

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO

TANJA ŽIBRET

DIPLOMSKA NALOGA

UNIVERZITETNI ŠTUDIJ FARMACIJE

Ljubljana, 2011

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO

TANJA ŽIBRET

**IDENTIFIKACIJA PRENAŠALCEV, ODGOVORNIH ZA
PRIVZEM IN IZLOČANJE RALOKSIFENA IN
BAZEDOKSIFENA TER NJUNIH METABOLITOV V
JETRIH**

**IDENTIFICATION OF TRANSPORTERS, RESPONSIBLE
FOR THE UPTAKE AND EXCRETION OF RALOXIFENE
AND BAZEDOXIFENE AND THEIR METABOLITES IN
THE LIVER**

Ljubljana, 2011

Diplomsko naloge sem opravljala na Fakulteti za farmacijo, na Katedri za biofarmacijo in farmakokinetiko, pod mentorstvom prof. dr. Aleša Mrharja in somentorstvom asist. dr. Jurija Trontlja.

Posebna zahvala ob diplomi gre asist. Tini Trdan, mag. farm., ki je s svojo pomočjo veliko prispevala k izdelavi te diplomske naloge. Hvala tudi mentorju in somentorju in vsem, ki so delali z menoj v laboratoriju in so mi pomagali s koristnimi nasveti.

Rada bi se zahvalila tudi mojim staršem, ki so mi študij omogočili in me podpirali pri študiju. Hvala Andreju, ki me je doma čakal in bil potrpežljiv, ko sem imela veliko dela s študijem.

Izjava

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

Tanja Žibret

Predsednik diplomske komisije: izr. prof. dr. Aleš Obreza, mag. farm.

Član diplomske komisije: doc. dr. Damjan Janeš, mag. farm.

Ljubljana, junij 2011

KAZALO VSEBINE

KAZALO VSEBINE	1
POVZETEK	3
ABECEDNI SEZNAM OKRAJŠAV	4
1 UVOD	6
1.1 OSTEOPOROZA	6
1.1.1 Zdravljenje osteoporoze	7
1.2 RALOKSIFEN	9
1.3 BAZEDOKSIFEN	12
1.4 <i>IN VITRO</i> MODELI ZA PROUČEVANJE TRANSPORTA	14
1.4.1 Caco-2 celična linija	15
1.4.2 Difuzijske celice Sweetana/Grass	15
1.4.3 Vezikularni testi	16
1.4.4 Jetrne rezine	17
1.4.5 HepG2 nesmrtna celična linija	18
1.5 PRENAŠALCI	19
1.5.1 ABC družina proteinov	19
1.5.2 Prenašalci organskih anionov	23
2 NAMEN DELA	28
3 MATERIALI IN METODE	29
3.1 MATERIALI	29
3.2 METODE	31
3.2.1 Izbira prenašalcev in njihovih substratov in inhibitorjev	31
3.2.2 Izbira <i>in vitro</i> sistema	31
3.2.3 Priprava raztopin	33
3.2.4 Potek poskusa na mikrosomih	34
3.2.5 Potek poskusov na jetrnih rezinah	36
3.2.6 Potek poskusov na HepG2 celicah	39
3.2.7 Analitika	42
3.2.8 Obdelava rezultatov	45

4	REZULTATI IN RAZPRAVA	46
4.1	REZULTATI POSKUSA NA MIKROSOMIH	46
4.2	REZULTATI POSKUSOV NA JETRNIH REZINAH.....	49
4.2.1	Rezultati pozitivnih kontrol na jetrnih rezinah.....	49
4.2.2	Rezultati poskusov na jetrnih rezinah z raloksifenom.....	50
4.2.3	Rezultati poskusov na jetrnih rezinah z bazedoksifenom.....	53
4.3	REZULTATI POSKUSOV NA HepG2 CELICAH.....	55
4.3.1	Rezultati pozitivnih kontrol na HepG2 celicah	55
4.3.2	Rezultati poskusov na HepG2 celicah z raloksifenom	58
4.3.3	Rezultati poskusov na HepG2 celicah z bazedoksifenom	62
4.3.4	Drugi rezultati na HepG2 celicah	65
4.4	RAZPRAVA.....	66
4.4.1	Razprava rezultatov za raloksifen.....	66
4.4.2	Razprava rezultatov za bazedoksifen	67
4.4.3	Primerjava rezultatov raloksifena in bazedoksifena	68
4.4.4	Razprava o metabolitih.....	69
4.4.5	Razprava o rezultatih na mikrosomih.....	69
5	ZAKLJUČEK	70
6	LITERATURA	71

POVZETEK

Osteoporoza je bolezen skeleta, pri kateri pride do zmanjšanja mineralne kostne gostote s prisotnimi spremembami v mikroarhitekturi kosti. Selektivni modulatorji estrogenskih receptorjev so strukturno raznolika skupina učinkovin, ki delujejo na estrogenske receptorje kot agonisti ali kot antagonisti. Predstavnika le-teh sta raloksifen in bazedoksifen, ki se uporablja v preventivi in zdravljenju osteoporoze. Obe učinkovini imata zelo nizko biološko uporabnost. Raloksifen izkazuje med posamezniki velike razlike v farmakokinetičnih parametrih. Ker mu je bazedoksifen strukturno podoben, lahko tudi pri njem pričakujemo podobne težave. Naš cilj je bil identificirati prenašalce, s katerimi se raloksifen in bazedoksifen prenašata v jetrne celice in iz njih in s tem poskušati pojasniti takšne raznolikosti v farmakokinetiki učinkovin. Poskuse smo izvajali na *in vitro* modelu podganjih jetrnih rezin in HepG2 celični liniji, ugotavljni pa smo prenašanje učinkovin s P-glikoproteinom (P-gp), MRP (ang. »multidrug resistance-associated protein«) prenašalcem, BCRP (ang. »breast cancer resistance protein«) prenašalcem in OATP (ang. »organic anion transporting polypeptide«) prenašalcem. Ugotavljni smo razlike v koncentracijah učinkovin med poskusi z in brez inhibitorja določenega prenašalca. Iz rezultatov na jetrnih rezinah lahko z veliko verjetnostjo sklepamo, da se raloksifen prenaša s P-gp, OATP in MRP prenašalcem, bazedoksifen pa z OATP prenašalcem. Rezultati na HepG2 celicah so za raloksifen potrdili sklepe na jetrnih rezinah, rezultati za bazedoksifen pa so pokazali, da je bazedoksifen substrat še za P-gp in BCRP prenašalec in da po vsej verjetnosti ni substrat MRP prenašalcev. Iz vseh poskusov zato lahko predvidevamo, da se raloksifen z veliko verjetnostjo v hepatocite prenaša z OATP prenašalcem, iz hepatocita pa z P-gp prenašalcem in MRP prenašalcem. Pri bazedoksifenu lahko predvidevamo le izločanje iz hepatocita s P-gp in BCRP prenašalcema. Po vsej verjetnosti se bazedoksifen v hepatocite prenaša z OATP prenašalcem. Pri raloksifenu smo ugotovili, da mora obstajati še nek drug privzemni prenašalec, za katerega je substrat, ki pa ga mi nismo identificirali. Ti rezultati kažejo na to, da so tudi prenašalci v enterocitih in hepatocitih pomemben dejavnik, ki vpliva na biološko uporabnost in farmakokinetične parametre raloksifena in bazedoksifena.

Prenašalci omogočajo učinkovinama tudi enterohepatično cirkulacijo.

ABECEDNI SEZNAM OKRAJŠAV

ABC	ATP-vezavna domena (ang. »ATP-binding cassette«)
ADP	adenozindifosfat
ATP	adenozintrifosfat
BAZ	bazedoksifen
BCRP	resistenten protein izoliran pri raku na dojki (ang. »breast cancer resistance protein«)
CYP 450	družina citokromov P450
DIDS	4,4'-diizotiocianostilben-2,2'-disulfonska kislina
DMSO	dimetilsulfoksid
E-3-S	estron-3-sulfat
EPHX	epoksidne hidrolaze
ER	estrogenski receptor
ER α oz. ER β	estrogenski receptor alfa oz. beta
FLU	fluorescein
GST	glutation-S-transferaza
HDL	lipoproteini visoke gostote (ang. »high density cholesterol«)
HNZ	hormonsko nadomestno zdravljenje
HPLC	tekočinska kromatografija z visokim pritiskom (ang. »high pressure liquid chromatography«)
LC	tekočinska kromatografija (ang. »liquid chromatography«)
LC-MS/MS	sklopljen sistem tekočinske kromatografije in tandemnskega masnega spektrometra
LDL	lipoproteini visoke gostote (ang. »low density cholesterol«)
M1	metabolit raloksifena – raloksifen-6-glukuronid
M2	metabolit raloksifena – raloksifen-4'-glukuronid
M3	metabolit raloksifena – raloksifen-6,4'-diglukuronid
M4	metabolit bazedoksifena – bazedoksifen-4'-glukuronid
M5	metabolit bazedoksifena – bazedoksifen-5-glukuronid
M6	metabolit bazedoksifena – bazedoksifen-5,4'-diglukuronid
min	minuta (čas)

MCF-7	celična linija človeškega raka dojk (ang. »human breast tumor cell line«)
MDR	protein povezan z resistenco več spojin (ang. »multidrug resistance protein«)
MKG	mineralna kostna gostota
MRP	družina proteinov povezanih z resistenco na več spojin (ang. »multidrug resistance-associated protein«)
MS	masni spektrometer
MXR	na mitoksantron resistenten protein (ang. »mitoxantrone resistance«)
NAT	<i>N</i> -acetiltransferaza
OATP	polipeptidi, ki prenašajo organske anione (ang. »organic anion transporting polypeptide«)
PBS	raztopina fosfatnega pufra (ang. »phosphate buffer solution«)
P-gp	P-glikoprotein
RAL	raloksifen
RANK	receptor za aktivator jedrnega dejavnika kapa B
RANKL	ligand receptorja za aktivator jedrnega dejavnika kapa B
Rho123	rodamin 123
SERM	selektivni modulatorji estrogenskih receptorjev (ang. »selective estrogen receptor modulator«)
SLC21	ang. »solute carrier family 21«
SULT	sulfoniltransferaza
UGT	uridindifosfat glukuronil transferaza
UGT1A1	uridindifosfat glukuronil transferaza iz družine 1, poddružine A, encim 1

1 UVOD

1.1 OSTEOPOROZA

Osteoporoza je nesimptomatska sistemska bolezen skeleta, pri kateri pride do zmanjšanja kostne mase za več kot 2,5 standardnih deviacij glede na največjo kostno maso v odrasli dobi s prisotnimi spremembami v mikroarhitekturi kosti. Te spremembe v kosti vodijo v povečano tveganje za zlome kosti že ob najmanjših poškodbah, še posebej za zlome vretenc, kolka in zapestja. Je ena izmed najpogostejših motenj v starejši populaciji in predstavlja pomemben javno zdravstveni problem [1, 2, 3].

V Sloveniji je prevalenca osteoporoze pri ženskah po 50. letu 27,5 %, pri moških po 60. letu pa 14,6 % [2]. V ZDA so ugotovili, da je vsaj 90 % zlomov medenice in vretenc med starejšimi belimi ženskami in več kot 70 % med starejšimi belimi moškimi povezanih z osteoporozo. Pojav osteoporoznih zlomov vodi v veliko smrtnost, obolenost, zmanjšano mobilnost in zmanjšano kvaliteto življenja. To breme zdravstva je že zdaj veliko in še raste zaradi staranja prebivalstva [1].

Pomemben kazalec trdnosti kosti in tveganja za osteoporozni zlom je mineralna kostna gostota (MKG), ki jo ocenjujejo z enoenergijsko absorpciometrijo (SXA), dvoenergijsko absorpciometrijo (DXA), kvantitativno računalniško tomografijo ter ultrazvočno kvantitativno ultrasonografijo. Kostno gostoto merijo najpogosteje v področju ledvenih vretenc in kolka. Vse več študij pa kaže, da tveganje za zlom raste hitreje kot lahko opazimo zmanjšanje MKG. Na trdnost kosti ne vpliva le MKG, ampak tudi več drugih dejavnikov kot sta velikost kosti in njena mikroarhitektura [1].

Razlogov za nastanek osteoporoze je več. Izvirajo lahko že iz mladosti, če se ljudje ne gibljejo dovolj. Do petindvajsetega leta starosti človek doseže svojo največjo MKG, na kar lahko vpliva predvsem s prehrano, bogato s kalcijem in vitaminom D, in s čim več telesne dejavnosti. Sekundarno se osteoporoza lahko razvije zaradi revmatoidnega artritisa, malabsorpcijskega sindroma, prevelike uporabe tiroksina, ciklosporina in glukokortikoidov. Pri ženskah se pojavi osteoporoza v največji meri po menopavzi, za kar je odgovoren primanjkljaj estrogena (pomenopavzna osteoporoza). Delovanje estrogena na kostno remodelacijo še ni čisto razjasnjeno, predvidevajo pa, da estrogen inhibira citokine,

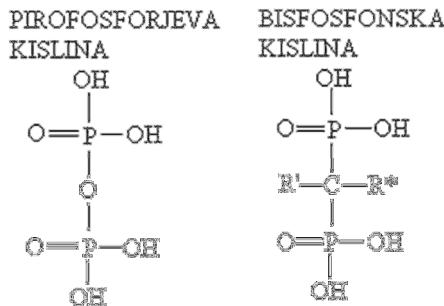
ki spodbudijo delovanje osteoklastov, zmanjšuje osteoklastogenezo, povzroča apoptozo osteoklastov in nasprotuje resorpciji kostnine tako, da zmanjša izplavljanje kalcija posredovano s paratiroidnim hormonom. Pri starejših moških pride do zmanjšanja nastajanja estrogena iz androgenskega predhodnika. Ker pride do tega pozneje kot pri ženskah, se pojavi osteoporoza pri moških bolj pozno (senilna osteoporoza) [1, 4].

1.1.1 Zdravljenje osteoporoze

Kot osnovno terapijo pri preventivi in zdravljenju osteoporoze se priporoča ustreznost jemanje kalcija in vitamina D ter njegovih metabolitov. Na dan se priporoča 1000 – 1200 mg kalcija in 800 – 1000 E (okrog 25 µg) holekalciferola. Vitamin D je pomemben za absorpcijo kalcija v črevesju [4].

Ostala zdravila lahko razdelimo na zdravila, ki zmanjšujejo razgradnjo kosti (A), zdravila, ki povečajo izgradnjo kosti (B) in zdravila, ki zmanjšujejo razgradnjo kosti in povečajo njen izgradnjo (C).

Bisfosfonati so encimsko odporni analogi pirofosfata, ki zavirajo resorpcijo kosti. Vežejo se na kostne minerale v kostnem matriksu in se iz njih počasi ali skoraj ne sproščajo zaradi delovanja osteoklastov. Kljub temu, da se zelo slabo absorbirajo, pa je njihova koncentracija v telesu velika, ker ostajajo v kosteh. Ob jemanju te učinkovine lokalno dražijo želodec. Med bisfosfonate spadajo alendronat (in njegova kislina), zolendronska kislina, risedronat, pamidronat in kladronat. Bisfosfonati spadajo v skupino zdravil A [4]. Splošna struktura bisfosfonatov je prikazana na sliki 1.



Slika 1 – Kemijska struktura pirofosforjeve kislinske in bisfosfonske kisline.

Hormonsko nadomestno zdravljenje (HNZ) pri ženskah nadomešča pomanjkanje estrogena. Estrogen povečuje izgradnjo in zmanjšuje razgradnjo kostnega tkiva (zdravila C). A estrogen ne deluje le na kosti, ampak na vse tkiva, s čimer so povezani neželeni učinki te terapije: zadrževanje vode, bolečine v dojkah, ponovitev menstruacijskega cikla,

razvije se lahko tudi rak dojk in endometrija maternice. Estrogen lahko dajemo peroralno (konjugirani estrogeni, estradiol, estriol), vaginalno, s transdermalnimi obliži ali subkutanimi implantati [1, 4].

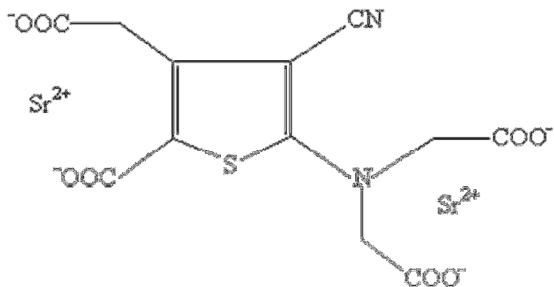
Selektivni modulatorji estrogenskih receptorjev (SERM) spadajo v skupino A. So strukturno raznolika skupina učinkovin, ki se vežejo na estrogenski receptor (ER) in izkazujejo mešano aktivnost na njem. Razvili so jih z namenom selektivnega delovanja na estrogenске receptorje v različnih tkivih, da bi se izognili neželenim učinkom HNZ [5]. Imamo tri skupine učinkovin – trifeniletileni, benzotiofeni in indolski derivati [6]. Med trifeniletilene spadata npr. ormeloksifen, tamoksifen. Ti imajo antagonističen učinek na dojke, a delujejo stimulativno na endometrij maternice, kar ni zaželeno. Uporabljajo se pri estrogensko odvisnem raku dojk [7]. V benzotiofensko skupino spadata npr. raloksifen in arzoksifen, ki imata agonistično aktivnost na ER v kosteh, krvnem obtoku in v centralnem živčnem sistemu ter antagonistično aktivnost na ER v dojkah in endometrij maternice [5, 6]. Uporabljata se v preventivi in zdravljenju osteoporoze. V indolsko skupino spada bazedoksifen, ki deluje enako kot benzotiofenska skupina in se uporablja pri zdravljenju osteoporoze [6].

Za vezavo SERM na ER je pomembna prisotnost fenolne skupine v molekuli [8]. Ko se SERM veže na membransko vezan ER, spremeni njegovo konformacijo, kompleks se veže na DNA in sproži transkripcijo. ER je jedrni receptor in poznamo dva podtipa ER, alfa (ER α) in beta (ER β). ER α se nahaja v dojkah in endometriju maternice, ER β pa v kosteh, v srcu, v endoteliju in drugih tkivih [9]. Na učinek SERM v določenem tkivu vpliva različno izražanje podtipov ER v tkivih, različne konformacije ER-ligand in različne vezave ER-ligand-kompleksa na dele DNA za regulatorne proteine [5].

Paratiroidni hormon nima velike učinkovitosti, a se je izkazalo, da hormon in njegovi fragmenti stimulirajo aktivnost osteoblastov in povečajo izgradnjo kostnine. V ta namen se uporablja teriparatid, peptidni fragment rekombinantnega paratiroidnega hormona [4]. Spada v skupino zdravil B.

Stroncijev ranelat hkrati poveča tvorbo kosti in zmanjšuje resorpcijo kosti in tako povečuje kostno maso in trdnost kosti [4, 10]. Spojina je sestavljena iz dveh ionov stabilnega izotopa stroncija in ene molekule ranelske kisline, organske dela, ki je odgovoren za farmakokinetiko in prenašanje zdravila [11]. Absorpcija iz

gastrointestinalnega trakta je zelo slaba, poslabša jo mleko. Mehanizem delovanja ni povsem jasen. Stroncijevi ioni se adsorbirajo na hidroksiapatitne kristale in se s časom zamenjajo za kalcij, a ostanejo dolgo časa v kosteh [4]. Zaradi visoke cene ga predpisujejo le bolnicam, pri katerih so bisfosfonati neučinkoviti ali jim povzročajo neželene učinke [12]. Spada v skupino zdravil C. Struktura stroncijevega ranelata je prikazana na sliki 2.



Slika 2 – Kemijska struktura stroncijevega ranelata ($C_{12}H_6N_2O_8SSr_2$).

Kalcitonin deluje kot zelo šibek zaviralec kostne razgradnje (skupina zdravil A). Deluje tako, da se veže na specifičen receptor na osteoklastih in inhibira njihovo delovanje. V ledvicah zmanjša reabsorpcijo kalcija in fosfata v proksimalnih tubulih. Njegov glavni učinek je zmanjšanje plazemske koncentracije kalcija. V terapiji osteoporoze se uporablja le redko [4].

Denosumab (protitelo proti ligandu receptorja za aktivator jedrnega dejavnika kapa B, RANKL) je novo biološko zdravilo (monoklonsko protitelo) za zdravljenje osteoporoze. Uporablja se ga kot podkožni implantat in se ga injicira 60 mg dvakrat na leto. Deluje tako, da se veže na RANKL. RANKL je telesu lastna spojina, ki se veže na receptor za aktivator jedrnega dejavnika kapa B (RANK) in pospeši razmnoževanje osteoklastov in njihovo aktivacijo. RANKL je močan aktivator kostne razgradnje in če ga inhibiramo, zaustavimo kostno razgradnjo [13]. Učinkovina je danes že v uporabi, zdravilo pa je registrirano tudi v Sloveniji. Spada v skupino zdravil A.

1.2 RALOKSIFEN

Raloksifen (RAL) spada v benzotiofensko skupino SERM. Veže se na ER in z njim interagira, deluje kot estrogenski agonist v kosteh in jetrih ter kot estrogenski antagonist v tkivu dojk in maternice. Predstavlja alternativo HNZ pri ženskah po menopavzi v preventivi in zdravljenju osteoporoze ter srčno-žilnih boleznih [14]. Raloksifen izkazuje linearno farmakokinetiko z visoko variabilnostjo med osebami za večino

farmakokinetičnih parametrov [14]. Vzdrževanje ustrezne plazemske koncentracije je doseženo z odmernim intervalom enkrat na dan.

Absorpcija

Raloksifen se hitro absorbira po peroralni aplikaciji [14, 15], absorpcija je ocenjena na okrog 60 % [14, 16]. Absolutna biološka uporabnost raloksifena je zaradi obsežnega predsistemskega metabolizma le 2 % [14, 15, 16]. Maksimalne plazemske koncentracije raloksifena in sekundarni vrhovi metabolitov raloksifena se tipično pojavijo okrog 6 ur po aplikaciji [14]. Hrana naj ne bi imela vpliva na absorpcijo [14, 15]. Navidezni logP za RAL je okrog 5,5 [17].

Porazdelitev

Raloksifen se močno porazdeli po telesu, po enem odmerku je navidezni volumen 2348 L/kg in ni odvisen od odmerka [14, 16]. Raloksifen in njegovi monoglukuronidni metaboliti se močno vežejo na plazemske proteine (več kot 95 %), vključno z albuminom in α -1 kislom glikoproteinom, a ne na globuline, ki vežejo steroide [14, 15].

Metabolizem

Raloksifen je podvržen obsežni predsistemske glukuronidaciji, pri prvem prehodu skozi jetra se v celoti metabolizira [16]. Z uridindifosfat glukuronil transferazami (UGT) se pretvori v konjugate z glukuronsko kislino. Nastane raloksifen-4'-glukuronid (M1), raloksifen-6-glukuronid (M2) in raloksifen-6,4'-diglukuronid (M3). Nekonjugiranega raloksifena je v plazmi malo, manj kot 1 % [14, 18]. Struktura RAL in njegovih metabolitov je prikazana v tabeli 1.

Izločanje

Raloksifen se primarno izloča z blatom in le malo s sečem (manj kot 6 %) [16]. Po intravenski aplikaciji je očistek RAL enak pretoku skozi jetra, kar je možno pripisati izključno metabolizmu. Peroralni očistek je 44,1 L/(kg*h) [14]. Metaboliti raloksifena so ponovno uporabljeni z reverzibilnim sistemskim metabolizmom in enterohepatično cirkulacijo – vse to pa podaljša plazemski razpolovni čas izločanja na 27 ur po peroralni aplikaciji [14, 15]. Pri kronični terapiji je očistek v območju med 40 do 60 L/(kg*h) [14].

Tabela 1 – Tabela prikazuje kemijsko strukturo raloksifena in njegovih metabolitov.

	R ¹	R ²
raloksifen	H	H
raloksifen-4'-glukuronid (M1)	H	
raloksifen-6-glukuronid (M2)		H
raloksifen-6,4'-diglukuronid (M3)		

Učinek

RAL poveča MKG v ledvenih vretencih, v kolku in v vratu stegnenice [15]. RAL zniža vrednosti kazalcev kostne premene do enakih vrednosti kot jih imajo ženske pred menopavzo [15]. V 24 mesecih zniža serumsko koncentracijo celotnega holesterola in LDL-holesterola [15]. Že po 6 mesecih terapije s 60 mg in 120 mg RAL na dan so opazili znižanje serumskega LDL-holesterola za okrog 12 % v primerjavi s placebom [15]. Serumske vrednosti HDL-holesterola so ostale po terapiji z RAL nespremenjene. Na podganah so ugotovili, da RAL minimalno učinkuje na maternico in ne povzroča sprememb v debelini endometrija [15]. V primerjavi s placebom malo, a signifikantno, poveča mokro težo maternice pri podganah [8]. Kot neželeni učinek so preiskovanke navajale več vročinskih navalov v primerjavi s placebom in opazili so tromboembolijske dogodke [14, 15].

1.3 BAZEDOKSIFEN

Bazedoksifen (BAZ) je predstavnik tretje generacije SERM in ima v strukturnem jedru indol. Nima steroidne kemijske strukture kot estrogen, a je njegova terciarna struktura takšna, da se z lahkoto veže na ER [1, 19]. BAZ se veže na ER α in ER β z visoko afiniteto [8]. Za ER α ($IC_{50} = 26$ nM) ima okrog štirikrat večjo afiniteto kot za ER β ($IC_{50} = 99$ nM) [20]. V primerjavi z RAL in 17- β -estradiolom ima BAZ desetkrat nižjo afiniteto do ER α in je manj selektiven za ER α kot RAL [8, 9]. BAZ izkazuje pozitivne učinke na kosti, na kazalce kostne premene in na lipidni profil brez stimulacije celic endometrija in raka dojk.

Absorpcija

BAZ se hitro absorbira, za dosego najvišje plazemske koncentracije po peroralni aplikaciji je potreben čas okrog 2 ur (t_{max}) [19, 20, 21]. BAZ izkazuje linearno zvišanje plazemskih koncentracij pri enkratnih odmerkih od 0,5 mg do 120 mg in večkratnih odmerkih od 1 mg do 80 mg [21]. Absolutna biološka uporabnost BAZ je 6 %, biološka uporabnost za tablete in kapsule po peroralni aplikaciji pa je enaka [19, 20, 21]. Ker so na plazemskem profilu opazili sekundarne vrhove, sklepajo na enterohepatično cirkulacijo. BAZ se lahko aplicira neodvisno od hrane [20, 21]. Na Caco-2 celicah so določili vrednosti navideznega porazdelitvenega koeficiente med 0,71 in $1,33 \times 10^6$ cm/s (izračunan logP je med 6,1 in 5,8), kar nakazuje dobro pasivno permeabilnost BAZ in podpira teorijo o dobri absorpciji [22].

Porazdelitev

Po intravenski aplikaciji tri miligramskega odmerka BAZ je porazdelitveni volumen $14,7 \pm 3,9$ L/kg [20, 21]. BAZ se *in vitro* v veliki meri veže na plazemske proteine (več kot 99 %) [19, 20, 21, 23]. Pri poskusih na podganah je površina pod krivuljo koncentracije po času po večkratnem odmerjanju večja kot tista po enem odmerku, kar nakazuje, da se BAZ akumulira v plazmi in tkivih po večkratnem odmerjanju [20].

Metabolizem

Po peroralni aplikaciji se BAZ intenzivno metabolizira. Velik del učinkovine zapade metabolismu prvega prehoda. Najpomembnejša pot metabolizma je glukuronidacija z UGT encimi, opazili pa so zelo malo ali skoraj nič metabolitov, ki bi nastali z citokromom P450 [19, 20, 21]. Večina BAZ v krvi je v obliki metabolitov, večinoma (40 % - 95 %) v obliki

bazedoksifen-5-glukuronida (M5). V krvi se nahaja še bazedoksifen-4'-glukuronid (M4, do 20 %) in nespremenjeni BAZ (0 – 13 %). Nastane lahko še diglukuronid (M6) [19].

Struktura BAZ in njegovih metabolitov je prikazana v tabeli 2.

Tabela 2 – Kemijska struktura bazedoksifena in njegovih metabolitov.

	R	R ¹
bazedoksifen	H	H
bazedoksifen-4'-glukuronid (M4)		H
bazedoksifen-5-glukuronid (M5)	H	
bazedoksifen-5,4'-diglukuronid (M6)		

Izločanje

Po peroralni aplikaciji radioaktivno označenega BAZ se v izločkih v 10 dneh pojavi 85,6 % odmerka. Najpomembnejša pot izločanja je z blatom (84,7 %) in le majhen del učinkovine se izloči z urinom (0,81 %) [19]. BAZ se izloča s srednjim razpolovnim časom izločanja okrog 30 ur [19, 20], kar nakazuje počasno izločanje. Navidezni peroralni očistek BAZ je približno 4 do 5 L/(kg*h) [21]. Na podganah so ugotovili, da se tudi po intravenski aplikaciji največ BAZ nahaja v blatu, kar kaže na močno izločanje BAZ z žolčem [24]. V vzorcih podganjega žolča so opazili največ M4 in M5, nespremenjen BAZ je v sledovih [24]. V blatu podgan so ugotovili največ nespremenjenega BAZ [24]. Tudi v blatu pomenopavznih žensk po peroralni aplikaciji BAZ so ugotovili največ nespremenjenega BAZ [19]. Nespremenjen BAZ v blatu razlagajo s tem, da je to manjši delež

neabsorbiranega BAZ ali pa je to z žolčem in iz enterocitov izločen BAZ v obliki glukuronidov, ki se je hidroliziral s pomočjo črevesnih bakterijskih encimov [19].

Učinki

Terapija z 20 mg in 40 mg BAZ že po 24 tednih signifikantno poveča MKG v ledvenih vretencih v primerjavi s placebo skupino, kjer se MKG celo zniža. MKG se poveča tudi v kolku in vratu stegnenice. Pri ženskah po menopavzi z zelo visokim tveganjem za zlom vretenc ima BAZ večji učinek, bolj zmanjša tveganje za zlom, hkrati pa zmanjša tudi tveganje za nevretenčne zlome. Po 12 tednih so opazili signifikantno znižanje vrednosti kazalcev kostne premene (serumskega *C*-terminalnega telopeptida, serumskega *N*-terminalnega telopeptida, serumskega osteokalcina in urinskega *N*-terminalnega telopeptida) v primerjavi s placeboom [25]. BAZ ne stimulira proliferacije MCF-7 celic (celična linija človeškega raka dojk), a inhibira s 17-β-estradiolom povzročeno proliferacijo [8]. Pri poskusu na neodraslih podganah je BAZ zelo malo povečal mokro maso maternice (35 %) v vseh odmerkih. Povečanje mase je zanemarljivo, ker je v skupini, ki je dobivala etinilestradiol, to povečanje znašalo 406 %, v skupini, ki je dobivala RAL, pa 80 % [8]. BAZ inhibira stimulacijo celic maternice, ki jo je povzročil RAL [9]. BAZ je v odmerku 20 mg in 40 mg signifikantno znižal raven celokupnega holesterola v krvi v primerjavi s placeboom. Signifikantno je zmanjšal tudi raven LDL-holesterola, raven HDL-holesterola pa se je v primerjavi s placeboom zvišala, a povišanje ni bilo signifikantno [25].

1.4 IN VITRO MODELI ZA PROUČEVANJE TRANSPORTA

Raziskave absorpcije učinkovin lahko izvajamo na primernih živalskih modelih, bodisi *in vivo* bodisi *in situ*, ali na izrezanih tkivih človeka in živali ali na pripravljenih celičnih linijah. Kljub temu, da so študije na celičnih linijah in na živalskih tkivih cenejše in vzamejo manj časa kot študije na ljudeh, obstajajo razlike v izražanju in substratnem profilu za prenašalce in metabolične encime. To lahko vodi v napačne zaključke. V nadaljevanju bomo na kratko predstavili *in vitro* modele, ki se uporabljajo za proučevanje transporta učinkovin: Caco-2 celice, model Sweetana/Grass, vezikularne teste, podganje jetrne rezine in HepG2 nesmrtno celično linijo. Tekom našega diplomskega dela smo poskuse izvedli na podganjih jetrnih rezinah in HepG2 celični liniji.

1.4.1 Caco-2 celična linija

Med *in vitro* sistemi je celična linija raka debelega črevesa (ang. »colon carcinoma cell line«, Caco-2) eden najširše uporabljenih modelov za napovedovanje absorpcije učinkovin iz črevesja [26]. Če jih gojimo v monosloju, se diferencirajo in oblikujejo zelo tesne stike med celicami, zaradi česar jih lahko uporabljam kot model za paracelularni prehod učinkovin preko epitelija [27, 28]. Vendar pa ti tesni stiki predstavljajo oviro za hidrofilne spojine, ki prehajajo preko epitelija ravno skozi te stike [28]. Caco-2 celice izražajo na svoji površini različne prenašalce (P-gp in MRP2), izločevalne proteine in metabolne encime II. faze metabolizma [26, 27]. Ena izmed funkcionalnih razlik med normalnimi celicami in Caco-2 celicami je pomanjkanje izražanja izoencimov citokroma P450 v Caco-2 celicah, zlasti CYP3A4, ki je v normalnem človeškem črevesju dobro izražen. Vendar lahko izražanje CYP3A4 spodbudimo z dodajanjem vitamina D3 [27]. Zaradi prisotnosti metabolnih encimov in prenašalcev se večkrat uporablja kot *in vitro* model za določanje navideznega permeabilnostnega koeficiente in za oceno interakcij med učinkovinami ali med učinkovinami in sestavinami hrane. Caco-2 celične monosloje gojijo na semipermeabilni plastični podlagi, ki je fiksirana v luknje na gojiščni plošči z več luknjami [27]. Na teh ploščah celice tvorijo monosloj in lahko določimo njihovo apikalno in bazolateralno stran, zaradi česar lahko izračunamo navidezni permeabilnostni koeficient [27].

1.4.2 Difuzijske celice Sweetana/Grass

Difuzijski sistem celic Sweetana/Grass omogoča udobno in hitro *in vitro* merjenje permeabilnosti učinkovin in ugotavljanje njihove stabilnosti tekom celotnega gastrointestinalnega trakta [29]. Na nastavke se napne delčke črevesja, ki se jih nareže na okrog 2 cm dolge segmente in razreže po dolžini, in vgradi na difuzijsko celico [30]. Velikost celice in površina izpostavljenega tkiva je odvisna od proizvajalca ($1\text{-}2 \text{ cm}^2$), v enem poskusu pa morajo biti vse celice enake [31, 32]. Celice se napolni s pufrom, ki posnema fiziološke pogoje, prepihuje s karbogenom, ki zagotavlja tudi mešanje raztopin, in ohranja temperaturo na 37°C [29, 31]. Med poskusom se v določenih časovnih intervalih meri z Ag/AgCl elektrodo transepitelijski potencial tkiva, s čimer se preverja vitalnost tkiva [31]. Vitalnost tkiva se lahko preverja še z merjenjem prenosa določenih spojin (npr. glukoze), merjenjem sproščanja laktat dehidrogenaze in z merjenjem drugih električnih parametrov [30]. Donorsko raztopino preiskovane spojine damo na mukozno ali serozno

stran tkiva [29]. Dobra stran difuzijskih celic je odprtost sistema, zaradi česar lahko vzorčimo na katerikoli strani sistema in kadarkoli med poskusom. Ker lahko časovno spremljamo spremembe koncentracij, lahko na ta način izračunamo permeabilnostne koeficiente spojin. S temi celicami lahko določimo mesto absorpcije spojine v črevesu, določimo vpliv prenašalcev na absorpcijo spojin in ugotavljamo metabolizem v steni črevesa [29, 32]. Vzorci, dobljeni s tem sistemom ne potrebujejo posebne priprave, preden jih damo na HPLC analizo. Slabost sistema je zapletena priprava in namestitev tkiva pred poskusom [30].

1.4.3 Vezikularni testi

Vezikli membran s prenašalci nam dajo podatke o interakcijah med prenašalcem in spojino tako, da merimo katalitično aktivnost prenašalca ali da merimo količino dejansko prenešene spojine. Ti testi so relativno enostavni in omogočajo visoko permeabilnost. Membrane je enostavno pripraviti in vzdrževati [33].

1) Merjenje ATP-azne aktivnosti

Prenos spojin z ABC prenašalci preko membrane potrebuje energijo, ki jo dobi s hidrolizo ATP. ATP-azno aktivnost lahko ocenimo s kvantifikacijo porabe ATP, kvantifikacijo sproščenega ADP ali kvantifikacijo sproščenega anorganskega fosfata. Za merjenje aktivnosti ATP-aze so primerni membranski vezikli, ki jih pripravijo iz celic s povečanim izražanjem testiranega ABC prenašalca, npr. sesalske celice ali celice insektov. ATP-azni poskusi so primerni za teste visoko permeabilnih spojin, za raziskovanje interakcij med učinkovinami in za določanje kinetičnih parametrov interakcij med ABC prenašalci in spojinami. Slabost testa je, da je interpretacija teh rezultatov po navadi zapleta, če spojina v nizki koncentraciji ne vpliva ali celo inhibira bazalno aktivnost ATP-aze [33].

2) Vezikularni transport

Bolj direktno merjenje prehoda spojin je lahko doseženo s kvantifikacijo v vezikle ujetih spojin po poskusu. V testu se meri akumulacija testiranih spojin v membranskih veziklih, ki so pripravljeni iz celic, ali v rekonstituiranih transportno-membranskih veziklih. V celici je nukleotid-vezavna domena ABC prenašalca v intracelularnem prostoru, pri veziklih pa je nukleotid-vezavna domena obrnjena h inkubacijskemu mediju, kjer ima dostop do ATP in ostalih potrebnih snovi za delovanje. Spojine so aktivno prenesene v notranjost vezikla. Vezikle ločijo iz inkubacijske raztopine s hitro filtracijo z uporabo filtrov s steklenimi

vlakni ali nitroceluloznimi membranami. Količino prenesene spojine se nato določa na filtru. Spojino, ki se je ne da označiti, se določi z visoko občutljivo analitično metodo. Če pa je možno spojino radioaktivno ali fluorescentno označiti, se lahko kvantificira radioaktivnost ali fluorescenco, ki se zadrži na filtru. Slabost metode je, da ni specifična za hidrofobne spojine, ker se vežejo na lipidne membrane in filtre, in da lahko spojine uhajajo iz veziklov [33].

1.4.4 Jetrne rezine

Napovedne *in vitro* metode za raziskovanje metabolizma učinkovin v človeškem črevesju z uporabo intaktnih tkiv so velikega pomena. Natančno odrezane jetrne rezine so široko uporabljen *in vitro* model za raziskovanje toksičnosti spojin, metabolizma ksenobiotikov in encimske indukcije [33]. Rezine tkiva se lahko odreže s pomočjo avtomatskih aparatov za rezanje ali ročno. Pred poskusom mora biti tkivo ves čas v raztopini, ki je prepohana s karbogenom (plin, sestavljen iz 95 % O₂ in 5 % CO₂), da se zagotovi tkivu dovolj kisika, in hlajena, da se zmanjša celični metabolizem in nastajanje potencialno toksičnih kisikovih spojin [34]. Poskus na rezinah poteka v ploščah za gojenje celic s 6 do 24 luknjicami, v primerinem mediju z virom energije ter ob nežnem mešanju plošče v inkubatorju. Do 1,5 ure dajejo poskusi na tkivnih rezinah primerljive rezultate tudi glede vitalnosti tkiva in metabolizma učinkovin [34].

Njihova prednost pred drugimi *in vitro* sistemi (kot so kulture hepatocitov) je normalna tkivna arhitektura, celična heterogenost in ohranjenost medceličnih stikov [33]. Za razliko od ostalih *in vitro* modelov pri pripravi tkivnih rezin ni potrebna uporaba proteoliznih encimov, ki lahko motijo interakcije med celicami in so lahko škodljivi za celice [34].

Slabost jetrnih rezin je slaba penetracija učinkovin v notranje plasti celic rezine in izguba metabolične kapacitete med poskusom, kljub temu da ostanejo metabolično aktivne več period inkubacije. Pomembna je debelina rezine. Pri predebeli rezini niso vse celice rezine v direktnem kontaktu z medijem, ki vsebuje preiskovane spojine [34]. Spojina mora tako pripraviti v notranje plasti celic in metaboliti iz njih. Tudi penetracija kisika v notranje plasti celic je slaba in celice mogoče zaradi tega ne delujejo pravilno [35]. Če pa so rezine pretanke, imamo velik del poškodovanih celic na površini rezine v primerjavi s številom zdravih celic v notranjosti rezine [34]. Spojine se lahko tudi nespecifično vežejo na rezine in imamo izgube spojine (to lahko ugotovimo z izračunom masne bilance spojine) [35].

1.4.5 HepG2 nesmrtna celična linija

Iz človeka pridobljeno jetrno celično linijo HepG2 je leta 1979 izoliral Aden s sodelavci iz primarnega jetrnega blastoma 11 let starega argentinskega dečka [36]. To je nesmrtna celična linija [37]. Celice imajo morfologijo podobno jetrnim parenhimskim celicam in sintetizirajo in izločajo več plazemskih proteinov, ki so značilni za normalne človeške jetrne celice [36]. Medtem ko so celice ohranile nekatere jetrno specifične funkcije, je izražanje in aktivnost citokromov P450 in encimov II. faze metabolizma nizko [37, 38]. HepG2 celice izražajo zelo malo genov za citokomske transkripcijske faktorje [39]. Izoobliki citokroma, ki sta prisotni pri plodu, CYP1A1 in CYP3A7, sta izraženi v visokih vrednostih, drugače pa HepG2 celice v primerjavi s krioprezerviranimi človeškimi hepatociti izražajo veliko manj vseh ostalih citokromov in tudi encimov II. faze metabolizma (UGT1A1 in CYP1A6) [37]. Z izjemo UGT encimov imajo HepG2 celice celoten komplet encimov II. faze metabolizma (sulfoniltransferaze – SULT, glutation-S-transferaze – GST, N-acetiltransferaze – NAT in epoksidne hidrolaze – EPHX), njihovo izražanje pa je podobno kot v človeških hepatocitih [37, 38]. Količina SULT encimov se le malo razlikuje od tistih v človeških krioprezerviranih primarnih hepatocitih, količina GST encimov pa je enaka. Količina UGT encimov je veliko večja v primarnih hepatocitih kot v HepG2 celicah. Količina in aktivnost encimov je odvisna tudi od hrane in pogojev gojišča [38].

HepG2 celični monosloji se oblikujejo med celično rastjo [39]. HepG2 celice je treba gojiti v gojiščnem mediju in te se širijo in poravnavajo dokler ne dosežejo konfluentnosti. Tesni stiki med njimi se vzpostavijo šele pri visoki gostoti celic, ustvarjanje tesnih stikov pa je pomembno za vzdrževanje normalne celične polarnosti in celičnega komuniciranja [40].

HepG2 celice imajo izražen MRP2 prenašalec [41]. mRNA vrednosti, ki določajo prenašalce v HepG2 celicah, kažejo, da je izražanje MRP2, P-glikoproteina in monokarboksilnega kislinskega prenašalca 1 zadovoljivo, da lahko kvantitativno ocenimo možne interakcije. Kot *in vitro* model se lahko uporablja za ugotavljanje vpliva prenašalcev na permeabilnost spojin in za ugotavljanje interakcij med prehranskimi dopolnilni in učinkovinami [39].

1.5 PRENAŠALCI

Učinkovitost mnogih zdravil je odvisna od sposobnosti za prehod celičnih membran. Ker niso vse spojine sposobne preiti celice z difuzijo, je njihov prehod odvisen od prenašalcev v membranah. Danes se veliko ve o prenašalcih in se jim zato pripisuje ključno vlogo v procesih absorpcije učinkovin, njihove distribucije, metabolizma in izločanja. Prenašalci nadzorujejo dostop učinkovin do metabolnih encimov in do poti izločanja [42]. Ker se nahajajo na različnih membranah celic in ker prenašajo substrate v različne smeri, jih delimo na privzemne in izločevalne prenašalce.

Privzemni prenašalci so odgovorni in potrebni za absorpcijo nekaterih učinkovin. Mednje spadata dve skupini prenašalcev, SLC in SLCO naddružina. Obe družini prenašata organske anione, njuni prenašalci pa uporabljajo različen mehanizem prenosa (uniport, simport ali antiport). Ti prenašalci za svoje delovanje ne potrebujejo nobenega vira energije, za prenos ionov je odgovoren le osmotski gradient. Med SLCO družino spadajo npr. OATP prenašalci [42].

Izločevalni prenašalci se nahajajo na apikalni membrani enterocitov in na kanikularni membrani hepatocitov. Večinoma spadajo v ABC družino proteinov. Mednje spadajo MRP prenašalci, MDR1 prenašalec (imenovan tudi P-glikoprotein ali P-gp) in BCRP prenašalec. Spojine prenašajo iz notranjosti enterocitov nazaj v lumen črevesa in tako preprečujejo absorpcijo spojin v kri ter iz hepatocita v žolčni kanal, s čimer se poveča izločanje učinkovin. Za prenos spojin uporabljajo vir energije, ki jo dobijo iz hidrolize ATP. Takšen način delovanja jim omogoča, da prenašajo spojine proti koncentracijskemu gradientu [42].

1.5.1 ABC družina proteinov

Družino ABC proteinov sestavljajo membranski prenašalci, ionski kanali in receptorji, skupaj jih je okrog 50 [41]. Med njimi obstajajo strukturne podobnosti. Najbolj značilna lastnost vseh ABC proteinov je ohranjena ATP-vezavna domena na citoplazemski strani membrane iz 200 – 250 aminokislin, ker ti proteini potrebujejo za prenos substratov energijo, ki jo po navadi dobijo iz hidrolize molekule ATP [33, 41]. Splošna struktura ABC proteinov zajema 12 transmembranskih domen, ki so razdeljene na polovico, vsaka polovica pa ima nukleotid-vezavno domeno na citoplazemski strani membrane [41]. Ta razred vključuje 51 človeških genov in 7 poddružin (A, B, C, D, E, F, G) [33, 43]. Med prvimi ABC proteini so odkrili P-glikoprotein, ki spada v poddružino MDR proteinov

(ang. »multidrug resistance protein«), in je najbolj raziskan. Med pomembnejše ABC proteine pa spadajo še MRP (ang. »multidrug resistance-associated protein«) prenašalci in BCRP (ang. »breast cancer resistance protein«) prenašalec.

P-glikoprotein (P-gp, ABCB1)

P-gp je produkt gena *MDR1* pri človeku, ki leži na kromosomu 7q21.1 [43]. P-gp prenaša spojine raznolike kemijske strukture, večinoma so to lipofilne, kationske spojine. Lista njegovih substratov in inhibitorjev konstantno raste, nekateri inhibitorji in substrati so prikazani v tabeli 3 [41, 44]. Ker je v zelo veliki meri izražen v tumorjih, ga povezujejo s pojavom rezistence na protitumorne učinkovine.

V veliki meri je izražen v ledvicah in nadledvični žlezi, v srednji meri v jetrih, tankem črevesu, kolonu in pljučih ter v nizki meri v prostati, koži, vranici, srcu, skeletnih mišicah, želodcu in jajčnikih. Izražen je tudi v možganih in placenti. P-gp je del poti za razstrupljanje in izločanje. Nahaja se na apikalni membrani celic v črevesju, jetrih, ledvicah in krvno-možganski barieri, kar mu omogoča, da izloča ksenobiotike in toksine v črevesni lumen, žolč, urin in kri (njegovo nahajanje je prikazano na sliki 3) [41]. Vedno prenaša substrate v nasprotni smeri koncentracijskega gradiента [43]. Zaradi izražanja na vseh teh mestih in zaradi strukturne raznolikosti njegovih substratov ima velik vpliv na razporeditev učinkovin v telesu.

Črevesni P-gp se nahaja na ščetkasti membrani enterocitov in je tako v neposredni bližini črevesnega lumna, zato še lažje omejuje absorpcijo učinkovin [41]. Njegovo izražanje se povečuje od želodca proti kolonu [43]. Odkrili so usklajeno izražanje P-gp z metabolnimi encimi I. in II. faze metabolizma (citokrom P450 3A4 (CYP3A4), glutation-S-transferazo) v enterocitih, s katerimi ima prekrivajočo substratno specifičnost. Tudi v enterocitu se P-gp in CYP3A4 nahajata zelo blizu skupaj – P-gp je na ščetkasti membrani enterocita, CYP3A4 pa se nahaja v endoplazemskem retikulumu, ki je čisto zraven ščetkaste membrane. Z metaboličnimi encimi lahko nastanejo metaboliti učinkovin, ki so še boljši substrati za P-gp [41].

MRP (ang. »multidrug resistance associated protein«) prenašalci (ABCC)

MRP skupino proteinov sestavlja 13 proteinov, ki spadajo v ABCC podskupino ABC proteinov. Prenašalci MRP 1, 2, 3, 6 in 7 imajo posebno strukturo, ker imajo na *N*-terminalnem delu 5 dodatnih transmembranskih domen, teh prenašalci MRP 4, 5, 8, 9

nimajo. Večinoma prenašajo substrate iz celic nazaj v zunanje okolje. Nekaj substratov in inhibitorjev teh prenašalcev je prikazanih v tabeli 3, njihovo nahajanje na membranah določenih celic pa je prikazano na sliki 3.

MRP1 prenašalec je bil kloniran iz celične linije človeškega raka pljuč, ki ne izraža P-gp [41, 46]. Nahaja se povsod po telesu, še posebej v črevesju, možganih, ledvicah, pljučih, testisih in malo v jetrih. Izražen je na bazolateralni membrani polariziranih epitelijskih celic. Prenaša glukuronidne, sulfatne in glutationske konjugate iz celic v kri. Vloga MRP1 je detoksifikacija endogenih metabolitov. Njegovo izražanje se po kemoterapiji poveča [41].

MRP2 prenašalec je strukturno podoben MRP1 in MRP3 prenašalcema. Izražen je na apikalni membrani enterocitov in epitelnih celic ledvičnih tubulov ter kanalikularni (apikalni) membrani hepatocitov, kjer prenaša konjugirane in nekonjugirane anionske spojine v žolčni kanal (bilirubin, levkotrien C₄, sulfatirane žolčne kisine) [41, 46, 47]. MRP2 prenaša veliko amfifilnih organskih anionov, ksenobiotike in tudi nespremenjene učinkovine [41]. Spojine, ki so MRP2 substrati, so pogosto tudi substrati MRP1 prenašalca, večkrat tudi P-gp prenašalca. Ker izraženost prenašalca v črevesju narašča od kripte do vilusa in ker se nahaja na apikalni membrani enterocitov, MRP2 predstavlja veliko oviro učinkovin za absorpcijo v krvni obtok. Pri pacientih z Dubin-Johnsonovim sindromom je ta prenašalec odsoten, zato se pri njih povečajo koncentracije zgoraj naštetih spojin v krvi [41, 46].

MRP3 prenašalec je najmočneje izražen v jetrih in kolonu, izraža pa se tudi v tankem črevesu, ledvicah, pljučih in trebušni slinavki [43, 46]. V črevesju je bolj izražen v kolonu in ileumu kot v duodenu in jejunumu [41]. Nahaja se na bazolateralni membrani enterocitov in sinusoidni (bazolateralni) membrani hepatocitov [43]. MRP3 prenaša večino žolčnih soli in bilirubin. Na Caco-2 celicah so potrdili, da se izražanje MRP3 v enterocitih poveča, če so te kulture prej izpostavljene žolčnim solem [41]. Podobne razmere se pojavijo pri bolnikih z Dubin-Johnsonovim sindromom, kjer MRP3 prenašalec nato prenaša žolčne soli nazaj v kri [46].

MRP4 prenašalec je v nizkih vrednostih izražen povsod po telesu, tudi možganih in prostati. Najdemo ga na bazolateralni membrani enterocitov in hepatocitov, kjer prenaša spojine v kri, in na apikalni membrani epitelnih celic proksimalnih ledvičnih tubulov, kjer

prenaša substrate v urin [41, 42]. Struktura prenašalca je bolj podobna P-gp kot ostalim MRP prenašalcem, ker mu manjka začetnih 5 transmembranskih domen. Njegova fiziološka vloga je prenos žolčnih kislin in sproščanje prostaglandina E [41].

MRP5 prenašalec je strukturno podoben MRP4 in je izražen povsod po telesu. Veliko afiniteto ima do spojin z nukleotidno strukturo [41].

MRP6 prenašalec je močno izražen v ledvicah in jetrih, prenaša pa veliko naravnih citotoksičnih spojin [41].

MRP8 prenašalec je podoben MRP5 in ugotavlja, da se v večji meri izraža v rakavih celicah dojk. Odgovoren je za rezistenco na zdravila [41].

BCRP/MXR (ang. »breast cancer resistance protein/mitoxantrone resistance«) prenašalec (ABCG2)

BCRP je pomemben membranski prenašalec za ksenobiotike, velik okrog 75 kDa [48]. Izolirali so ga iz človeških MCF-7 rakavih celic dojk in človeške placente [41]. Imenujejo ga tudi polprenašalec (ang. »half-transporter«), ker lahko prenaša substrate šele po dimerizaciji oz. tetramerizaciji [41, 48]. Za prenos substratov potrebuje energijo, ki se sprosti ob hidrolizi ATP [41, 48]. Visoko je izražen v posteljničnih trofoblastih in manj v dojkah, jajčnikih, tankem črevesu, kolonu in jetrih. Opazili so ga tudi na matičnih celicah, ki jih varuje pred ksenobiotiki [48]. Imunohistokemično barvanje z uporabo monoklonskih protiteles proti BCRP je pokazalo, da se BCRP nahaja na apikalni membrani epitelija tankega črevesa in kolona ter na kanalikularni membrani hepatocitov (prikazano na sliki 3). V tankem črevesu omejuje absorpcijo učinkovin in njihovo razpoložljivost [41]. BCRP prenaša mnoge ksenobiotike in endogene lipidne substrate kot so steroidi in njihovi konjugati. Nekateri substrati in inhibitorji so prikazani v tabeli 3. Pri nosečnicah posteljnični BCRP zmanjša izpostavljenost ploda toksičnim ksenobiotikom. Ugotavlja, da BCRP regulira prenos substratov v in iz posteljice, kar potrjuje domneve, da BCRP varuje plod. A nove raziskave kažejo, da BCRP koncentrira učinkovine in okoljske toksine v mleku dojk [49]. BCRP ima velik vpliv na peroralno biološko uporabnost protitumornih učinkovin. Ob sočasni aplikaciji protitumorne učinkovine topotekana in inhibitorja BCRP GF120918 so pazili zmanjšano izločanje topotekana v žolč in povečan ponovni privzem v

tankem črevesu [41]. Dodatna funkcija BCRP je varovanje celic pred hipoksijo in vzdrževanje potenciala za regeneracijo zarodnih celic [49].

1.5.2 Prenašalci organskih anionov: OATP (»organic anion transporting polypeptide«)

OATP prenašalci spadajo v glede na gene v SLC21A (»solute carrier family 21A«) poddružino prenašalcev organskih anionov. Ker so posamezen prenašalec poimenovali ob izolaciji, je med imeni v tej družini velika zmeda. Vsak prenašalec je poimenovan s tremi različnimi imeni – glede na genetiko, strukturo in funkcijo prenašalca [43]. Do zdaj so pazili 11 genov pri ljudeh in 14 genov pri podganah. OATP prenašalci prenašajo več endogenih snovi kot ksenobiotikov. Med endogenimi spojinami prenašajo žolčne kisline, ščitnične hormone, prostanoide in konjugirane steroide, med ksenobiotiki pa prenašajo kardiotonične glikozide (digoksin), HMG-CoA reduktazne inhibitorje (pravastatin), protitumorne učinkovine (metotreksat), ACE inhibitorje (temokaprilat), antibiotike (benzilpenicilin), razne nesteroidne protivnetne učinkovine in nekatere peptide (opioidni analgetiki) [44]. Nekateri njihovi substrati in inhibitorji so prikazani v tabeli 3, razporeditev na membranah celic pa na sliki 3.

OATP1B1 prenašalec (ali OATP-C ali OATP2 ali LST- 1) se izraža samo na bazolateralni membrani normalnih jetrnih celic. Pomemben je za prenos albuminsko vezanih organskih anionskih spojin. OATP1B1 je produkt gena *SLCO1B1*, ki ima genski lokus na kromosomu 12p12 [43, 44].

OATP1B3 prenašalec (ali OATP8 ali LST-2) se ravno tako nahaja na bazolateralni membrani hepatocita, a tudi v rakavih celicah prebavil kot sta rak debelega črevesa in rak jeter [44]. Substrate prenašajo v hepatocite. OATP1B1 ima večjo afiniteto za privzem bilirubina kot OATP1B3 [50].

OATP2B1 prenašalec (OATP-B) je izražen v več organih kot so črevesje, vranica, placenta, pljuča, ledvica, srce in jetra [44]. V enterocitu ga najdemo na apikalni membrani [51]. OATP2B1 prenaša le sulfobromoftalein, estron-3-sulfat in dehidroepiandrosteron sulfat, ne pa žolčnih kislin, ki so tipični substrati prenašalcev v jetrih. OATP2B1 ima pomembno vlogo v absorpciji anionskih spojin preko apikalne membrane človeških črevesnih epitelnih celic in za njihov prenos v hepatocite [43, 44].

OATP1A2 prenašalec (OATP-A) se močno izraža v možganih in je pomemben za prenos ščitničnih hormonov [44]. Ugotovili so, da sok grenivke inhibira črevesni OATP1A2 [43].

OATP4A1 prenašalec (OATP-E) se izraža v perifernih organih, tudi v tankem črevesu. OATP4A1, OATP1B1 in OATP1B3 so mogoče pomembni za enterohepatično cirkulacijo žolčnih kislin in ščitničnih hormonov [44].

OATP3A1 prenašalci (OATP-D) so pri človeku in podganah izraženi v možganih in prenašajo prostanoide neodvisno od natrijevih ionov. Pri človeku so OATP3A1 opazili še v hepatocitih, v srcu, v testisih, v žilnem epiteliju in v ledvicah, povsod pa prenaša prostanoide [44].

OATP1C1 prenašalec (OATP-F) je izražen v možganih in testisih in prenaša ščitnične hormone v centralni živčni sistem [44].

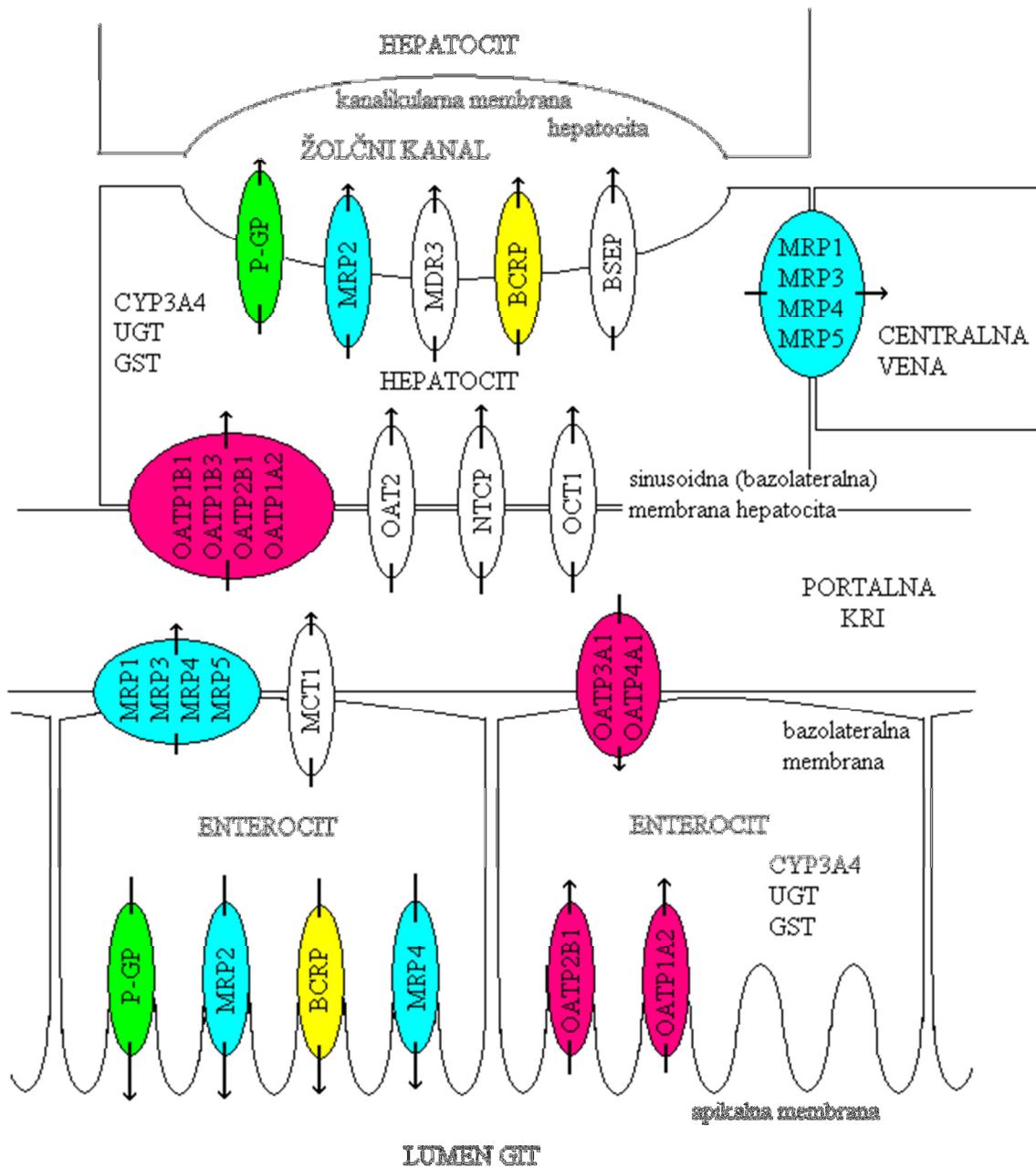
Pri podganah so odkrili, da **Oatp1a4 in Oatp1a5** prenašata ščitnične hormone v mrežnico in živčne nevrone. **Oatp1a1 in Oatp2** sta izražena na apikalni in bazolateralni strani epitelija horoidnega pleksusa in prenašata ščitnične hormone iz bazolateralne strani v cerebrospinalno tekočino in možgane. **Oatp3** prenašalec je izražen na apikalni membrani enterocitov v jejunumu [44].

Tabela 3 – Tabela prenašalcev ter njihovih substratov in inhibitorjev, ki smo jih zasledili v prebrani literaturi.

prenašalec		Substrati prenašalca	Inhibitorji prenašalca
P-gp	MDR1 (ABCB1)	digoksin, feksofenadin, indinavir, nelfinavir, ritonavir, sakvinavir, adefovir, verapamil, vinkristin, kolhicin, topotekan, paklitaksel, vinblastin, daunorubicin, doktorubicin, etopozid, cisplatin, metotreksat, celiprolol, talinolol, kinidin, ciprofloksacin, grepafloksacin, sparfloksacin, levofloksacin, eritromicin, estradiol-17-β-glukuronid, žolčne soli, takrolimus, cimetidin, ranitidin, LTC ₄ , Rho123, fluo-3, feksofenadin, cetirizin, azasetron, antraciklini, gliburid, imatinib, mitoksantron, prazosin, rosuvastatin [41, 42, 43, 48, 52, 53, 54]	verapamil, ciklosporin A, GG918, amiodaron, diltiazem, lovastatin, propranolol, kinidin, simvastatin, tamoksifen, ciprofloksacin, cisplatin, PSC833 [41, 42, 43, 53, 55]
MRP	MRP1 (ABCC1)	adenovir, indinavir, metotreksat, vinblastin, vinkristin, daunorubicin, doktorubicin, etopozid, cisplatin, mitoksantron, grepafloksacin, estron-3-sulfat, estradiol-17-β-glukuronid, dehidroepiandrosteron sulfat, LTC ₄ , Rho123, fluo-3 [41, 42, 43, 52]	MK571, benzboromaron, probenecid, indometacin, sulfpirazon, vinblastin, cisplatin, indinavir, Rho123 [41, 42, 43, 56]
	MRP2	dibromosulfoftalein, cefodizime, pravastatin, temokaprilat, ciklični anionski peptidi, levkotrien C ₄ , indinavir, ritonavir, sakvinavir, adefovir, cisplatin, ciprofloksacin, grepafloksacin, furosemid, indometacin, metotreksat, vinblastin, vinkristin, doktorubicin, etopozid, digoksin, estron-3-sulfat, dehidroepiandrosteron, estradiol-17-β-glukuronid, žolčne soli, glutationski, glukuronidni in sulfatni konjugati, fluo-3, rosuvastatin [41, 42, 43, 52, 54, 57]	MK571, ciklosporin, probenecid, glibenklamid, digoksin, ciprofloksacin [42, 43]
	MRP3	etopozid, metotreksat, tenoposide, vinkristin, daunorubicin, doktorubicin, cisplatin, metotreksat, indinavir, ritonavir, estradiol-17-β-glukuronid, dehidroepiandrosteron, LTC ₄ [41, 42, 52]	MK571, indometacin, benzboromaron [42, 43]
	MRP4	topotekan, ceftizoksin, cefazolin, adefovir, zidovudin monofosfat, naltrekson, etopozid, metotreksat [41, 42, 43]	MK571, probenecid, sildenafil [42, 43]
	MRP5	cGMP, metotreksat, merkaptopurin, adefovir, Rho123, mitoksantron [41, 42, 43]	MK571, sildenafil, probenecid [42, 43]
	MRP6	cisplatin, daunorubicin, vinkristin, doktorubicin, etopozid, metotreksat, mitoksantron, topotekan, LTC ₄ , estradiol-17-β-glukuronid [41, 42]	verapamil, indometacin, benzboromaron, probenecid [42, 43]

BCRP	(ABCG2)	rosuvastatin, doksorubicin, sulfasalazin, topotekan, daunorubicin, vinkristin, etopozid, metotreksat, mitoksantron, indinavir, ritonavir, sakvinavir, estron-3-sulfat, Rho123, irinotecan, imatinib, gefitinib, prazosin, gliburid, nitrofurantoin, dipiridamol, statini, cimetidin, porfirini [41, 42, 48, 52, 54]	indinavir, sakinavir, ciklosporin A, Ko143, FTC [42]
OATP	OATP2B1	estron-3-sulfat, atorvastatin, benzilpenicilin, dehidroepiandrosteron, bromosulfoftalein, prostaglandin E2, pravastatin, feksofenadin, rosuvastatin [42, 43, 52, 54]	rifampicin, DIDS*, bromosulfoftalein, MK571 [42, 51, 58]
	OATP1A2	estron-3-sulfat, deltorfin II, feksofenadin, žolčne soli, organski anioni, organski kationi, T3 in T4 [42, 43, 52]	rifampicin, bromosulfoftalein, eritromicin, indinavir, lovastatin, sakvinavir kinidin, ritonavir, [42, 43]
	OATP3A1	PGE1, PGE2, BQ-123, vazopresin, estron-3-sulfat, benzilpenicilin [42, 43, 52]	
	OATP4A1	tauroholat, triiodotironin, tetraiodotironin, prostaglandin, benzilpenicilin, estron-3-sulfat [42, 43, 52]	
	OATP1B1	rifampicin, rosuvastatin, metotreksat, pravastatin, tiroksin, žolčne soli, organski anioni, bilirubinski konjugati, atorvastatin, estradiol-17-β-glukuronid, estron-3-sulfat, PGE2, dehidroepiandrosteron sulfat, benzilpenicilin, bromosulfoftalein [42, 43, 52, 54]	rifampicin, ciklosporin, gemfibrozil, montelukast, MK571 [42, 43, 58]
	OATP1B3	digoksin, rifampicin, metotreksat, žolčne soli, organski anioni, T3, T4, estradiol-17-β-glukuronid, ouabain, rifampicin, bromosulfoftalein, rosuvastatin, CCK-8, penicilin G, feksofenadin [42, 43, 52, 54, 58]	rifampicin, ciklosporin A, MK571, silibinin dihemisukcinat, antamanid, montelukast [41, 58]
	OATP2A1	eikozanoidi, prostaglandini, tromboksan B2, iloprost [43, 52]	furosemid [43]
	OATP1C1	tiroksin, rekombinantni triiodotironin, estron-3-sulfat, bromosulfoftalein, estradiol-17-β-glukuronid [43, 52]	

* DIDS je po vsej verjetnosti neselektiven za OATP prenašalce in vpliva na prenos vseh OATP prenašalcev, a tega izrecno ni bilo nikjer napisanega.



Slika 3 – Slika prikazuje, na kateri membrani se nekateri prenašalci nahajajo v enterocitih in hepatocitih. Transcelularna absorpcija iz črevesja v kri zahteva privzem preko apikalne membrane enterocita, sledi transport skozi citosol, kjer so prisotni metabolni encimi, in nato izhod preko bazolateralne membrane enterocita v portalno kri. Da pride spojina v centralno veno, mora najprej preiti še bazolateralno membrano hepatocita, preiti citosol hepatocita, kjer so spet prisotni metabolni encimi in se lahko metabolizira, in se nato izločiti preko membrane hepatocita v kri [41, 42, 43, 54].

2 NAMEN DELA

Raloksifen in bazedoksifen sta učinkovini za zdravljenje osteoporoze, vendar njuna farmakokinetika še ni v celoti raziskana. Med posamezniki so velike razlike v koncentracijah raloksifena v plazmi, ki bi jih že leli pojasniti. Ker je novi bazedoksifen strukturno zelo podoben raloksifenu, ki je že precej časa na trgu, sklepamo, da bi tudi pri bazedoksifenu lahko prišlo do velike variabilnosti farmakokinetičnih parametrov med posamezniki. Ker na področju prenašalcev zaradi prisotnosti različnih možnih polimorfizmov v genih za prenašalce prihaja do spremenjene aktivnosti in substratne specifičnosti prenašalcev, sklepamo, da bi mogoče bili prenašalci tisti, ki so odgovorni za variabilnost farmakokinetičnih parametrov. Ker sta raloksifen in bazedoksifen in njuni metaboliti velike in nabite molekule pri fiziološkem pH, potrebujejo za prehod membran prenašalce. Cilj naše diplomske naloge je bil identificirati prenašalce, ki so udeleženi pri prenosu raloksifena, bazedoksifena in njunih metabolitov v jetrne celice in iz njih. Izbrali bomo *in vitro* sistem, ki najbolje ponazarja pogoje v jetrih. Ker je seznam prenašalcev dolg, smo si zadali, da bomo preverili, če se raloksifen in bazedoksifen v jetrne celice in iz njih prenašata s P-gp prenašalcem, MRP prenašalci, BCRP prenašalcem ali OATP prenašalci. Za vsak prenašalec bomo izbrali primeren inhibitor in nato izvedli poskus s posamezno spojino z in brez inhibitorja. Rezultate bomo primerjali in ugotovili, če inhibitor vpliva na transport raloksifena, bazedoksifena in njunih metabolitov.

3 MATERIALI IN METODE

3.1 MATERIALI

Uporabljene spojine v poskusih:

- bazedoksifen; sintetiziran in karakteriziran na Fakulteti za farmacijo, Ljubljana; stopnja čistosti: več kot 97,5 %;
- raloksifen, ekstrahiran z metanolom iz tablet Evista ® (Lilly & Co.), stopnja čistosti: več kot 98,5 %;
- estron-3-sulfat (E-3-S), Sigma Aldrich Chemie, Deisenhofen, Nemčija;
- Ko143, Sigma Aldrich Chemie, Deisenhofen, Nemčija;
- DIDS (4,4'-diizotiociano-2,2'-stilbendisulfonska kislina), Sigma Aldrich Chemie, Deisenhofen, Nemčija;
- fluorescein (FLU), Sigma Aldrich Chemie, Deisenhofen, Nemčija;
- rodamin 123 (Rho123), Sigma Aldrich Chemie, Deisenhofen, Nemčija;
- PSC833, Tocris;
- verapamil, Sigma Aldrich Chemie, Deisenhofen, Nemčija;
- benzboromaron, Sigma Aldrich Chemie, Deisenhofen, Nemčija;
- MK571, Sigma Aldrich Chemie, Deisenhofen, Nemčija.

Druge snovi:

- bidestilirana voda – mili-Q voda, pridobljena z aparatom Milli-Q Advantage A10 Ultrapure Water Purification System (Millipore, Bedford, ZDA) na Fakulteti za farmacijo, Ljubljana;
- DMSO – dimetilsulfoksid; 99%, Kemika, M = 78,13 g/mol, ρ = 1,099 - 1,101;
- Albumin Avbunorm™ 200 g/L, humani albumin, Octapharma, Velika Britanija;
- metanol, Sigma Aldrich Chemie, Deisenhofen, Nemčija;
- haloperidol, Sigma Aldrich Chemie, Deisenhofen, Nemčija;
- mikrosomi – Human liver microsomes CMV negative pool, BD Biosciences Discovery Labware, vsebnost proteinov 20 mg/mL v 250 mM sukrozi, ZDA;
- UGT Reaction Mix, raztopina A (UDPGA kofaktor) in raztopina B (5X-UGT mešanica pufra z alameticinom), BD Biosciences, GenTest, ZDA;
- Dulbecco's PBS (PAA, the cell culture company), brez MgCl₂ in CaCl₂, Sigma Aldrich Chemie, Deisenhofen, Nemčija;

- William's E medij (z NaHCO₃, brez L-glutamina in fenolnega rdečega), Sigma Aldrich Chemie, Deisenhofen, Nemčija;
- raztopina insulina (10 mg/mL, pH 8,2), Sigma Aldrich Chemie, Deisenhofen, Nemčija;
- albuminski standard s Pierce® BCA protein assay reagent A in BCA™ protein assay reagent B.

Naprave:

- pipete Eppendorf Research: 2 – 20 µL, 20 – 200 µL, 100 – 1000 µL, 1 – 10 µL;
- multipeta Eppendorf Multipette® plus;
- nastavki za multipeto, Combitips plus 0,1; 1,0; 5 mL;
- večkanalne pipete Eppendorf: 0,5 – 10 µL, 30 – 300 µL;
- termični stresalnik, Tehnica, Vortemp 56 EVC, Železniki, Slovenija;
- ročno mešalo, Tehnica, Vubromix 114, Železniki, Slovenija;
- hladilno-grelna plošča, Cole-Parmer®, Chilling/Heating Block;
- mikrofilterski čitalec Tecan, GENios, Durham, ZDA;
- ultrazvok Ultrasonic Homogenizer 4710 Series, Cole-Parmer Instrument Co., ZDA;
- mikser Polytron PT 1600 E, dispersing and mixing technology by kinematica;
- centrifuga Eppendorf Centrifuge 5415 R, ZDA;
- LC-MS/MS sistem je bil sestavljen iz UPLC (Agilent 1290 Infinity) in MS (Agilent 6460 MSD (Triple quad.)), Agilent technologies;
- mikrotiterske plošče, Agilent 96 PP 0,5 mL;
- mikrotiterske plošče, TPP, 96, 0,5 mL;
- polipropilenski 1,5 mL in 2,0 mL vsebniki (oz. Eppendorfove epruvete oz. epice);
- britvice;
- kovinske spatule in pincete;
- steklovina.

3.2 METODE

3.2.1 Izbira prenašalcev in njihovih substratov in inhibitorjev

Pri svojem delu smo se osredotočili na prenašalce MRP, P-gp, BCRP in OATP. Za vsakega izmed prenašalcev smo poiskali primeren inhibitor. Da smo lahko komentirali rezultate, smo morali potrditi, da naša metoda dobro deluje in da je inhibitor primeren za ta poskus. To smo potrdili na poskusih pozitivnih kontrol.

Za **MRP prenašalce** smo uporabili substrat fluorescein (FLU) [45] in selektivni inhibitor MK571 ter inhibitor benzboromaron [45, 56]. Ta inhibitorja inhibirata skoraj vse MRP prenašalce. Poskus z inhibitorjem benzboromaronom smo izvedli le na HepG2 celicah.

Za **P-gp prenašalec** smo uporabili substrat rodamin 123 (Rho123) [41] in inhibitorja PSC833 [53] in verapamil [41, 55].

Za **BCRP prenašalec** smo uporabili inhibitor Ko143, ki je selektivni inhibitor tega prenašalca in skoraj ne inhibira prenašalca P-gp in MRP1 [48, 49]. Glede na to, da koncentracije Ko143 do 5 µM nimajo škodljivega učinka na preživetje celic, smo uporabili to koncentracijo v poskusih. Kot tipični substrat BCRP prenašalca smo uporabili estron-3-sulfat (E-3-S).

Za **OATP prenašalce** smo uporabili inhibitor DIDS (4,4'-diizotiocianostilben-2,2'-disulfonska kislina), kot substrat prenašalca pa estron-3-sulfat (E-3-S) [51].

3.2.2 Izbira *in vitro* sistema

Izbrali smo dva *in vitro* sistema, podganje jetrne rezine in HepG2 celice, ker se za tovrstne raziskave pogosto uporablja. Jetrne rezine imajo prisotne metabolične encime, ohranjeno citoarhitekturo in orientacijo hepatocitov, HepG2 celice pa so enostavnejši model in smo lahko ločili prenos učinkov od metabolizma, ker nimajo prisotnih UGT encimov. Hkrati sta ta dva modela enostavna za ugotavljanje vpliva prenašalcev na prehod raloksifena in bazedoksifena v hepatocite (jetrne celice).

Pri jetrnih rezinah smo naredili poskuse, ki smo jih prikazali v tabeli 4. Poskuse smo delali v tem zaporedju. Inkubacija poskusa je vedno trajala 1,5 ure.

Tabela 4 - Zaporedje in načrt poskusov, ki smo jih izvedli na jetrnih rezinah.

	prenašalec	substrat	inhibitor
1.	MRP	10 µM FLU	50 µM MK571
2.	MRP	10 µM FLU	100 µM MK571
3.	P-gp	2 µM Rho123	10 µM PSC833
4.	BCRP	10 µM E-3-S	5 µM Ko143
5.	OATP	10 µM E-3-S	0,5 mM DIDS
6.	MRP	15 µM RAL	50 µM MK571
7.	MRP	15 µM RAL	100 µM MK571
8.	P-gp	15 µM RAL	10 µM PSC833
9.	BCRP	15 µM RAL	5 µM Ko143
10.	OATP	15 µM RAL	0,5 mM DIDS
11.	MRP	15 µM BAZ	50 µM MK571
12.	MRP	15 µM BAZ	100 µM MK571
13.	P-gp	15 µM BAZ	10 µM PSC833
14.	BCRP	15 µM BAZ	5 µM Ko143
15.	OATP	15 µM BAZ	0,5 mM DIDS

Pri poskusih na HepG2 celicah pa smo izvedli še poskuse po shemi v tabeli 5. Pri teh poskusih smo vzorčili trikrat, po 10, 30 in 60 minutah. Zaradi možnosti plošče smo tu naredili štiri paralelke poskusa.

Tabela 5 - Zaporedje in načrt poskusov, ki smo jih izvedli na HepG2 celični liniji.

	prenašalec	substrat	inhibitor
1.	MRP	10 µM FLU	50 µM MK571
2.	MRP	10 µM FLU	50 µM benzboromaron
3.	P-gp	2 µM Rho 123	10 µM PSC833
4.	P-gp	2 µM Rho 123	100 µM verapamil
5.	BCRP	10 µM E-3-S	5 µM Ko143
6.	OATP	10 µM E-3-S	0,5 mM DIDS
7.	MRP	15 µM RAL	50 µM MK571
8.	MRP	15 µM RAL	50 µM benzboromaron
9.	P-gp	15 µM RAL	10 µM PSC833
10.	P-gp	15 µM RAL	100 µM verapamil
11.	BCRP	15 µM RAL	5 µM Ko143
12.	OATP	15 µM RAL	0,5 mM DIDS
13.	MRP	15 µM BAZ	50 µM MK571
14.	MRP	15 µM BAZ	50 µM benzboromaron
15.	P-gp	15 µM BAZ	10 µM PSC833
16.	P-gp	15 µM BAZ	100 µM verapamil
17.	BCRP	15 µM BAZ	5 µM Ko143
18.	OATP	15 µM BAZ	0,5 mM DIDS

Ker imajo ploščice več luknj, smo lahko nekatere poskuse združili v eno ploščo. Ko smo potrdili, da kontrolni poskusi pravilno delujejo, samo lahko prešli na poskuse z raloksifenom in bazedoksifenom. Pri poskusih smo vedno hkrati naredili poskus brez inhibitorja in poskus z inhibitorjem. Le tako smo lahko izločili druge vplive na rezultate kot so drugačni pogoji poskusa, različne raztopine in drugačen čas od poskusa do analize vzorcev. Vedno pa smo delali štiri paralelke identičnega poskusa, da smo lahko iz njih izračunali standardno deviacijo in standardno napako.

3.2.3 Priprava raztopin

Priprava raztopine fosfatnega pufra (PBS, ang. »phosphate buffer solution«)

Za 100 mL pufra smo v valj odmerili 10 mL Dulbecco's PBS raztopine, jo prelili v 100 mL bučko in z destilirano vodo dopolnili do 100 mL. Bučko smo nato dobro premešali. Dobili smo desetkrat redčen PBS s pH od 6,7 do 7,0.

Priprava metanolne raztopine haloperidola

V 1000 mL bučko smo zatehtali 0,50 mg haloperidola in dopolnili do oznake z metanolom. Tako smo dobili metanolno raztopino haloperidola s koncentracijo 0,5 mg/L.

Priprava donorskih raztopin uporabljenih spojin

Za poskuse smo si pripravili raztopine posameznih inhibitorjev, substratov in preiskovanih spojin. V epico smo natančno natehtali približno maso spojine in preračunali, koliko DMSO (dimetilsulfoksid) moramo dodati, da bomo dobili ustrezno koncentracijo spojine. Da se je spojina raztopila v DMSO, smo si pomagali z ročnim mešalnikom. Pripravili smo 5,0 mM MK571, 10,0 mM MK571, 50 mM DIDS, 0,5 mM Ko143, 1 mM PSC833, 1 mM E-3-S, 1 mM FLU, 0,2 mM Rho123, 5,0 mM benzboromaron, 10,0 mM verapamil, 1,5 mM RAL in 1,5 mM BAZ.

3.2.4 Potelek poskusa na mikrosomih***Priprava donorskih raztopin za poskus na mikrosomih***

Pripravili smo 50 mL raztopine 1,5 % albumina z redčenjem 20 % raztopine humanega albumina. Uporabili smo donorske raztopine RAL, BAZ in inhibitorjev, ki smo si jih pripravili že prej.

Potelek poskusa na mikrosomih, vzorčenje in priprava vzorcev za LC-MS/MS

Najprej smo pripravili 12 epic za RAL in 12 enomililitrskih epic za BAZ, ker smo delali po dve paralelki vsakega testa. Naredili smo kombinacije poskusov, ki so prikazane v tabeli 6.

Tabela 6 – Prikaz kombinacij poskusov, ki smo jih naredili v epicah pri poskusu na mikrosomih.

	DMSO (kontrola)	50 µM MK571	100 µM MK571	0,5 mM DIDS	5 µM Ko143	10 µM PSC833
RAL	2 paralelki	2 paralelki	2 paralelki	2 paralelki	2 paralelki	2 paralelki
BAZ	2 paralelki	2 paralelki	2 paralelki	2 paralelki	2 paralelki	2 paralelki

Mikrosome in reakcijske raztopine za poskuse na mikrosomih smo vzeli tik pred poskusom iz zamrzovalnika, kjer smo jih hranili na -80°C. Odtalili smo jih pod tekočo vodo in takoj postavili na led. V posamezno epico smo pripravili zmes mikrosomov: k 9,52 µL mikrosomov smo dodali 95,2 µL raztopine B in 28,5 µL prečiščene vode. Zmes smo dobro premešali na ročnem mešalu in postavili na led za 15 minut. V raztopini B je pufer z

alameticinom, ki naluknja mikrosome, da lahko substrat pride do aktivnega mesta encima, ki je v notranjosti mikrosoma.

Po 15 minutah smo k zmesi dodali 333,3 μL 22,5 μM donorske raztopine RAL oz. BAZ ter 5 μL ustreznega inhibitorja oz. DMSO in dobro premešali. Koncentracija testirane učinkovine v končni inkubacijski zmesi je bila 15 μM . Nato smo naredili predinkubacijo - zmes smo postavili v inkubator za 10 min na temperaturo 37°C in hitrosti mešanja 65 obratov/minuto. Po 10 min smo vsako epico vzeli ven, ji dodali 33,3 μL raztopine A (ki vsebuje uridindifosfatglukuronsko kislino, kosubstrat za glukuronidacijo, jo dobro premešali, vzeli prvi vzorec 100 μL , pri 0 minutah, in postavili nazaj v inkubator na 37°C in mešanje. To je bil začetek poskusa. Po odvzemu vzorca smo le-tega prenesli v mikrotitrsko ploščo, v katero smo predhodno dodali po 300 μL metanolne raztopine haloperidola (0,5 mg/L) v vsako luknjo kot internim standardom. Vzorec smo premešali in postavili na led.

Ob 10, 30 in 90 minutah smo iz vsake epice odpipetirali 100 μL inkubata v mikrotitrsko ploščo z metanolno raztopino haloperidola. Po končanem poskusu pa smo dali mikrotitrsko ploščo za dva dni v zamrzovalnik na -20°C.

Čez dva dni smo mikrotitrsko ploščo centrifugirali 100 min pri 1300 $\times g$ in 4°C. Supernatant smo prenesli v novo mikrotitrsko ploščo in vzorce analizirali z LC-MS/MS.

3.2.5 Potek poskusov na jetrnih rezinah

Priprava medija za transport in inkubacijo jetrnih rezin

Za pripravo 100 mL medija smo v 100 mL bučko odpipetirali 59,2 µL raztopine humanega insulina ter dodali 29 mg L-glutamina, ki smo ga natehtali v epico in s spiranjem z Williams-ovim E medijem kvantitativno prenesli v bučko. Bučko smo do 100 mL dopolnili z Williams-ovim E medijem in jo dobro premešali. Nato smo približno 40 mL raztopine prelili v stekleničko z navojem, postavili stekleničko na led in vanjo potopili kovinsko iglo, skozi katero smo v raztopino uvajali karbogen (plin, sestavljen iz 95 % O₂ in 5 % CO₂). Po pol ure prepihovanja raztopine smo stekleničko zaprli, jo dali v zatesnjeno posodo z ledom in vanjo spustili sveže izolirana po podganja jetra. Medtem smo preostalo raztopino dali na led in jo prepihovali s karbogenom do prihoda jeter.

Pridobivanje jeter in rezanje jeter na rezine

Dovoljenje za delo na tkivih žrtvovanih živali je pridobila Fakulteta za farmacijo na Veterinarski upravi Republike Slovenije. Jetrne rezine smo pridobili iz podganjih jeter. Živali so živele pod standardnimi pogoji (temperatura, svetloba, hrana). Jetra so bila odstranjena takoj po žrtvovanju živali in dana v pripravljen ledeno hladen transportni medij.

Po dostavi jeter na fakulteto smo jetra vzeli iz medija in jih na plutovinasti podlagi s pomočjo britvice narezali na čim tanjše rezine. Za en poskus smo se potrudili, da smo vedno pridobili vse rezine iz jeter samo ene živali. Vsako jetrno rezino smo sproti potopili v prepihan medij v kristalizirki na ledu.

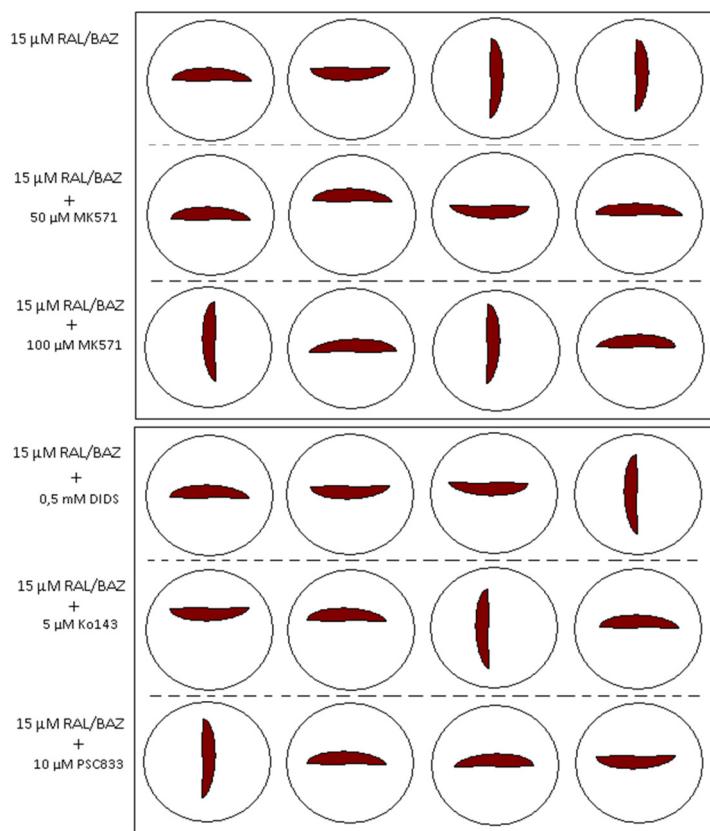
Priprava donorskih raztopin za poskuse na jetrnih rezinah

Za poskuse z RAL smo uporabili donorsko raztopino 15 µM RAL. Ker smo uporabljali plošče z 12 luknjami in smo hkrati delali poskus na dveh ploščah, smo potrebovali 24-krat po 1,5 mL donorske raztopine, kar je 36 mL. Da smo raztopino lažje pripravili, smo vzeli 50 mL bučko. V njo smo dodali toliko RAL iz pripravljene epice, da smo dobili končno raztopino s 15 µM RAL in bučko dopolnili s pripravljenim medijem, ki smo ga uporabili tudi za transport jeter.

Enako smo pripravili donorsko raztopino 15 µM BAZ.

Potek poskusa na jetrni rezinah, vzorčenje in priprava vzorcev za LC-MS/MS in mikrofilterski čitalnik

Ko smo prejeli jetra, smo pripravljeno donorsko raztopino RAL/BAZ potopili v čašo s toplo vodo, da se je pred poskusom ogrela na 37°C. Jetra smo vzeli iz transportnega medija in narezali na rezine, ki smo jih dajali na led. Nato smo v posamezno luknjo na ploščici odpipetirali 1,5 mL donorske raztopine RAL/BAZ. V luknje, kjer smo imeli samo RAL/BAZ, brez inhibitorja, smo dodali 15 µL čistega DMSO, v nadaljnje luknje pa 15 µL ustreznega inhibitorja (npr. za luknje s 50 µM MK571 smo dodali v luknjo še 15 µL 5,0 mM MK571). Čisti DMSO smo dodali v luknje brez inhibitorja zato, da smo imeli v vseh luknjah enako koncentracijo DMSO. V vsako luknjo na plošči smo dali eno jetrno rezino, ploščo pokrili in jo dali v termični stresalnik. Termični stresalnik je bil nastavljen na hitrost stresanja 20 obratov/minuto, segret na 37°C in prepelan s karbogenom. Razporeditev plošče je prikazana na sliki 4.

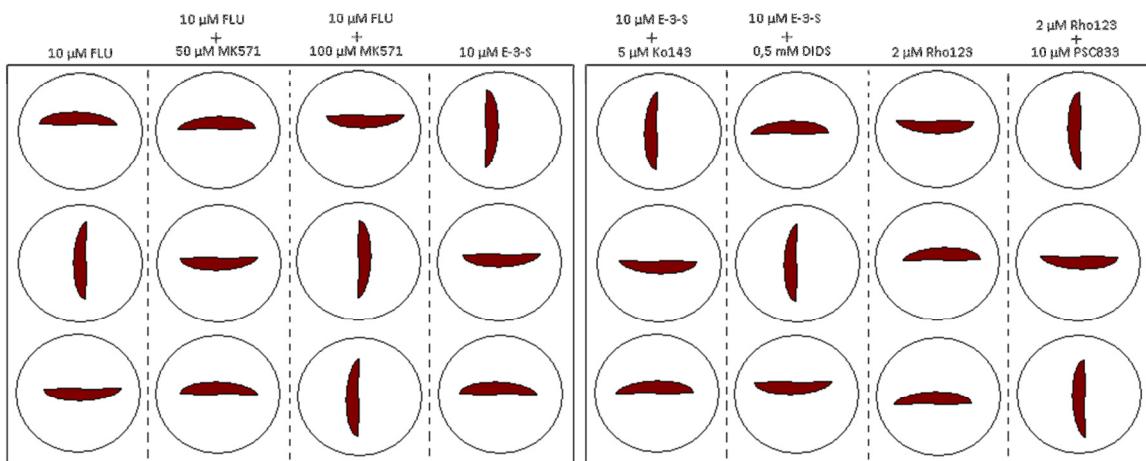


Slika 4 – Razporeditev plošče pri poskusih na jetrni rezinah z RAL oz. BAZ.

Pri poskusih pozitivnih kontrol, s katerimi smo preverjali delovanje našega sistema, smo plošče zastavili drugače. Za vsak prenašalec smo naredili poskus s samim substratom in še poskus s tipičnim inhibitorjem. Za te poskuse smo luknje na plošči napolnili le z 1,5 mL

transportnega medija za jetra, substrate in ustrezné inhibitorje pa smo v luknje dodali naknadno. V vsako luknjo smo dodali 15 µL ustrezné spojine iz pripravljenih donorských epic. Tudi tu smo v luknje, kjer nismo dodali inhibitorja, dodali 15 µL DMSO.

Razporeditev na ploščah se vidi na sliki 5.



Slika 5 – Razporeditev plošč pri pozitivnih kontrolah na jetrnih rezinah.

Med čakanjem na dokončanje poskusa smo si pripravili po eno 1,5 mL epico za vsako luknjo in nanjo napisali, kaj bomo dali vanjo. Pripravili smo si tudi 2 mL epice, ki smo jih ravno tako označili. V te epice smo po poskusu dali rezine. V 50 mL čašo smo nalili raztopino PBS in jo postavili na led. Pripravili smo še papirnate brisače in kovinsko pinceto.

Po uri in pol smo vzeli ploščo iz stresalnika. Ploščo smo odprli in iz vsake luknje v svojo epico odpipetirali 100 µL zunanje raztopine. Vsak nastavek za pipeto smo najprej nasitili z raztopino (smo enkrat odpipetirali nazaj v luknjo) in isti nastavek uporabili za vse paralelke poskusa. Ko smo prenesli vse vzorce zunanje raztopine, smo vsako rezino posebej s kovinsko pinceto vzeli iz luknje, jo sprali v ledeno hladni raztopini PBS, osušili na papirnati brisači in jo nato dali v 2 mL epico. Epice smo takoj zaprli in jih zamrznili v posodi s tekočim dušikom. V epice z zunanjim raztopinom smo odpipetirali po 300 µL metanolne raztopine haloperidola, jih zaprli in dali na led. Epice z rezinami smo pobrali iz tekočega dušika, jih osušili in v vsako epico z rezino dodali 300 µL ledeno hladne raztopine PBS. Epice smo dali na led in homogenizirali s homogenizatorjem Polytron PT 1600 E. Homogenatu rezin smo dodali 900 µL metanolne raztopine haloperidola. Vse vzorce smo čez noč pustili v zamrzovalniku.

Naslednje jutro smo epice centrifugirali 15 min pri $15\ 000 \times g$ in $4^\circ C$.

Iz epic smo prenesli $100\ \mu L$ supernatanta v mikrotitrsko ploščo. Pri tem smo pazili, da nismo zajeli usedline. Mikrotitrsko ploščo smo postavili do analize na LC-MS/MS nazaj v zamrzovalnik.

Iz epic s FLU in Rho123 pa smo odpipetirali $100\ \mu L$ supernatanta v črno mikrotitrsko ploščo. Nato smo vzorce z FLU razredčili s $100\ \mu L$ $0,025\ M$ NaOH, vzorce z Rho123 pa s $100\ \mu L$ $0,01\ M$ HCl. Koncentracije FLU in Rho123 smo pomerili na mikrofilterskem čitalcu Tecan, GENios.

3.2.6 Potek poskusov na HepG2 celicah

Gojenje HepG2 celic

Celice smo gojili v Dulbecco-vem spremenjenem Eagles-ovem mediju (ang. »Dulbecco's modified Eagle's medium«, DMEM), oplemenitenem z 10 % fetalnega govejega seruma, 1 % L-glutamina (200x, 100 mmol/L) in 1 % antibiotikov (ampicilina in streptomicina). Plošče s celicami so bile v inkubatorju na $37^\circ C$, na primerni vlažnosti in prepokane s karbogenom. Za poskus smo celice nacepili na nove gojiščne plošče z 48 luknjami in jih gojili do konfluentnosti (gostota celic okrog 150 000 celic na luknjo). Medij smo menjali vsak dan.

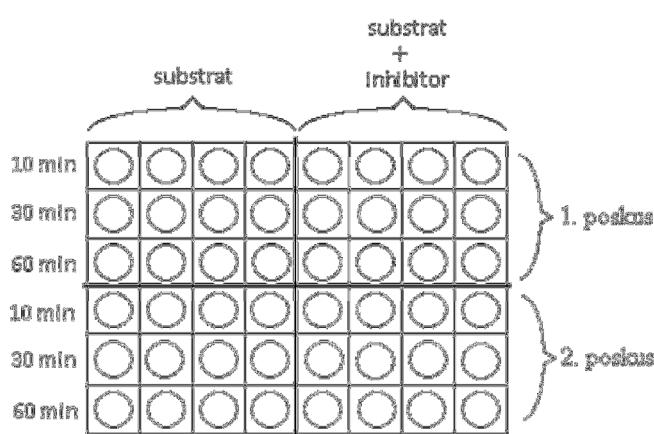
Priprava donorskih raztopin za poskuse na HepG2 celicah

Uporabili smo osnovne donorske raztopine substratov in inhibitorjev, ki smo jih uporabili že v prejšnjih poskusih. Na eni gojitveni plošči z 48 luknjami smo hkrati izvajali dva poskusa. Za en poskus smo potrebovali eno bučko s substratom oz. RAL oz. BAZ in drugo bučko substrata z ustreznim inhibitorjem. Ker smo imeli tri časovne točke s štirimi paralelkami, smo potrebovali 12-krat po $300\ \mu L$ donorske raztopine, kar je $3,6\ mL$. Za lažjo pripravo smo uporabili $5\ mL$ bučke. Tako smo na primer za RAL v eno bučko odpipetirali $50\ \mu L$ $1,5\ mM$ raztopine RAL, dodali $50\ \mu L$ čistega DMSO in dopolnili do oznake z DMEM medijem, da smo dobili $15\ \mu M$ raztopino RAL. V drugo bučko smo ravno tako odpipetirali $50\ \mu L$ $1,5\ mM$ raztopine RAL ter npr. $50\ \mu L$ $5,0\ mM$ raztopine MK571, da smo dobili raztopino $15\ \mu M$ RAL in $50\ \mu M$ MK571. Tudi to bučko smo do oznake dopolnili z DMEM medijem. Pri vsakem poskusu smo preračunali, koliko osnovne donorske raztopine moramo dodati v bučko, da bomo dobili pravo koncentracijo.

Potek poskusa na HepG2 celicah, vzorčenje in priprava vzorcev za LC-MS/MS ter mikrofilterski čitalnik

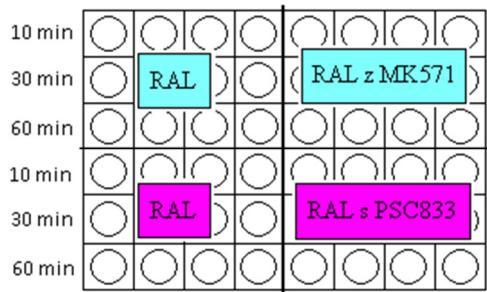
Najprej smo si pripravili donorske raztopine, označili epice s številkami od 1 do 48, prižgali hladilno/grelno ploščo in jo nastavili na 37°C. Naredili smo 250 mL raztopine PBS, jo nekaj natočili v malo čašo, nato pa bučko in čašo postavili na led. Pripravili smo male čaše in 5 mL nastavke za multipeto. K pultu, kjer smo delali poskus, smo potegnili sesalno iglo. Preden smo odšli po ploščo s HepG2 celicami, smo donorske raztopine potopili v toplo vodo, da so se ogrele na 37°C.

Ko smo prinesli ploščo s celicami, smo jo takoj postavili na ogreto hladilno/grelno ploščo. Ploščo smo razdelili na štiri dele in označili, kateri poskus bomo kje izvajali. Razdelitev je prikazana na sliki 6. Nato smo ploščo odprli in najprej posesali medij iz prvih treh vrstic. Prvi in drugi poskus smo malo zamknili, ker smo porabili pri vzorčenju veliko časa.



Slika 6 – Razdelitev plošče pri poskusih na HepG2 celicah.

V nadaljevanju je opisan primer poskusa RAL z inhibitorjem MK571 in PSC833. Najprej smo iz tople vode vzeli eno donorsko raztopino RAL in donorsko raztopino RAL z MK571. Vsako raztopino smo prelili v svojo čašo. Vzeli smo en 5 mL nastavek za multipeto, ga vstavili v multipeto in multipeto nastavili na 300 µL. Najprej smo v 12 lukenj levo zgoraj odpipetirali po 300 µL donorske raztopine RAL, nato pa v 12 lukenj desno zgoraj še 300 µL donorske raztopine RAL z MK571. Ko smo napolnili luknje levo zgoraj smo vključili štoparico. Po 6 minutah smo iz tople vode vzeli še drugo donorsko raztopino RAL in donorsko raztopino RAL s PSC833. Tudi te smo prelili v novi čaši. Posesali smo medij iz ostalih treh lukenj, vzeli nov nastavek za multipeto in ob sedmi minutih najprej napolnili 12 lukenj levo spodaj s 300 µL donorske raztopine RAL in nato še 12 lukenj desno spodaj s 300 µL donorske raztopine RAL s PSC833 (slika 7).



Slika 7 – Razporeditev plošče v primeru poskusa na HepG2 celicah med RAL in inhibitorjem MK571 in PSC833.

Prvič smo vzorčili po 10 minutah, drugič po 30 minutah in tretjič po 60 minutah. Vzorčili smo po naslednjem zaporedju. Najprej smo posesali raztopino iz prve vrstice (pri raloksifenu z modro barvo, 10 min). Takoj smo v vsako luknjo z multipeto odpipetirali 600 μL pripravljene ledeno hladne raztopine PBS in jo posesali ven. To smo ponovili še dvakrat. Po tem smo v vsako luknjo odpipetirali po 200 μL PBS, ki smo ga pustili v luknji. V vsako luknjico smo vstavili nastavek za pipeto in z njim praskali po dnu luknjice. Kako smo praskali, je prikazano na sliki 8.



Slika 8 – Prikaz načina praskanja celic iz luke.

S pomočjo pipete smo nato iz vsake luknjice vso raztopino PBS s celicami prenesli v epico z določeno številko. Epice smo zaprli in jih dali takoj na led. Po 7 minutnem zamiku smo posesali še donorske raztopine iz četrte vrstice (pri raloksifenu z vijolično barvo, 10 min) in ponovili postopek opisan pri prvi vrstici. Enako smo postopali pri ostalih časovnih točkah. Po vsaki časovni točki smo nato epice z vzorci trikrat zamrznili in odmrznili v tekočem dušiku, s čimer smo lizirali celice. Ko smo celoten poskus končali, samo počakali, da se je vsebina epic odtalila. V nadaljevanju smo celice lizirali še z ultrazvočno sonifikacijo. Vse epice smo nato centrifugirali 10 minut pri $16\,000 \times g$ in 4°C .

Iz epic smo nato previdno prenesli 100 μL supernatanta v mikrotitrsko ploščo. Supernatantu smo dodali z večkanalno pipeto še 300 μL metanolne raztopine haloperidola. Mikrotitrsko ploščo smo 48 ur hranili v zamrzovalniku. Po 48 urah smo plošče centrifugirali pri $15\,000 \times g$ in 4°C 10 minut in supernatant prenesli v mikrotitrsko ploščo za merjenje na LC-MS/MS.

Tudi tu smo vzorce, ki so vsebovali FLU in Rho123, merili s mikrofilterskim čitalnikom. 100 µL supernatanta smo previdno prenesli v črno mikrotitrsko ploščo in ga razredčili s 100 µL 0,025 M NaOH v primeru FLU in s 100 µL 0,01 M HCl v primeru Rho123 in izmerili fluorescenco.

Priprava vzorcev za določitev količine proteinov po Bradfordovi metodi

Z namenom normiranja koncentracij RAL/BAZ v lizatih smo določili količino proteinov v vzorcih. Iz vzorcev po centrifugiraju, ki smo jih pripravili za določitev spojin, smo prenesli po 20 µL supernatanta v prozorno mikrotitrsko ploščo. V vsako luknjo smo z multipeto dodali še 20 µL destilirane vode in z večkanalno pipeto še 160 µL delovnega reagenta za določanje proteinov. Delovni reagent za določitev proteinov smo pripravili z mešanjem 50 delov Pierce® BCA reagenta A in 1 dela BCA™ reagenta B. Pripravljeno mikrotitrsko ploščo smo dali na hladilno/grelno ploščo na 37°C za pol ure, da se je tekočina v luknjicah obarvala vijolično. Nato smo izmerili absorbanco vzorcev na mikrofilterskem čitalniku pri 595 nm.

3.2.7 Analitika

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

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

Raloksifen

Volumen injiciranja: 0,1 µL.

Čas analize na MS: 0,7 – 2 min.

Program gradientnega izpiranja na koloni po injiciranju vzorca je predstavljen v tabeli 7.

Kako smo identificirali RAL in njegove metabolite z LC-MS/MS, je predstavljeno v tabeli 8.

Tabela 7 – Program gradientnega izpiranja na koloni po injiciranju vzorca.

čas od začetka injiciranja (min)	% mobilne faze B	pretok (mL/min)
0,25	10	0,80
0,50	20	0,65
1,00	30	0,65
1,25	50	0,65
1,70	50	0,65
1,75	10	0,65

Tabela 8 – Identifikacija RAL in njegovih metabolitov z LC-MS/MS.

analit	MRM prehod (m/z)	fragmentor	kolizijska energija [eV]	Polarnost	retencijski čas [min]
RAL	474,2 > 112	200	32	+	1,433
M1	650,2 > 474	200	28	+	1,073
M2	650,2 > 474	200	28	+	1,209
M3	826,2 > 474	200	40	+	0,906
HAL	376 > 165	200	32	+	1,463

Bazedoksifen

Volumen injiciranja: 0,1 µL.

Čas detekcije na MS: 1,1 – 2 min.

Program gradientnega izpiranja na koloni po injiciranju vzorca je predstavljen v tabeli 9, kako smo identificirali BAZ in njegove metabolite z LC-MS/MS pa je predstavljeno v tabeli 10.

Tabela 9 – Program gradientnega izpiranja na koloni po injiciranju vzorca.

čas od začetka injiciranja (min)	% mobilne faze B	pretok (mL/min)
0,25	10	0,80
0,50	20	0,65
1,00	30	0,65
1,80	50	0,65
2,00	50	0,65
2,01	10	0,65
2,50	10	0,65

Tabela 10 – Identifikacija BAZ in njegovih metabolitov z LC-MS/MS.

analit	MRM prehod (m/z)	fragmentor	kolizijska energija [eV]	polarnost	retencijski čas [min]
BAZ	471 > 126	200	32	+	1,633
M4	647 > 471	200	28	+	1,296
HAL	376 > 165	200	32	+	1,502

Fluorescein in rodamin 123

FLU in Rho123 smo merili z mikrofilterskim čitalnikom Tecan, GENios. Ekscitacijska svetloba je bila nastavljena na valovno dolžino 485 nm in emisijska svetloba na valovno dolžino 535 nm. Aparat je meril po predhodno nastavljeni metodi.

Proteini

Z mikrofilterskim čitalnikom smo merili absorbanco pri valovni dolžini 595 nm. Aparat je meril po predhodno nastavljeni metodi.

3.2.8 Obdelava rezultatov

Obdelava rezultatov pri jetrnih rezinah

S pomočjo LC-MS/MS in mikrofilterskega čitalnika smo dobili podatke o koncentracijah spojin v lizatih. Rezultate iz LC-MS/MS smo umerili na interni standard haloperidol, ki smo ga dodali priobarjanju vzorcev. V programu Microsoft Office Excel smo naredili t-test s primerjavo kontrolnega lizata (brez inhibitorja) in testnega lizata (z inhibitorjem). Za vsak poskus smo izračunali standardno deviacijo in standardno napako. Iz podatkov smo narisali grafe koncentracije substratov in jih primerjali med seboj. Na grafih smo prikazali standardne napake in stolpce označili z zvezdico, če je bila razlika do kontrolnega lizata signifikantna ($p < 0,05$).

Obdelava rezultatov pri HepG2 celicah

S pomočjo LC-MS/MS in mikrofilterskega čitalnika smo dobili podatke o koncentracijah v lizatih celic, te pa smo normirali na koncentracijo proteinov, ki je premosorazmerna s številom celic. V programu Microsoft Office Excel smo naredili t-test s primerjavo kontrolnega lizata (brez inhibitorja) in testnega lizata (z inhibitorjem). Za vsak poskus smo izračunali standardno deviacijo in standardno napako. Iz podatkov smo narisali grafe koncentracije substratov v odvisnosti od časa. Na grafih smo prikazali standardne napake in točke s signifikantno razliko od kontrole označili z zvezdico ($p < 0,05$).

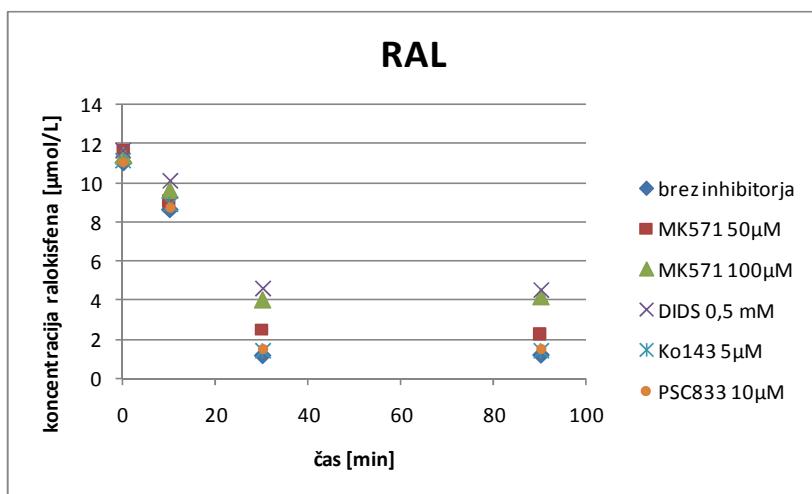
4 REZULTATI IN RAZPRAVA

4.1 REZULTATI POSKUSA NA MIKROSOMIH

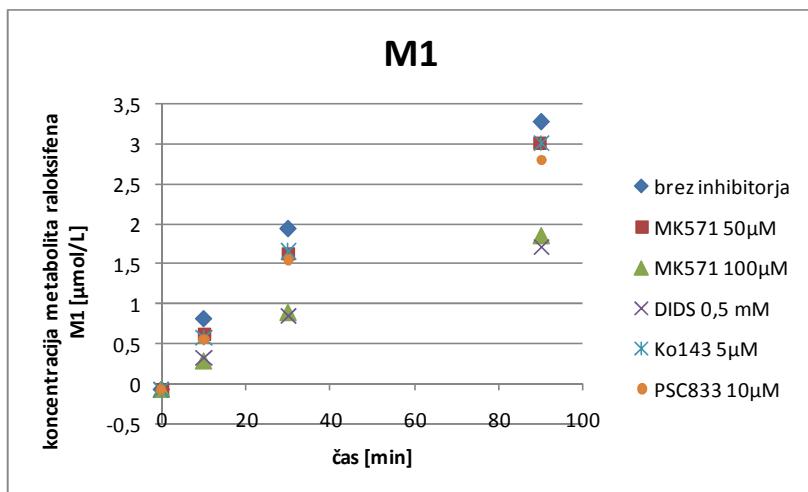
Z izvedbo poskusov na mikrosomih smo ugotavljali vpliv inhibitorjev prenašalcev na metabolizem RAL in BAZ.

Iz slik 9, 10 in 11 lahko vidimo, da prisotnost inhibitorjev prenašalcev 0,5 mM DIDS in 100 µM MK571 sorazmerno močno inhibira metabolizem RAL do M1 in M2. Prisotnost inhibitorjev 50 µM MK571, 5 µM Ko143 in 10 µM PSC833 pa le rahlo inhibira metabolizem RAL do njegovih metabolitov.

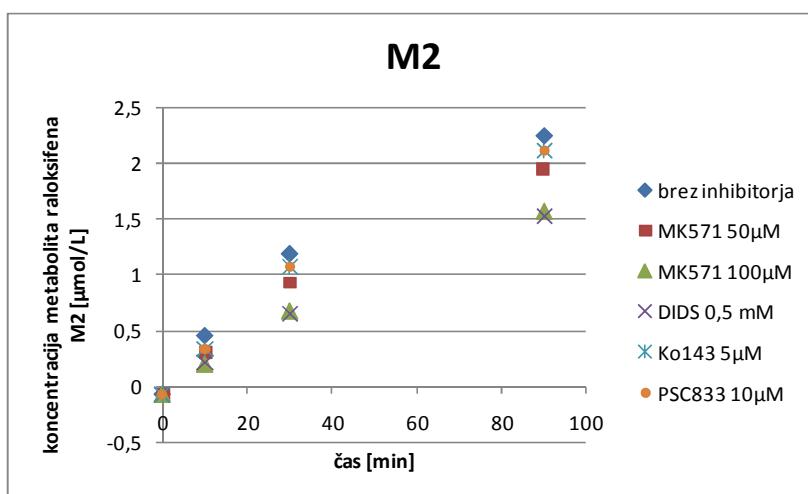
Iz teh rezultatov lahko sklepamo, da DIDS in MK571 pri uporabljenih koncentracijah vplivata na kinetiko metabolizma RAL z UGT encimi in spremenita razmerje RAL in njegovih metabolitov v celici. To ugotovitev je treba upoštevati predvsem pri razlagi rezultatov poskusov na jetrnih rezinah, pri komentiranju poskusov na HepG2 celicah pa ne, saj tam ne pride do nastanka metabolitov.



Slika 9 - Poskus na mikrosomih: potek spremnjanja koncentracije RAL v odvisnosti od časa ob uporabi različnih inhibitorjev prenašalcev.

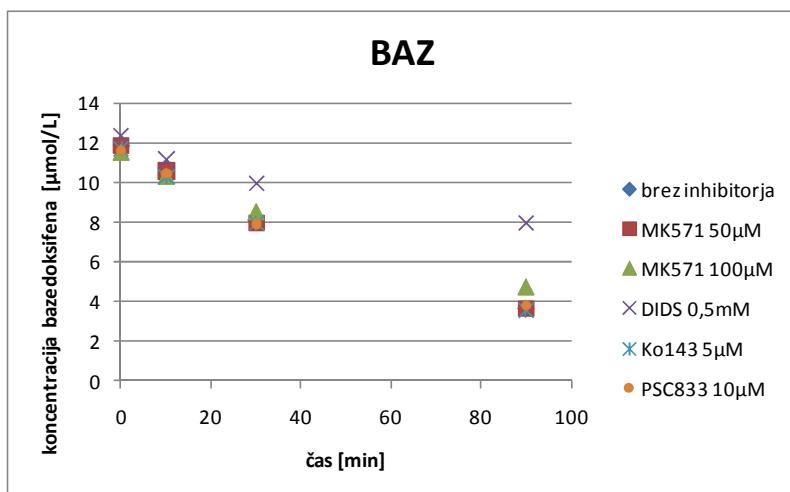


Slika 10 - Poskus na mikrosomih: potek spremnjanja koncentracije M1, metabolita RAL, v odvisnosti od časa ob uporabi različnih inhibitorjev prenašalcev.

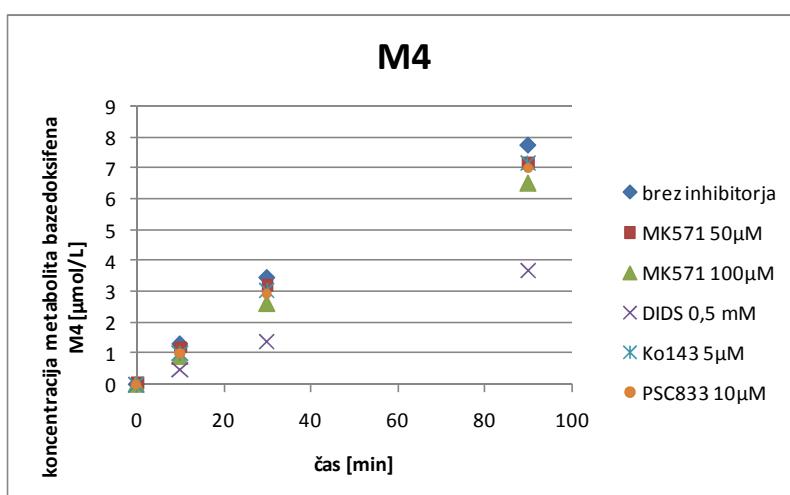


Slika 11 - Poskus na mikrosomih: potek spremnjanja koncentracije M2, metabolita RAL, v odvisnosti od časa ob uporabi različnih inhibitorjev prenašalcev.

Na slikah 12 in 13 smo prikazali rezultate vpliva prisotnosti inhibitorjev prenašalcev na metabolizem BAZ. In teh grafov vidimo, da DIDS v precejšnji meri inhibira nastanek glukuronida M4. Poleg DIDS ima nekoliko večji vpliv na glukuronidacijo BAZ še MK571 ($100 \mu\text{M}$). Vpliv ostalih inhibitorjev je minimalen. Pri poskusih na jetrnih rezinah moramo to upoštevati. Enako kot v primeru RAL, HepG2 celice ne metabolizirajo BAZ, zato tam upoštevanje vpliva na metabolizem ni potrebno.



Slika 12 - Poskus na mikrosomih: potek spremnjanja koncentracije BAZ v odvisnosti od časa ob uporabi različnih inhibitorjev prenašalcev.

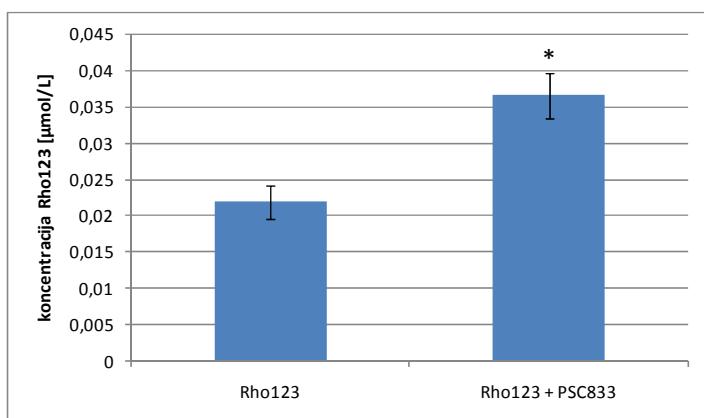


Slika 13 - Poskus na mikrosomih: potek spremnjanja koncentracije M4, metabolita BAZ, v odvisnosti od časa ob prisotnosti različnih inhibitorjev prenašalcev.

4.2 REZULTATI POSKUSOV NA JETRNIH REZINAH

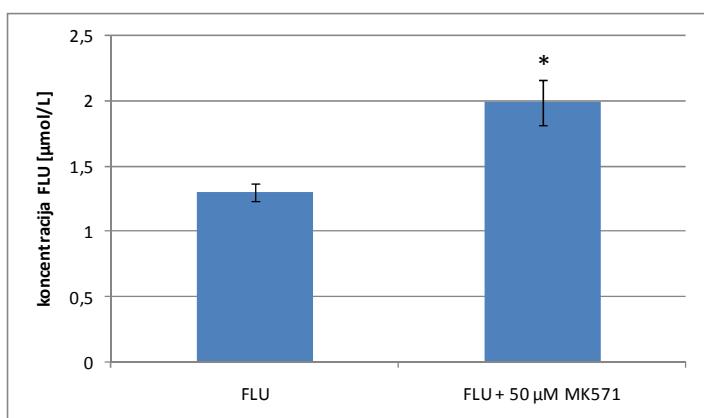
4.2.1 Rezultati pozitivnih kontrol na jetrnih rezinah

Pri pozitivni kontroli za **P-gp** na rezinah je bil substrat Rho123 in inhibitor 10 µM PSC833. Ker P-gp prenaša spojine iz hepatocitov, naj bi se ob prisotnosti njegovega inhibitorja koncentracija njegovega substrata v hepatocitih povečala. Iz slike 14 vidimo, da se je koncentracija Rho123 ob inhibitorju PSC833 res signifikantno povečala (t -test = 0,043), zato lahko rečemo, da je pozitivna kontrola za P-gp potrdila prisotnost P-gp.



Slika 14 - Pozitivna kontrola na jetrnih rezinah za prenašalec P-gp; Rho123 je substrat, PSC833 je inhibitor prenašalca. * pomeni signifikantno spremembo.

MRP prenašalci prenašajo spojine iz hepatocitov, zato mora ob prisotnosti inhibitorja več substrata ostati v celici. Kot substrat smo uporabili FLU in kot inhibitor 50 µM MK571. Kot vidimo iz slike 15, se je koncentracija FLU ob MK571 res signifikantno povečala (t -test = 0,0092), zato lahko z gotovostjo rečemo, da je pozitivna kontrola za MRP delovala.

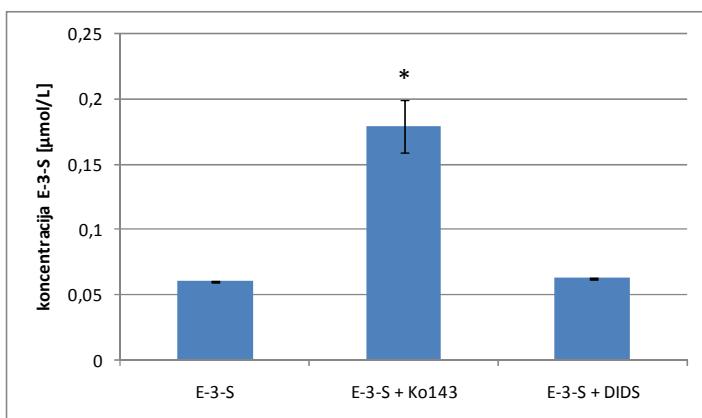


Slika 15 - Pozitivna kontrola na jetrnih rezinah za MRP prenašalce: FLU je substrat, MK571 je inhibitor. * pomeni signifikantno spremembo.

Slika 16 prikazuje rezultate pozitivne kontrole za prenašalca BCRP in OATP.

BCRP je izločevalni prenašalec in prenaša spojine iz hepatocita v žolčni kanal. Če ga inhibiramo se začnejo njegovi substrati kopitičiti v hepatocitu. Iz slike 16 je razvidno, da se je ob inhibitorju BCRP, 5 µM Ko143, koncentracija E-3-S v hepatocitu signifikantno povečala ($t\text{-test} = 0,0065$). Zato lahko rečemo, da je pozitivna kontrola za BCRP delovala in smo s tem potrdili ustreznost eksperimentalnih pogojev.

OATP prenašalci prenašajo spojine v hepatocit, zato se koncentracija njihovih substratov v hepatocitih zmanjša, če jih inhibiramo. Ob inhibitorju OATP, 0,5 mM DIDS, se koncentracija E-3-S presenetljivo ni značilno spremenila ($t\text{-test} = 0,121$).



Slika 16 - Pozitivna kontrola na jetrnih rezinah za BCRP prenašalec (inhibitor Ko143) in OATP prenašalce (inhibitor DIDS): substrat za oba prenašalca je E-3-S. * pomeni signifikantno spremembo.

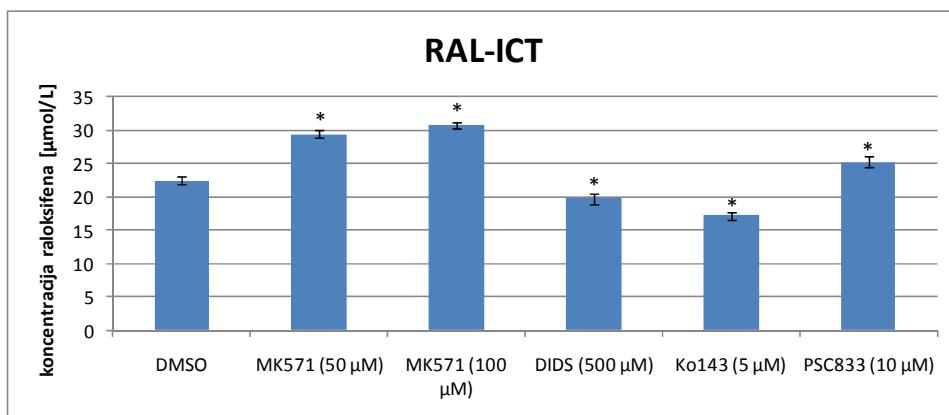
4.2.2 Rezultati poskusov na jetrnih rezinah z raloksifenom

P-gp je izražen na kanalikularni membrani hepatocita in če ga inhibiramo s PSC833, se mora koncentracija njegovih substratov v hepatocitu povečati. Iz slike 17 je razvidno, da se je koncentracija RAL ob prisotnosti PSC833 signifikantno povečala ($t\text{-test} = 0,043$), zato lahko sklepamo, da je RAL substrat P-gp prenašalca.

MK571 inhibira **MRP** prenašalce, ki so izločevalni prenašalci. Iz slike 17 lahko vidimo, da se je koncentracija RAL ob uporabi obeh koncentracij MK571 signifikantno povečala (pri 50 µM MK571 je $t\text{-test} = 0,049$, pri 100 µM MK571 je $t\text{-test} = 0,0011$). Predvidevamo, da se RAL z MRP prenašalci ni izločal iz hepatocita in ga je zato več ostalo v hepatocitu. Hkrati se ga je verjetno tudi manj metaboliziralo. Sklepamo lahko, da je RAL substrat MRP prenašalcev.

BCRP je tudi izločevalni prenašalec in ob prisotnosti njegovega inhibitorja se mora koncentracija substratov BCRP v hepatocitu povečati. Ko143 je inhibitor BCRP. Kot je razvidno iz slike 17, se je ob prisotnosti Ko143 koncentracija RAL v hepatocitu signifikantno zmanjšala (t -test = 0,0077). Ta rezultat niti ne potrdi, da je RAL substrat za BCRP, ker bi se morala njegova koncentracija signifikantno povečati, niti ne pove, da ni substrat za BCRP, ker bi v tem primeru morala koncentracija RAL ostati enaka kot v kontroli. Tega rezultata z našim trenutnim znanjem ne znamo razložiti.

OATP prenašalci prenašajo substrate v hepatocyte. Ob inhibitorju DIDS se mora zato koncentracija substratov v hepatocitu zmanjšati. Kot je razvidno na sliki 17, se je koncentracija RAL ob prisotnosti DIDS res signifikantno zmanjšala (t -test = 0,0345), kar kaže na to, da je RAL substrat za OATP prenašalce.



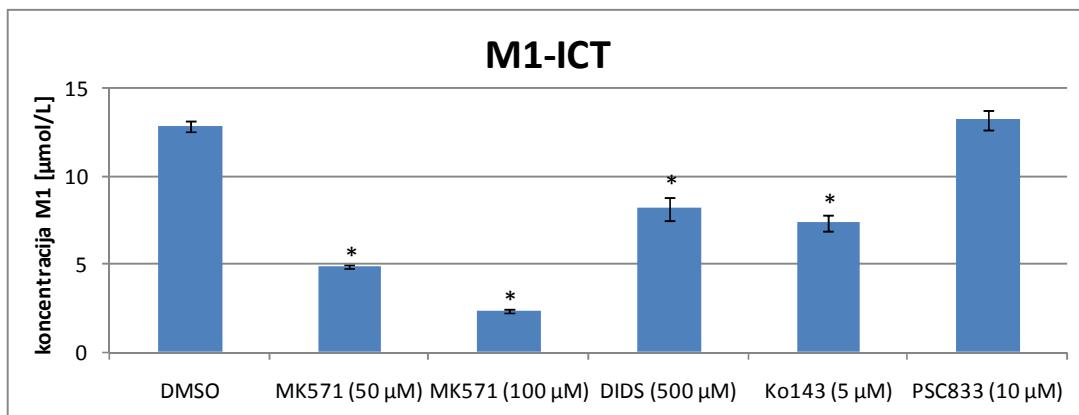
Slika 17 - Poskus na jetrnih rezinah z RAL ob prisotnosti inhibitorjev prenašalcev, prikazana je koncentracija RAL: DMSO za kontrolo, MK571 za MRP prenašalce, DIDS za OATP prenašalce, Ko143 za BCRP prenašalec in PSC833 za P-gp prenašalec. * pomeni signifikantno spremembo.

Na slikah 18 in 19 smo prikazali rezultate poskusa RAL na jetrnih rezinah, s tem da smo prikazali koncentracije njegovih metabolitov. Pri obeh metabolitih opazimo podobne spremembe v koncentracijah glede na kontrolni poskus (z DMSO). Iz poskusov na mikrosomih vemo, da inhibitorja MK571 in DIDS upočasnita metabolizem RAL (slika 9) in da se spremeni koncentracija njegovih metabolitov (slika 10 in 11). Pri inhibitorjih **MK571** in **DIDS** smo zato pričakovali manj metabolitov v hepatocitih, kar se je dejansko zgodilo (sliki 18 in 19). Znižanje koncentracij M1 in M2 je signifikantno. Ob prisotnosti DIDS je v hepatocitu manj RAL (slika 17) in je že zato manj metabolitov, hkrati pa je upočasnen še metabolizem. Znižanje koncentracije obeh metabolitov lahko razložimo tudi s tem, da MK571 inhibira še privzemne prenašalce (OATP1B1, OATP2B1, OATP1B3 in druge), ki ju privzemajo nazaj v hepatocyte [58].

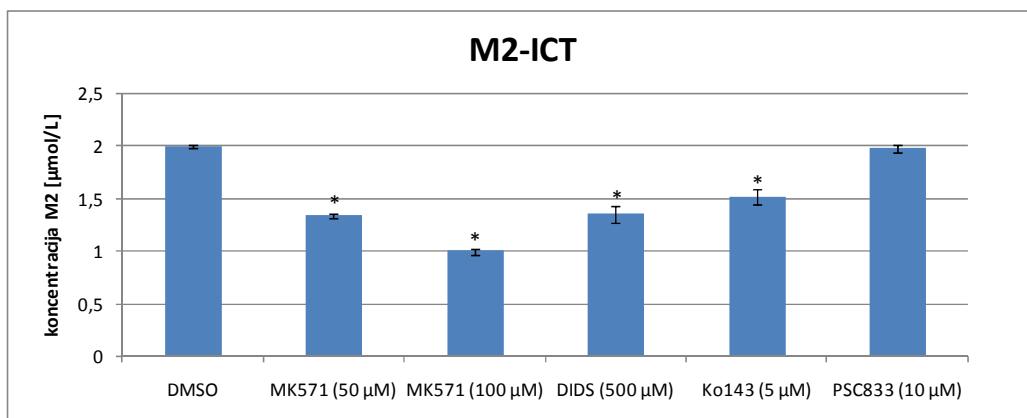
REZULTATI IN RAZPRAVA

Zakaj se zmanjša koncentracija metabolitov RAL v prisotnosti **Ko143** (sliki 18 in 19), s svojim znanjem ne znamo razložiti, kljub temu, da Ko143 ne vpliva na metabolizem in da bi moralo biti v hepatocitu več metabolitov. Vendar glede na to, da je bilo v tem poskusu manj RAL v hepatocitu in ne več, tudi metabolitov ni moglo nastati več.

Z inhibitorjem **PSC833** je nastala enaka količina metabolitov RAL kot pri kontrolnem poskusu (slika 18 in 19). Pri poskusu na mikrosomih (slika 10 in 11) vidimo, ob PSC833 nastalo čisto malo manj metabolitov kot pri kontrolnem poskusu, zato mogoče pri našem poskusu ne opazimo razlike, pa tudi razlika v koncentraciji RAL ni bila velika (slika 17).



Slika 18 - Poskus na jetrnih rezinah z RAL ob prisotnosti inhibitorjev prenašalcev, prikazana je koncentracija metabolita RAL, M1: DMSO za kontrolo, MK571 za MRP prenašalce, DIDS za OATP prenašalce, Ko143 za BCRP prenašalec in PSC833 za P-gp prenašalec. * pomeni signifikantno spremembo.



Slika 19 - Poskus na jetrnih rezinah z RAL ob prisotnosti inhibitorjev prenašalcev, prikazana je koncentracija metabolita RAL, M2: DMSO za kontrolo, MK571 za MRP prenašalce, DIDS za OATP prenašalce, Ko143 za BCRP prenašalec in PSC833 za P-gp prenašalec. * pomeni signifikantno spremembo.

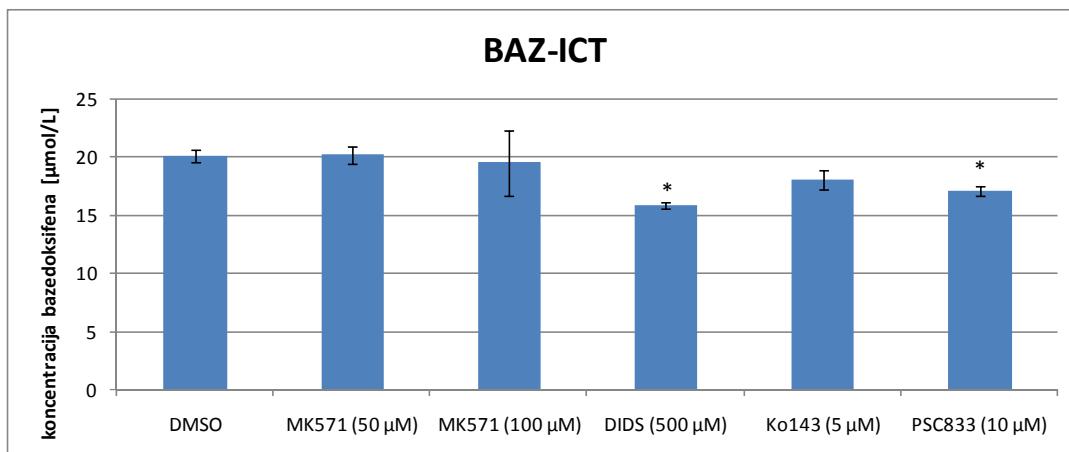
4.2.3 Rezultati poskusov na jetrnih rezinah z bazedoksifenom

Ob inhibitorju PSC833, ki je inhibitor **P-gp prenašalca**, na sliki 20 opazimo signifikantno spremembo koncentracije BAZ. Koncentracija BAZ se je zmanjšala, kar je v nasprotju z dejstvom, da naj bi se ob inhibiciji P-gp, ki je izločevalni prenašalec, koncentracija njegovega substrata povečala. Zato ne moremo sklepati, niti da je, niti da BAZ ni substrat za P-gp.

MRP prenašalci prenašajo spojine iz hepatocita, zato se koncentracija njihovih substratov poveča, če jih inhibiramo. Na sliki 20 je razvidno, da se koncentracija BAZ ob prisotnosti MK571, ki je MRP inhibitor, ni spremenila. Na podlagi tega lahko sklepamo, da BAZ ni substrat za MRP prenašalec.

Z inhibitorjem Ko143, ki je inhibitor **BCRP**, na sliki 20 ni opaziti signifikantne spremembe koncentracije BAZ, kar nakazuje na dejstvo, da BAZ najverjetneje ni substrat za BCRP prenašalec.

OATP prenašalci prenašajo spojine v hepatocite. Ko smo z DIDS inhibirali OATP prenašalce, naj bi se koncentracija njegovih substratov v hepatocitu zmanjšala. Kot je razvidno na sliki 20, se je koncentracija BAZ signifikantno zmanjšala, zato lahko sklepamo, da je BAZ substrat OATP prenašalcev.



Slika 20 - Poskus na jetrnih rezinah z BAZ ob prisotnosti inhibitorjev prenašalcev, prikazana je koncentracija BAZ: DMSO za kontrolo, MK571 za MRP prenašalce, DIDS za OATP prenašalce, Ko143 za BCRP prenašalec in PSC833 za P-gp prenašalec. * pomeni signifikantno spremembo.

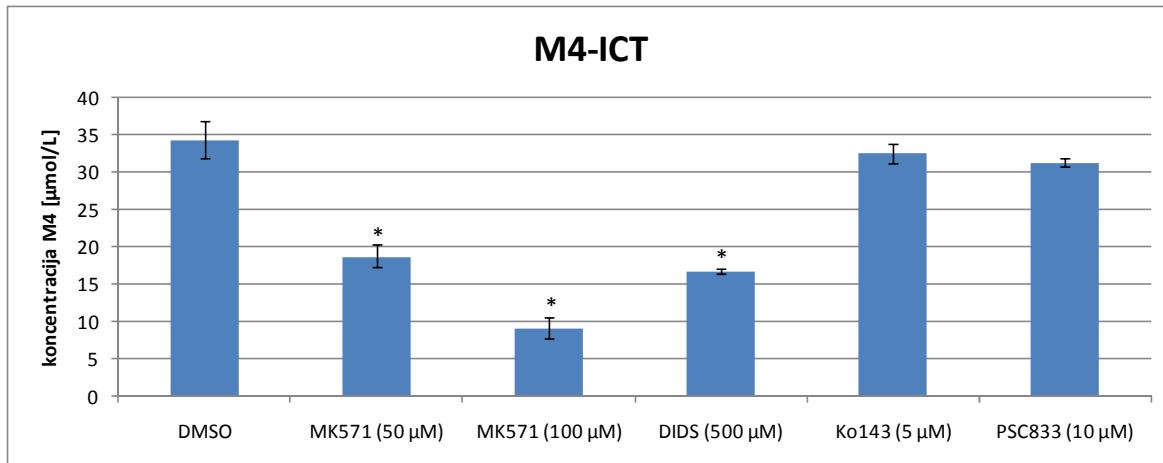
Spremembe koncentracije metabolita BAZ, M4, ob prisotnosti inhibitorjev prenašalcev so prikazane na sliki 21.

Ob prisotnosti inhibitorja **MK571** se je koncentracija M4 signifikantno znižala. Iz poskusa na mikrosomih nismo zaznali, da bi inhibitor MK571 vplival na metabolizem BAZ. Znižanje M4 lahko razložimo s tem, da MK571 inhibira tudi privzemni prenašalec, ki M4 privzema nazaj v hepatocit [58].

Ob prisotnosti inhibitorja **DIDS** se je koncentracija M4 signifikantno zmanjšala. V hepatocitu je manj BAZ, zato je nastalo tudi manj metabolitov, hkrati pa smo s poskusom na mikrosomih ugotovili, da DIDS upočasni metabolizem. Poleg tega je M4 lahko tudi substrat za OATP, kar pomeni, da se ob prisotnosti DIDS koncentracija M4 v hepatocitu zniža. Tako da je nižja koncentracija M4 to vse samo še potrdila.

Ob **Ko143** se koncentracija M4 skoraj ni spremenila. Ker je Ko143 selektivni inhibitor BCRP, lahko predvidevamo, da se je M4 iz hepatocita prenašal z nekim drugim prenašalcem. Iz poskusa na mikrosomih vemo, da Ko143 ne vpliva na metabolizem BAZ.

Tudi ob prisotnosti **PSC833** se koncentracija M4 ni signifikantno spremenila. Tudi M4 najverjetneje ni substrat P-gp prenašalca.



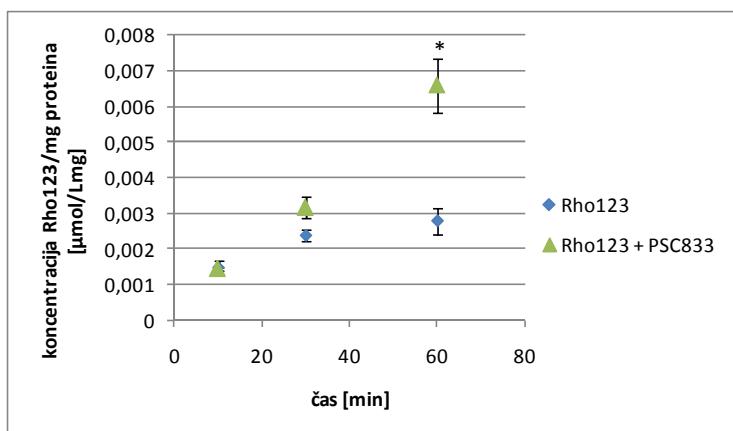
Slika 21 - Poskus na jetrnih rezinah z BAZ ob prisotnosti inhibitorjev prenašalcev, prikazana je koncentracija metabolita BAZ, M4: DMSO za kontrolo, MK571 za MRP prenašalce, DIDS za OATP prenašalce, Ko143 za BCRP prenašalec in PSC833 za P-gp prenašalec. * pomeni signifikantno spremembo.

4.3 REZULTATI POSKUSOV NA HepG2 CELICAH

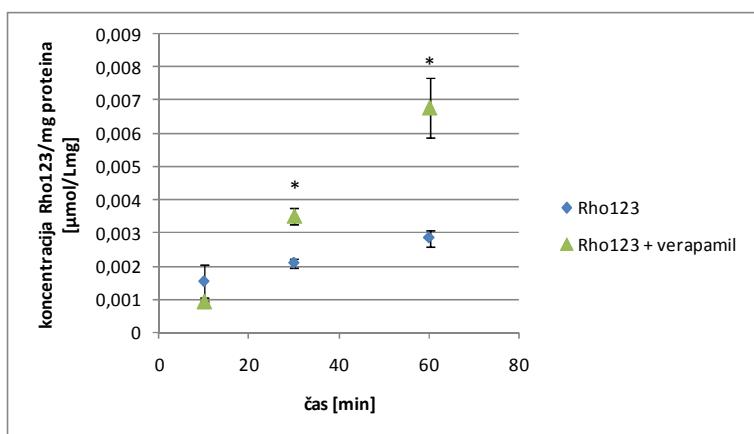
4.3.1 Rezultati pozitivnih kontrol na HepG2 celicah

Da smo preverili, če je naš sev HepG2 celic izražal določen prenašalec, smo naredili pozitivne kontrole.

Za prenašalec **P-gp** smo naredili poskus z Rho123 in inhibitorjem 10 μM PSC833 in 100 μM verapamilom. Ker P-gp prenaša spojine iz hepatocitov, se ob njegovi inhibiciji njegovi substrati kopičijo v hepatocitu. Iz slike 22 je razvidno, da je bila koncentracija Rho123 ob prisotnosti PSC833 signifikantno višja v primerjavi s kontrolo po 60 minutah poskusa. Na sliki 23 je razvidno, da je bila tudi ob prisotnosti verapamila koncentracija Rho123 signifikantno višja v primerjavi s kontrolo že po 30 minutah. Sklepamo lahko, da je naš sev HepG2 celic dovolj dobro izražal P-gp.

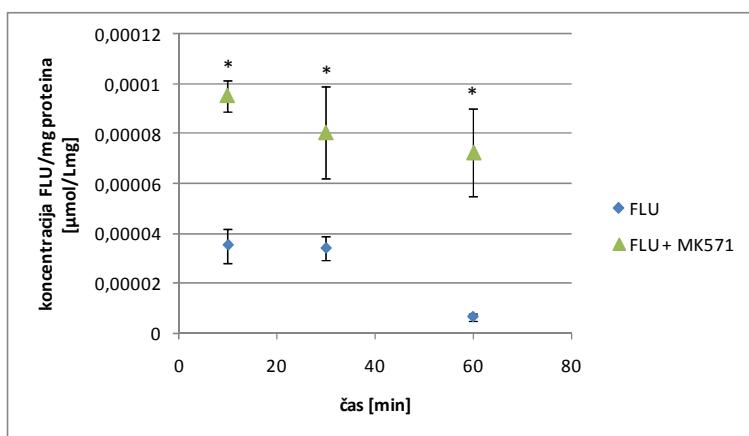


Slika 22 - Pozitivna kontrola na HepG2 celicah za prenašalec P-gp; Rho123 je substrat, PSC833 je inhibitor prenašalca. * pomeni signifikantno spremembo.

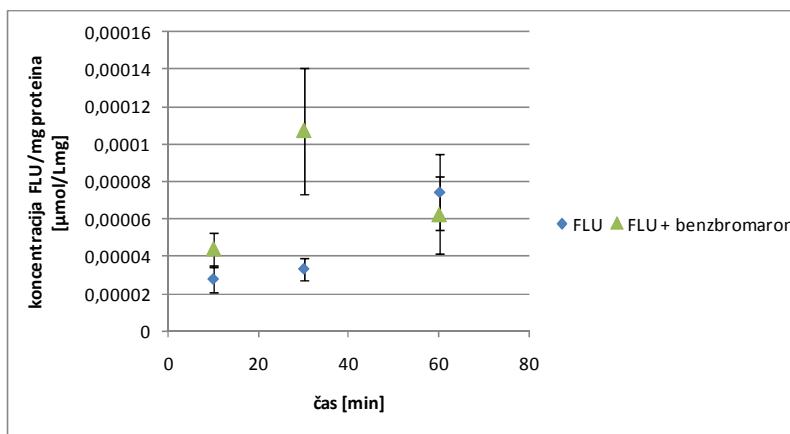


Slika 23 - Pozitivna kontrola na HepG2 celicah za prenašalec P-gp; Rho123 je substrat, verapamil je inhibitor prenašalca. * pomeni signifikantno spremembo.

Za prenašalce **MRP** smo izvedli pozitivni kontroli s substratom FLU in inhibitorjem 50 μM MK571 in 50 μM benzbromaronom. Rezultati so prikazani na slikah 24 in 25. Pri sliki 24 opazimo, da se je koncentracija FLU ob inhibitorju MK571 sicer signifikantno povečala, a je s časom padala. Tudi pri kontroli, kjer ni bilo inhibitorja, je koncentracija s časom padala. Glede na to, da MRP prenašalci prenašajo spojine iz hepatocitov, je ta pozitivna kontrola delovala pravilno, saj je bilo ob inhibitorju več FLU v celici. Pri poskusu FLU ob benzbromaronu je koncentracija FLU narasla, a ne signifikantno, v zadnji časovni točki pa je celo padla. Sklepamo lahko, da HepG2 celice imajo v zadostni meri izražene MRP prenašalce.

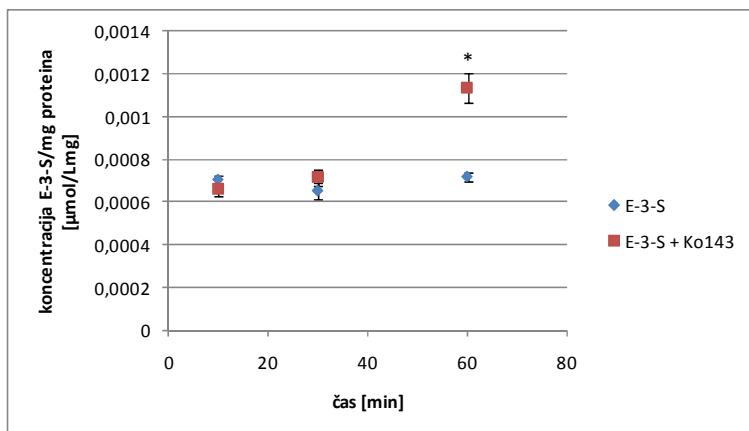


Slika 24 - Pozitivna kontrola na HepG2 celicah za prenašalce MRP; FLU je substrat, MK571 je inhibitor prenašalca. * pomeni signifikantno spremembo.



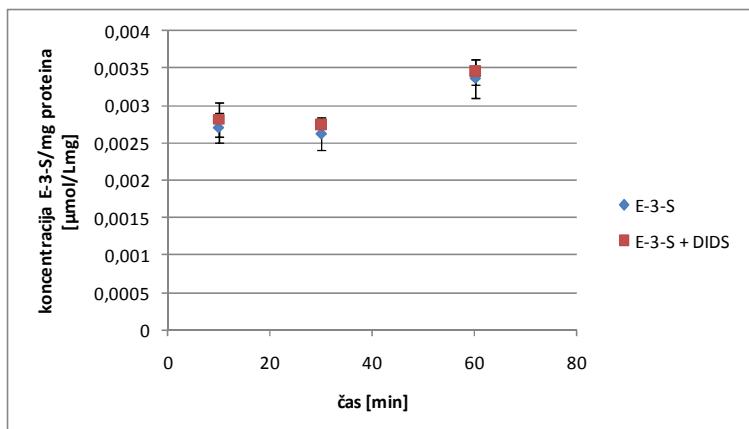
Slika 25 - Pozitivna kontrola na HepG2 celicah za prenašalce MRP; FLU je substrat, benzbromaron je inhibitor prenašalca.

Za prenašalec **BCRP** smo uporabili substrat E-3-S in inhibitor Ko143. BCRP prenosa spojine iz hepatocita in če ga inhibiramo, se koncentracija njegovih substratov v celici poveča. Kot je razvidno iz slike 26, se je koncentracija E-3-S v HepG2 celicah po 60 minutah signifikantno povečala. Iz te pozitivne kontrole lahko sklepamo, da naš sev HepG2 celic izraža BCRP prenašalec.



Slika 26 - Pozitivna kontrola na HepG2 celicah za prenašalec BCRP; E-3-S je substrat, Ko143 je inhibitor prenašalca. * pomeni signifikantno spremembo.

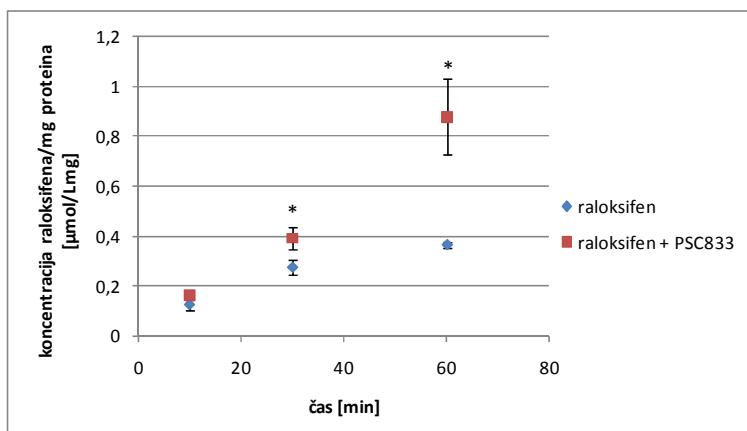
Za **OATP** prenašalce, smo naredili pozitivno kontrolo s substratom E-3-S in inhibitorjem 0,5 mM DIDS (slika 27). Rezultati kažejo na to, da HepG2 celice ne izražajo OATP prenašalcev ali pa je izražanje teh prenašalcev zelo šibko.



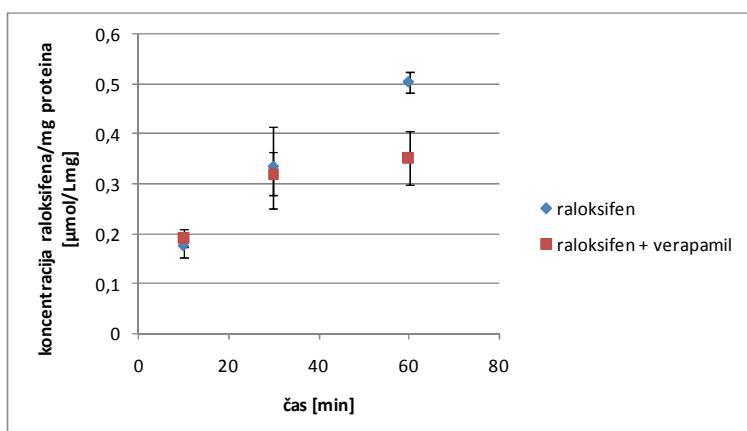
Slika 27 - Pozitivna kontrola na HepG2 celicah za prenašalce OATP; E-3-S je substrat, DIDS je inhibitor prenašalca.

4.3.2 Rezultati poskusov na HepG2 celicah z raloksifenom

Ob inhibiranju P-gp prenašalca se koncentracije njegovih substratov v celici povečajo. Na sliki 28 smo prikazali odvisnost koncentracije RAL brez in z inhibitorjem PSC833 v odvisnosti od časa. Ob PSC833 je bila koncentracija RAL signifikantno višja že po 30 minutah. Iz tega lahko sklepamo, da je RAL substrat za P-gp. Slika 29 prikazuje koncentracijo RAL v odvisnosti od časa brez in z inhibitorjem verapamilom. Ob prisotnosti verapamila je bila koncentracija RAL nižja v primerjavi s kontrolo, kar je ravno obratno, kot smo pričakovali. S PSC833 smo že dokazali, da je RAL P-gp substrat. Ker je verapamil manj selektiven inhibitor kot PSC833 za P-gp prenašalec, najverjetneje verapamil inhibira še neidentificirane privzemne prenašalce, kar lahko pripelje do nižjih znotrajceličnih koncentracij RAL v HepG2 celicah.

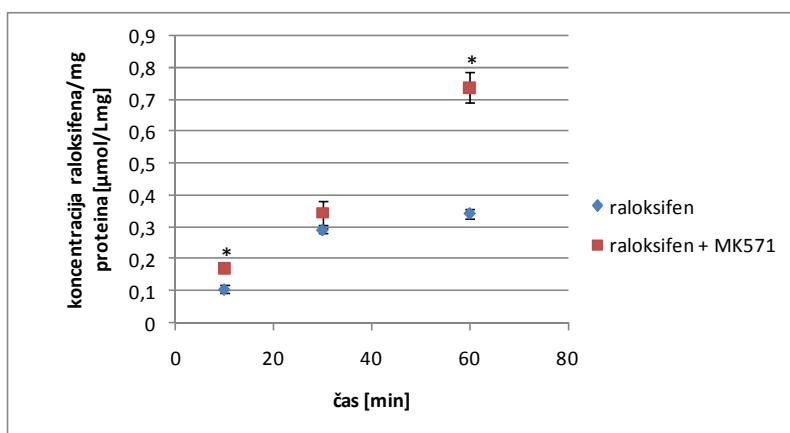


Slika 28 - Poskus na HepG2 celicah z RAL ob prisotnosti inhibitorja PSC833 za P-gp prenašalec.
* pomeni signifikantno spremembo.

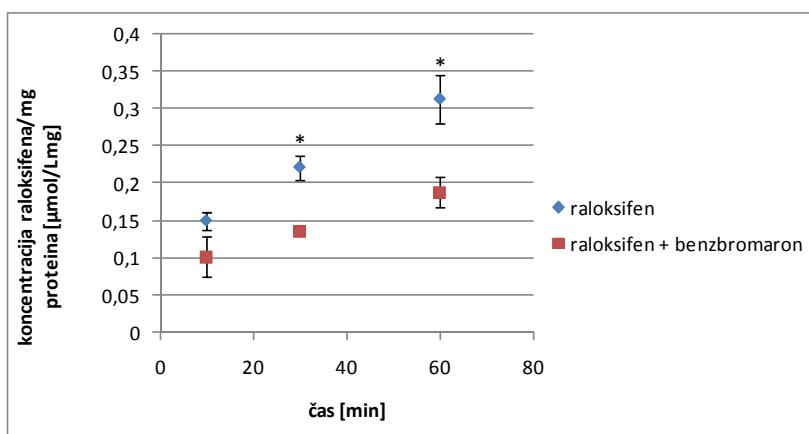


Slika 29 - Poskus na HepG2 celicah z RAL ob prisotnosti inhibitorja verapamila za P-gp prenašalec.

Za MRP prenašalce smo izvedli poskus z inhibitorjem MK571 in benzboromaronom. Na sliki 30 je razvidno, da je bila koncentracija RAL ob prisotnosti MK571 signifikantno višja po 10 minutah in 60 minutah. Do signifikantne razlike pri času 30 min zaradi velike variabilnosti ni prišlo. Kljub temu lahko rečemo, da je MK571 inhibiral izločanje RAL iz celic, zato lahko sklepamo, da je RAL substrat MRP prenašalcev. Ob inhibitorju benzboromarunu pa smo dobili ravno nasprotne rezultate – ob inhibitorju se je koncentracija RAL signifikantno zmanjšala. Vzrok za to je najverjetneje zopet v manjši selektivnosti benzboromarona kot inhibitorja MRP prenašalcev. Verjetno benzboromaron inhibira tudi privzemni prenašalec, ki je odgovoren za privzem RAL v hepatocit.

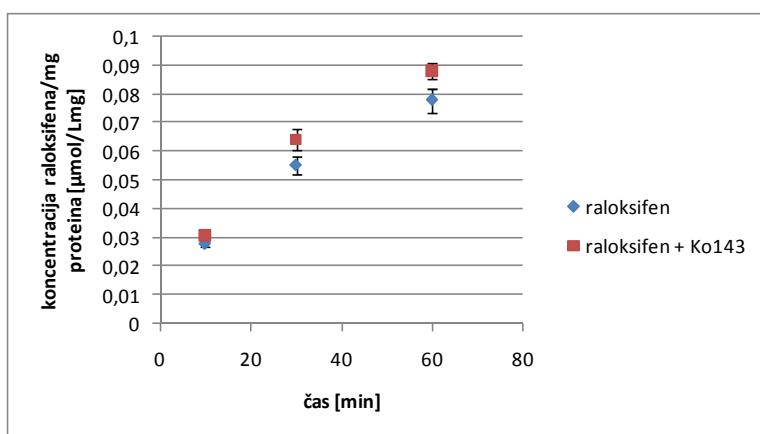


Slika 30 - Poskus na HepG2 celicah z RAL ob prisotnosti inhibitorja MK571 za MRP prenašalce.
* pomeni signifikantno spremembo.



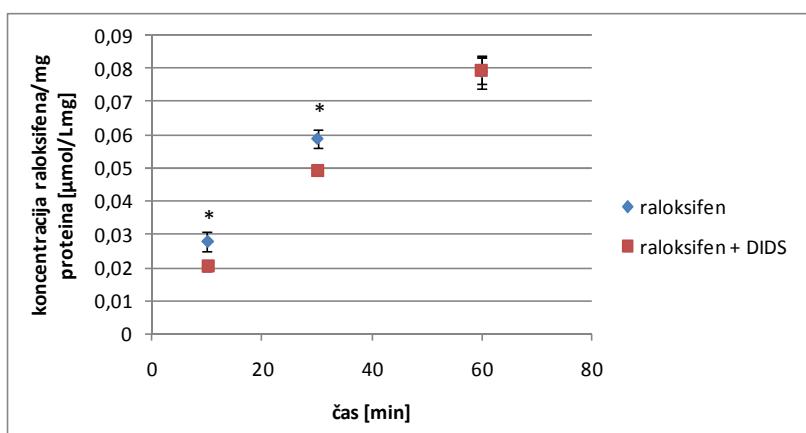
Slika 31 - Poskus na HepG2 celicah z RAL ob prisotnosti inhibitorja benzboromarona za MRP prenašalce.
* pomeni signifikantno spremembo.

BCRP prenašalec prenese substrate iz hepatocita, zato se ob inhibiranju prenašalca koncentracija substrata v celici poveča. Na sliki 32 smo prikazali odvisnost koncentracije RAL v odvisnosti od časa brez in z inhibitorjem Ko143, ki inhibira BCRP. Na sliki je razvidno, da je koncentracija RAL v vseh časovnih točkah višja glede na kontrolo, a razlika ni signifikantna. Ker smo tudi pri pozitivni kontroli signifikantno povečanje opazili šele po 60 minutah, predvidevamo, da je poskus trajal prekratek čas, da bi lahko dokazali signifikantnost. Menimo, da vseeno lahko rečemo, da je RAL substrat za BCRP, tudi glede na ostale rezultate naše raziskovalne skupine [59].



Slika 32 - Poskus na HepG2 celicah z RAL ob prisotnosti inhibitorja Ko143 za BCRP prenašalec.

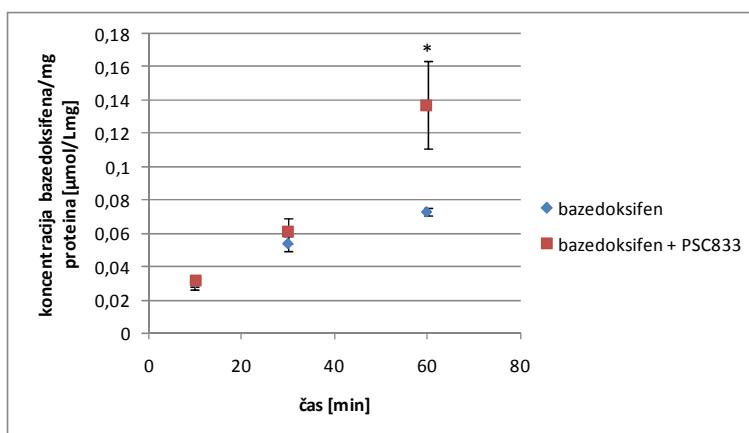
Če OATP prenašalce inhibiramo z DIDS, se bo njihovim substratom koncentracija v hepatocitu zmanjšala. Na sliki 33 je razvidno, da se je koncentracija RAL ob DIDS-u signifikantno zmanjšala, a ne v zadnji časovni točki. Ker je bila pozitivna kontrola za OATP prenašalce negativna, smo na podlagi tega predvideli, da HepG2 celice ne izražajo OATP prenašalcev. Sklepamo lahko, da DIDS kot neselektivni inhibitor inhibira še neki drugi privzemni prenašalec, za katerega je RAL substrat. Za identifikacijo tega prenašalca pa bi bilo treba izvesti še veliko poskusov, kar pa bi bilo za okvir te diplomske naloge preobsežno.



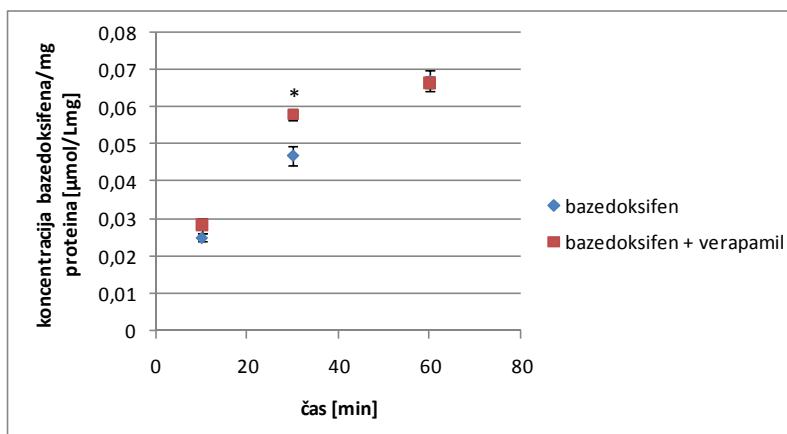
Slika 33 - Poskus na HepG2 celicah z RAL ob prisotnosti inhibitorja DIDS za OATP prenašalce.
* pomeni signifikantno spremembo.

4.3.3 Rezultati poskusov na HepG2 celicah z bazedoksifenom

Če se BAZ prenaša iz hepatocita s prenašalcem **P-gp**, smo preverili s poskusom, pri katerem smo ob BAZ uporabili inhibitorja PSC833 in verapamil. Ker je P-gp izločevalni prenašalec, se bo koncentracija njegovih substratov v hepatocitu povečala, če ga inhibiramo. Na sliki 34 so prikazani rezultati z inhibitorjem PSC833. Ob PSC833 se je koncentracija BAZ signifikantno povečala. Ta poskus kaže, da je BAZ verjetno substrat za P-gp. Tudi ob inhibitorju verapamilu se je koncentracija BAZ signifikantno povečala, kot je razvidno na sliki 35, čeprav ob koncu tega poskusa ni bilo opaziti nobene razlike. Iz obeh poskusov lahko z veliko verjetnostjo predvidimo, da je BAZ substrat za P-gp.

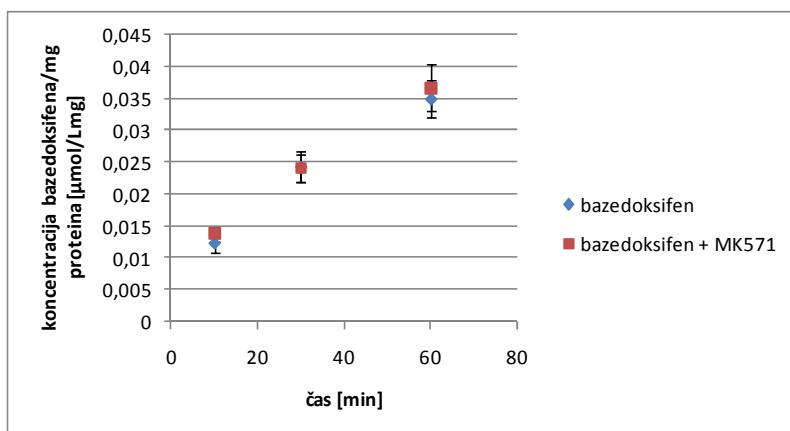


Slika 34 - Poskus na HepG2 celicah z BAZ ob prisotnosti inhibitorja PSC833 za P-gp prenašalec.
* pomeni signifikantno spremembo.

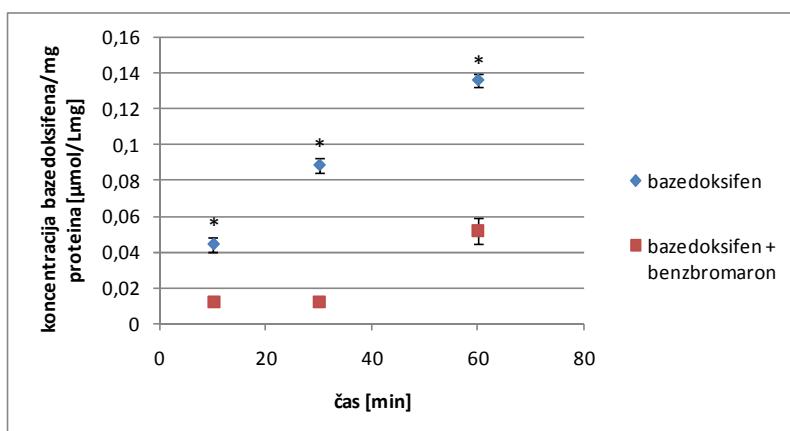


Slika 35 - Poskus na HepG2 celicah z BAZ ob prisotnosti inhibitorja verapamila za P-gp prenašalec.
* pomeni signifikantno spremembo.

Da smo preverili, če se BAZ prenaša iz hepatocita z MRP prenašalci, smo naredili poskuse z MK571 in benzboromaronom. Pri poskusu z MK571 na sliki 36 je razvidno, da razlika v nobeni točki ni bila signifikantna. Ker prisotnost inhibitorja MK571 ni vplivala na koncentracijo BAZ, BAZ verjetno ni substrat MRP. Z benzboromaronom, kot je prikazano na sliki 37, pa so bile koncentracije BAZ v vseh časovnih točkah signifikantno nižje kot brez inhibitorja. Benzboromaron verjetno ni inhibiral le MRP prenašalcev, ampak tudi kakšne neidentificirane prenašalce prizema v hepatocit.

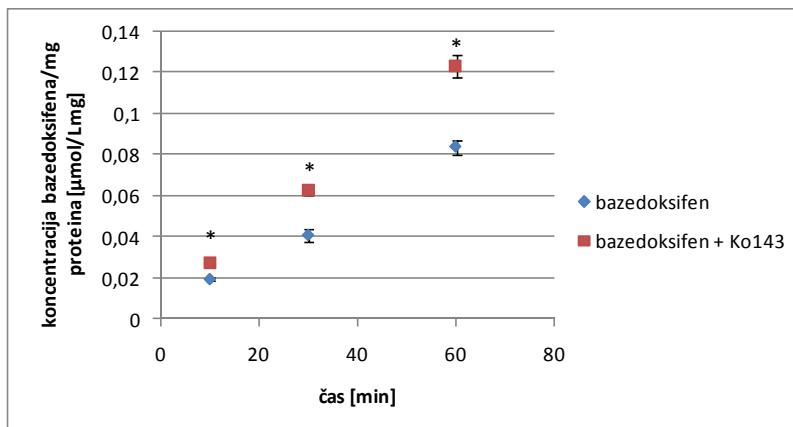


Slika 36 - Poskus na HepG2 celicah z BAZ ob prisotnosti inhibitorja MK571 za MRP prenašalce.



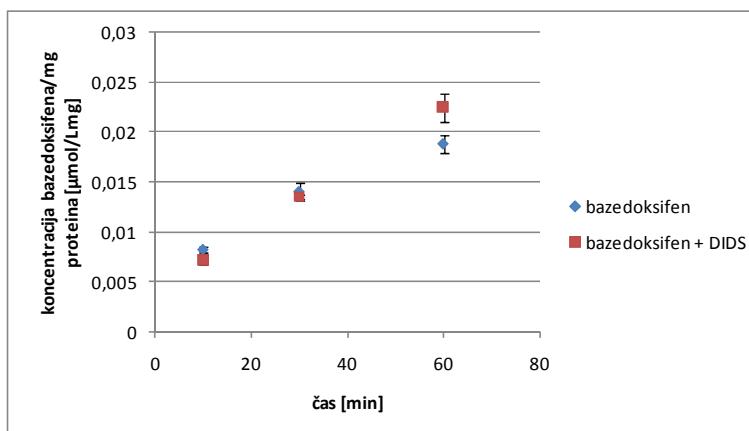
Slika 37 - Poskus na HepG2 celicah z BAZ ob prisotnosti inhibitorja benzboromarona za MRP prenašalce.
* pomeni signifikantno spremembo.

BCRP prenašalec prenaša substrate iz hepatocita, zato se koncentracija njegovih substratov poveča, če ga inhibiramo. V vseh časovnih točkah se je koncentracija BAZ v prisotnosti inhibitorja Ko143 signifikantno povečala, kot je razvidno iz slike 38. Z veliko verjetnostjo lahko sklepamo, da je BAZ substrat BCRP prenašalca.



Slika 38 - Poskus na HepG2 celicah z BAZ ob prisotnosti inhibitorja Ko143 za BCRP prenašalec.
* pomeni signifikantno spremembo.

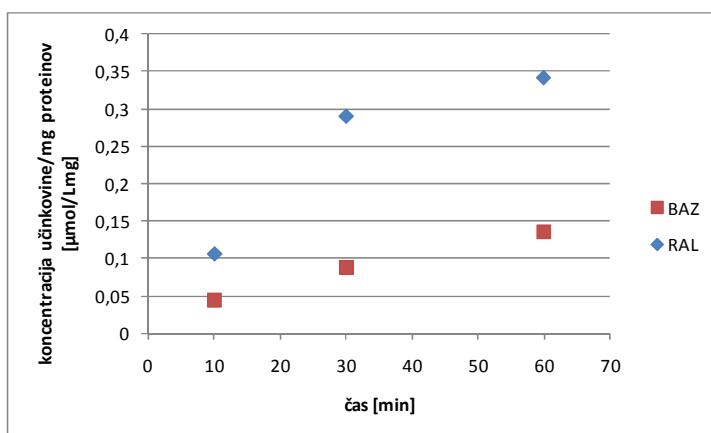
Z DIDS smo preverjali, če se BAZ prenaša v hepatocite z **OATP** prenašalci. Na sliki 39 so prikazani rezultati z DIDS. Rezultati niso enoznačni, v prvi točki se zdi koncentracija ob DIDS nižja, vendar se v zadnji točki (pri 60 minutah) koncentracija obrne. Glede na to, da na HepG2 celicah že pozitivna kontrola ni bila ustrezena, lahko rečemo, da HepG2 celice ne izražajo OATP prenašalcev in posledično zaradi tega ni razlik med kontrolo in poskusom z inhibitorjem.



Slika 39 - Poskus na HepG2 celicah z BAZ ob prisotnosti inhibitorja DIDS za OATP prenašalce.

4.3.4 Drugi rezultati na HepG2 celicah

S primerjavo koncentracij samega RAL oz. samega BAZ v HepG2 celicah smo opazili pomembno razliko v hitrosti prehajanja v HepG2 celice. Koncentracija BAZ je počasneje naraščala v HepG2 celicah kot koncentracija RAL, kot je razvidno iz slike 40. Vrednosti logP za RAL in BAZ so zelo blizu (za RAL je logP 5,5 in za BAZ je logP 5,95). Razlika v hitrosti v prehajanju v celice je zato posledica predvsem različno hitrega transporta s prenašalnimi proteini. Naši rezultati kažejo na to, da se BAZ počasneje prenaša v celico. Morda je to tudi eden izmed razlogov, da je biološka uporabnost BAZ večja, ker počasneje prehaja v hepatocite, kjer se glukuronizira in izloča v žolč.



Slika 40 - Potek spremenjanja koncentracije RAL/BAZ v HepG2 celicah v odvisnosti od časa.

4.4 RAZPRAVA

Ker smo pri tem diplomskem delu uporabili dva *in vitro* modela in za posamezen prenašalec uporabili tudi različne inhibitorje, smo naše ugotovitve o tem, ali je posamezna učinkovina substrat določenega prenašalca, zaradi preglednosti prikazali v tabeli 10.

Tabela 10 – Povzetek rezultatov. »ni izvedeno« pomeni, da poskusa med posamezno učinkovino in inhibitorjem na določenem *in vitro* modelu nismo naredili, »da« pomeni, da predvidevamo, da učinkovina je substrat določenega prenašalca, »ne« pomeni, da predvidevamo, da učinkovina ni substrat določenega prenašalca in »nejasno« pomeni, da rezultati niso enoznačni oz. da jih z našim znanjem ne znamo razložiti.

		RAL		BAZ	
		jetrne rezine	HepG2 celice	jetrne rezine	HepG2 celice
P-gp	PSC833	da	da	nejasno	da
	verapamil	ni izvedeno	nejasno	ni izvedeno	da
MRP	MK571	da	da	ne	ne
	benzbromaron	ni izvedeno	nejasno	ni izvedeno	nejasno
BCRP	Ko143	nejasno	nejasno	ne	da
OATP	DIDS	da	nejasno	da	nejasno

4.4.1 Razprava rezultatov za raloksifen

Za **P-gp** prenašalec in RAL smo s pomočjo obeh *in vitro* modelov ugotovili, da je RAL substrat za P-gp prenašalec. Kljub temu, da so bili rezultati z verapamilom drugačni, kot smo jih pričakovali, so bili rezultati s PSC833 vedno signifikantni. Ker je verapamil manj selektiven kot PSC833 za P-gp prenašalec, lahko z veliko verjetnostjo sklepamo, da je RAL substrat za P-gp.

Tudi za **MRP** prenašalce smo s pomočjo *in vitro* modelov predvideli, da je RAL substrat zanje. Z inhibitorjem MK571 smo na obeh modelih dobili signifikantne rezultate, z benzbromaronom pa so bili rezultati ravno obratni, verjetno zaradi inhibicije privzemnih prenašalcev. Glede na rezultate lahko z veliko verjetnostjo sklepamo, da je RAL substrat za MRP prenašalce.

Za **BCRP** prenašalec smo dobili na rezinah ob inhibitorju Ko143 signifikantne rezultate, a so bili ti rezultati v nasprotju s pričakovanimi. Zato s temi rezultati ne moremo ničesar zaključiti. Na HepG2 celicah se je koncentracija RAL ob inhibitorju v celicah povečala, a povečanje ni bilo signifikantno. Pri teh rezultatih zato ne moremo z veliko verjetnostjo

sklepati, da je RAL substrat za BCRP, predvidimo pa lahko. Za potrditev bi bilo potrebno ponoviti poskus s HepG2 celicami in podaljšati dolžino poskusa.

Pri **OATP** prenašalcih smo z inhibitorjem DIDS na jetnih rezinah pokazali, da bi RAL lahko bil substrat za OATP prenašalce. Ker naš sev HepG2 celic nima OATP prenašalcev, rezultati nakazujejo na to, da je za znojtrajcelične koncentracije učinkovine odgovoren še nek drug prenašalec.

Tako smo pokazali, da je RAL substrat za P-gp prenašalec, MRP prenašalce in OATP prenašalce. Rezultati so nakazali, da je za privzem v hepatocite odgovoren še nek drug prenašalec, ki pa ga nismo raziskovali. P-gp prenašalec in MRP2 prenašalec sta prisotna na apikalni membrani enterocitov in že tam zmanjšujeta absorpcijo RAL, OATP prenašalci omejujejo vstop RAL v hepatocite, ko pa učinkovina pride v hepatocit, je ali hitro metabolizirana ali pa se zelo hitro izloči s P-gp in MRP v žolčni kanal. Te omejitve na poti RAL v centralni krvni obtok so verjetno vzrok za nizko biološko uporabnost RAL (2 %) in enterohepatično cirkulacijo (sekundarni vrhovi na plazemskem profilu), ker se metaboliti ali sam RAL lahko nato ponovno absorbira. Glede na to, da se največ RAL izloči z blatom [16], sta P-gp in MRP2 prenašalca ključna za njegovo izločanje, saj ga prenašata v žolčni kanal in nato naprej v črevo in z blatom iz telesa.

4.4.2 Razprava rezultatov za bazedoksifen

Na jetnih rezinah smo z inhibitorjem PSC833 sicer dobili signifikantne rezultate, a so bile koncentracije BAZ ob inhibitorju nižje namesto višje. Zato iz teh rezultatov ne moremo ničesar sklepati. Za razliko od jetnih rezin, pa smo na HepG2 celicah z obema inhibitorjema, PSC833 in verapamilom, dobili signifikantne rezultate, ki kažejo na to, da naj bi BAZ bil substrat za **P-gp**.

Z inhibitorjem DIDS smo na jetnih rezinah dobili signifikantne rezultate, ki v veliki meri kažejo na to, da je BAZ substrat za **OATP**. Z DIDS na HepG2 celicah nismo dobili kakšnih razlik v koncentracijah v primerjavi s kontrolo. Ker HepG2 celice najverjetneje ne izražajo OATP prenašalcev, lahko na podlagi rezultatov jetnih rezin sklepamo, da je BAZ OATP substrat.

Na jetnih rezinah in HepG2 celicah se v poskusih z MK571 koncentracija BAZ ob inhibitorju ni veliko spremenila glede na kontrolo. Ker smo v literaturi našli podatek, da

MK571 inhibira tudi OATP1B3, OATP2B1 in OATP1B1 prenašalce [57] in ne samo MRP prenašalce, lahko predvidevamo, da se koncentracije BAZ v poskusih na jetrnih rezinah niso povečale, ko smo dodali inhibitor za MRP prenosa, ker BAZ niti ni prehajal v celice z OATP prenosa. Z benzboronatom pa smo na HepG2 celicah dobili nasprotno signifikantne rezultate, ki pa nakazujejo verjetnost, da je še neki drugi privzemni prenosa odgovoren za privzem BAZ v hepatocite, saj je benzboronat nespecifičen MRP inhibitor. O prenosu BAZ z MRP prenosa tako ničesar ne moremo sklepati, morda le to, da je slab substrat, če sploh je.

Podobne rezultate na jetrnih rezinah, kot smo jih dobili pri RAL z inhibitorjem BCRP, Ko143, smo dobili tudi pri BAZ. Tudi tu smo na jetrnih rezinah dobili nižje koncentracije BAZ z inhibitorjem kot brez njega, a ne signifikantne, zato je zelo verjetno, da BAZ ni substrat za BCRP. Na HepG2 celicah pa smo dobili signifikantne rezultate v vsaki časovni točki, ki kažejo na to, da je BAZ substrat za BCRP prenosa. Ker so HepG2 celice bolj enostaven sistem za preučevanje transporta so rezultati tega modela lažje razložljivi in lahko rečemo, da BAZ je substrat za BCRP prenosa.

Za BAZ lahko z veliko verjetnostjo predvidevamo, da se prenosa s P-gp in BCRP prenascema iz hepatocitov in enterocitov ter z OATP prenosa v hepatocite. Omejevanje vstopa BAZ v hepatocite in njegovo izločanje iz hepatocita s prenascema nekoliko pojasni nizko biološko uporabnost (6 %). Tudi BAZ se z blatom verjetno izloča v tako veliki meri ravno zaradi izločanja v žolčni kanal s P-gp in BCRP. Takšna pot izločanja mu omogoča tudi enterohepatično cirkulacijo, ki podaljša biološko razpolovno dobo.

4.4.3 Primerjava rezultatov raloksifena in bazedoksifena

RAL se prenosa s P-gp prenascem in MRP prenosa, BAZ pa s P-gp in BCRP prenascema. Oba se v hepatocite prenosa z OATP prenosa. Ker sta substrata za P-gp oz. RAL še za MRP in BAZ še za BCRP, se lahko prenosa v žolčni kanal in se vključeta v enterohepatično cirkulacijo, ki jima podaljša biološko razpolovno dobo. BAZ se je v HepG2 celice prenosal počasneje kot RAL. V *in vivo* pogojih bi se BAZ zato počasneje metaboliziral, kar je verjetno razlog, da ima večjo biološko uporabnost.

4.4.4 Razprava o metabolitih

Zaradi velikega prispevka tako metabolizma kot tudi transporta je težko ločiti med obema procesoma in posledično opredeliti katere prenašalce so metaboliti substrati. Če bi žeeli to opredeliti, bi bilo treba same metabolite inkubirati z jetrnimi rezinami. Ker pa nismo imeli na razpolago zadostne količine metabolitov, se za ta korak nismo odločili.

4.4.5 Razprava o rezultatih na mikrosomih

S poskusi na mikrosomih smo pokazali, da inhibitorja DIDS in MK571 vplivata na kinetiko metabolizma z UGT encimi. Ta vpliv je večji pri RAL kot pri BAZ, kjer MK571 nima tako velikega vpliva. Vendar pa MK571 v večji meri vpliva na metabolizem le v koncentraciji 100 µM.

5 ZAKLJUČEK

Na *in vitro* modelih jetnih rezin in HepG2 celic smo ugotavljali, kako se koncentracije raloksifena in bazedoksifena spremenijo, če v poskus vključimo inhibitorje posameznega prenašalca.

Za raloksifen lahko z veliko verjetnostjo predvidimo, da se iz hepatocita prenaša s P-gp prenašalcem in MRP prenašalci. Pri bazedoksifenu lahko predvidimo izločanje iz hepatocita s P-gp in BCRP prenašalcem. Z MRP prenašalci se po vsej verjetnosti ne prenaša. Se pa raloksifen in bazedoksifen po vsej verjetnosti v hepatocite prenašata še z nekim drugim privzemnim prenašalcem, ne samo z OATP prenašalci.

Glede na naše predvidevanje o prenosu raloksifena in bazedoksifena z izločevalnimi prenašalci sta nizki biološki uporabnosti raloksifena in bazedoksifena nekoliko bolj jasni. Ker sta P-gp in MRP prenašalca prisotna že v enterocitih, predstavljata za ti dve učinkovini že v tankem črevesju veliko oviro za absorpcijo. Prisotnost teh prenašalcev na kanalikularni membrani pa jima omogoča enterohepatično cirkulacijo, ki so jo že dokazali, in glavno pot izločanja iz telesa.

Ker smo delali naše poskuse na dveh *in vitro* modelih, lahko sklenemo, da so HepG2 celice bolj enostaven model za proučevanje prenosa v hepatocite, ker lahko z njimi proučujemo samo prenašalce, saj imajo metabolične encime nizko izražene in ne motijo transporta učinkovin. Model jetnih rezin pa bolje ponazarja resnično okolje v *in vivo* sistemih, ker vključuje tako transport kot metabolizem in daje zato boljše napovedi za očistek *in vivo*. Naši rezultati so dokaz, da je smiselno v raziskavah uporabljati več vrst *in vitro* modelov, ki se razlikujejo po svoji kompleksnosti, ker na ta način lažje razjasnimo zapletene in sklopljene procese, kot sta transport in metabolizem.

6 LITERATURA

1. Gennari L, Merlotti D, De Paola V, Martini G, Nuti R. Bazedoxifene for the prevention of postmenopausal osteoporosis. *Ther Clin Rick Manag* 2008; 4 (6): 1229-1242.
2. Žorž G. Prevalenca osteoporoze v Sloveniji. *ISIS* 2006; 15 (3): 34-36.
3. Miller PD, Derman RJ. What is the best balance of benefits and risks among anti.resorptive therapies for postmenopausal osteoporosis? *Osteoporos Int* 2010; 21: 1793-1802.
4. Rang HP, Dale MM, Ritter JM, Flower RJ. *Rang and Dale's Pharmacology*, šesta izdaja; Churchill Livingstone, Elsevier, ZDA, 2007: 461-470.
5. Kulak JJ, Kulak CAM, Taylor HS. SERMs in the prevention and treatment of postmenopausal osteoporosis: an update. *Arq Bras Endocrinol Metab* 2010; 54 (2): 200-205.
6. Silverman SL. New selective estrogen receptor modulators (SERMs) in development. *Curr Osteoporos Rep* 2010; 8: 151-153.
7. Ravn P, Nielsen TF, Christiansen C. What can be learned from the levormeloxifene experience? *Acta Obstet Gynecol Scand* 2006; 58 (2): 135-142.
8. Komm BS, Kharode YP, Bodine PVN, et al. Bazedoxifene acetate: a selective estrogen receptor modulator with improved selectivity. *Endocrine* 2005; 146 (9): 3999-4008.
9. Chang KCN, Wang Y, Bodine PVN, et al. Gene expression profiling studies of three SERMs and their conjugated estrogen combinations in human breast cancer cells: Insights into the unique antagonistic effects of bazedoxifene on conjugated estrogens. *J Steroid Biochem Mol Biol* 2010; 118 (1-2): 117-124.
10. Farlay D, Boivin G, et al. Long-term strontium ranelate administration in monkeys preserves characteristics of bone mineral crystals and degree of mineralization of bone. *J Bone Miner Res.* 2005; 10 (9): 1569-1578.
11. Povzetek glavnih značilnosti zdravila Protelos. Dostop preko spletta, februar 2011: http://www.ema.europa.eu/docs/sl_SI/document_library/EPAR_-Product_Information/human/000560/WC500045525.pdf.
12. Kocjan T, Franić D. Osteoporoza in hormonsko nadomestno zdravljenje. *Zdrav Vestn* 2008; 77, III: 43-48.

13. Trouvin AP, Goëb V. Receptor activator of nuclear factor-κB ligand and osteoprotegerin: maintaining the balance to prevent bone loss. *Clin Interv Aging* 2010; 5: 345-354.
14. Hochner-Celnikier D. Pharmacokinetics of raloxifene and its clinical application. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 1999; 85: 23-29.
15. Scott JA, Da Camara CC, Early JE. Raloxifene: A selective estrogen receptor modulator. *Am Fam Physician* 1999; 60 (4): 1131-1139.
16. Povzetek glavnih značilnosti zdravila Evista. Dostop preko spletja, februar 2011: http://www.ema.europa.eu/docs/sl_SI/document_library/EPAR_-Product_Information/human/000184/WC500031011.pdf.
17. Podatek pridobljen na spletni strani Drug Bank, dostop maj 2011: <http://www.drugbank.ca/drugs/DB00481>.
18. Vogel VG. Raloxifene: a selective estrogen receptor modulator for reducing the risk of invasive breast cancer in postmenopausal women. *Womens Health* 2007; 3 (2): 139-153.
19. Chandrasekaran A, McKeand WE, et al. Metabolic disposition of [¹⁴C] bazedoxifene in healthy postmenopausal women. *Drug Metab Dispos* 2009; 37 (6): 1219-1225.
20. Poročilo o oceni zdravila Conbriza, postopek št. EMEA/H/C/913. Dostop preko spletja, februar 2011: http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/EPAR_-Public_assessment_report/human/000913/WC500033576.pdf.
21. Povzetek glavnih značilnosti zdravila Conbriza. Dostop preko spletja, februar 2011: http://www.ema.europa.eu/docs/sl_SI/document_library/EPAR_-Product_Information/human/000913/WC500033577.pdf.
22. Shen L, Ahmad S, Park S, DeMaio W, et al. *In vitro* metabolism, permeability and efflux of bazedoxifene in humans. *Drug Metab Dispos* 2010; 38 (9): 1471-1479.
23. Kung AW, Chu EY, Xu L. Bazedoxifene: a new selective estrogen receptor modulator for the treatment of postmenopausal osteoporosis. *Expert Opin Pharmacother* 2009; 10 (8): 1377-1385.
24. Chandrasekaran A, Ahmad S, Shen L, et al. Disposition of bazedoxifene in rats. *Xenobiotica* 2010; 40 (8): 578-585.
25. Itabashi A, Yoh K, Chines AA, et al. Effects of bazedoxifene on bone mineral density, bone turnover, and safety in postmenopausal Japanese women with osteoporosis. *J of Bone Miner Res* 2010; 26 (3): 519-529.

26. Yengi LG, Leung L, Kao J. The evolving role of drug metabolism in drug discovery and development. *Pharm Res* 2007; 24 (5): 842-858.
27. Van Breemen RB, Li Y. Caco-2 cell permeability assays to measure drug absorption. *Expert Opin Drug Metab Toxicol* 2005; 1 (2): 175-185.
28. Hilgendorf C, Spahn-Langguth H, Regårdh CG, et al. Caco-2 versus Caco-2/HT29-MTX co-cultured cell lines: permeabilities via diffusion, inside- and outside-directed carrier-mediated transport. *J Pharm sci* 2000; 89 (1): 63-75.
29. Hwang K, Jiang L, Ren Y, et al. Site-specific absorption of M100240 and MDI 100,173 in rats evaluated using Sweetana-Grass diffusion chamber methodology. *J Pharmacol Toxicol Methods* 2002; 48 (2): 97-101.
30. Polentarutti BI, Peterson AL, Sjöberg ÅK, et al. Evaluation of viability of excised rat intestinal segments in the ussing chamber: investigation of morphology, electrical parameters, and permeability characteristics. *Pharm Res* 1999; 16 (3): 446-454.
31. Nejdors P, Ekelund M, Jeppsson B, Weström BR. Mucosal *in vitro* permeability in the intestinal tract of the pig, the rat, and man: species- and region-related differences. *Scand J Gastroenterol* 2000; 35 (5): 501-507.
32. Grass GM, Sweetana SA. *In vitro* measurement of gastrointestinal tissue permeability using a new diffusion cell. *Pharma Res* 1988; 5 (6): 372-376.
33. Szakács G, Váradi A, Özvegy-Laczka C, Sarkadi B. The role of ABC transporters in drug absorption, distribution, metabolism, excretion and toxicity (ADME-Tox). *Drug Discov Today* 2008; 13 (9-10): 379-393.
34. Lerche-Langrand C, Toutain HJ. Precision-cut liver slices: characteristics and use for *in vitro* pharmaco-toxicology. *Toxicology* 2000; 153 (1-3): 221-253.
35. de Graaf IA, de Kanter R, de Jager MH, Camacho R, et al. Empirical validation of a rat *in vitro* organ slice model as a tool for *in vivo* clearance prediction. *Drug Metab Dispos* 2006; 34 (4): 591-599.
36. Knasmüller S, Parzefall W, Sanyal R, Ecker S, et al. Use of metabolically competent human hepatoma cells for the detection of mutagens and antimutagens. *Mutation Res* 1998; 402 (1-2): 185-202.
37. Pearson PG, Wienkers LC. Handbook of drug metabolism, 2. izdaja: Informa, Healthcare, New York, ZDA, 2009: 481-482, 531.

38. Westerink WM, Schoonen WG. Phase II enzyme levels in HepG2 cells and cryopreserved primary human hepatocytes and their induction in HepG2 cells. *Toxicol In Vitro* 2007; 21 (8): 1592-1602.
39. Berginc K, Kristl A. Transwell-grown HepG2 cell monolayers as *in vitro* permeability model to study drug-drug or drug-food interactions. *J Med Food* 2011; 14 (1-2): 135-139.
40. LeCluyse EL. Human hepatocyte culture systems for the *in vitro* evaluation of cytochrome P450 expression and regulation. *Eur J Pharm Sci* 2001; 13 (4): 343-368.
41. Chan LM, Lowes S, Hirst BH. The ABCs of drug transport in intestine and liver: efflux proteins limiting drug absorption and bioavailability. *Eur J Pharm Sci* 2004; 21 (1): 25-51.
42. Shugarts S, Benet LZ. The role of transporters in the pharmacokinetics of orally administered drugs. *Pharm Res* 2009; 26 (9): 2039-2054.
43. Beringer PM, Slaughter RL. Transporters and their impact on drug disposition. *Ann Pharmacother* 2005; 39 (6): 1097-1108.
44. Mikkaichi T, Suzuki T, Tanemoto M, Ito S, Abe T. The organic anion transporter (OATP) family. *Drug Metab Pharmacokin* 2004; 19 (3): 171-179.
45. Anderle P, Huang Y, Sadée W. Intestinal membrane transport of drugs and nutrients: genomics of membrane transporters using expression microarrays. *Eur J Pharm Sci* 2004; 21 (1): 17-24.
46. König J, Nies AT, Cui Y, et al. Conjugate export pumps of the multidrug resistance protein (MRP) family: localization, substrate specificity, and MRP2-mediated drug resistance. *Biochim Biophys Acta* 1999; 1461 (2): 377-394.
47. Slot AJ, Wise DD, et al. Modulation of human mrp1 (ABCC1) and mrp2 (ABCC2) transport activities by endogenous and exogenous glutathione-conjugated catechol metabolites. *Drug Metab Dispos* 2008; 36 (3): 552-560.
48. Ni Z, Bikasl Z, Rosenberg MF, Mao Q. Structure and function of the human breast cancer resistance protein (BCRP/ABCG2). *Curr Drug Metab* 2010; 11 (7): 603-617.
49. Evseenko DA, et al. The ABC transporter BCRP/ABCG2 is a placental survival factor, and its expression is reduced in idiopathic human fetal growth restriction. *FASEB J* 2007; 21 (13): 3592-3605.

50. Campbell SD, de Moraes SM, Xu JJ. Inhibition of human organic anion transporting polypeptide OATP1B1 as a mechanism of drug-induced hyperbilirubinemia. *Chem Biol Interact* 2004; 150 (2): 179-187.
51. Kobayashi D, Nozawa T, Imai K, et al. Involvement of human organic anion transporting polypeptide OATP-B (SLC21A9) in pH-dependent transport across intestinal apical membrane. *J Pharmacol Exp Ther* 2003; 396 (2): 703-708.
52. Sai Y, Tsuji A. Transporter-mediated drug delivery: recent progress and experimental approaches. *Drug Discov Today* 2004; 9 (16): 712-720.
53. Mayer U, Wagenaar E, Dorobek B, et al. Full blockade of intestinal P-glycoprotein and extensive inhibition of blood-brain barrier P-glycoprotein by oral treatment of mice with PSC833. *J Clin Invest* 1997; 100 (10): 2430-2436.
54. Kitamura S, Maeda K, Wang Y, Sugiyama Y. Involvement of multiple transporters in the hepatobiliary transport of rosuvastatin. *Drug Metab Dispos* 2008; 36 (10): 2014-2023.
55. Potschka H, Baltes S, Löscher W. Inhibition of multidrug transporters by verapamil or probenecid does not alter blood-brain barrier penetration of levetiracetam in rats. *Epilepsy Res* 2004; 58 (2-3): 85-91.
56. Uršič D, Berginc K, Žakelj S, Kristl A. Influence of luminal monosaccharides on secretion of glutathione conjugates from rat small intestine *in vitro*. *Int J Pharm* 2009; 381: 199-204.
57. Hirono S, Nakaqome I, et al. Estimation of the three-dimensional pharmacophore of ligands for rat MRP2 using ligand-based drug design techniques. *Pharm Res* 2005; 22 (2): 260-269.
58. Letschert K, Faulstich H, Keller D, Keppler D. Molecular characterization and inhibition of amanitin uptake into human hepatocytes. *Toxicol Sci* 2006; 91 (1): 140-149.
59. Sanja Femić: Identifikacija prenašalcev raloksifena in njegovih metabolitov ter bazedoksifena in na membranah celic transficiranih s prenašalnimi proteini, diplomsko delo. Fakulteta za farmacijo, Univerza v Ljubljani, 2010.