-0,4	13	-2,4	17	-0,3	11	-3,1	15	0,7	6	-2,7	29	-3,6	13
asimetrija	1,8		0,1		0,4		-0,1		0,7		1,2		-1,8		-2,9	

Na podlagi kriterijev za ocenjevanje vitalnosti smo ugotovili:

- tkivi celicah 1 in 6 nista preživeli postopka priprave tkiva za poskus in ju zato v končnih rezultatih nismo upoštevali;
- tkivi v celicah 2 in 4 ob koncu poskusa nista bili vitalni, zato ju v končnih rezultatih nismo upoštevali.

10.17 Poskus 17: FITC-dekstran in 0,3 % TMC

Poskus smo izvedli po postopku opisanem v poglavju Materiali in metode.

Rezultati so zbrani v Preglednicah XLVI in XLVII.

Preglednica XLVI: Izračun navideznih permeabilnostnih koeficientov za FITC-dekstran

	FITC-dekstran + 0,3 % TMC							
	celica 1	celica 2	celica 3	celica 4	celica 5	celica 6	celica 7	celica 8
kd [mol/h]	8,09E-07	9,18E-07	9,41E-07	8,82E-07	9,02E-07	7,45E-07	7,04E-07	1,90E-06
J [nmol/hcm ²]	8,09E+02	9,18E+02	9,41E+02	8,82E+02	9,02E+02	7,45E+02	7,04E+02	1,90E+03
P _{app} [cm/s]	2,13E-06	2,07E-06	2,25E-06	2,47E-06	2,28E-06	1,75E-06	1,82E-06	4,37E-06

Preglednica XLVII: Elektrofiziološki parametri

	celica 1		celica 2		celica 3		celica 4		celica 5		celica 6		celica 7		celica 8	
	Pd [mV]	TEER [Ω]	Pd [mV]	TEER [Ω]	Pd [mV]	TEER [Ω]	Pd [mV]	TEER [Ω]	Pd [mV]	TEER [Ω]	Pd [mV]	TEER [Ω]	Pd [mV]	TEER [Ω]	Pd [mV]	TEER [Ω]
pred začetkom	-2,6	34	-3,9	38	-2,2	28	-1,7	20	-2	32	-2,1	26	-3,7	43	-3	42
začetek	-2,1	38	-3,4	44	-2,5	36	-2,4	30	-2,3	37	-2	33	-3,2	48	-2,6	50
konec	-1,2	24	-1,7	21	-1	17	0,1	9	-0,5	17	-0,9	21	-1,4	28	0,8	8
glukoza	-2,1	24	-2,3	22	-1,9	19	-0,5	10	-1	22	-1,7	22	-1,9	31	0,7	27
asimetrija	0,4		0		0		0,5		-0,2		-0,2		-0,1		0	

Na podlagi kriterijev za ocenjevanje vitalnosti smo ugotovili:

- vse tkiva v celicah so preživela postopek priprave tkiva za poskus;
- tkivi v celicah 4 in 8 ob koncu poskusa nista bili vitalni, zato ju v končnih rezultatih nismo upoštevali.