

UNIVERZA V LJUBLJANI  
FAKULTETA ZA FARMACIJO

PETRA TURK

# **DIPLOMSKA NALOGA**

UNIVERZITETNI ŠTUDIJ FARMACIJE

Ljubljana, 2011

UNIVERZA V LJUBLJANI  
FAKULTETA ZA FARMACIJO

PETRA TURK

***IN VITRO* RAZISKAVE METABOLIZMA BISFENOLA A Z  
MIKROSOMI**

***IN VITRO* STUDIES OF BISPHENOL A METABOLISM WITH  
MICROSOMES**

Ljubljana, 2011

Diplomsko nalogo sem opravljala na Fakulteti za farmacijo, na Katedri za biofarmacijo in farmakokinetiko, pod mentorstvom doc. dr. Roberta Roškarja.

### **Zahvala**

Zahvaljujem se mentorju doc. dr. Robertu Roškarju, mag. farmacije, za pomoč pri izdelavi diplomske naloge ter še posebno Tini Trdan, mag. farmacije za res izdatno pomoč in ustrežljivost.

Prav tako bi se rada zahvalila družini, mojemu fantu, prijateljem in sošolkam za oporo, potrpežljivost in razumevanje, tako v času izvedbe diplomskega dela, kot tudi v celotnem času mojega študija.

### **Izjava**

Izjavljam, da sem diplomsko nalogo samostojno izdelala pod vodstvom mentorja doc. dr. Roberta Roškarja, mag. farmacije.

Petra Turk

Ljubljana, junij 2011

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

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

# KAZALO VSEBINE

<b>KAZALO VSEBINE .....</b>	<b>1</b>
<b>POVZETEK .....</b>	<b>3</b>
<b>SEZNAM OKRAJŠAV .....</b>	<b>4</b>
<b>1. UVOD .....</b>	<b>6</b>
1.1 HORMONSKI MOTILCI .....	6
1.2 BISFENOL A.....	8
• 1.2.1 Toksikologija .....	9
• 1.2.2 Farmakodinamika.....	10
• 1.2.4 Metabolizem in farmakokinetični profil .....	12
1.3 URIDINDIFOSFAT-GLUKURONIL-TRANSFERAZE (UGT).....	14
• 1.3.1 Nomenklatura UGT.....	15
• 1.3.2 Izražanje UGT.....	16
• 1.3.3 Podružina UGT1A.....	16
• 1.3.4 Polimorfizmi v genu za UGT1A1 .....	17
1.3.4.1 Gilbertov sindrom.....	18
1.4 FARMAKOKINETIKA IN ENCIMSKA KINETIKA.....	19
• 1.4.1 Kinetika enosubstratne encimsko katalizirane reakcije .....	19
1.4.1.1 Substratna inhibicija .....	21
• 1.4.2 Določevanje navideznih encimskih parametrov .....	23
• 1.4.3 Napovedovanje metaboličnega očistka .....	24
1.4.3.1 Farmakokinetični modeli .....	24
1.4.3.2 Intrinzični očistek.....	25
1.5 <i>IN VITRO</i> MODELI ZA PREISKOVANJE METABOLIZMA .....	25
• 1.5.1 Mikrosomi.....	26
<b>2. NAMEN DELA.....</b>	<b>29</b>

<b>3. MATERIALI IN METODE</b> .....	<b>30</b>
3.1 MATERIALI .....	30
3.2 METODE .....	31
• 3.2.1 Priprava BPAG in BPAG-d16 .....	31
3.2.1.1 Sinteza BPAG in BPAG-d16 .....	31
3.2.1.2 Določanje koncentracije BPAG in BPAG-d16 z $\beta$ -glukuronidazo .....	34
3.2.1.3 Preparativno čiščenje BPAG in BPAG-d16 .....	36
• 3.2.2 Časovno spremljanje nastajanja BPA-glukuronida v različnih organih .....	37
• 3.2.3 Kinetika nastajanja metabolitov BPA v različnih organih .....	39
• 3.2.4 Analitika .....	42
• 3.2.5 Obdelava podatkov .....	45
3.3 IZVEDBA POSKUSOV .....	47
<b>4. REZULTATI IN RAZPRAVA</b> .....	<b>49</b>
4.1 REZULTATI SINTEZE BPAG IN BPAG-D16 .....	49
4.2 REZULTATI SPREMLJANJA NASTAJANJA BPA-GLUKURONIDA V RAZLIČNIH ORGANIH .....	52
4.3 KINETIKA NASTAJANJA BPA-GLUKURONIDA V RAZLIČNIH ORGANIH .....	53
4.4 VPLIV POLIMORFIZMA <i>UGT1A1</i> *28 NA KINETIKO NASTAJANJA BPA-GLUKURONIDA Z MIKROSOMI, GENOTIPIZIRANIMI ZA TA ENCIM. ....	56
<b>5. SKLEPI</b> .....	<b>61</b>
<b>6. LITERATURA</b> .....	<b>62</b>

## POVZETEK

Bisfenol A (BPA) je zelo razširjena snov v okolju. Široko je uporabljan pri proizvodnji polikarbonatne plastike in epoksi smol in tudi kot stabilizator ali antioksidant pri proizvodnji polivinil-kloridne plastike. Ta plastika pa je glavni material za izdelavo plasten, embalaže za hrano in prevlek na notranji strani pločevink za hrano ter pijačo. Zaradi odpuščanja iz materialov in izpustov iz proizvodnih obratov se nahaja povsod v naravnem okolju, prav tako v izdelkih, s katerimi je v stiku. Ljudje in živali smo v neprestanem stiku z BPA. Ugotovili so, da že v zelo majhnih koncentracijah deluje kot hormonski motilec. Veže se na estrogenske receptorje v telesu. Povzroča motnje metabolizma in reprodukcije, obenem pa povečuje možnost nastanka motenj endokrinega sistema, tudi rakavih obolenj.

Namen diplomske naloge je bil ugotoviti, kateri so glavni organi odgovorni za metabolizem BPA (jetra, ledvice, tanko črevo, pljuča), opredeliti vrsto encimske kinetike UDP-glukuronil transferaz in izračunati intrinzični očistek posameznega organa. Znano je, da je glavni metabolit BPA glukuronid, zato smo se osredotočili samo na ta metabolit. Ko smo opredelili glavne organe, v katerih poteka glukuronidacija, smo ugotavljali, ali polimorfizem *UGT1A1*\*28 pomembno vpliva na hitrost metabolične inaktivacije BPA in s tem na detoksifikacijo BPA.

Najprej smo sintetizirali in okarakterizirali glukuronid BPA (BPAG) in glukuronid BPA-d16 (BPAG-d16), za potrebe kvantifikacije vzorcev z LC-MS/MS metodo. Sledili so poskusi z mikrosomi. BPA smo najprej inkubirali z mikrosomi različnih človeških organov in spremljali kinetiko nastajanja glukuronida. Nato pa smo z inkubacijo BPA z genotipiziranimi človeškimi jetrnimi mikrosomi ugotavljali, ali ima polimorfizem *UGT1A1*\*28 vpliv na glukuronidacijo BPA in posledično na izpostavljenost in toksičnost BPA. Z uporabo mikrosomov kot *in vitro* modela in nadaljnjega računanja intrinzičnega očistka ekstrapoliranega na organ, smo ugotovili, da imajo jetra največji prispevek k celokupnemu metaboličnemu očistku BPA. Metabolizem BPA poteka najhitreje v jetrnih mikrosomih, počasneje v ledvičnih mikrosomih in najpočasneje v črevesnih mikrosomih. Metabolizma v pljučih nismo zaznali. Z uporabo genotipiziranih jetrnih mikrosomov za polimorfizem *UGT1A1*\*28 smo ugotovili, da le ta pomembno vpliva na hitrost glukuronidiranja BPA z encimom UGT1A1, saj je intrinzični očistek pri genotipu *UGT1A1* \*28/\*28 značilno nižji kot pri genotipu *UGT1A1* \*1/\*1.

## SEZNAM OKRAJŠAV

Kratica	Pomen
BPA	bisfenol A
BPA-d16	bisfenol A-d16
BPAG	bisfenol A- glukuronid
BPAG-d16	bisfenol A-d16- glukuronid
BLR	bilirubin
Cl <sub>int</sub>	intrinzični očistek
Cl <sub>int,o</sub>	intrinzični očistek ekstrapoliran na celoten organ
Cl <sub>H</sub>	jetrni očistek
CYP450	naddružina citokromov P450
DDT	2,2-(-klorofenil)-1,1,1-trikloroetan
E	encim
E <sub>0</sub>	začetna koncentracija encima
ECD	motilci endokrinega sistema
EFSA	Evropska agencija za varnost hrane
EH	jetrna ekstrakcija
EMV	ang. <i>Electron multiplier voltage</i>
EPA	Ameriška agencija za zaščito okolja
ER $\alpha/\beta$	estrogenski receptor alfa, beta
ERE	na estrogen odzivni element
ERR $\alpha/\beta/\gamma$	estrogenskim receptorjem sorodni receptorji alfa, beta, gama
ERRE	estrogenskim receptorjem sorodni odzivni elementi
ESI	elektrozprševalna ionizacija (ang. <i>Electrospray ionization</i> )
ES	kompleks encima in substrata
FAO	Organizacija za prehrano in kmetijstvo pri Združenih narodih
FDA	Ameriški vladni urad za zdravila in prehrano
GS	Gilbertov sindrom
hER	gen za človeški receptor za estrogen
HLB	ang. <i>Hydrophilic-Lipophilic-Balanced</i>
HPLC	tekočinska kromatografija visoke ločljivosti
HPLC-ECD	tekočinska kromatografija visoke ločljivosti z elektrokemičnim detektorjem
HPLC-FLD	tekočinska kromatografija visoke ločljivosti s fluorescenčnim detektorjem
ICH	Mednarodna konferenca za harmonizacijo
IS	interni standard
K <sub>i</sub>	konstanata inhibicije
K <sub>m</sub>	Michaelis-Mentenova konstanta
LC-MS/MS	tekočinska kromatografija s tandemsko masno spektrometrijo
LOAEL	najnižja vrednost odmerka za opaženi neželeni učinek
MCF7	človeške rakave celice v prsih
MRP2/3	ang. <i>Multiple reaction monitoring</i>
MRM	ang. <i>multi-drug resistance protein 2/3</i>
MS	masna spektrometrija
PSB	poliklorirani bifenili
PBB	polibromirani bifenili
S	substrat
S <sub>0</sub>	začetna koncentracija substrata
SE	standardna napaka

SERM	selektivni modulator estrogenskih receptorjev
SML	meja specifične migracije
TDI	dovoljen dnevni vnos
TM	telesna masa
UDPGA	uridindifosfoglukuronska kislina
UGT	uridindifosfat-glukuronil-transferaza
$V_{max}$	maksimalna hitrost encimske reakcije
WHO	Svetovna zdravstvena organizacija



# 1.UVOD

## 1.1 HORMONSKI MOTILCI

Hormonske motilce ali motilce delovanja endokrinega sistema (EDCs ang. *Endocrine disrupting compounds*) je Agencija za varstvo okolja Združenih držav Amerike (EPA) definirala, kot eksogene agense, ki motijo sintezo, sproščanje, transport, metabolizem, vezavo, delovanje ali eliminacijo naravnih hormonov, ki so odgovorni za homeostazo, reprodukcijo in razvoj osebkov. Hormonski motilci torej spremenijo delovanje endokrinega oziroma hormonalnega sistema in so posledično zdravju škodljivi (1, 2).

Endokrini sistem je sistem žlez z notranjim izločanjem, ki izločajo hormone. Skupaj z živčnim in imunskim sistemom predstavlja glavni regulatorni mehanizem, ki nadzoruje različne ključne funkcije v telesu človeka in živali. Hormoni namreč vplivajo na rastne, razvojne, regulatorne in homeostatske mehanizme organizma, kot so razmnoževanje, vzdrževanje normalne koncentracije glukoze in ionov v krvi, krvni tlak. Ravnotežje hormonov v organizmu je nujno potrebno za preprečevanje funkcionalnih nepravilnosti. Endokrini sistem ima številne povratne mehanizme, ki uravnavajo spremembe v koncentraciji hormonov, vendar je tudi zelo občutljiv na zunanje vplive, ki škodujejo celotnemu razvoju organizma (1, 3, 4, 5).

Izpostavljenost hormonskim motilcem je povezana z disfunkcijo metabolizma, energijsko bilanco in razmnoževanjem, povečuje pa tudi tveganje za endokrine motnje in za nastanek raka. Te motnje se pojavijo zaradi epigenetskih sprememb, ki pa so posledica izpostavljenosti hormonskim motilcem v zgodnjem otroštvu ali celo v embrionalni fazi razvoja organizma. Takrat je osebek tudi najbolj občutljiv in dovzeten za te vplive - motnje pa se navadno izrazijo šele v odrasli dobi. V nekaterih primerih hormonski motilci vplivajo tudi na naslednje generacije, saj povzročijo večje možnosti za nastanek določenih motenj ali bolezni. Ključen je čas izpostavljenosti organizma, čeprav nobeno življenjsko obdobje ni imuno na vplive. Mnoge raziskave so pokazale povezavo med zgodnjo izpostavljenostjo hormonskim motilcem in poznejšim motnjam endokrinega sistema, kot je npr. rak, neplodnost, sladkorna bolezen tipa 2, debelost, boleznj ščitnice. Vplivi so lahko tudi življenjsko ogrožujoči in se kažejo lahko zelo drastično; s feminizacijo ribjih samcev, zgodnjo puberteto pri mladih dekletih, neplodnostjo (1, 2, 6). Kako visoke so koncentracije teh snovi v okolju priča podatek Ameriškega centra za kontrolo bolezni, kjer so pri testiranju preko 2000 posameznikov, kar v 90% zasledili

prisotnost ene izmed teh snovi, najpogosteje je šlo za BPA ali za polibromirane difenilne etre (7).

Skupina spojin, ki jih definiramo kot hormonski motilci je zelo heterogena - iz vidika uporabe, kemijske strukture in načinov vezave na receptor. Vsebuje sintezne kemikalije, ki se uporabljajo v industriji, kot so topila ali lubrikanti (poliklorirani bifenili, *ang. PCBs*; polibromirani bifenili, *ang. PBBs* in dioksini), snovi, ki so široko uporabljene v industriji in potrošni plastiki (BPA, ftalati), kemikalije, ki se uporabljajo pri proizvodnji rastlinske ali živalske hrane; pesticidi (metoksiklor; diklorodifeniltrikloroetan, *ang. DDT*), fungicidi (vinklozolin). Med njih pa uvrščamo tudi farmacevtske učinkovine (dietilstilbestrol, zdravila za zdravljenje raka). Tudi naravne spojine, ki jih najdemo v rastlinski in živalski hrani - fitoestrogeni, lahko delujejo kot hormonski motilci. Za fitoestrogene velja, da imajo zaščitni vpliv pri nastanku raka dojke s podaljšanjem menstrualnega ciklusa, ohranjajo kostno gostoto pri ženskah v menopavzi ter znižajo serumski holesterol in tako zmanjšajo možnost nastanka kardiovaskularnih obolenj. Problem nastane zaradi povečanega vnosa le teh s prehranskimi dopolnili in zaradi prisotnosti v hrani za dojenčke (1, 5, 8, 9, 10).

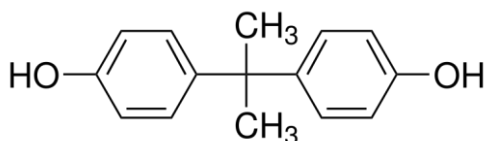
Hormonski motilci so prišli v okolje z odpadki, kontaminirano vodo, tako iz industrije, kot tudi iz gospodinjstev, s pesticidi in še prek mnogo drugih virov. Zaradi lipofilnosti in rezistence so nekatere od teh spojin sposobne bioakumulacije. Zanimivo je, da imajo vrste, ki so na vrhu prehranjevalne verige, npr. orli, polarni medvedi in tudi ljudje, najvišje koncentracije teh bioakumulativnih hormonskih motilcev v telesu (2).

Hormonski motilci se lahko vežejo na različne receptorje in imajo različne mehanizme delovanja. Vežejo se na receptorje steroidnih hormonov v jedru, med drugim estrogenske, androgenske, progestagenske, tiroidne, retinoidne (5). Najpogosteje se vežejo na estrogenske receptorje. Vemo, da sta sposobnost vezave na estrogenske receptorje in delovanje spojine odvisna od tega, kako uspešno posnemajo strukturo 17- $\beta$  estradiola, ki je najučinkovitejši naravni estrogen. Pogoj za interakcijo z estrogenskimi receptorji je prisotnost vsaj enega fenolnega obroča s prosto hidroksilno funkcionalno skupino. Na fenolni obroč mora biti vezana vsaj tri ogljikove atome dolga stranska veriga ali obroč. Jakost delovanja na estrogenskem receptorju je odvisna od dolžine in razvejanosti stranske verige. Učinke izkazujejo po različnih mehanizmih. Lahko se vežejo neposredno na hormonske receptorje, lahko pa posredno vplivajo na endokrini sistem na različnih ravneh. Pri neposredni vezavi na

hormonske receptorje lahko delujejo kot agonisti oz. antagonisti. Po vezavi na estrogenski receptor pride do konformacijske spremembe in nastali kompleks se pomakne v celično jedro, kjer interagira s celično DNA. Rezultat je indukcija ali inhibicija transkripcije DNA, ki regulira sintezo določenih proteinov. Posredni vpliv hormonskih motilcev na endokrini sistem pa je vpliv na samo koncentracijo hormonov v organizmu. Tako npr. indukcija encimov, ki jih uvrščamo v skupino citokromov P450, vpliva na ravnovesje hormonov. Ti encimi imajo ključno vlogo pri sintezi in razgradnji steroidnih hormonov (11).

## 1.2 BISFENOL A

BPA uvrščamo v skupino bisfenolov (2,2-bis(4-hidroksifenil)propan), glej sliko 1 (12).



Slika 1.: Kemijska struktura bisfenola A (13).

BPA je precej hidrofobna spojina (logP znaša 3,25), ki ima šibko kisle lastnosti (pKa znaša 9,7). V vodi je zelo težko topna (topnost v vodi je 89 mg/L) (14).

BPA so prvič sintetizirali leta 1891. Že v tridesetih letih prejšnjega stoletja so ga označili za sintetični estrogen. V petdesetih letih prejšnjega stoletja so ga začeli uporabljati za proizvodnjo polikarbonatne plastike (15). Vse do danes je BPA ena izmed najbolj proizvajanih kemikalij, preko 8 milijard ton se ga proizvede letno in več kot 100 ton ga je letno puščenega v atmosfero (16). BPA se uporablja za proizvodnjo epoksidnih, polikarbonatnih in poliester-stirenskih smol. Materiali proizvedeni iz BPA se uporabljajo v zobozdravstvu, v proizvodnji: posod za hrano in pijačo, stekleničk za dojenčke, polivinil-kloridnih raztegljivih filmov, papirja in kartona, CD-jih, DVD-jih (12, 15, 16, 17, 18, 19). BPA prehaja iz teh materialov že ob nepopolni polimerizaciji; med proizvodnjo se namreč ves BPA ne vključi v strukturo s kemijskimi vezmi, del ostaja prost in lahko prehaja iz materiala. Pri povišani temperaturi, v kisljih ali bazičnih pogojih pa pride do povečanega sproščanja BPA. BPA so odkrili v različnih

vzorcih. Odkrili so ga v vodi, kanalizaciji, v zraku in v prašnih delcih. Sledove BPA so našli tudi v papirju in medicinski opremi. Pojavlja se tudi v različnih telesnih tekočinah, zlasti v urinu in krvi, med drugim pa tudi v plodovni vodi, placenti, krvi novorojenčkov, popkovnični krvi in v materinem mleku (15, 16). Njegova zelo razširjena prisotnost vzbuja skrb predvsem zaradi dokazane estrogenske aktivnosti.

- **1.2.1 Toksikologija**

BPA se ne obnaša kot tradicionalen toksin, saj zanj ne velja običajno pravilo večji odmerek, večji neželeni učinek. BPA kaže estrogensko aktivnost že v zelo nizkih koncentracijah, že pri 1ng/L (delček na trillion ang. *ppt*) (20). V osemdesetih letih prejšnjega stoletja je bila določena najnižja koncentracija substance pri kateri opazimo neželene učinke (ang. LOAEL- *Lowest observed adverse effect level*). Znaša 50 mg/kg<sup>TM</sup>/dan, torej 50 mg na kg telesne mase na dan, Agencija za varstvo okolja Združenih držav Amerike (EPA) pa je določila dovoljeno dnevno količino (TDI) BPA (ang. *Acceptable dose oz. Reference dose*), ki znaša 50 µg/kg<sup>TM</sup>/dan. Od takrat se je pojavilo že veliko dokazov, da so odmerki, ki vplivajo na endokrini sistem še veliko manjši (15, 16). Evropska komisija je v letu 2004 določila vrednost za mejo specifične migracije (SML ang. *Specific migration limit*) za vsebnike, ki so v neposrednem stiku s hrano, 600 ng/g (14). Smrtni odmerek je tudi relativno visok, pri podganah znaša 4,24 g/kg pri miših pa 2,5 g/kg. Torej akutna toksičnost ni ravno visoka (21). Na seji Organizacije Združenih narodov za prehrano in kmetijstvo (FAO) in Svetovne zdravstvene organizacije (WHO) novembra 2010 so ocenjevali toksikološko in zdravstveno tveganje BPA. Želeli so določiti našo dnevno izpostavljenost BPA s hrano in pijačo. Na osnovi najbolj zanesljivih objavljenih ocen izpostavljenosti BPA so zaključili, da povprečni dnevni vnos BPA s hrano in pijačo pri odraslih znaša od 0,01 do 0,40 µg/kg<sup>TM</sup> in pri otrocih ter najstnikih od 0,1 do 0,5 µg/kg<sup>TM</sup> (22). Mnenja glede toksičnosti majhnih odmerkov BPA pa so še vedno deljena. Kanadska vladna organizacija, ki je odgovorna za zdravje ljudi – Health Canada je leta 2008 BPA označila za nevarno substanco in prepovedala uporabo otroških stekleničk, ki vsebujejo BPA. V nasprotju pa ameriška vladna agencija Food and Drug Administration (FDA) in Evropska agencija za varnost European Safety Agency (EFSA), ki sta odgovorni za varnost hrane tega nista storili (23). 28. januarja 2011 je Evropska

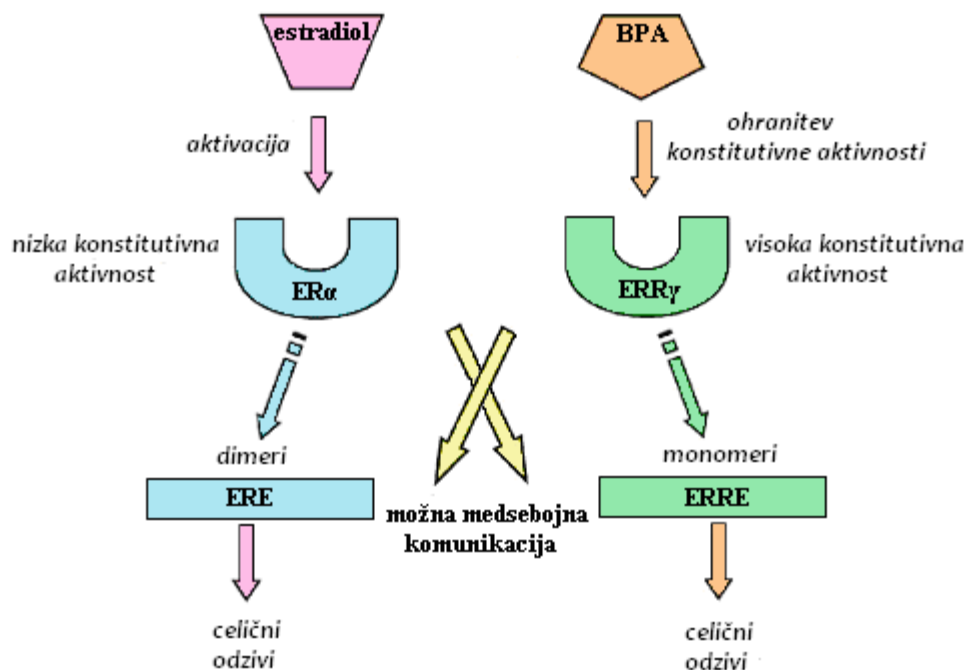
komisija sprejela spremembo *Direktive 2002/72/ES glede omejitve uporabe bisfenola A v plastičnih stekleničkah za dojenčke*. Tako bo po novem tudi na območju Evropske Unije začela veljati prepoved uporabe plastičnih stekleničk, ki vsebujejo BPA, pri dojenčkih. Konkretno v Sloveniji to pomeni, da od marca 2011 BPA ni več dovoljen pri proizvodnji stekleničk za dojenčke, od junija 2011 stekleničk z BPA ni dovoljeno več niti prodajati (24, 25).

BPA so uspeli povezati že z zelo različnimi tipi boleznimi. Povezujejo ga s kardiovaskularnimi boleznimi, debelostjo, sladkorno boleznijo, različnimi oblikami raka (predvsem na prostati in prsah), neplodnostjo, hiperaktivnostjo pri otrocih in tudi z različnimi nevrološkimimi boleznimi. BPA predstavlja veliko grožnjo za splošno zdravje ljudi (16, 26). Največjo grožnjo predstavlja že zelo zgodnja izpostavljenost organizma vplivom BPA. Tu mislimo predvsem izpostavljenost zarodkov, novorojenčkov in dojenčkov, razvijajoči organi in možgani so namreč v zgodnji fazi življenja najbolj občutljivi (16). BPA stimulira celično proliferacijo (MCF-7) človeških rakavih celicah v prsah in inducira sintezo progesteronskih receptorjev v MCF-7 in v endometrijskih rakavih celicah. Pri miših so v *in vivo* študijah dokazali zmanjšanje dnevne produkcije sperme in s tem tudi zmanjšano plodnost (17, 21, 27, 28).

### • 1.2.2 Farmakodinamika

O estrogenskih učinkih BPA so prvič poročali leta 1993. Jakost delovanja je 10000 do 100000-krat nižja kot v primeru 17- $\beta$  estradiola, zaradi česar so določili, da v okolju deluje šibko estrogensko (14). Ugotovili so, da se veže na dva podtipa estrogenskih receptorjev, ER $\alpha$  in ER $\beta$ , vendar je afiniteta do ER $\beta$  približno 10-krat večja. Do nedavnega so ga šteli med šibke zunanje estrogene, zaradi relativno nizke afinitete receptorja v jedru - v primerjavi z estradiolom. Študije v zadnjih letih pa so pokazale, da BPA lahko stimulira hitre celične odgovore pri zelo nizkih koncentracijah. Te koncentracije so nižje od tistih pri katerih pričakujemo vezavo BPA na receptorje v jedru. BPA je sposoben tudi vezave na receptor na celični membrani in lahko sproži ne-genomske steroidne reakcije z enako jakostjo, kot estradiol (16). Številne študije dokazujejo udeležnost BPA v kompleksnih biokemijskih in molekularnih interakcijah, ki vključujejo klasične ER in tudi mnogo drugih receptorskih sistemov in molekularnih tarč (22). BPA je endokrini motilec s šibko estrogensko aktivnostjo

in selektivni modulator estrogenskih receptorjev (*ang. selective estrogen receptor modulator, SERM*) s tkivno specifičnimi učinki (30). Poleg vezave na estrogenske receptorje (agonist) je BPA sposoben vezave tudi na androgenske receptorje, na katere deluje kot antagonist. Te ugotovitve so nakazale, da se je BPA verjetno sposoben vezati še na kakšen drug tip receptorjev. V zadnjih letih so to potrdili in ugotovili, da se BPA močno veže na receptorje, imenovane estrogenskim receptorjem sorodni receptorji  $\gamma$  (*ang. estrogen-related receptor  $\gamma$ , ERR $\gamma$* ). Nanje se BPA veže s kar 80 do 100-krat večjo afiniteto kot na ER. Družino estrogenskim receptorjem sorodni receptorji delimo na tri podtipe, in sicer: ERR $\alpha$  in ERR $\beta$  in ERR $\gamma$ . To so jedrni receptorji sirote, ki so strukturno in funkcionalno zelo podobni estrogenskim receptorjem. Njihov naravni ligand še ni poznan. Vežejo se lahko na ERE (*ang. estrogen responsive element*), nastali kompleks aktivira na estrogen odzivne elemente DNA. Vežejo pa se tudi na ERR odzivne elemente. Po tej vezavi dobimo komplekse ERRE (*ang. estrogen-related receptor responsive element*). ERR $\gamma$  so med razvojem zarodkov prisotni v možganih in posteljici sesalcev, pri odraslih pa v možganih, pljučih in v ostalih tkivih. Delujejo kot konstitutivni aktivatorji transkripcije z vlogo diferenciacije in zorenja fetalnih možganov. Konstitutivna aktivnost ERR $\gamma$  (sposobnost receptorja, da sproži biološki odziv v odsotnosti liganda) je zelo visoka in sicer kar 25-krat večja od konstitutivne aktivnosti ER $\alpha$ . Vezava BPA na ERR $\gamma$  daje dobro korelacijo med odmerkom in učinkom, vendar se po vezavi ne spremeni konstitutivna energija receptorja. Estrogensko aktivnost BPA si zato lahko razložimo na dva načina. Prvi predvideva, da vezava BPA na ERR $\gamma$  upočasni metabolizem ERR $\gamma$  in tako podaljša njegovo transkripcijsko aktivnost. Drugi mehanizem pa upošteva komunikacijo med ERR $\gamma$  in ER $\alpha$  sistemom: BPA se veže na ERR $\gamma$  in nastali kompleks v monomerni obliki interagira z ERRE in sproži celični odziv, ki pa ni večji kot v odsotnosti BPA. Prav tako se lahko kompleks v dimerni obliki veže na ERE, kjer interagira z dimernim kompleksom estradiol-ER $\alpha$ , pri čemer nastali heterodimeri med sabo interferirajo in tako regulirajo (povečajo) celokupni estrogenski odziv (slika 2) (28).

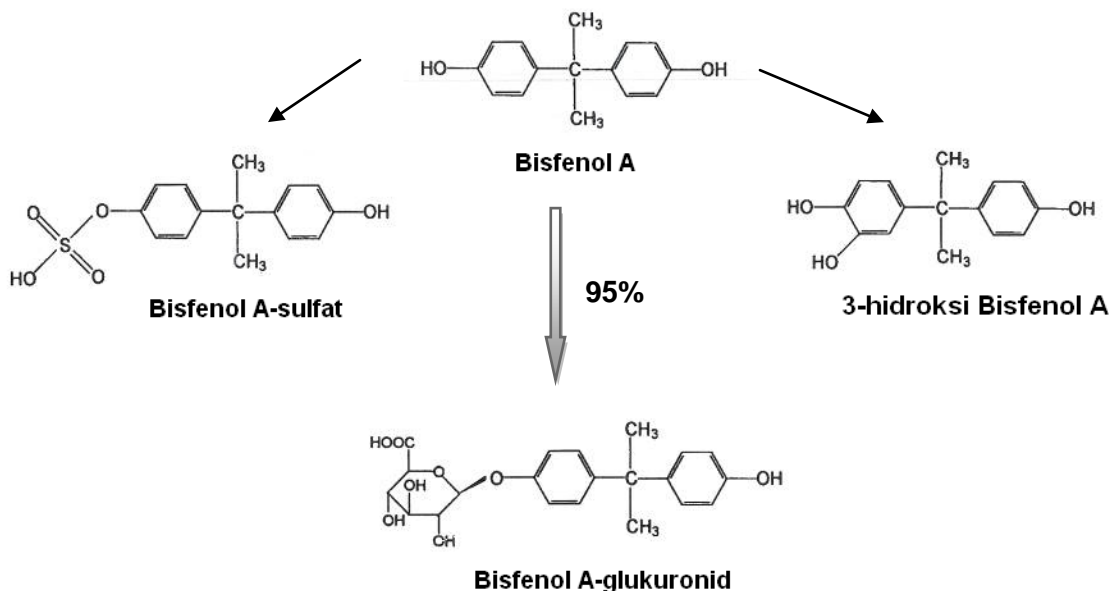


Slika 2: Eden izmed predvidenih mehanizmov estrogenskega delovanja BPA.

#### • 1.2.4 Metabolizem in farmakokinetični profil

Absorpcija, distribucija, metabolizem, eliminacija in nadalje tudi toksičnost BPA so odvisni od načina aplikacije. Že leta 1966 so prvič poročali, da je glavni metabolit BPA v urinu pri podganah glukuronid. Po peroralni aplikaciji se skoraj ves BPA glukuronidira do monoglukuronida (>95%), in sicer pretežno v jetrih in prebavilih. BPA-monoglukuronid nima več estrogenske aktivnosti, izloča pa se pretežno z urinom in fecesom pri podganah in z urinom pri ljudeh. Njegova razpolovna doba je približno 4 ure. Čeprav imajo podganji mladički takoj po rojstvu manj encimov za glukuronidacijo, so tudi pri njih našli več kot 99% BPA v obliki glukuronida. Tudi pri prezgodaj rojenih mladičkih so opazili več kot 90% BPA v obliki glukuronida. Pri brejih podganah pa so v fetusih našli neglukuronidiran BPA, kar pomeni, da imajo fetusi zmanjšano zmožnost glukuronidacije oziroma inaktivacije BPA. To obenem pomeni, da BPA lahko prehaja placento in tudi, da ima BPA v fetusih še ohranjeno estrogensko aktivnost. Biološka uporabnost je veliko večja pri parenteralnih aplikacijah (21, 30). Konjugacija z glukuronsko kislino v jetrih in učinkovit metabolizem prvega prehoda skoraj v celoti odstranita BPA iz krvi v urin. 24 ur po peroralnem zaužitju pride do popolne eliminacije BPA. Ostali metaboliti; hidroksiliran BPA (5-hidroksi BPA ali 3-hidroksi BPA,

BPA-O-kinon) in BPA-sulfat pa nastanejo pri visokih koncentracijah apliciranega BPA, ko pride do nasičenja encimov, odgovornih za glukuronidacijo (slika 3). Za človeka je tudi značilno, da ne pride do enterohepatične cirkulacije, medtem ko se ta pri podganah pojavi (12, 31). Metabolna pot BPA je torej odvisna od vrste aplikacije, apliciranega odmerka in spola organizma (21).



Slika 3: Biotransformacija BPA.

Obstajajo razlike med stopnjo glukuronidacije v odvisnosti od spola. Pri izoliranih hepatocitih je pri podganah ženskega spola prišlo do 100% glukuronidacije, medtem ko je pri samčkah prišlo samo do 58% glukuronidacije, 30% BPA pa se je pretvorilo v BPA-sulfat. Razlika je verjetno v različnih izoenzimih, ki so odgovorni za metabolizem BPA. Do sprememb v stopnji glukuronidacije prihaja tudi v nosečnosti oziroma brejosti. Pri brejih podganah se je zmanjšalo jetrno izločanje. To spremembo so razložili z zmanjšano ekspresijo in funkcijo proteina MRP2 (ang. *multi-drug resistance protein 2*), podaljšano izločanje glukuronida pa bi lahko bila posledica nasičenja encima MRP3 (ang. *multi-drug resistance protein 3*), ki ga je v nosečnosti tudi manj. Zaradi zmanjšane izločanja glukuronida v žolč, zaradi manjše količine proteina MRP2, se kompenzatorno poveča vračanje glukuronida nazaj v sistemski krvni obtok. Nekateri organi, med njimi pljuča, tanko črevo in placenta imajo visoko aktivnost  $\beta$ -glukuronidaz. V teh organih lahko prihaja do dekonjugacije glukuronida in BPA se zopet



pojavi v prosti obliki. Pri človeku je bila ravno tako dokazana  $\beta$ -glukuronidazna aktivnost v placenti med nosečnostjo. Obstaja torej možnost, da prosti BPA prehaja v popkovnično kri. S temi ugotovitvami je bilo dokazano, da obstaja velika možnost izpostavljenosti zarodkov BPA, kljub ohranjeni visoki stopnji glukuronidacije v jetrih pri materah (32). Podoben primer so opazili tudi pri podganjih samčkah. Po daljšem času so opazili, da v testisih prihaja do akumulacije prostega BPA. BPA sicer naj ne bi bil škodljiv za starejše samčke, saj imajo normalno aktivnost UGT encima. To je problematično predvsem za zarodke, ki zaenkrat nimajo še dokazane UGT-aktivnosti (33). Glavni organ odgovoren za glukuronidacijo BPA pri podganah so jetra, sledijo ledvice in testisi. Minimalno glukuronidacijo BPA so opazili tudi v pljučih in možganih. Večina BPA-glukuronida se izloči v žolč. Nekateri organi, kot so pljuča, tanko črevo in placenta imajo visoko aktivnost  $\beta$ -glukuronidaz. V teh organih se lahko BPA-glukuronid cepi in nato s krvnim obtokom potuje v nižje organe. V placenti pa seveda obstaja nevarnost izpostavljenosti zarodkov BPA-ju (17, 34).

UGT2B1 je glavni encim odgovoren za glukuronidacijo BPA v jetrih podgan. Podobno sekvenco aminokislin imata pri človeku UGT2B7 in UGT2B17. Zato so domnevali, da sta ta dva tipa odgovorna za glukuronidacijo pri človeku (27). Danes je znano, da je BPA pri človeku v največji meri glukuronidiran z jetrnimi mikrosomi z izoencimom UGT2B15. Encimi UGT1A1, UGT1A3, UGT1A9, UGT1B4 in UGT2B7 so tudi sposobni glukuronidacije BPA, vendar samo pri velikih koncentracijah BPA (12). UGT2B15 se v glavnem nahaja v jetrih, požiralniku in prostati (35). Glukuronidiran BPA se povečini izloči v urin (18).

### **1.3 URIDINDIFOSFAT-GLUKURONIL-TRANSFERAZE (UGT)**

Encimi uridindifosfat-glukoronil-transferaze (UGT) spadajo v veliko encimsko skupino glikozil-transferaz, ki na različne lipofilne substrate pripenjajo sladkorne enote z glikozidno vezjo. Tvorijo se O-glukuronidi (eterskega ali esterskega tipa) ter N-glukuronidi (36). UGT encimi so najpomembnejša poddružina UDP-encimov, encimov ki sodelujejo pri konjugaciji snovi z različnimi sladkorji. Igrajo pomembno vlogo pri biotransformaciji eksogenih in endogenih komponent, kot na primer zdravilne učinkovine, okoljski toksini, kancerogeni. Povzročijo pretvorbo malih lipofilnih komponent v vodotopne glukuronide. Včasih pa povzročijo tudi aktivacijo ali tvorbo toksičnih komponent. Tak primer je morfin-6-glukuronid,

ki se v primerjavi z izhodno spojino drugače veže na opioidne receptorje ter ostaja dlje časa v organizmu in izkazuje manj neželenih učinkov. Metabolne encime v grobem delimo na encime I. in II. faze. Za razliko od citokromov P450, ki so encimi I. faze metabolizma, pa so UGT encimi II. faze metabolizma. Kar v 35% reakcij II. faze sodelujejo UGT encimi (37, 38, 39). UGT so tipični membranski proteini, ki se nahajajo na membrani endoplazmatskega retikuluma in jedrni ovojnici. Aktivni del encima je obrnjen proti notranjosti, v lumen, tako da je za aktivnost encima potrebno kofaktorje (UDPGA) spraviti iz citosola skozi membrano v lumen. Glukuronidi, ki se tvorijo v lumnu endoplazmatskega retikuluma so hitro translocirani v citosol. Nato se metaboliti iz citosola transporirajo v žolč ali v krvni obtok. Veliko snovi lahko vpliva na delovanje UGT. Nekatere lahko delujejo inhibitorno, druge UGT encime aktivirajo. Med endogene inhibitorje uvrščamo nukleotide in hormone. Aktivatorji pa so UDP-N acetilglukozamin in maščobni acilCo-A. Lahko jih razdelimo v dve skupini, glede na N- in C- terminalne domene. Sestavlja jih akceptorski substrat in UDP-glukuronska kislina, kot donor (19, 36, 37).

- **1.3.1 Nomenklatura UGT**

Nad-družina UGT ima po mednarodni encimski klasifikaciji oznako UGT (E.C. 2.4.1.17). Nad-družino UGT encimov lahko razdelimo v dve glavni družini, UGT1 in UGT2, ki sta tudi v glavni meri udeleženi v glukuronidaciji. Po novejših podatkih so nad-družino razširili na štiri družine, in sicer: UGT1, UGT2, UGT3 in UGT8. Vsaka družina ima svoje značilne substrate in posebnosti (17, 29, 40). Človeški UGT encimi pripadajo trem poddružinam, UGT1A, UGT2A in UGT2B. Encimi posamezne družine izkazujejo vsaj 50% enakega zaporedja aminokislin, v poddružini pa homologija zavzema okoli 60% strukture proteinov. UGT1A genski lokus je lociran na 2q37 kromosomu, kodira pa 9 funkcionalnih proteinov, in sicer: UGT1A1, UGT1A3, UGT1A4, UGT1A5, UGT1A6, UGT1A7, UGT1A8, UGT1A9 in UGT1A10. UGT2 družina ima multiple lokuse, ki so locirani na kromosomu 4q13 in sestavljajo naslednje proteine: UGT2A1, UGT2B4, UGT2B7, UGT2B10, UGT2B11, UGT2B15, UGT2B17 in UGT2B28 (37).

### • 1.3.2 Izražanje UGT

UGT encimi se izražajo v odvisnosti od genskih značilnosti in vplivov okolja (41). Glavni organ, odgovoren za biotransformacijo so jetra. Vendar tudi izvenjetrna glukuronidacija izrazito sodeluje pri izločanju ksenobiotikov (38). V jetrih so potrdili prisotnost naslednjih izoform družine UGT1: UGT1A1, UGT1A3, UGT1A4, UGT1A6, UGT1A9. V tankem črevesju pa UGT1A1, UGT1A4, UGT1A6, UGT1A7, UGT1A8 in UGT1A10. Zadnji trije izmed naštetih se nahajajo le izven jeter (tabela I). Ekspresija družine UGT2 je prav tako porazdeljena po različnih tkivih, pri čemer so v jetrih in ledvicah prisotni naslednji predstavniki: UGT2B4, UGT2B7, UGT2B10, UGT2B11, UGT2B15, UGT2B17 in UGT2B28. V tankem črevesju najdemo enake izoforme kot v jetrih, razen izoforme UGT2B11 (39).

Tabela I: Izraženost UGT izoform v jetrih, tankem črevu, ledvicah (42).

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

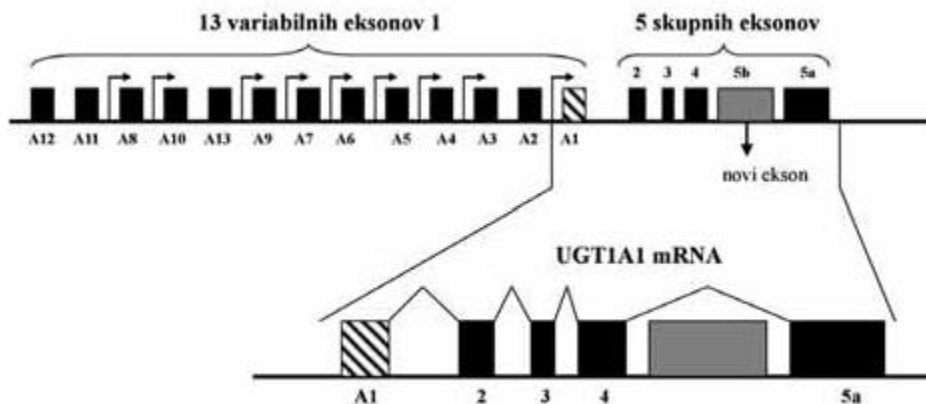
n.d., ni podatka; +, prisoten; - ni prisoten

### • 1.3.3 Poddružina UGT1A

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

Skupnim eksonom sledijo kasete s trinajstimi eksoni, ki kodirajo celotne N-terminalne dele posameznega predstavnika poddružine in najverjetneje kodirajo vezavno mesto za substrat. Od trinajstih možnih mRNA izoform jih 9 kodira funkcionalno aktivne polipeptide (UGT1A1, UGT1A3, UGT1A4, UGT1A5, UGT1A6, UGT1A7, UGT1A8, UGT1A9 in UGT1A10), ostali štirje pa so psevdogeni (UGT1A2p, UGT1A11p, UGT1A12p in UGT1A13p) (43).

V poddružini UGT1A so za glukoronidacijo BPA najbolj odgovorne izoforme UGT1A1, UGT1A3 in UGT1A9 (12).



Slika 4: Struktura genskega lokusa UGT1A in izoencim UGT1A1 (44).

#### • 1.3.4 Polimorfizmi v genu za UGT1A1

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

BLR je razgradni produkt hema in se sintetizira v celicah retikuloendotelnega sistema, predvsem vranice. Dnevno nastane od 250 do 400 mg BLR. Nativni BLR je zaradi tvorbe intramolekularnih vodikovih vezi nevodotopen. V serumu se veže na albumin in prenese do jeter. To obliko imenujemo nekonjugiran BLR. V jetrih se BLR odcepi od albumina in preko anionskih membranskih proteinov ali s procesom difuzije vstopa v hepatocite, kjer ga prevzame citoplazemski protein ligandin in ga prenese do endoplazmatskega retikuluma. Na endoplazmatskem retikulumu poteče reakcija esterifikacije z glukuronsko kislino, ki jo katalizira UGT1A1. Nastaneta vodotopna BLR-monoglukoronid in BLR-diglukoronid s skupnim imenom konjugiran bilirubin. Konjugiran BLR se z aktivnim transportom izloča v žolčni mehur od tam pa v tanko črevo.

V eksonu A1, njegovi promotorski regiji ter eksonih 2-5 genskega kompleksa, so odkrili že 113 sprememb nukleotidnega zaporedja, ki povzročijo nekonjugirane hiperbilirubinemije od Gilbertovega sindroma do Crigler-Najjar-jevega sindroma tipa I in II. Vrsta in pogostost

sprememb se razlikuje med pripadniki različnih etničnih skupin (44, 48). V naši diplomski nalogi bomo preučevali vplive polimorfizma *UGT1A1*\*28 na metabolizem BPA. Polimorfizem *UGT1A1*\*28 pa se izraža kot Gilbertov sindrom.

#### **1.3.4.1 Gilbertov sindrom**

Gilbertov sindrom (GS) je dedna motnja, za katero je značilna blaga nekonjugirana hiperbilirubinemija v odsotnosti hemolize in jetrnih bolezni. GS je najpogostejša dedna motnja v presnovi bilirubina (BLR), saj je glede na meritve serumske koncentracije BLR, prisoten kar pri 3-10% populacije. Pogostejši je pri moških (12,4%), ki imajo tudi višje koncentracije BLR, kot pri ženskah (4,8%). Serumske koncentracije celotnega BLR se dvignejo na 20 do 50  $\mu\text{mol/L}$ , redko pa presežejo 85  $\mu\text{mol/L}$  (referenčne vrednosti za odrasle so do 17  $\mu\text{mol/L}$ ). Značilno je, da vrednosti hitro narastejo ob metabolnem stresu, kot je stradanje ali prisotnost druge bolezni.

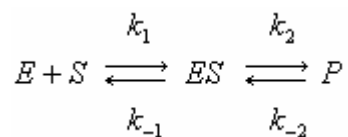
Vzroki za GS še niso povsem razjasnjeni. Najpomembnejšo vlogo igra znižana konjugacija BLR, ki je pri bolnikih z GS znižana na 30% normalne. K povišanim koncentracijam nekonjugiranega BLR v plazmi prispeva tudi zmanjšan privzem v hepatocite. Za prvo so odgovorni polimorfizmi gena za encim *UGT1A1*, za drugo polimorfizmi gena za organski anionski prenašalec 1B1 (*SLCO1B1*) (44). V prvem primeru pride do vrinjene dodatne timinadenin (TA) enote. Namesto šest enot (TA) se pojavi sedem enot (TA). Ta polimorfizem so poimenovali *UGT1A1*\*28. Normalni gen ima sekvenco  $A(\text{TA})_6\text{TAA}$ , ko se vrine še en par enot TA nastane  $A(\text{TA})_7\text{TAA}$ . Tako se zmanjša vezava transkripcijskega faktorja IID in s tem posledično zniža ekspresija *UGT1A1* na 20 do 30%. Iz dejstva, da razen ob dieti z omejenim vnosom kalorij, hiperbilirubinemija ni prisotna pri vseh homozigotih  $\text{TA}_{(77)}$ , sledi, da je homozigotnost potreben, ne pa tudi zadosten pogoj za klinično manifestacijo sindroma. Možni dodatni dejavniki so lahko skrajšana življenjska doba eritrocitov ali zmanjšan privzem BLR v hepatocite (44, 45, 46).

## 1.4 FARMAKOKINETIKA IN ENCIMSKA KINETIKA

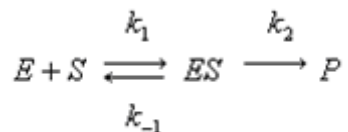
Farmakokinetika je veda, ki se ukvarja s časovnim potekom absorpcije, distribucije, metabolizma in eliminacije učinkovine iz telesa. S pomočjo farmakokinetičnih modelov poskuša razložiti obnašanje učinkovine v telesu, predvideti koncentracije učinkovine v plazmi in s tem napovedati farmakološki učinek oz. neželene učinke zdravila. Predvsem na nivoju metabolizma se pojem farmakokinetike sreča z encimsko kinetiko. Slednja se osredotoča na časovno odvisne encimske reakcije, ki težijo k temu, da bi dosegle neko stacionarno stanje in predstavljajo temelj metaboličnih sprememb v organizmu (49).

### • 1.4.1 Kinetika enosubstratne encimsko katalizirane reakcije

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



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



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

a) **Michaelis-Mentenova kinetika** temelji na predpostavki, da se takoj vzpostavi in nato tudi vzdržuje ravnotežje med encimom, substratom in kompleksom encim-substrat, medtem ko je razpad kompleksa [ES] v produkt prepočasen, da bi zmotil to ravnotežje. Če želimo uporabiti Michaelis-Mentenovo enačbo, moramo upoštevati naslednje predpostavke:

- Koncentracija encima je zelo majhna v primerjavi s koncentracijo substrata, tako da se koncentracija substrata med reakcijo ne spreminja.

- Produkta nastane zanemarljivo malo. To drži le v začetnih pogojih, ko hitrost reakcije že lahko izmerimo, produkta pa je še tako malo, da praktično ne prehaja nazaj v ES.
- Nastanek produkta je sicer hiter, vendar veliko počasnejši od razpada kompleksa ES na E in S ( $k_2 \ll k_{-1}$ ), velja torej izraz:

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

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

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

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

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

$$v_0 = \frac{k_2 [E_0] [S_0]}{[S_0] + K_m}$$

*Enačba 1*

kjer je:

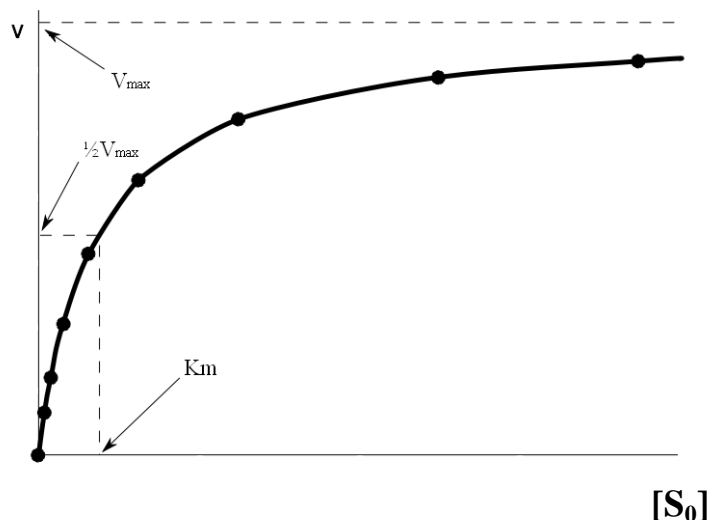
- $V_0$  ..... začetna hitrost reakcije  
 $E_0$  ..... (začetna) koncentracija encima  
 $S_0$  ..... začetna koncentracija substrata  
 $K_m$  ..... Michaelis-Mentenova konstanta  
 $k_2$  ..... konstanta hitrosti razpada kompleksa ES v produkt P

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

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

Enačba 2

Graf odvisnosti hitrosti reakcije od koncentracije substrata bo v tem primeru izgledal tako, kot je prikazano na sliki 5.



Slika 5: Odvisnost hitrosti reakcije od koncentracije substrata glede na enačbo 2.

#### 1.4.1.1 Substratna inhibicija

Za tipično encimsko katalizirano reakcijo je značilno, da z večanjem koncentracije substrata narašča tudi začetna hitrost, ki se bliža asimptotični vrednosti  $V_{max}$ . V primeru substratne inhibicije se zgodi, da začne pri visokih koncentracijah substrata hitrost upadati, namesto da bi se približevala  $V_{max}$ . Takšno inhibicijo povzroči sekundarna molekula substrata, ki se veže na aktivni [ES] kompleks in inhibira reakcijo. To lahko kaže na dve vezavni mesti za substrat na encimu. Prvo se z veliko afiniteto do substrata zasede že pri nižjih koncentracijah in omogoča normalen potek reakcije. Drugo mesto ima manjšo afiniteto, zato se zasede šele pri visokih koncentracijah substrata in ob tem ovira nadaljnjo reakcijo (50).

Iz Michaelis-Mentenove enačbe lahko izpeljemo enačbo za substratno inhibicijo, in sicer s predpostavko, da gre za nekompetitivno inhibicijo, kjer je inhibitor neka dodatna, sekundarna molekula substrata. Dobimo enačbo 3:



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

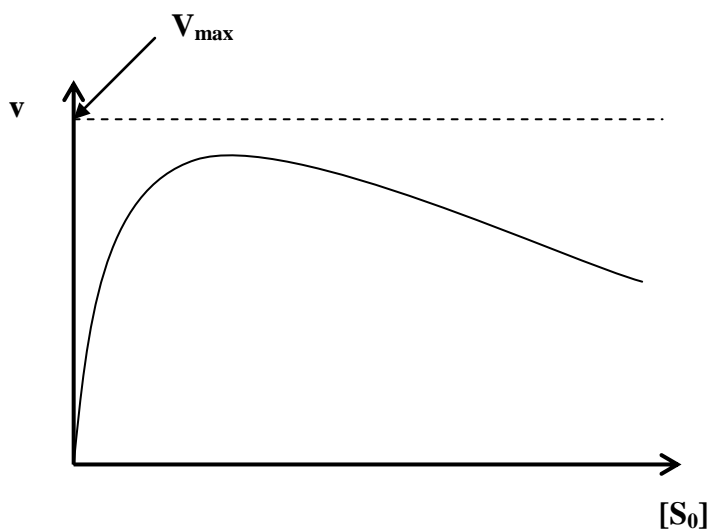
*Enačba 3*

Pri zelo nizkih  $S_0$  je člen  $S_0/K_i$  zanemarljivo majhen in izraz se poenostavi v normalno Michaelis-Mentenovo enačbo. Pri visokih  $S_0$  ( $S_0 \gg K_m$ ) izgleda poenostavljen izraz takole (enačba 4):

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

*Enačba 4*

Na sliki 6, ki prikazuje odvisnost hitrosti reakcije od koncentracije substrata, vidimo pojav substratne inhibicije kot odklon krivulje od asimptotične vrednosti  $V_{max}$ .



Slika 6: Odvisnost hitrosti encimske reakcije od količine substrata v primeru substratne inhibicije.

- **1.4.2 Določevanje navideznih encimskih parametrov**

Navidezni encimski parametri so osnova za izračun intrinzičnega očistka. Pridobiti jih moramo iz eksperimentalnih podatkov. Slednje lahko obdelamo na več različnih načinov, vendar se moramo ob tem zavedati, da lahko različne metode obdelave podatkov vodijo do različnih rezultatov, saj vsaka metoda v sebi nosi določeno napako. Zato je treba dobljene rezultate tudi ustrezno interpretirati (51). Cilj obdelave eksperimentalnih podatkov je pridobitev podatkov o maksimalni hitrosti ( $V_{\max}$ ) in Michaelis-Mentenovi konstanti ( $K_m$ ), ki ju bomo v nadaljevanju uporabili za izračun intrinzičnega očistka.

Če količino nastalih metabolitov delimo s časovno enoto in količino encima v inkubatu, dobimo hitrost nastajanja metabolitov. Te hitrosti nato povežemo s koncentracijo substrata v sistemu. To lahko storimo na različne načine.

A) Za lažjo obdelavo podatkov izvedemo linearizacijo, kar pomeni, da podatke pretvorimo v obliko  $y = mx + c$ , kar nam bo omogočilo izračun  $K_m$  in  $V_{\max}$ . Poznamo več različnih načinov linearizacije:

- Lineweaver-Burk-ova enačba,
- Eadie-Hofstee-jeva enačba,
- Hanes-ova enačba,
- Haldane-ovo razmerje, itd.

B) Za obdelavo podatkov lahko uporabljamo tudi drugi pristop. To je nelinearna regresija z uporabo najmanjše vsote kvadratov odklonov. Podatke v tem primeru obdelamo s pomočjo različnih programov (Microsoft Exel, Sigma Plot Enzyme Kinetics, IBMSPPSS). Skozi eksperimentalno izmerjene točke potegnemo krivuljo s predvideno enačbo, program nam izračuna želene parametre ( $K_m$ ,  $K_i$  in  $V_{\max}$ ).

Danes se največ uporablja slednji način obdelave podatkov, priporoča pa se vsaj vizualni pregled katere od metod linearizacije. Bistveni odstop od premice namreč pomeni, da opazovana encimska reakcija ni sledila Michaelis-Mentenovim predpostavkam oziroma da gre za netipično kinetiko (52).

- **1.4.3 Napovedovanje metaboličnega očistka**

Za napovedovanje metaboličnega očistka moramo poznati vrsto metabolične reakcije, odgovoren encim, produkt reakcije in encimske kinetične parametre. S pomočjo encimskih kinetičnih parametrov, kot so npr.  $K_m$ ,  $V_{max}$ ,  $K_i$ , lahko uporabimo katerega od matematičnih modelov za napovedovanje *in vivo* metaboličnega očistka. Ob tem moramo poznati tudi nekatere *in vivo* parametre npr. vezavo učinkovine na plazemske proteine in njen porazdelitveni volumen (53).

#### **1.4.3.1 Farmakokinetični modeli**

Pri ekstrapolaciji rezultatov iz *in vitro* modela na *in vivo* situacijo potrebujemo čim boljše farmakokinetične modele, ki se delijo na prostorne in fiziološke. Prostorni modeli vsebujejo prostore, ki nimajo definirane anatomske sestave, hitrost nastajanja in izginjanja snovi je največkrat 1. reda. Za fiziološke modele je značilno, da imajo prostori definirano anatomsko sestavo, snovi v teh prostorih lahko nastajajo in izginjajo, hitrosti procesov so odvisne od hitrosti pretoka krvi skozi organ.

Med farmakokinetičnimi koncepti je očistek najuporabnejši z vidika klinične prakse. Način izračuna njegove vrednosti se razlikuje glede na model, ki ga uporabimo. Po prostornem farmakokinetičnem modelu ga izračunamo z enačbo 5:

$$Cl = k_e \times V_D, \quad \text{Enačba 5}$$

kjer je:

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

$V_D$ ..... volumen porazdelitve [L];

Izračun očistka s pomočjo fiziološkega modela temelji na enačbi 6:

$$Cl = Q \times E, \quad \text{Enačba 6}$$

kjer je:

Q ..... pretok skozi organ [L/h]

E..... ekstrakcijsko razmerje (razmerje med hitrostjo izločanja in hitrostjo vstopanja učinkovine v organ); napisano enačbo nadalje razširimo glede na izbrani organ in fiziološki model.

### 1.4.3.2 Intrinzični očistek

Intrinzični očistek izraža sposobnost organa za metabolično odstranjevanje nevezane učinkovine. Je proporcionalna konstanta med hitrostjo odstranjevanja in koncentracijo nevezane učinkovine. Odraža dogajanja znotraj celice in zato poda vrednost, ki bi jo dobili, če ne bi bilo prisotne vezave na proteine ali omejitve s pretokom. Prav zaradi tega so vrednosti tega očistka ponavadi več redov velikosti večje od pretoka krvi skozi organ.

Intrinzični očistek je rezultat metabolizma in izločanja učinkovine, zato ga v pogojih nenasičenosti encimov lahko izračunamo po enačbi 7:

$$Cl_{int} = \sum \frac{v_{max}}{K_m} + \sum \frac{T_m}{K_d} , \quad \text{Enačba 7}$$

kjer je:

- $T_m$  ..... največja hitrost prenosa učinkovine
  - $K_d$  ..... konstanta disociacije vsakega prenašalca, vpletenega v izločanje učinkovine
- (54).

## 1.5 IN VITRO MODELI ZA PREISKOVANJE METABOLIZMA

Glavno mesto metabolizma učinkovin predstavljajo jetra. Zato je nujno poznavanje jetrne ekstrakcije (EH) in jetrnega očistka ( $Cl_H$ ) ter dejavnikov, ki vplivajo na ta dva parametra. Oba imata namreč velik pomen za učinkovitost in varnost zdravil, v našem primeru na hitrost in uspešnost eliminacije BPA iz telesa (55).

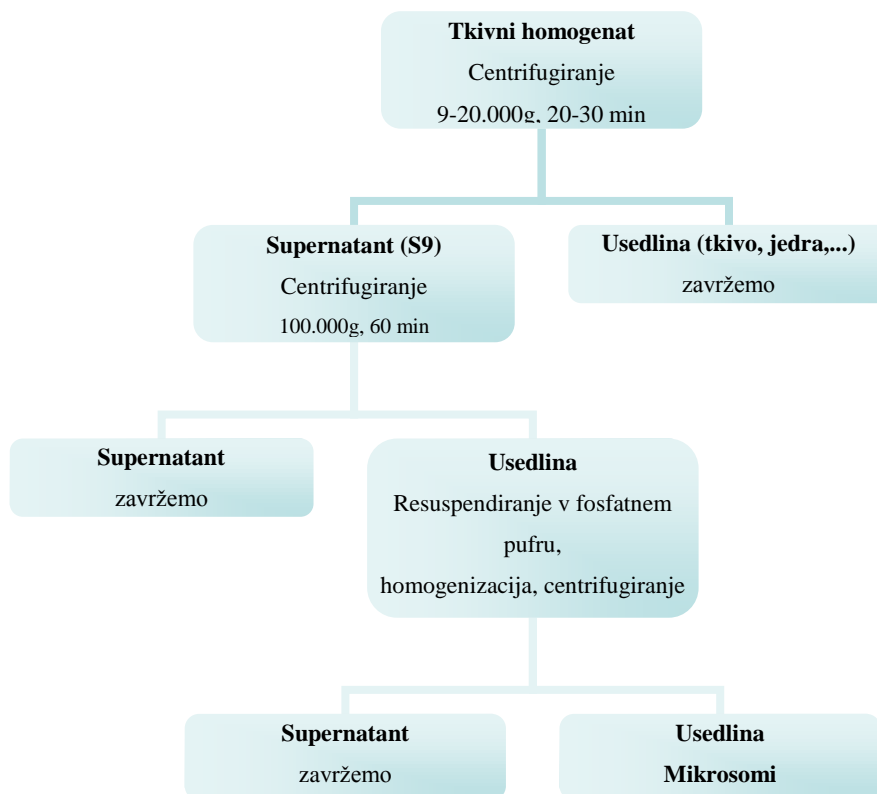
V zadnjem času se je zelo povečalo zanimanje za *in vitro* metode s ciljem napovedovanja metabolizma *in vivo*. Z novejšimi pristopi lahko tako kvalitativno napovemo metabolizem, obenem lahko tudi kvantitativno predvidimo metabolni očistek. Modeli, ki poenostavljeno

posnemajo pogoje v organizmu, so lahko celični (tkivne rezine, izolirani in kultivirani hepatociti, jetrne celične linije), kot tudi subcelični (od najbolj kompleksnega k najenostavnejšemu: jetrni homogenat, S9 frakcija, citosol, mikrosomi, peroksisomi in mitohondriji) (56, 57). V naši diplomski nalogi smo uporabili mikrosome, ki predstavljajo glavni *in vitro* sistem za preiskovanje metabolizma pri razvoju zdravil.

- **1.5.1 Mikrosomi**

Mikrosomi so majhni membranski vezikli velikosti 20-200 nm. Pridobivamo jih iz gladkega endoplazmatskega retikuluma pri homogenizaciji in ultracentrifugiranju tkiva. Mikrosomi so najenostavnejši *in vitro* model za preiskovanje metabolizma pridobljen iz organov (npr. jeter, tankega črevesa, ledvic,...). V njih so prisotni encimi prve in tudi nekateri encimi druge faze metabolizma zdravil. Tako vsebujejo encime CYP 450, flavinske monooksigenaze, epoksidne hidrolaze, glukuronoziltransferaze, esteraze, amidaze, mikrosomske glutation-S-transferaze in metiltransferaze (58, 59). Njihova prednost je ta, da dajejo precej ponovljive rezultate, imajo visoko vsebnost metaboličnih encimov in izkazujejo relativno majhno nespecifično vezavo učinkovin. Shranjevanje ni problematično (krioprezervacija) in tudi po večkratnem zamrzovanju ter odtajevanju dajejo ponovljive rezultate (60, 61). Uporabljamo jih lahko za napoved poti razgradnje učinkovine in za identifikacijo ter pridobivanje standarda metabolitov. Uporabni so tudi za določanje parametrov encimske kinetike in za napovedovanje intrinzičnega očistka.

Pridobivanje mikrosomov je relativno enostavno. Izolacijo subceličnih frakcij izvedemo z razbitjem celic s homogenizacijo v ustreznem pufru, ki ji sledi diferencialno centrifugiranje (uporaba razlik v gostoti in velikosti delcev) in resuspenzija usedline v primernem pufru za shranjevanje ali izolacija topne frakcije. Priprava mikrosomov je prikazana na sliki 7 (62, 63).



Slika 7: Shema priprave mikrosomov (62).

Pri napovedovanju *in vivo* metabolnega očistka se soočamo z nekaterimi težavami. Predvideti moramo različne lastnosti učinkovin. Učinkovine so lahko bazične, kisle ali nevtralne. Od teh lastnosti je odvisna različna vezava na mikrosome. Izračunati moramo tudi kakšen vpliv ima vezava učinkovine na plazemske proteine na koncentracijo učinkovine v hepatocitu. Pomanjkljivost uporabe mikrosomov je tudi nezmožnost kvantitativne ocene biotransformacije *in vivo*, saj je v mikrosomih povečana količina CYP in UGT encimov, odsotno pa je tekmovanje z drugimi encimi (64).

Kadar prevladuje metabolizem druge faze (konjugacija) in/ali mehanizem aktivnega privzema, lahko uporaba jetrnih mikrosomov pripelje do netočne napovedi *in vivo* vrednosti  $Cl_{int}$ . Koncentracija učinkovine v celicah mora biti poznana, saj je potrebno v približno taki koncentraciji inkubirati mikrosome. Podobno težavo imamo s koncentracijo kofaktorjev (npr. uridin difosfoglukuronska kislina in alamecicin za UGT) – te moramo običajno dodati v prebitku, kar lahko vpliva na rezultate (65). V primeru UGT predstavlja problem tudi dostopnost aktivnega mesta mikrosomalnih encimov, ki je obrnjeno v notranjost mikrosoma.

Membrano, ki predstavlja difuzijsko bariero, lahko prekinemo s pomočjo ultrazvoka, površinsko aktivnih snovi (Brij 58) ali s posebnim proteinom, ki naluknja membrano (alameticin) (66). Če tega ne storimo, lahko določimo nižji jetrni očistek, kot je v resnici. Vzrok za prenizko oceno  $Cl_H$  je lahko tudi vrsta pufra, njegov pH in ionska moč.

V primeru glukuronidacije na oceno jetrnega očistka vpliva obseg vezave na plazemske proteine in mikrosome. Za netočnost rezultatov so odgovorne tudi UGT iz drugih delov telesa, ne le jeter. Zaradi nepopolne raziskanosti encima UGT je interpretacija mehanizma glukuronidacije *in vitro* precej težka (67).

## 2. NAMEN DELA

Bisfenol A je zelo razširjena snov v okolju. Široko je uporabljan pri proizvodnji polikarbonatne plastike in epoksi smol in tudi kot stabilizator ali antioksidant pri proizvodnji polivinil-kloridne plastike. Ta plastika je glavni material za izdelavo plastenke, embalaže za hrano in prevlek na notranji strani pločevink za hrano ter pijačo. Zaradi odpuščanja iz materialov in izpustov iz proizvodnih obratov se nahaja povsod v naravnem okolju, prav tako tudi v izdelkih, s katerimi je v stiku. Ljudje in živali smo v neprestanem stiku z BPA. Ugotovili so, da že v zelo majhnih koncentracijah deluje kot hormonski motilec. Veže se na estrogenske receptorje v telesu. Povzroča motnje metabolizma in reprodukcije, obenem povečuje možnost nastanka motenj endokrinega sistema, tudi rakavih obolenj.

Namen diplomske naloge bo z uporabo mikrosomov, kot *in vitro* modela, ugotoviti, kateri so glavni organi odgovorni za metabolizem BPA (jetra, ledvice, tanko črevo, pljuča), opredeliti vrsto encimske kinetike in izračunati očistek posameznega organa. Znano je, da je glavni metabolit BPA glukuronid, zato se bomo osredotočili samo na ta metabolit. Za potrebe kvantifikacije vzorcev z LC-MS/MS metodo bomo najprej sintetizirali in okarakterizirali glukuronid BPA in glukuronid BPA-d16. Po opredelitvi glavnih organov, v kateri poteka glukuronidacija, bomo ugotavljali še, ali ima polimorfizem *UGT1A1\*28* vpliv na glukuronidacijo BPA in posledično na izpostavljenost in toksičnost BPA.



## 3. MATERIALI IN METODE

### 3.1 MATERIALI

#### Testirane učinkovine:

- Bisfenol A, Sigma-Aldrich, molska masa: 228,29 g/mol, čistost >99%,

#### Druge snovi:

- Bisfenol A-d16, Sigma-Aldrich, Molska masa: 244,38 g/mol, čistost 98 atom % D,
- glukuronidaza, tip H-1, pridobljena iz Helix Pomatia, Sigma-Aldrich, koncentracija: 451.000 IU/gram
- mili-Q voda, pridobljena z aparatom Milli-Q Advantage A10 Ultrapure Water Purification System (Millipore, Bedford, ZDA), na Fakulteti za farmacijo, Ljubljana,
- acetonitril, MS grade, Sigma-Aldrich,
- metanol, HPLC grade, Sigma-Aldrich,
- raztopina A (UGT Reaction Mix solution A, BD Biosciences), vsebuje 25 mM uridin 5'-difosfoglukuronske kisline (UDPGA) v vodi,
- raztopina B (UGT Reaction Mix solution B, BD Biosciences), vsebuje 250 mM TRIS-HCl, 40 mM MgCl<sub>2</sub> in 0,125 mg/mL alameticina v vodi,
- mikrosomi (pooled), 20 mg/mL: gre za združene mikrosome več različnih dajalcev z različnimi genotipi:
  1. človeški jetrni mikrosomi (Human liver microsomes CMV negative pooled, BD Biosciences),
  2. človeški črevesni mikrosomi (Human mixed sex intestinal microsomes pooled, BD Biosciences) - tu je koncentracija mikrosomov 10 mg/mL,
  3. človeški pljučni mikrosomi (Human mixed sex lung microsomes, pooled, Celsis IVT),
  4. človeški ledvični mikrosomi (Human mixed sex kidney microsomes, pooled, Celsis IVT),
- mikrosomi (20 mg/mL), genotipizirani glede na polimorfizem gena za UGT1A1:
  1. homozigoti *UGT1A1\*1 / UGT1A1\*1* (Human liver microsomes allelic variant - UGT1A1\*1\*1, BD Biosciences),

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

Aparature:

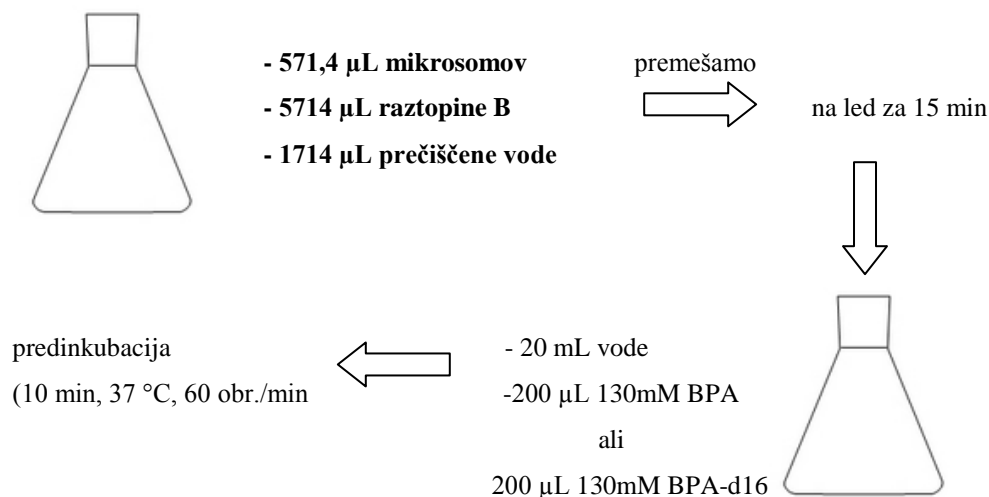
- LC-MS/MS sistem: - UPLC: Agilent 1290 Infinity,  
- MS: Agilent 6460 Triple quad,
- tehtnica Mettler toledo AB54-S,
- termični stresalnik, Tehtnica, Vortemp 56EVC,
- centrifuga, Tehtnica, Centric 322A,
- centrifuga Sigma 3K30,
- hladilno-grelna plošča, Cole-Parmer<sup>®</sup>, Chilling/Heating Block,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

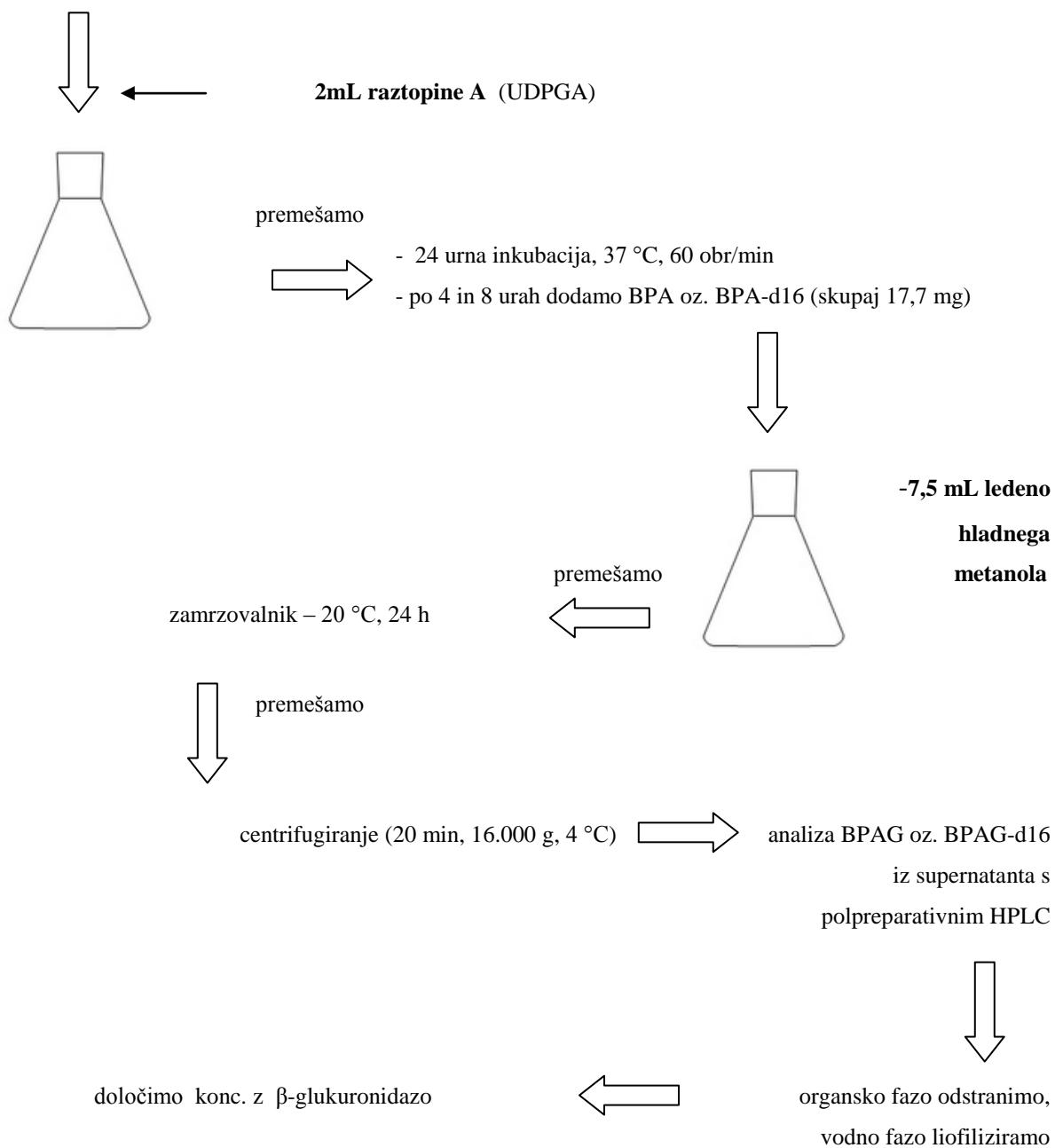
## 3.2 METODE

- **3.2.1 Priprava BPAG in BPAG-d16**

### 3.2.1.1 Sinteza BPAG in BPAG-d16

1. Mikrosome smo vzeli tik pred poskusom iz zamrzovalnika, kjer smo jih shranjevali na  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Odtalili smo jih pod tekočo vodo in takoj postavili na led.
2. Pripravili smo dve zmesi mikrosomov: k  $571,4\text{ }\mu\text{L}$  mikrosomov smo dodali  $5714\text{ }\mu\text{L}$  raztopine B in  $1714\text{ }\mu\text{L}$  prečiščene vode. Zmesi smo dobro premešali na ročnem mešalu in postavili na led za 15 min.
3. K obema zmesema smo dodali po  $20\text{ mL}$  prečiščene vode in po  $200\text{ }\mu\text{L}$  raztopine  $130\text{ mM}$  BPA oziroma BPA-d16 ter dobro premešali.
4. Sledila je predinkubacija: zmesi smo postavili v inkubator za 10 min pri temperaturi  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$  in hitrosti mešanja 60 obratov/minuto.
5. Po 10 min smo v obe dodali  $2\text{ mL}$  raztopine A dobro premešali in postavili v inkubator ( $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ , hitrost mešanja 60 obratov/minuto).
6. Sledila je 24-urna inkubacija, po 4 in 8 urah pa smo raztopinama dodali BPA oziroma BPA-d16 v metanolu. Skupno smo dodali  $17,7\text{ mg}$ .
7. Reakcijo smo ustavili z dodatkom  $7,5\text{ mL}$  hladnega metanola ( $4^{\circ}\text{C}$ ).
8. Vzorce smo dobro premešali in jih postavili v zamrzovalnik na  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  za 24 h.
9. Vzorce smo razporedili v epice in jih centrifugirali 20 min pri  $16.000\text{ g}$  in  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ .
10. Supernatant smo aplicirali na polpreparativni HPLC, ki omogoča ločeno zbiranje frakcij (BPAG oz. BPAG-d16).
11. Zbrane frakcije smo nato rotavapirali, da smo odstranili organsko topilo (metanol), vodni del pa smo liofilizirali. Z metanolom smo rekonstruirali produkte, nato pa smo z  $\beta$ -glukuronidazo določili koncentracijo raztopin (glej 3.2.1.2.).





Slika 8: Prikaz izvedbe postopka za sintezo BPAG in BPAG-d16.

V tabeli II so prikazane končne koncentracije reagentov v reakcijski zmesi pri sintezi BPAG in BPAG-d16

Tabela II: Končne koncentracije reagentov v reakcijski zmesi.

	koncentracije
BPA/BPA-d16	2,60 mM/2,45 mM
mikrosomi	0,38 mg/mL
alameticin	0,024 mg/mL
Tris-HCl	47,62 mM
MgCl	7,62 mM
UDPGA	1,67 mM
MeOH	1%

### 3.2.1.2 Določanje koncentracije BPAG in BPAG-d16 z $\beta$ -glukuronidazo

1. Pripravili smo 5 mM raztopine BPA, BPA-d16, BPAG, BPAG-d16 v metanolu.
2. Nato smo osnovne raztopine redčili z metanolom, da smo dobili naslednje koncentracije:

$$5\text{mM} \xrightarrow{1/100} 0,5\text{ mM} \xrightarrow{1/10} 0,05\text{mM}$$

3. Pripravili smo 50 mM amonijev acetatni pufer, katerega pH smo na 5 umerili z očetno kislino ter 50 mM amonijev acetatni pufer (pH=5) v katerega smo dodali tako količino  $\beta$ -glukuronidaze, da je bila v končnem inkubatu koncentracija 2000 IU/mL.
4. V luknjice na mikrotitrski ploščici smo nanесли 200  $\mu$ L pufra oz. pufra z  $\beta$ -glukuronidazo po shemi v tabeli III. Za vsako koncentracijo testiranih substanc smo pripravili po 6 paralelk. V tri paralelke smo dodali pufer, v tri pa smo dodali pufer z  $\beta$ -glukuronidazo. V nadaljevanju smo dodali metanolne raztopine testiranih substanc, da so bile koncentracije testiranih substanc v inkubatu 50, 5 in 0,5  $\mu$ M.

Tabela III: Shema priprave različnih koncentracij BPA zvrsti z ali brez dodatka  $\beta$ -glukuronidaze.

	BPA ( $\mu\text{M}$ )			BPA-d16 ( $\mu\text{M}$ )			BPAG ( $\mu\text{M}$ )			BPAG-d16 ( $\mu\text{M}$ )		
pufer1	50	50	50	50	50	50	50	50	50	50	50	50
pufer2	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
pufer3	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5
$\beta$ -gluk.1	50	50	50	50	50	50	50	50	50	50	50	50
$\beta$ -gluk.2	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
$\beta$ -gluk.3	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5

5. Mikrotitrsko ploščico smo inkubirali 5 ur, na 37 °C, 60 obr/min.
6. Reakcijo smo ustavili z dodatkom 600  $\mu\text{L}$  ledeno hladnega metanola.
7. Nato smo ploščico za 10 minut postavili na led.
8. Raztopine smo premešali in centrifugirali 100 min pri 1300g in 4 °C.
9. Supernatant smo analizirali z LC-MS/MS:



Slika 9: Mikrotitrsko ploščica.

- 3 različne koncentracije BPA, BPA-d16, BPAG in BPAG-d16
- v tri paralelke dodamo pufer
- v tri paralelke dodamo pufer z  $\beta$ -glukuronidazo



inkubacija 5 ur (na 37 °C, 60 obr/min)



ustavitev reakcije z 600 $\mu\text{L}$  ledeno hladnega metanola



centrifugiranje (100 min, 1300 g, 4 °C)



analiza supernatanta z LC-MS/MS

Slika 10: Prikaz izvedbe postopka za določanje koncentracije BPAG in BPAG-d16 z  $\beta$ -glukuronidazo.

### 3.2.1.3 Preparativno čiščenje BPAG in BPAG-d16

SISTEM:

- HPLC sistem: 1100/1200 Series (Agilent Technologies);  
razplinjevalec, kvarтерна črpalka, avtomatski vzorčevalnik, UV-detektor, zbiralec frakcij, termostat za kolono.

KOLONA:

- polpreparativna kolona;  
Onyx Monolithic SEMI-PREP C18 100x10 mm (Phenomenex)

PREDKOLONA:

- Onyx Monolithic C18 5x4,6mm (Phenomenex)

KROMATOGRAFSKI POGOJI:

- mobilna faza A: voda
- mobilna faza B: metanol
- gradient (tabela IV):

*Tabela IV: Časovno spreminjanje gradienta.*

čas (min)	mobilna faza B(%)	pretok (mL/min)
0	20	3
1	20	3
5	90	3
7,5	90	3
7,6	20	5
9	20	5

- čas analize = 9 minut
- $V_{inj} = 900 \mu\text{L}$
- $\lambda = 220 \text{ nm}$
- $T_{kolone} = \text{sobna}$
- čas zbiranja BPAG oziroma BPAG-d16: 4,5-6,1 min
- injiciramo iz 6 mL vial.

- **3.2.2 Časovno spremljanje nastajanja BPA-glukuronida v različnih organih**

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

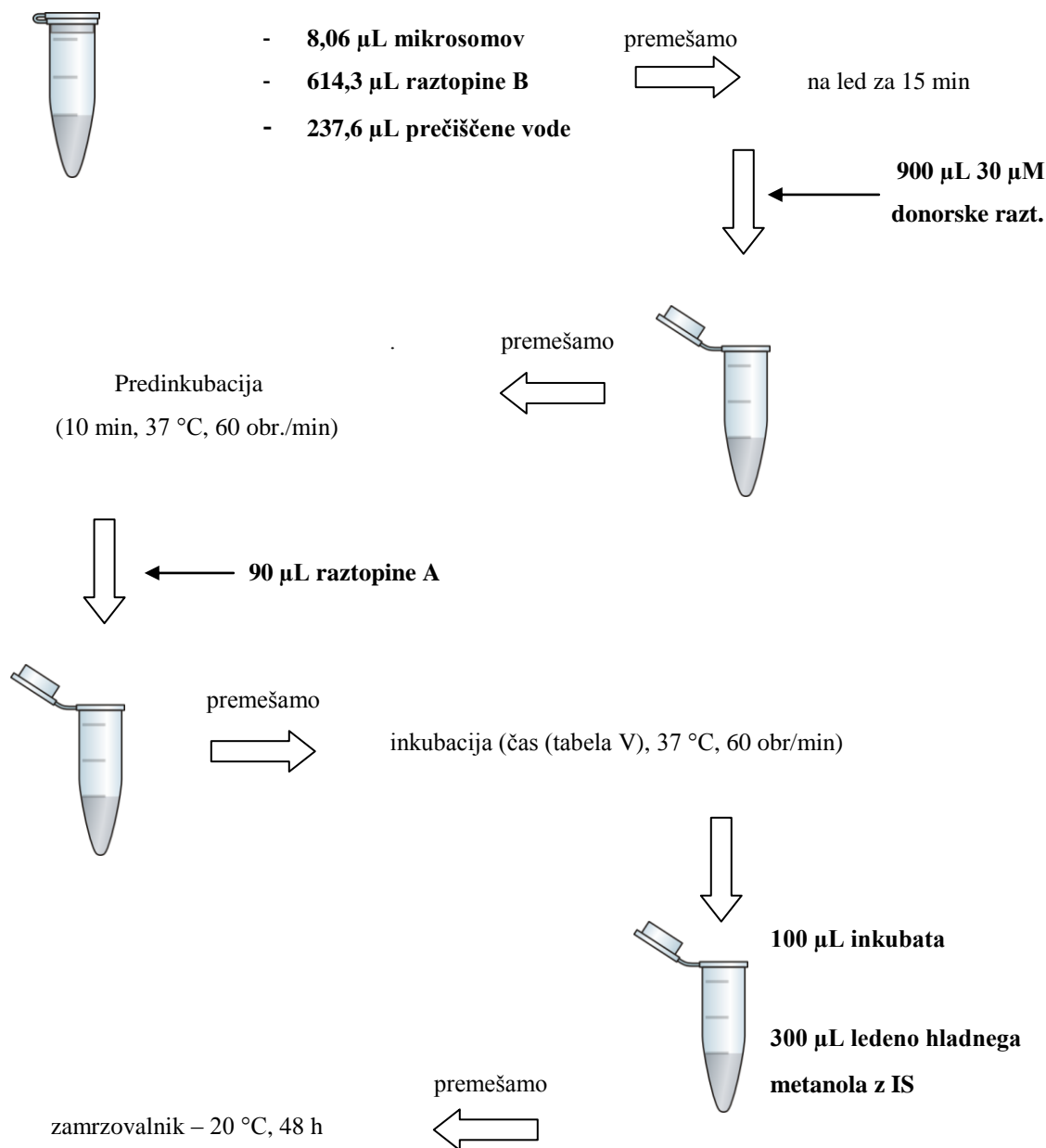
1. Mikrosome smo vzeli tik pred poskusom iz zamrzovalnika, kjer smo jih shranjevali na  $-80 \text{ }^\circ\text{C}$ . Odtalili smo jih pod tekočo vodo in takoj postavili na led.
2. Pripravili smo zmes mikrosomov:  $8,06 \mu\text{L}$  mikrosomov (pri črevesnih mikrosomih je bila količina 2x večja, zaradi manjše koncentracije v izhodni raztopini mikrosomov-torej  $16,12 \mu\text{L}$ ), dodali smo  $614,3 \mu\text{L}$  raztopine B in  $237,6 \mu\text{L}$  prečiščene vode (pri črevesnih  $229,5 \mu\text{L}$ ). Zmes smo dobro premešali na ročnem mešalu in postavili na led za 15 min.
3. K  $360 \mu\text{L}$  zmesi (začetno zmes smo razdelili v dve paralelki) smo dodali  $900 \mu\text{L}$   $30 \mu\text{M}$  donorske raztopine BPA in dobro premešali. Koncentracija testirane substance v končni inkubacijski zmesi je bila  $20 \mu\text{M}$ .
4. Nato je sledila predinkubacija: zmes smo postavili v inkubator za 10 min pri temperaturi  $37 \text{ }^\circ\text{C}$  in hitrosti mešanja 60 obratov/minuto.
5. Po 10 min smo dodali  $90 \mu\text{L}$  raztopine A, dobro premešali in postavili v inkubator ( $37^\circ\text{C}$ , hitrost mešanja 60 obratov/minuto).
6. Po točno določenem času (tabela V) smo odpipetirali  $100 \mu\text{L}$  inkubata in ga dodali k  $300 \mu\text{L}$  ledeno hladnega metanola z internima standardoma, ki smo ga že prej pripravili v Eppendorfove epruvete (epice) in hladili na ledu.

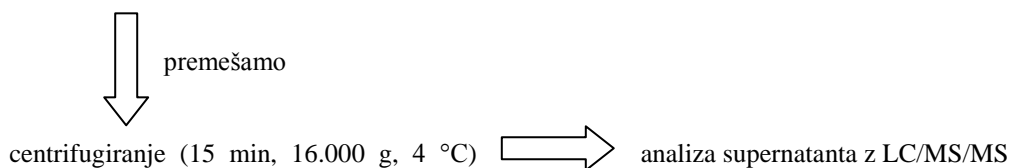


Tabela V: Časovno spremljanje BPA.

Čas (min)	0	5	10	15	30	45	60	90	120	240	360
-----------	---	---	----	----	----	----	----	----	-----	-----	-----

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





Slika 11: Prikaz izvedbe postopka za časovno spremljanje nastajanja metabolitov BPA v inkubacijski zmesi.

V tabeli VI so prikazane končne koncentracije reagentov v reakcijski zmesi ob spremljanju nastajanja glukuronida.

*Tabela VI: Končne koncentracije reagentov v reakcijski zmesi.*

	koncentracije
BPA	20 $\mu$ M
mikrosomi	0,05 mg/ml
alameticin	0,024 mg/ml
Tris-HCl	47,62 mM
MgCl	7,62 mM
UDPGA	1,67 mM
MeOH	1%

### • 3.2.3 Kinetika nastajanja metabolitov BPA v različnih organih

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

1. Mikrosome smo vzeli tik pred poskusom iz zamrzovalnika, kjer smo jih shranjevali na  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Odtalili smo jih pod tekočo vodo in takoj postavili na led.
2. Sledila je priprava zmesi mikrosomov: 20,68  $\mu$ L mikrosomov (črevesnih - 41,36  $\mu$ L), dodali smo 1570,8  $\mu$ L raztopine B in 607,8  $\mu$ L prečiščene vode (pri črevesnih 587,12  $\mu$ L prečiščene vode). Zmes smo dobro premešali na ročnem mešalu ter postavili na led za 15 min.

Z multipeto smo odpipetirali po 40  $\mu\text{L}$  zmesi mikrosomov v prvih 48 luknjic na globoki (1000  $\mu\text{L}$ ) mikrotitrski plošči s 96 luknjicami. Nato smo v vsako od teh luknjic odpipetirali po 100  $\mu\text{L}$  donorske raztopine z ustrežno koncentracijo (tabela VII), da smo imeli na koncu 12 luknjic z različnimi koncentracijami testirane učinkovine.

Tabela VII: Shema pipetiranja različnih konc. ( $\mu\text{M}$ ) BPA na mikrotitrsko ploščo.

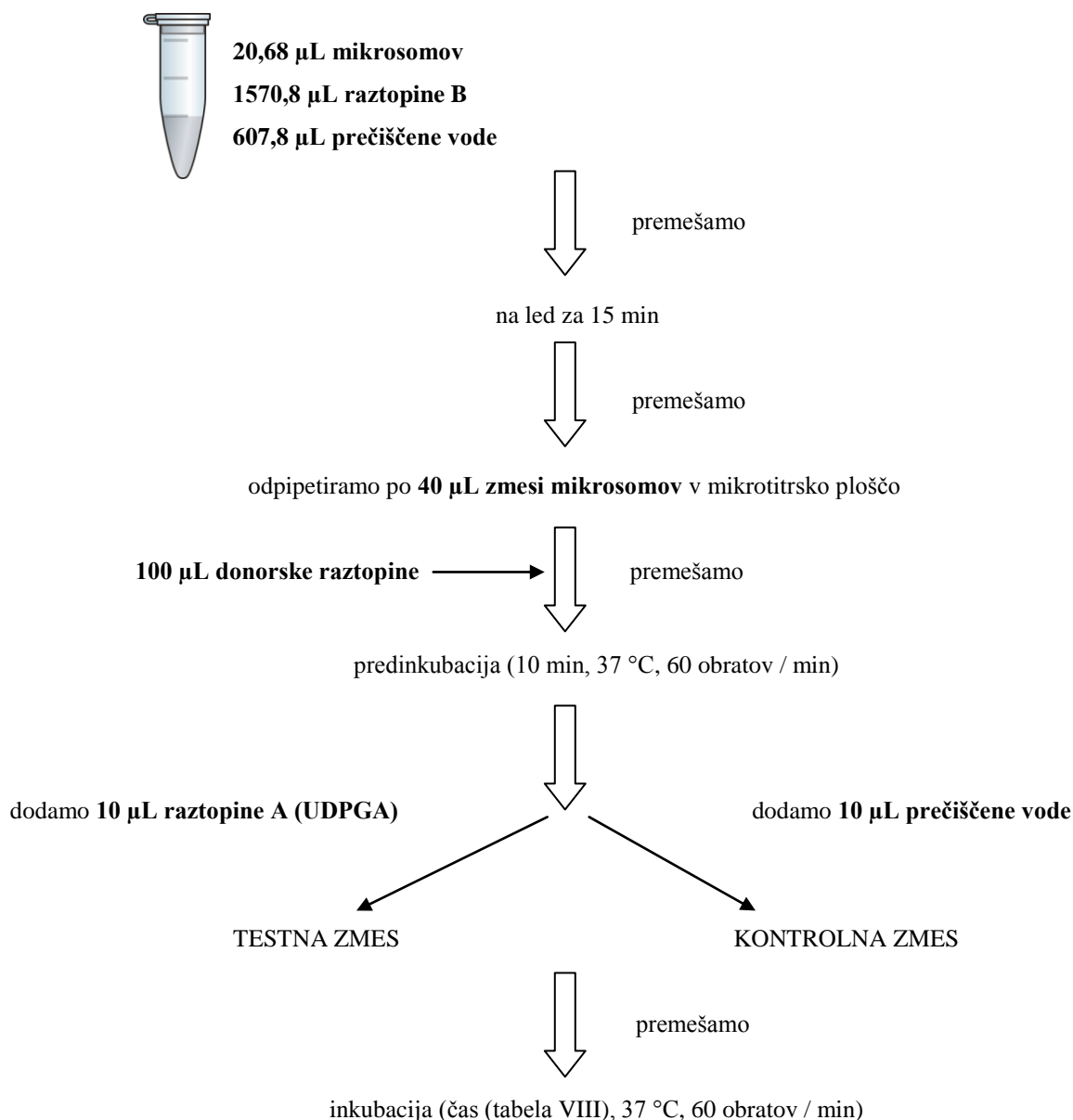
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	
A	100	80	60	40	30	20	15	10	5	3,5	2	0,5	1. paralelka
B	100	80	60	40	30	20	15	10	5	3,5	2	0,5	2. paralelka
C	100	80	60	40	30	20	15	10	5	3,5	2	0,5	3. paralelka
D	100	80	60	40	30	20	15	10	5	3,5	2	0,5	kontrola
E													
F													
G													
H													

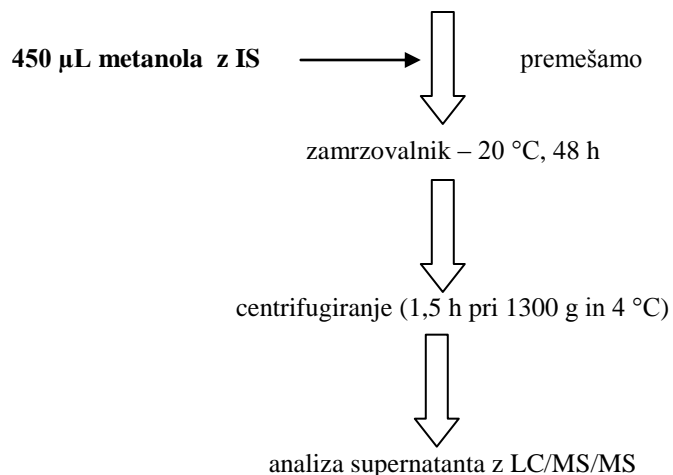
- Nato je sledila predinkubacija: mikrotitrsko ploščo smo postavili v inkubator za 10 min. Temperaturo v inkubatorju smo nastavili na 37 °C, hitrost mešanja na 60 obratov/minuto.
- Po 10 min smo vzeli mikrotitrsko ploščo iz inkubatorja in v vsako luknjico dodali z multipeto po 10  $\mu\text{L}$  raztopine A, v četrto paralelko smo dodali 10  $\mu\text{L}$  vode, saj smo jo uporabili le za kontrolo koncentracij. Vse skupaj smo dobro premešali in ponovno postavili v inkubator za določen čas (tabela VIII). Čas smo začeli meriti, ko smo dodali raztopino A v prvo luknjico.

Tabela VIII: Čas inkubacije.

	jetrni mikrosomi	črevesni mikrosomi	ledvični mikrosomi
t (min)	4	20	20

5. Po točno določenem času (glej tabelo VIII) smo vzeli mikrotitrsko ploščo iz inkubatorja, postavili na led in v luknjice takoj dodali trojni volumen (450  $\mu\text{L}$ ) raztopine metanola z internima standardoma v enakem vrstnem redu kot smo dodajali raztopino A.
6. Mikrotitrsko ploščo smo tesno zaprli in postavili v zamrzovalnik na  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  za 48 h.
7. Mikrotitrsko ploščo smo centrifugirali 1,5 h pri 1300 g in  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ .
8. Odpipetirali smo po 100  $\mu\text{L}$  supernatanta v nizko (300  $\mu\text{L}$ ) mikrotitrsko ploščo v enakem vrstnem redu in analizirali z LC/MS/MS:





Slika 12: Prikaz izvedbe postopka za spremljanje hitrosti nastajanja metabolitov BPA v različnih organih.

V tabeli IX so prikazane končne koncentracije reagentov v reakcijski zmesi pred inkubacijo.

Tabela IX: Končne koncentracije reagentov v reakcijski zmesi.

	koncentracije
BPA	0,5 - 100 µM
mikrosomi	0,05 mg/ml
alameticin	0,024 mg/ml
Tris-HCl	47,62 mM
MgCl	7,62 mM
UDPGA	1,67 mM
MeOH	1%

#### • 3.2.4 Analitika

BPA, BPA-d16 in BPAG in BPAG-d16 smo določili s pomočjo sklopljene tehnik LC-MS/MS:

- UPLC: Agilent 1290 Infinity,
- kolona : Zorbax SB-C18 (50 × 2,1 mm; 1,8 µL delci); Phenomenex,
- predkolona: LunaC18 (4 × 2 mm); Phenomenex
- mobilna faza: A (voda) in B (acetonitril),

- temperatura kolone: 50 °C,
- volumen injiciranja: 1 µL,
- gradient (tabela X):

Tabela X: Program gradientnega izpiranja na koloni po injiciranju vzorca.

čas od začetka injiciranja (min)	% mobilne faze B	pretok (mL/min)
0	15	0,4
1,8	85	0,4
1,9	15	0,4

- masni analizator: Agilent 6460 s trojnim kvadropolom,
- ionski izvor (ESI+Agilent Jet Stream):
  - sušilni plin: 275°C, 5 L/min,
  - nebulizacijski plin: 30 psi,
  - Jetstream® plin: 320°C, 11 L/min,
  - napetost na kapilari: 4000 V,
  - Nozzle voltage®: 2000 V,
  - EMV: 300 V,
  - širina masne ločljivosti na prvem kvadrupolu: angl. Widest,
  - širina masne ločljivosti na tretjem kvadrupolu: angl. Wide,
  - razdelilni čas (angl. dwell time): 50 ms.

Ostali parametri kvantifikacije, MRM (ang. *Multiple reaction monitoring*), fragmentor, kolizijska energija, polarnost in retencijski čas, pa so prikazane v tabeli XI:

Tabela XI: Parametri LC-MS/MS za kvantifikacijo BPA, BPA-d16, BPAG, BPAG-d16.

analit	MRM prehod (m/z)	fragmentor	kolizijska energija [eV]	polarnost	retencijski čas [min]
BPA	227→212	130	12	-	1,792
BPA-d16	241→142	130	20	-	1,777
BPAG	403→227	130	20	-	1,039
BPAG-d16	417→241	130	20	-	1,030

## PRIPRAVA OSNOVNIH RAZTOPIN:

Osnovne raztopine smo pripravili z redčenjem 100 mM BPA do spodnjih koncentracij (tabela XII):

Tabela XII: Priprava osnovnih raztopin BPA.

izhodna raztopina (mM)	10	8	6	4	3	2	1,5	1	0,5	0,25	0,2	0,05
donorska raztopina ( $\mu$ M)	150	120	90	60	45	30	22,5	15	7,5	5,25	3	0,75
končna raztopina ( $\mu$ M)	100	80	60	40	30	20	15	10	5	3,5	2	0,5

## PRIPRAVA INTERNEGA STANDARDA (IS)

Pripravili smo 500 mL raztopine 5  $\mu$ M BPA-d16 in 0,5  $\mu$ M BPAG-d16 v metanolu.

## PRIPRAVA UMERITVENE PREMICE

a) Za časovni potek.

Pripravili smo 2 mL raztopine BPA in BPAG najvišje koncentracije (*raztopina 1*). Odpipetirali smo 500  $\mu$ L, 200  $\mu$ L in 100  $\mu$ L *raztopine 1* v nove epice in jih dopolnili do 1 mL z destilirano vodo (dobili smo *raztopine 2, 3 in 4*). *Raztopino 4* smo pripravili 2 $\times$  in nato po enakem postopku redčili naprej vse do *raztopine 10* (tabela XIII). Na ta način smo dobili raztopine BPA in BPAG s koncentracijami, katerih vrednosti so navedene v tabeli XIV.

Tabela XIII: Shema za pripravo umeritvene premice.

številka raztopine	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
volumen raztopine I ( $\mu\text{L}$ )	1000	500	200	100	500	200	100	500	200	100
volumen vode ( $\mu\text{L}$ )		500	800	900	500	800	900	500	800	900
PARALELKE:										
volumen raztopine I ( $\mu\text{L}$ )	1000			100			100			
volumen vode ( $\mu\text{L}$ )				900			900			

Tabela XIV: Koncentracije BPA in BPAG v raztopinah za umeritveni premici.

številka raztopine	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
koncentracija BPA ( $\mu\text{M}$ )	20	10	4	2	1	0,4	0,2	0,1	0,04	0,02
koncentracija BPAG ( $\mu\text{M}$ )	20	10	4	2	1	0,4	0,2	0,1	0,04	0,02

b) Za kinetiko.

Za potrebe poskusa, kjer smo spremljali kinetiko nastajanja BPAG, smo umeritveni premici naredili po zgornji shemi (tabela XIII), koncentracije BPA in BPAG v posameznih točkah umeritvenih premic so napisane v spodnji tabeli:

Tabela XV: Koncentracije BPA in BPAG v raztopinah za umeritveni premici.

številka raztopine	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
koncentracija BPA ( $\mu\text{M}$ )	100	50	20	10	5	2	1	0,5	0,2	0,1
koncentracija BPAG ( $\mu\text{M}$ )	20	10	4	2	1	0,4	0,2	0,1	0,04	0,02

### • 3.2.5 Obdelava podatkov

#### IZRAČUN INTINZIČNEGA OČISTKA ORGANA IZ *IN VITRO* PODATKOV

Za obdelavo podatkov smo uporabili program SigmaPlot 11.0, Systat Software Inc., San Jose, California. V okviru katerega smo za prilaganje krivulje uporabili orodje »Enzyme Kinetics



Module«. Tako smo dobili podatke o  $V_{max}$ ,  $K_m$  in  $K_i$  in SE (standardna napaka) pri vseh parametrih.

S pomočjo izvedbe poskusov na mikrosomih in ustrezne obdelave podatkov smo določili vrednosti  $V_{max}$  in  $K_m$ , ki nam omogočata izračun intrinzičnega očistka po formuli:

$$Cl_{int} = \frac{v_{max}}{K_m}$$

*Enačba 8*

Vsem izračunanim parametrom smo določili tudi standardno napako (SE=standard error). S tem parametrom merimo natančnost naših meritev. Manjša kot je njena vrednost, manjša je variabilnost med vzorčnimi povprečnimi vrednostmi, boljši predstavnik statistične množice je vzorec, in obratno (68). Izračunamo jo po naslednji formuli:

$$SE_{Cl} = Cl \times \sqrt{\left(\frac{SE_{v_{max}}}{v_{max}}\right)^2 + \left(\frac{SE_{K_m}}{K_m}\right)^2}$$

*Enačba 9*

Sledila je ekstrapolacija dobljene vrednosti na celoten organ po enačbi 10, ki poda intrinzični očistek organa ( $Cl_{int,o}$ ):

$$Cl_{int,o} = Cl_{int} \times \frac{mg \text{ mikrosomov}}{g \text{ organa}} \times \frac{g \text{ organa}}{kg \text{ telesne teže}}$$

*Enačba 10*

\* pri izračunu upoštevamo vrednosti prikazane v tabeli XVI.

*Tabela XVI: Človeški fiziološki in biokemični parametri pomembni pri ekstrapolaciji in vitro farmakokinetičnih podatkov (69).*

	$\frac{\text{mg mikrosomov}}{\text{g organa}}$	$\frac{\text{g organa}}{\text{kg telesne teže}}$
jetra	45	20
ledvice	45	4,4
tanko črevo	3	30

Tako smo dobili vrednost intrinzičnega očistka za celoten organ.

#### STATISTIČNA POTRDITEV: Z-test

Za statistično potrditev smo uporabili Z-test. Z-test uporabimo takrat, ko imamo normalno porazdelitev vzorcev, veliko število vzorcev ( $n > 30$ ), medsebojno neodvisne podatke, naključno izbrane posameznike in velikosti vzorcev, ki morajo biti karseda podobne. Pri Z-testu gre ponavadi za primerjavo izračunane povprečne vrednosti iz dobljenih podatkov s tabelarično vrednostjo (70).

$$Z_{\text{exp}} = \frac{\bar{cl}_1 - \bar{cl}_2}{\sqrt{SE^2_1 + SE^2_2}}$$

*Enačba 11*

Z-tabelarična $_{\alpha=0,05} = 1,96$

$\alpha$  (stopnja tveganja) = 0,05

V našem primeru ugotovimo razlike med očistki dobljenimi na različnih mikrosomih. Če se rezultati razlikujejo več kot za 1,96 gre za signifikantno razliko.

### 3.3 IZVEDBA POSKUSOV

Naše eksperimentalno delo smo razdelili na več delov:

I. **del:** Priprava BPAG in BPAG-d16:

- sinteza glukuronidov z mikrosomi,
- preparativno čiščenje BPAG in BPAG-d16,
- določitev koncentracije z  $\beta$ -glukuronidazo.

II. **del:** Časovno spremljanje nastajanja BPA-glukuronida v različnih organih:

- inkubacija 20  $\mu$ M **BPA** s človeškimi jetrnimi, črevesnimi, ledvičnimi in pljučnimi mikrosomi.

III. **del:** Kinetika nastajanja BPA-glukuronida v različnih organih:

- inkubacija različnih koncentracij **BPA** s človeškimi jetrnimi, črevesnimi in ledvičnimi mikrosomi.

IV. **del:** Ugotavljanje vpliva polimorfizma UGT1A1\*28 na kinetiko nastajanja metabolitov BPA z jetrnimi mikrosomi, genotipiziranimi za ta encim:

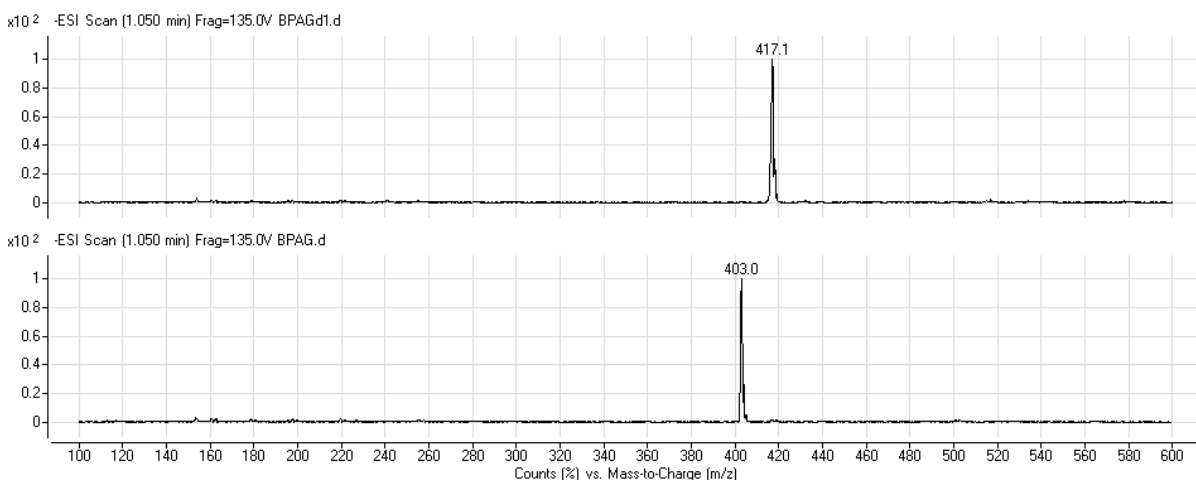
- inkubacija različnih koncentracij **BPA** z mikrosomi genotipa *UGT1A1\*1/UGT1A1\*1*,
- inkubacija različnih koncentracij **BPA** z mikrosomi genotipa *UGT1A1\*1/UGT1A1\*28*,
- inkubacija različnih koncentracij **BPA** z mikrosomi genotipa *UGT1A1\*28/UGT1A1\*28*.

## 4. REZULTATI IN RAZPRAVA

### 4.1 Rezultati sinteze BPAG in BPAG-d16

Za potrebe analitike smo sintetizirali BPAG in BPAG-d16 ter ju kasneje tudi okarakterizirali v smislu identitete, čistote in vsebnosti. Za ustrezno in zanesljivo vrednotenje metabolizma BPA smo namreč potrebovali standard metabolita (BPAG), ki ni komercialno dostopen. Hkrati smo potrebovali tudi ustrezni interni standard (IS), pri čemer je vsekakor naprimernejši strukturno soroden oziroma devteriran derivat BPAG (BPAG-d16). Z uporabo IS povečamo ponovljivost analiznega postopka, ki je lahko posledica izgub analita (v našem primeru BPA oz. BPAG) pri pripravi vzorca ali nihanja odziva instrumenta.

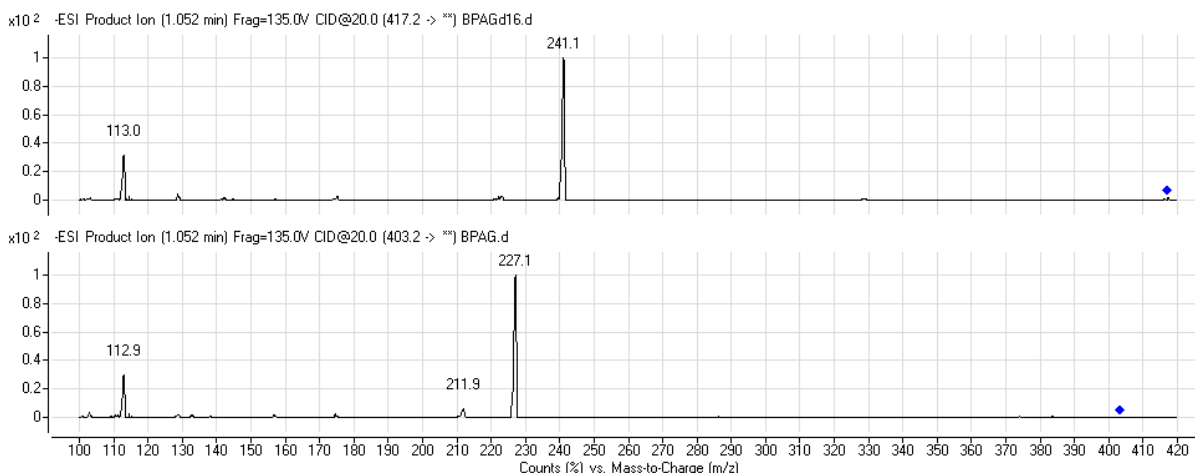
Identiteto in čistoto sintetiziranih standardov smo vrednotili z LC-MS/MS metodo. Izolirana standarda smo posamezno injicirali in v obeh primerih dobili v kromatogramu en kromatografski vrh (retencijski čas 1,05 min). Ker smo za način MS detekcije izbrali »full scan«, smo v kromatografskem vrhu posamezne substance dobili ustrezni MS spekter (Slika 13). V »full scan« spektru je prisoten samo en masni vrh; za BPAG-d16  $m/z$  417,1 in za BPAG  $m/z$  403,0. Zaradi uporabe negativne ESI ionizacije predstavlja masni pik ion substance z odcepom vodika ( $[M-H]^-$ ). S tem smo potrdili identiteto BPAG in BPAG-d16, saj je molekulska masa prvega 404 Da, drugega pa 418 Da in se ujema z MS spektroma ( $[M-H]^- = 403,0$  oz. 417,1) (slika13).



Slika 13: »Full scan« spekter kromatografskega vrha pri retencijskem času 1,05 min vzorca BPAG-d16 (zgoraj) in BPAG (spodaj).

Za dodatno potrditev identitete obeh substanc nam je služil »product ion« način detekcije, kjer smo izbrani ion ( $[M-H]^-$ ) fragmentirali (slika 14). BPAG je fragmentiral na  $m/z$  227, 212 in 113, pri čemer  $m/z$  227 predstavlja BPA (odcep glukuronske kisline od BPAG – 176),  $m/z$  212 dodaten odcep od BPA ( $-CH_3$ ) in  $m/z$  113 fragment glukuronske kisline ( $-H$ ,  $H_2O$ ,  $-CO_2$ ). Fragmentacija BPAG-d16 je potekla na enak način, kjer sta nastala značilna fragmenta  $m/z$  241,1 (BPA-d16, odcep glukuronske kisline od BPAG-d16) in 113 (fragment glukuronske kisline).

Na osnovi narejenih LC-MS/MS analiz smo potrdili identiteto BPAG in BPAG-d16. Ob tem smo določili tudi visoko čistoto posameznega standarda, saj se je pojavil le en kromatografski vrh pri »full scan« načinu MS detekcije, kar kaže na odsotnost dodatnih spojin v vzorcu standarda. Hkrati potrjujejo to domnevo tudi MS spektrer kromatografskega vrha, ker je prisoten samo 1 masni vrh v primeru obeh standardov (slika13).



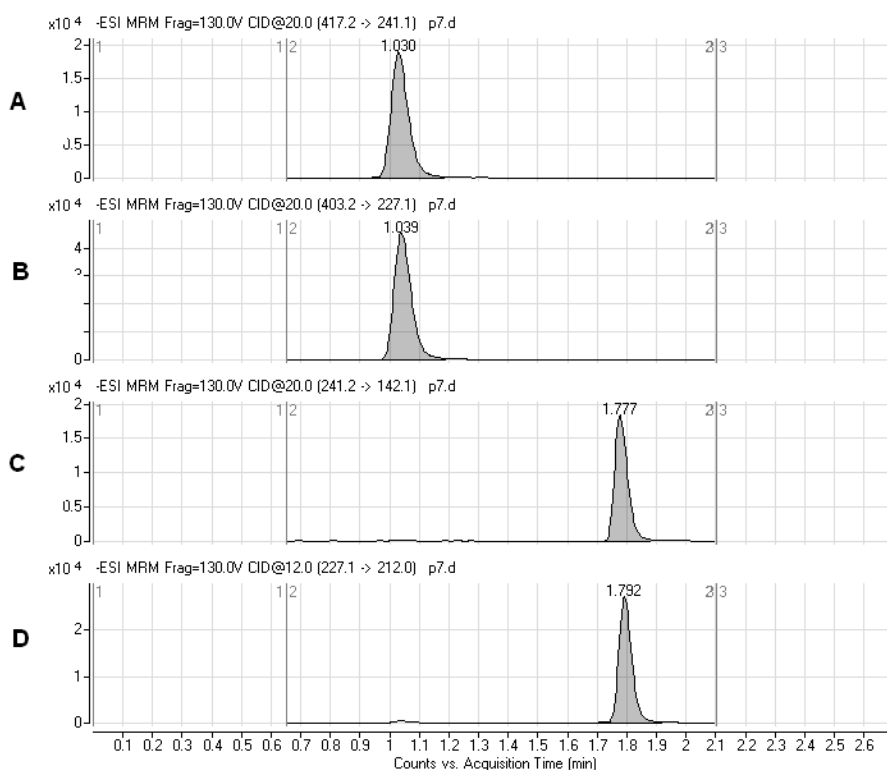
Slika 14: »Product ion« spekter kromatografskega vrha pri retencijskem času 1,05 min vzorca BPAG-d16 (zgoraj) in BPAG (spodaj).

Pred začetkom raziskav smo pripravili osnovni raztopini BPAG in BPAG-d16, ki smo ju nato uporabljali tekom celotne študije za vrednotenje obsega metabolizma BPA. Z  $\beta$ -glukuronidazo smo določili vsebnost BPAG oz. BPAG-d16. Prišlo je do cepitve glukuronske kisline, nato smo določili koncentracijo nastalega BPA oz. BPA-d16 preko umeritvene premice obeh komercialno dostopnih standardov. Cepitev obeh glukuronidov z  $\beta$ -glukuronidazo je pri izbranih eksperimentalnih pogojih potekla 100%. Na osnovi vrednotenja pri treh različnih

koncentracijah v treh paralelkah smo določili koncentracijo sintetiziranih metabolitov v osnovni raztopini:

- koncentracija BPAG-d16 je bila **5 mM**,
- koncentracija BPAG **2 mM**.

V okviru diplomske naloge smo za spremljanje nastajanja metabolita BPAG in izginjanja BPA uporabili ustrezno validirano LC-MS/MS metodo. Razvoj in vrednotenje analizne metode, ki je vključeval tudi uporabo sintetiziranih standardov ni bil predmet našega dela.

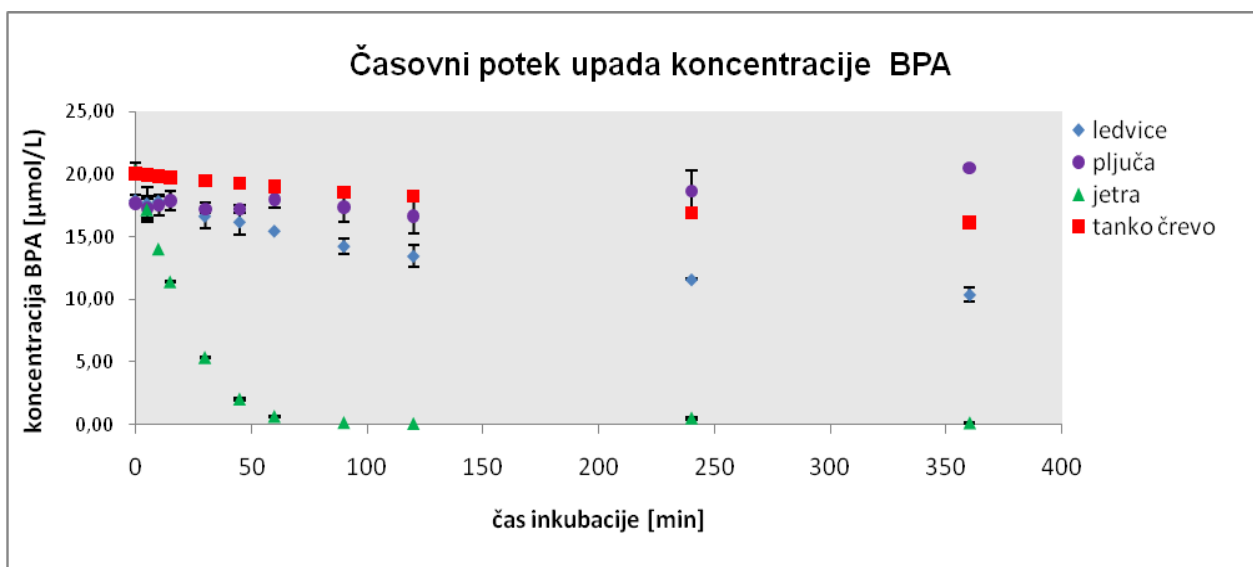


Slika 15: Kromatogram vzorca inkubata (**A**=BPAG-d16, **B**=BPAG, **C**=BPA-d16, **D**=BPA).

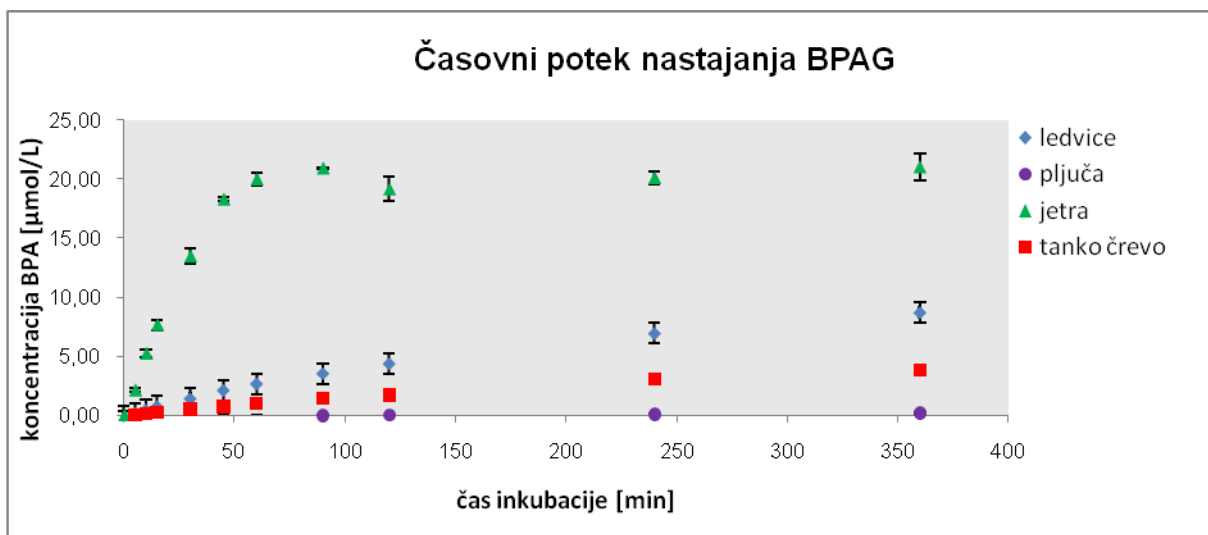
Na sliki 15 je predstavljen tipičen kromatogram vzorca inkubata z ustreznimi MRM prehod za vsako od spojin (**A**=BPAG-d16, **B**=BPAG, **C**=BPA-d16, **D**=BPA). BPAG-d16 je interni standard za BPAG, BPA-d16 pa za BPA. Zaradi strukturne podobnosti med devterirano in ne-devterirano molekulo imata oba para tudi podobne retencijske čase (1,030/1,039 min za metabolita oz. 1,777/1,792 min za osnovno substanco).

## 4.2 Rezultati spremljanja nastajanja BPA-glukuronida v različnih organih

Po opravljenih poskusih spremljanja nastajanja glukuronida v različnih organih z uporabo mikrosomov smo z LC-MS/MS izmerili odzive analitov v vzorcih in s pomočjo umeritvene premice izračunali koncentracije nastalega metabolita v inkubacijski zmesi. Rezultate smo prikazali v obliki grafov, ki prikazujejo časovni potek metabolizma testirane substance oz. nastajanje metabolita (slika 16 in slika 17).



Slika 16: Časovni potek upada koncentracije BPA v inkubacijah z jetrnimi, ledvičnimi, črevesnimi in pljučnimi mikrosomi.



Slika 17: Časovni potek nastajanja BPAG v inkubacijah z jetrnimi, ledvičnimi, črevesnimi in pljučnimi mikrosomi.

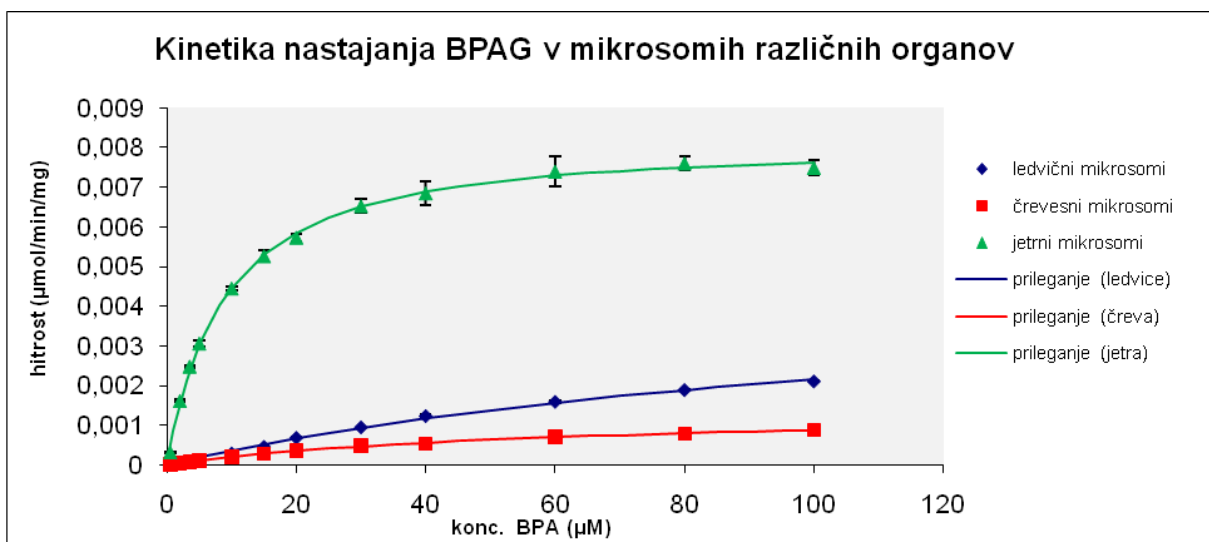
Iz grafov je razvidno, da BPAG najhitreje nastaja v jetrih, sledijo ledvice in tanko črevo, v pljučih metabolizem praktično ne poteka. Namen časovnega spremljanja metabolizma je bil določiti čas inkubacije, pri katerem so še zagotovljeni pogoji linearne kinetike. Za zagotavljanje pogojev mora v inkubacijski zmesi po ustavitvi reakcije ostati še najmanj 80% nespremenjenega substrata (71). Na podlagi tega pogoja smo določili čase inkubacij za nadaljnje ugotavljanje kinetike metabolizma na jetrnih, črevesnih in ledvičnih mikrosomih, ki so prikazani v tabeli VIII.

### 4.3 Kinetika nastajanja BPA-glukuronida v različnih organih

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



Na sliki 18 je predstavljena hitrost nastajanja glukuronida pri različnih koncentracijah BPA v inkubacijski zmesi. Posamezna točka je povprečna hitrost nastajanja metabolita izmerjena v treh paralelkah, označene so tudi standardne napake meritev. Isti podatki so obdelani tudi s programom SigmaPlot v okviru katerega smo za prileganje krivulje z metodo najmanjših odklonov uporabili orodje »Enzyme Kinetics Module«. Ob upoštevanju racionalnih omejitev vrednosti  $V_{max}$ ,  $K_m$  in  $K_i$  smo skozi posamezne točke prilegali krivuljo, ki sledi Michaelis-Mentenovi kinetiki, v primeru jeter pa Michaelis-Mentenovi kinetiki s substratno inhibicijo.



Slika 18: Kinetika nastajanja metabolita v inkubacijah z jetrnimi, ledvičnimi in črevesnimi mikrosomi.

Predvidevali smo, da poteka metabolizem po Michaelis-Mentenovi kinetiki. Iz dobljenih rezultatov lahko to potrdimo za ledvice in za tanko črevo. Pri jetrnih mikrosomih pri večjih koncentracijah substrata opazimo manjši odklon krivulje proti nižji hitrosti, zato sklepamo na Michaelis-Mentenovo kinetiko s substratno inhibicijo.

Že iz samih grafov je razvidno, da obstajajo razlike v kinetiki konjugiranja BPA med mikrosomi različnih organov. Metabolizem BPA poteka najbolj aktivno v jetrnih mikrosomih, počasneje v ledvičnih mikrosomih in najpočasneje v črevesnih mikrosomih. Vrednosti za  $V_{max}$ ,  $K_m$  in  $K_i$  smo izračunali z metodo najmanjših odklonov, uporabili smo orodje »Enzyme

Kinetics Module«. Intrinzični očistek in intrinzični očistek organa smo izračunali po formulah navedenih v uvodu (enačba 8, 10). Za vse vrednosti smo izračunali tudi standardno napako.

*Tabela XVII: Izračunani parametri encimske kinetike in očistki.*

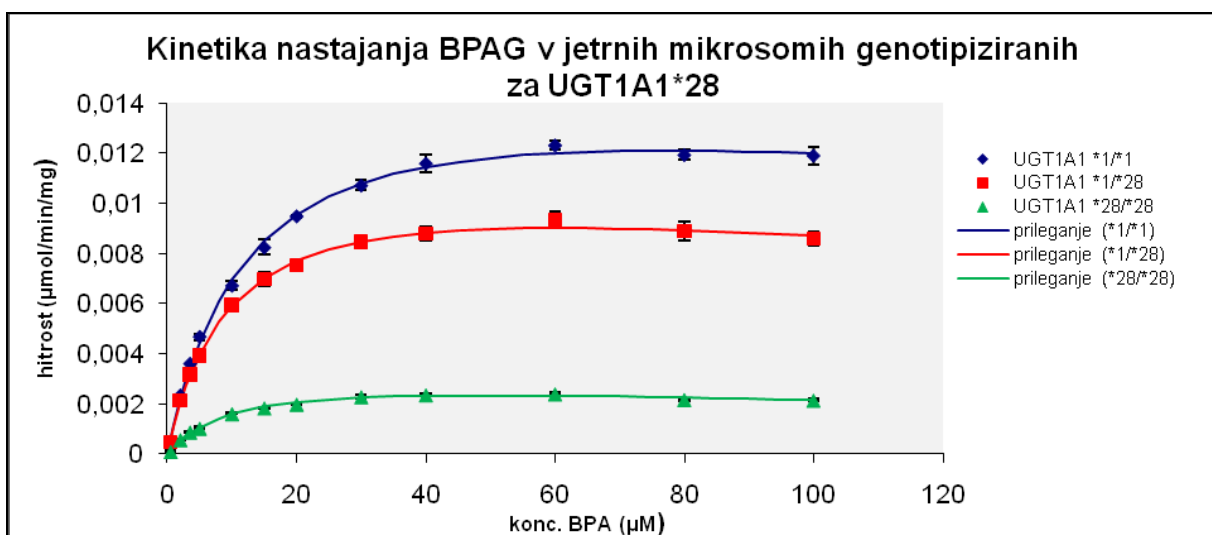
	ledvični mikrosomi	črevesni mikrosomi	jetrni mikrosomi
tip kinetike	Michaelis-Menten	Michaelis-Menten	Michaelis-Menten s substratno inhibicijo
izračuni	vrednost (SE)	vrednost (SE)	vrednost (SE)
$V_{max}$ [nmol/min/mg]	4,8 (0,2)	1,4 (0,1)	8,5 (0,4)
$K_m$ [ $\mu$ mol/L]	119,2 (9,6)	58,4 (7,8)	8,9 (0,8)
$K_i$ [ $\mu$ mol/L]			4303,0 (914,6)
$C_{int}$ [mL/min/mg]	0,040 (0,003)	0,024 (0,32)	0,95 (0,10)
$Cl_{int,o}$ [mL/min/kg]	8,0 (0,8)	2,1 (0,3)	856,8 (88,2)

Vrednosti v tabeli so predstavljene kot srednja vrednost (standardna napaka).

Vidimo, da imajo jetra daleč največji intrinzični očistek, sledijo ledvice in tanko črevo. Z izračunom očistka posameznega organa smo ugotovljeno sposobnost organov za metabolizem BPA prenesli v realne fiziološke pogoje. Tabela XVII prikazuje tudi primerjavo vrednosti intrinzičnega očistka ( $Cl_{int}$ ) in intrinzičnega očistka ekstrapoliranega na celoten organ ( $Cl_{int,o}$ ). Po pričakovanjih smo izračunali, da imajo jetra največji prispevek k metabolizmu BPA, sledijo ledvice in nato še tanko črevo. Iz primerjave dobljenih rezultatov vidimo, da imajo jetra več kot 200-krat večji intrinzični očistek v primerjavi s tankim črevesjem. To pomeni, da je prispevek slednjega zanemarljivo majhen pri obsežnem predsistemskem metabolizmu BPA (31). Do danes je znano, da se BPA pri človeku v največji meri glukuronidira z jetrnimi mikrosomi z izoenzimom UGT2B15 (12). UGT2B15 se v glavnem nahaja v jetrih, požiralniku in prostati (35). Razlog v tako velikem prispevku jeter k metabolizmu BPA je tudi ta, da imajo jetra precej večjo vsebnost mikrosomskih encimov. V jetrih imamo 45 mg proteinov na gram tkiva, medtem ko imamo na primer v črevesju 3 mg proteinov na gram tkiva. (69). Ker BPA-glukuronid nima več estrogenske aktivnosti, lahko rečemo, da so jetra glavni organ za detoksifikacijo BPA (32).

#### 4.4 Vpliv polimorfizma *UGT1A1*\*28 na kinetiko nastajanja BPA-glukuronida z mikrosomi, genotipiziranimi za ta encim.

Na sliki 19 je predstavljena hitrost nastajanja glukuronida pri različnih koncentracijah BPA v inkubacijski zmesi z genotipiziranimi jetrnimi mikrosomi. Posamezna točka je povprečna hitrost nastajanja metabolita izmerjena v treh paralelkah, označene so tudi standardne napake meritev. Isti podatki so obdelani s programom SigmaPlot. Ob upoštevanju racionalnih omejitev vrednosti  $V_{max}$ ,  $K_m$  in  $K_i$  smo skozi posamezne točke prilegali krivuljo, ki sledi Michaelis-Mentenovi kinetiki s substratno inhibicijo.



Slika 19: Kinetika nastajanja metabolita v inkubacijah z genotipiziranimi jetrnimi mikrosomi.

Iz grafov vidimo, da so prisotne razlike v kinetiki konjugiranja BPA med mikrosomi različnih genotipov *UGT1A1*. Najpočasnejši presnavljalci so homozigoti z genotipom *UGT1A1*\*28/\*28, sledijo jim heterozigoti z genotipom *UGT1A1*\*1/\*28, najvišje koncentracije metabolitov in s tem najhitrejšo presnovo BPA dosežajo homozigoti z genotipom *UGT1A1*\*1/\*1.

V tabeli XVIII so prikazani izračunani parametri encimske kinetike in očistki. Za izračun parametrov  $V_{max}$ ,  $K_m$  in  $K_i$  smo uporabili metodo najmanjših odklonov, uporabili smo orodje »Enzyme Kinetics Module«. Intrinzični očistek in intrinzični očistek organa smo izračunali po

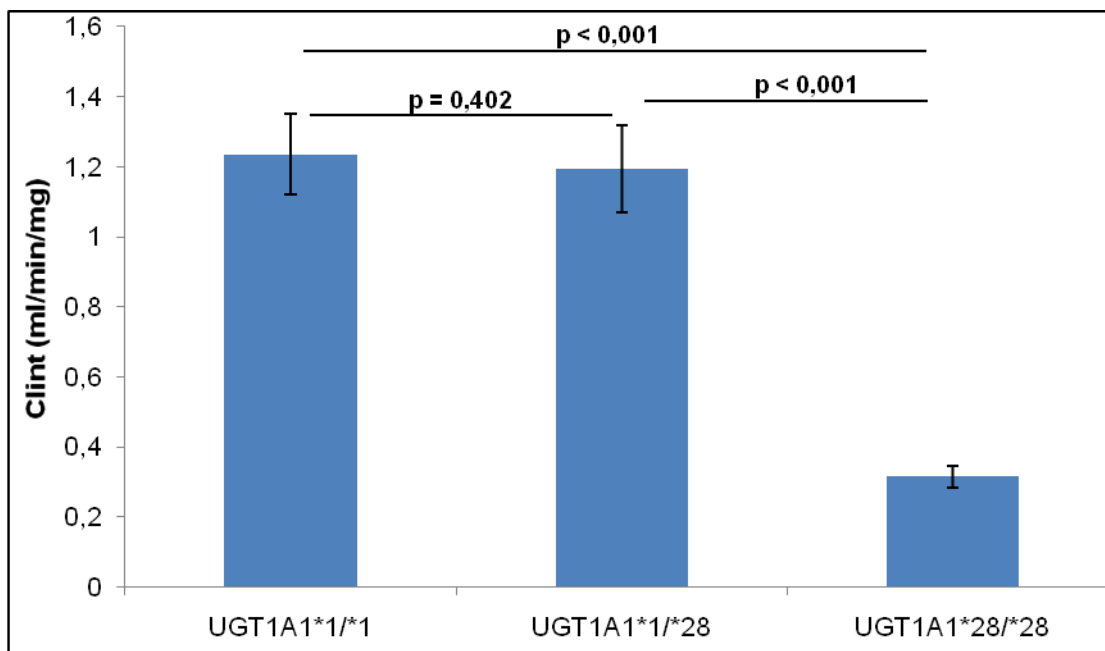
formulah navedenih v uvodu (enačba 8, 10). Za vse vrednosti smo izračunali tudi standardno napako.

Tabela XVIII: Izračunani parametri encimske kinetike in očistki

	UGT1A1 *1/*1	UGT1A1 *1/*28	UGT1A1 *28/*28
tip kinetike	Michaelis-Menten s substratno inhibicijo	Michaelis-Menten s substratno inhibicijo	Michaelis-Menten s substratno inhibicijo
izračuni	vrednost (SE)	vrednost (SE)	vrednost (SE)
$V_{max}$ [nmol/min/mg]	16,2 (0,9)	12,0 (0,5)	3,4 (0,1)
$K_m$ [ $\mu$ mol/L]	13,1 (1,1)	10,0 (0,9)	10,6 (0,9)
$K_i$ [ $\mu$ mol/L]	455,0 (121,5)	365,1 (89,1)	221,9 (36,6)
$Cl_{int}$ [mL/min/mg]	1,24 (0,12)	1,19 (0,12)	0,32 (0,03)
$Cl_{int,o}$ [mL/min/kg]	1112,6 (105,1)	1074,7 (111,4)	284,4 (27,6)

Vrednosti v tabeli so predstavljene kot srednja vrednost (standardna napaka).

Vrednosti  $K_m$  so pri vseh treh genotipih podobne, ne opazimo večjih razlik.  $V_{max}$  se ne razlikuje bistveno pri genotipu *UGT1A1*\*1/\*1 in genotipu *UGT1A1*\*1/\*28, pri genotipu *UGT1A1* \*28/\*28 je  $V_{max}$  izrazito manjša. Pri genotipu *UGT1A1*\*1/\*1 smo določili najvišji očistek. Torej prihaja pri teh homozigotih do najhitrejšega konjugiranja BPA z glukuronsko kislino, kar pomeni hitrejše pretvarjanje BPA v bolj polarno obliko in s tem hitrejše izločanje iz telesa. Pri heterozogitih smo določili malenkost nižji očistek in nižjo  $V_{max}$ , vendar razlika ni izrazita. Pri genotipu *UGT1A1* \*28/\*28 zasledimo najmanjši očistek, ki je tudi značilno manjši od prejšnjih dveh (slika 20).



Slika 20: Prikaz intrinzičnega očistka BPA z človeškimi jetrnimi mikrosomi genotipiziranimi za *UGT1A1*\*28 polimorfizem. Statistično značilno razliko predstavlja  $p < 0,05$ .

Tudi vizualni pregled grafov (slika 19) nam nakazuje pričakovane rezultate, kot jih pokaže primerjava izračunanih očistkov (slika 20). Pri večjih koncentracijah BPA opazimo manjši odklon krivulje proti nižji hitrosti. Zato smo tudi sklepali, da gre v tem primeru za Michaelis-Mentenovo kinetiko s substratno inhibicijo. Iz teh razlogov smo v tej diplomski nalogi uporabili model, ki se po vizualni oceni najbolje prilega prikazani kinetiki. Seveda obstaja možnost, da naše domneve niso čisto pravilne, na tem področju namreč ni bilo narejene študije, ki bi dovolj dobro preučila glukuronidiranje BPA preko encima *UGT1A1* in podala model, ki natančno opredeljuje kinetiko.

Za statistično potrditev ali ovržbo naših domnev smo naredili Z-test. Ugotavljali smo razlike med očistki (tabela XIX). Če se rezultati razlikujejo več kot je določena vrednost Z-tabelarična (v našem primeru 1,96) gre za statistično značilno različne očistke, če pa je Z-eksp. manjši od 1,96, pa razlika med očistki ni signifikantna.

Tabela XIX: Primerjava izračunanih Z vrednosti  $Cl_{int}$  in  $Cl_{int,o}$  med različnimi genotipi pri polimorfizmu  $UGT1A1^*28$ .

	$Cl_{int}$ [ml/min/mg]		$Cl_{int,o}$ [ml/min/kg]	
	$Z_{eksp}$	p vrednost	$Z_{eksp}$	p vrednost
*1/*1 v primerjavi z *1/*28	0,247	0,402	0,247	0,402
*1/*28 v primerjavi z *28/*28	6,889	< 0,001	6,889	< 0,001
*1/*1 v primerjavi z *28/*28	7,619	< 0,001	7,619	< 0,001

Z- tabelarična je 1,96

Ko smo primerjali očistka pri genotipu  $UGT1A1$  \*1/\*1 in genotipu  $UGT1A1$ \*/28 smo ugotovili, da se signifikatno ne razlikujeta. Pri ostalih dveh primerjavah, primerjavi  $UGT1A1$ \*/1/\*28 z  $UGT1A1$  \*/28/\*28 in pri primerjavi  $UGT1A1$  \*/1/\*1 z  $UGT1A1$  \*/28/\*28 pa smo ugotovili, da se očistka (intrinzični in intrinzični očistek organa) signifikantno razlikujeta.

Vzrok za to lahko najdemo v dedovanju, genetski polimorfizem  $UGT1A1$ \*/28 se namreč deduje avtosomno recesivno in imajo zato samo homozigoti z genotipom  $UGT1A1$  \*/28/\*28 zmanjšano sposobnost glukuronidiranja (72). Heterozigoti pa dosegajo vrednosti očistka blizu vrednostim homozigotov z genotipom  $UGT1A1$  \*/1/\*1. Za potrditev naše ugotovitve bi bilo smiselno izvesti klinično študijo, kjer bi posameznike razdelili v tri skupine glede na polimorfizem  $UGT1A1$ \*/28 in ugotavljati njihovo sposobnost metabolizma BPA.

Naše ugotovitve so vsekakor pomembne, še posebno glede na precej frekventno motnjo - Gilbertov sindrom, ki je neposredna posledica polimorfizma  $UGT1A1$ \*/28. Pojavlja se kar pri 3-10% populacije. Najpogostejši je med Afričani, kjer nastopa s frekvenco 36%, precej pogost je tudi pri Zahodnih Evropejcih z 10-13%, redkejši pri Azijcih, kjer je povprečna pojavnost sindroma 3% (44). Ob upoštevanju, da je pri tej motnji zmanjšana ekspresija  $UGT1A1$  na 20 do 30% normalne vrednosti je zaskrbljujoče predvsem dejstvo, da je prav tako zmanjšan metabolizem toksičnih substanc, tudi BPA. Zmanjšan obseg metabolizma oz. detoksifikacije

ima lahko za posledico večje tveganje za nastanek toksičnih učinkov BPA. Mednje spadajo: motnje metabolizma, reprodukcije, večja pojavnost motenj endokrinega sistema in rakavih obolenj. Izpostavljenost BPA predstavlja grožnjo za splošno zdravje ljudi, saj so ga uspeli povezati že z zelo različnimi tipi bolezni (kardiovaskularne, debelost, sladkorna bolezen, rak prostate in dojke, neplodnost, različne nevrološke bolezni) (16, 26).

## 5. SKLEPI

1. Sintetizirali in okarakterizirali smo BPA-glukuronid in BPA-d16-glukuronid za potrebe analitike, saj nobeden od njih ni komercialno dostopen.
2. Ugotovili smo, da so jetra glavni organ odgovoren za metabolizem BPA. Sledijo ledvice in nato še tanko črevo. Pri jetrnih mikrosomih smo ugotovili, da metabolizem poteka po Michaelis-Mentenovi kinetiki s substratno inhibicijo, pri ledvicah in tankem črevesju po Michaelis-Mentenovi kinetiki. V pljučih glukuronidacija ni potekala.
3. Z uporabo genotipiziranih jetrnih mikrosomov za polimorfizem *UGT1A1*\*28 smo ugotovili, da ta polimorfizem pomembno vpliva na hitrost glukuronidiranja BPA z encimom UGT1A1 v jetrih: nosilci genotipa *UGT1A1* \*28/\*28 imajo najnižji intrinzični očistek BPA, nosilci genotipa *UGT1A1* \*1/\*1 najvišji, heterozigoti pa dosegajo vrednosti intrinzičnega očistka blizu vrednosti homozigotov z genotipom *UGT1A1* \*1/\*1.
4. Na osnovi rezultatov predvidevamo, da polimorfizem *UGT1A1*\*28 in s tem spremenjena metabolna aktivnost lahko vpliva na potencialno toksičnost BPA.



## 6. LITERATURA

1. Diamanti Kandarakis E, Bourguignon JP, Giudice LC, Russ Hauser, Prins GS, Soto AM, Zoeller TR, Gore AC. Endocrine-Disrupting Chemicals: An Endocrine Society Scientific Statement. *Endocr. Rev.* 2009; 30: 293-342.
2. Walker DM, Gore AC. Transgenerational neuroendocrine disruption of reproduction. *Nat. Rev. Endocrinol.* 2011; 7 (4): 197-207.
3. <http://www.medenosrce.net/tiskaj.asp?id=1029>. Dostop: marec 2011.
4. <http://www.merckmanuals.com/professional/sec12/ch150/ch150a.html>. Dostop: marec 2011.
5. Wuttke W, Jarry H, SeidlovaWuttke D. Definition, classification and mechanism of action of endocrine disrupting chemicals. *Hormones* 2010; 9 (1): 9-15.
6. Harris CA, Hamilton PB, Runnalls TJ, Vinciotti V, Henshaw A, Hodgson D, Coe TS, Jobling S, Tyler CR, Sumpter JP. The Consequences of Feminization in Breeding Groups of Wild Fish. *Environ. Health Perspect.* 2011; 119:306–311.
7. Robins JC, Marsit CJ, Padbury JF, Sharma SS. Endocrine disruptors, environmental oxygen, epigenetics and pregnancy. *Front. Biosci. (Elite Ed)* 2011; 3: 690–700.
8. Caserta D, Mantovani A, Marci R, Fazi A, Ciardo F, La Rocca C, Maranghi F, Moscarini M. Environment and women's reproductive health. *Hum. Reprod. Update* 2011; 1-16.
9. Vrabič Dežman L. Menopavza in naravno zdravljenje. *Farm. Vest.* 2008; 77 (3): 21-27
10. <http://www.medenosrce.net/tiskaj.asp?id=1029>. Dostop: marec 2011.
11. Lintelmann J, Katayama A, Kurihara N, Shore L, Wenzel A. Endocrine disruptors in the environment. *Pure Appl. Chem.* 2003; 75: 631-681.
12. Hanioka N, Naito T, Narimatsu S. Human UDP-glucosyltransferase isoforms involved in bisphenol A glucuronidation. *Chemosphere* 2008; 74:33-36.
13. Mutashima A, Liu X, Shimohigashi M, Shimohigashi Y. Bisphenol AF Is a Full Agonist for the Estrogen Receptor ER $\alpha$  but a Highly Specific Antagonist for ER $\beta$ . *Environ. Health Perspect.* 2010; 118 (9): 1267-1272.
14. Ballesteros Gomez A, Rubio S, Perez Bendito D. Analytical methods for the determination of bisphenol A in food. *J. chromatogr. A.* 2008; 1216: 449-469.

15. Alonso Magdalena P, Ropero AB, Soriano S, Quesada I, Nadal A. Bisphenol –A: a new diabetogenic factor. *Hormones* 2010; 9 (2): 118-126.
16. Vanderberg LN, Chahoud I, Heindel JJ, Padmanabhan V, Paumgartten FJR, Schoenfelder G. Urinary, Circulating, and Tissue Biomonitoring Studies Indicate Widespread Exposure to Bisphenol A. *Environ. Health Perspect.* 2010; 118 (8): 1055-1070.
17. Yokota h, Iwano H, Edno M, Kobayashi T, Inoue H, Ikushiro S, Yuasa A. Glucoronidation of the environmental oetrogen bisphenol A by an isoform of UDP-glucuronosyltransferase, UGT2B1, in the rat liver. *Biochem. J.* 1999; 340:405-409.
18. Shibata N, Matusumoto J, Nakada K, Yuasa A, Yokota H. Male-specific suppression of hepatic microsomal UDP-glucuronosyl-transferase activities toward sex hormones in the adult male rat administered bisphenol A. *Biochem J.* 2002; 368: 783-788.
19. Mazur SC, Kenneke J.F, Hess-Willson JK, Lipscomb JC. Differences Between Human and Rat Intestinal and Hepatic Bisphenol-A Glucoronidation and the Influence of Alamethicin on In vitro Kinetic Measurements. *DMD* 2010; 3419:1-29.
20. Watabe Y, Kondo T, Imal H, Morita M, Tanaka N, Haginaka J, Hosoya K. Improved Detectability with a Polymer-based Trapping Device in Rapid HPLC Analysis for Ultra-low Levels of Bisphenol A (BPA) in Environmental Sampels. *Anal. Sci.* 2004; 20 (1): 133-137.
21. Yoshirara S, Makishima M, Suzuki N, Ohta S. Metabolic Activation of Bisphenol A by Rat Liver S9 Fraction. *Toxicol. Sci.* 2001; 62: 221-227.
22. Joint FAO/WHO Expert Meeting to Review Toxicological and Health Aspects of Bisphenol A, Summary report, Ottawa, Kanada, 1.-5. nov. 2010.
23. Ginsberg G, Rice DC. Does Rapid Metabolism Ensure Negligible Risk from Bisphenol A. *Environ. Health Pespect.* 2009; 117: 1639-1643.
24. <http://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=OJ:L:2011:026:0011:01:SL:HTML>. Dostop: marec 2011.
25. <http://www.flaska.si/steklenicke-za-dojencke-brez-bpa>. Dostop: marec 2011.

26. Muncke J. Endocrine disrupting chemicals and other substances of concern in food contact materials. An updated review of exposure, effect and risk assessment. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 2010; 3568: 1-10.
27. Elsby R, James L, Maggs, Ashby J, Kevin Park B. Comparison of the Modulatory Effects of Human and Rat Liver Microsomal Metabolism on the Estrogenicity of Bisphenol A: Implications for Extrapolation to Humans. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 2001; 297: 103-113.
28. Takayanagi S, Tokunaga T, Liu X, Okada H, Matsushima A, Shimohigashi Y. Endocrine disruptor bisphenol A strongly binds to human estrogen-related receptor  $\gamma$  (ERR $\gamma$ ) with high constitutive activity. *Toxicol. Lett.* 2006; 167: 95-105.
29. Wetherill Y.B, Akingbemi B.T, Kanno J, McLachlan J.A, Nadal A, Sonnenschein C, Watson C.S, Zoeller R.T, Belcher S.M. *In vitro* molecular mechanisms of bisphenol A action. *Reprod. toxicol.* 2007; 24: 178-198.
30. Tyl RW. Basic Exploratory Research versus Guideline-Compliant Studies Used for Hazard Evaluation and Risk Assessment: Bisphenol A as a Case Study. *Environ. Health Perspect.* 2009; 117 (11). 1644-1651.
31. Völkel W, Colnot T, Csanády GA, Filser JG, Dekant W. Metabolism and Kinetics of Bisphenol A in Humans at Low Doses Following Oral Administration. *Chem. Res. Toxicol.* 2002; 15: 1281-1287.
32. Inoue H, Tsuruta A, Kudo S, Ishii T, Fukushima Y, Iwano H, Yokota H, Kato S. Bisphenol A glucuronidation and excretion in liver of pregnant and nonpregnant rats. *Drug Metab. Dispos.* 2004; 33: 55-59.
33. Miyakoda H, Tabata M, Onodera S, Takeda K. Comparison of Conjugative Activity, Conversion of Bisphenol A Glucuronide, in Fetal and Mature Male Rat. *Journal of Health Science* 2000; 46(4): 269-274.
34. Inoue H, Hiroshi Y, Makino T, Yuasa A, Kato S. Bisphenol A glucuronide, a major metabolite in rat bile after liver perfusion. *Drug Metab. Dispos.* 2001; 29: 1084-1087.
35. Hanioka N, Oka H, Nagaoka K, Ikushiro S, Narimatsu S. Effect of UDP-glucuronosyltransferase 2B15 polymorphism on bisphenol A glucuronidation. *Toxicogenomics. Arch. Toxicol.* 2011. DOI 10.1007/s00204-011-0690-5.

36. Chiu SHL, Huskey SUW. Species differences in N-glucuronidation. *Drug Metab. Dispos.* 1998; 26(9): 838-847.
37. Ishii Y, Nurrochmad A, Yamada H. Modulation of UDP-Glucuronosyltransferase Activity by Endogenous Compounds. *Drug metab. Pharmacogenet.* 2010; 25(2): 134-148.
38. Spikova M, Strassburg CP, Braun F, Streit F, Gröne HJ, Armstrong VW, Tukey RH, Oellerich M, Wieland E. Glucoronide and glucoside conjugation of mycophenolic acid by human liver, kidney and intestinal microsomes. *Br. J. Pharmacol.* 2001; 132: 1027-1034.
39. Tukey RH, Strassburg CP. Genetic multiplicity of the human UDP-glucuronosyltransferases and regulation in the gastrointestinal tract. *Mol. Pharmacol.* 2001; 59(3): 405-14.
40. Mackenzie PI, Bock KW, Burchell B, Guillemette C, Ikushiro S, Iyanagi T, Miners JO, Owens IS, Nebert DW. Nomenclature update for the mammalian UDP-glycosyltransferase (UGT) gene superfamily. *Pharmacogenet. Genomics* 2005; 15(10): 677-85.
41. Kerdpin O, Knights KM, Elliot DJ, Miners JO. In vitro characterization of human renal and hepatic frudemide glucuronidation and identification of the UDP-glucuronosyltransferase enzymes involved in this pathway. *Biochem. Pharmacol.* 2008; 76 (2): 249-257.
42. Yamanaka H, Nakajima M, Katoh M, Yokoi T. Glucoronidation of Thyroxine in Human Liver, Jejunum and Kidney Microsomes. *Drug Metab. Dispos.* 2007; 35: 1642-1648.
43. Guillemette C, Lévesque E, Harvey M., Bellemare J, Menard V. UGT genomic diversity: beyond gene duplication. *Drug Metab. Rev.* 2009; 1-21.
44. Ostanek Barbara. Genetika in farmakogenetika Gilbertovega sindroma. *Farm. Vestn.* 2009; 60: 3-7.
45. Zhang D, Zhang D, Cui D, Gambardella J, Ma L, Barros A, Wang L, Fu Y, Rahematpura S, Nielsen J, Donegan M, Zhang H, Humphreys G. Characterization of the UDP Glucuronosyltransferase Activity of Human Liver Microsomes Genotyped for the *UGT1A1*\*28 polymorphism. *Drug Metab. Dispos.* 2007; 35: 2270-2280.

46. Beutler E, Gelbart T, Demina A. Racial variability in the UDP-glucuronosyltransferase I (UGT1A1) promoter: A balanced polymorphism for regulation of bilirubin metabolism. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1998; 95(14): 8170-8174.
47. Bosma PJ, Jayanta RC, Bakker C, Gantla C, Boer A, Oostra B, et  
-  
syndrome. *N. Engl. J. Med.* 1995; 333(18): 1171-1175.
48. Lodoso Torrecila B, Palomo Atace E, Camarena Grande C, Diaz Fernandez MC, Hierro Llanillo L, De la Vega Bueno A, Frauca Remacha E, Muñoz Bartolo G, Jara Vega P. Crigler-Najjar syndrome: Diagnosis and treatment. *An. Pediatr.* 2006; 8: 65-73.
49. <http://www.merck.com/mmpe/sec20/ch303/ch303a.html>. Dostop: april 2011.
50. Dixon M, Webb EC, Thorne CJR., Tipton KF. *Enzymes*. 3<sup>RD</sup> ed. London: Longman, 1979; 126.
51. Schnell S, Maini PK. A century of enzyme kinetics. Reliability of the Km and Vmax estimates. *Comm. Theor. Biol.* 2003; 8: 169-187.
52. Trontelj J. Raziskave metabolizma raloksifena z eksperimentalnimi modeli naraščajoče kompleksnosti, doktorska disertacija. Fakulteta za farmacijo, Univerza v Ljubljani, 2007.
53. Taavitsainen P. Cytochrome P450 isoform-specific in vitro methods to predict drug metabolism and interactions, Desertation, Department of Pharmacology and Toxicology, University of Oulu, 2001.
54. Rodrigues AD. *Drug-drug interactions*. First edition, Marcel Dekker, Inc., New York, 2002: 10.
55. Soars MG, Burchell B, and Riley RJ. In vitro analysis of human drug glucuronidation and prediction of in vivo metabolic clearance. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 2002; 301: 382-390.
56. Rayesh K. *Applications of pharmacokinetic principles of drug development*. 2003.
57. Huston BJ. Utility of in vitro drug metabolism data in predicting in vivo metabolic clearance. *Biochem. Pharmacol.* 1994; 47(9): 1469-1479.

58. Gomez Lechon MJ, Castell JV, Donato MT. Hepatocytes-the choice to investigate drug metabolism and toxicity in man. In vitro variability as a reflection of in vivo. *Chem. Biol. Interact.* 2007; 168(1): 30-50.
59. Hariparsad N, Sane RS, Strom SC, Desai PB. In vitro methods in human drug biotransformation research: implications for cancer chemotherapy. *Toxicol. In Vitro* 2006; 20(2): 135-53.
60. Baranczewski P, Stanczak A, Kautiainen A, Sandin P, Edlund PO. Introduction to early in vitro identification of metabolites of new chemical entities in drug discovery and development. *Pharmacol. Rep.* 2006; 58(3): 341-52.
61. Brandon EF, Raap CD, Meijerman I, Beijnen JH, Schellens JH. An update on in vitro test methods in human hepatic drug biotransformation research: pros and cons. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 2003; 189 (3): 233-46.
62. Bjornsson TD, Callaghan JT, Einolf HJ, Fischer V, Gan L, Grimm S, Kao J, King SP, Miwa G, NI L, Kumar G, McLeod J, Obach RS, Roberts S, Roe A, Shah A, Snikeris F, Sullivan JT, Tweedie D, Vega JM, Walsh J. The conduct of in vitro and in vivo drug-drug interaction studies: A pharmaceutical research and manufacturers of America (PhRMA) perspective. *Drug Metab. Dispos.* 2003; 31: 815-832.
63. Woolf TF. *Handbook of Drug Metabolism.* Marcel Dekker, New York, Basel 1999.
64. Skaggs MS, Foti SR, Fisher BM. A streamlined method to predict hepatic clearance using human liver microsomes in the presence of human plasma. *J. Pharmacol. Toxicol. Methods* 2006; 53: 284-290.
65. Soars MG, McGinnity DF, Grimea K, Riley RJ. The pivotal role of hepatocytes in drug discovery. *Review Chem. Biol. Interact.* 2007; 168(1): 2-15.
66. Narayanan R, LeDuc B, Williams DA. Glucuronidation of haloperidol by rat liver microsomes: involvement of family 2 UDP-glucuronosyltransferases. *Life Sci.* 2004; 74(20): 2527-2539.
67. Miners JO, Knights KM, Houston JB, Mackenzie PI. In vitro-in vivo correlation for drugs and other compounds eliminated by glucuronidation in humans: pitfalls and promises. *Biochem. Pharmacol.* 2006; 71(11): 1531-1539.
68. <http://shrani.si/f/2J/WJ/1HkYy8qF/file.pdf>. Dostop: maj 2011.

69. Soars MG, Burchell B, and Riley RJ. In vitro analysis of human drug glucuronidation and prediction of in vivo metabolic clearance. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 2002; 301: 382–390.
70. <http://www.le.ac.uk/bl/gat/virtualfc/Stats/ttest.html>. Dostop: april 2011.
71. Kwon Y. Handbook of essential pharmacokinetics, pharmacodynamics and drug metabolism for industrial scientists, Kluwer Academic/Plenum Publishers, New York, 2001: 90-91.
72. Trontelj J, Marc J, Zavratnik A, Bogataj M, Mrhar A. Effects of *UGT1A1*\*28 polymorphism on raloxifene pharmacokinetics and pharmacodynamics. *Br. J. Clin. Pharmacol.* 2009; 67(4): 437-444(8).