

UNIVERZA V LJUBLJANI  
FAKULTETA ZA FARMACIJO

KAJA KEČEK

**AKTIVNI TRANSPORT RALOKSIFENA IN DVEH  
NJEGOVIH METABOLITOV V SLUZNICI TANKEGA  
ČREVESA PODGANE *IN VITRO*  
DIPLOMSKA NALOGA**

UNIVERZitetni študiJ farmacije

Ljubljana, 2012

UNIVERZA V LJUBLJANI  
FAKULTETA ZA FARMACIJO

KAJA KEČEK

**AKTIVNI TRANSPORT RALOKSIFENA IN DVEH  
NJEGOVIH METABOLITOV V SLUZNICI TANKEGA  
ČREVESA PODGANE *IN VITRO***

**ACTIVE TRANSPORT OF RALOXIFENE AND TWO  
RALOXIFENE'S METABOLITES IN MUCOSA OF SMALL  
INTESTINE OF A RAT *IN VITRO***

Ljubljana, 2012

Diplomsko naložbo sem opravljala na Fakulteti za farmacijo, na Katedri za biofarmacijo in farmakokinetiko, pod mentorstvom doc. dr. Simona Žaklja in somentorstvom asist. dr. Jurija Trontlja. Pri delu mi je bila v veliko pomoč tudi Tina Trdan, mag.farm.

**Izjava**

Izjavljam, da sem diplomsko naložbo samostojno izdelala pod mentorstvom doc. dr. Simona Žaklja in somentorstvom asist. dr. Jurija Trontlja.

Kaja Keček

Predsednik diplomske komisije: izr. prof. dr. Darko Černe  
Član diplomske komisije: asist. dr. Ilija Ilić

Ljubljana, junij 2012

# KAZALO VSEBINE

<b>1 UVOD.....</b>	<b>1</b>
1.1 SELEKTIVNI MODULATORJI ESTROGENSKIH RECEPTORJEV (SERM).....	1
1.1.1 <i>Raloksifen</i> .....	2
1.1.2 <i>Farmakokinetika raloksifena</i> .....	2
1.2 BIOLOŠKA UPORABNOST .....	5
1.3 GASTROINTESTINALNI TRAKT .....	6
1.3.1 <i>Transport snovi skozi membrano</i> .....	8
1.3.1.1 Prenašalci .....	9
1.3.2 <i>Metabolizem</i> .....	16
1.3.2.1 Encimi I. faze metabolizma .....	16
1.3.2.2 Encimi II. faze metabolizma.....	17
<b>2 NAMEN DELA.....</b>	<b>20</b>
<b>3 MATERIALI IN METODE.....</b>	<b>21</b>
3.1 MATERIALI.....	21
3.2 METODE .....	27
3.2.1 DOLOČANJE FAKTORJA ODZIVA Z B-GLUKURONIDAZAMI.....	27
3.2.2 <i>Dvoprostorne difuzijske celice</i> .....	27
3.2.2.1 Priprava tkiva .....	28
3.2.2.2 Spremljanje elektrofizioloških parametrov.....	29
3.2.2.3 Potek poskusa na difuzijskih celicah in priprava elektrod .....	30
3.2.2.3 Analitika .....	33
3.2.2.4 Obdelava podatkov.....	35
<b>4 REZULTATI IN RAZPRAVA .....</b>	<b>39</b>
4.1 METABOLIZEM RALOKSIFENA V STENI TANKEGA ČREVESA.....	41
4.2 AKTIVNI TRANSPORT RALOKSIFENA IN NJEGOVIH DVEH METABOLITOV .....	44
<b>5 SKLEP .....</b>	<b>54</b>
<b>6 LITERATURA .....</b>	<b>56</b>

## POVZETEK

Raloksifen je izpostavljen obširnemu predsistemskemu metabolizmu, predvsem glukuronidaciji. Kljub temu da imajo njegovi metaboliti veliko manjšo afiniteto do estrogenskih receptorjev in posledično majhno biološko aktivnost, niso nepomembni. V plazmi se namreč raloksifen pojavlja večinoma v obliki glukuronidov, vezanih na plazemske proteine. Večinoma metaboliti tako predstavljajo transportno obliko, ki se nato cepi nazaj na raloksifen in se lahko v obliki raloksifena reabsorbira. Z našim delom smo poskusili ugotoviti, kateri prenašalci so udeleženi pri transportu raloksifena skozi sluznico črevesja podgane *in vitro*, kako se raloksifen presnavlja v sluznici tankega črevesa podgane, kateri prenašalci so udeležni pri transportu metabolitov raloksifena ter ali obstaja morebitno medsebojno delovanje med metabolnimi encimi in prenašalci v primeru raloksifena in njegovih metabolitov.

Poskuse smo izvajali na tkivu podganjega črevesja, ki smo ga vpeli v dvoprostorne difuzijske celice in spremljali njegovo vitalnost s pomočjo elektrofizioloških parametrov. Med difuzijske celice smo vpenjali različne segmente podganjega črevesja in primerjali deleže nespremenjenega raloksifena in njegovih metabolitov glede na segment. Ugotovili smo, da se je pretok skozi membrano enterocitov razlikoval glede na uporabljen segment intestinalnega trakta podgane. Največji transport raloksifena smo opazili v ileumu, medtem ko je bilo največje prehajanje skozi membrano v primeru M1 in M2 opaženo v duodenumu. Prav tako smo ugotovili, da je za velikost pretokov metabolitov pomembno, na kateri strani segmenta (bazolateralni/apikalni) se nahaja donorska raztopina. S pomočjo inhibitorjev različnih prenašalcev (P-gp, MRP, OATP in BCRP) smo prav tako želeli ugotoviti, s katerimi prenašalci se raloksifen oziroma njegovi glavnji metaboliti prenašajo skozi črevesno sluznico. Dobljeni podatki ne kažejo na vpletene prenašalce BCRP pri transportu raloksifena, M1 in M2 skozi membrano intestinalnega trakta podgane. Pokazali smo, da je za izločanje raloksifena iz enterocitov večinoma odgovoren P-gp ter morebiti OATP. V primeru prenašalca OATP gre najverjetneje za kompleksno medsebojno delovanje prenašalca z encimom UGT. V primeru prenašalca MRP3 pa rezultati nakazujejo, da bi lahko raloksifen spodbujal aktivnost MRP3, s katerim se morda prenašata oba njegova metabolita.

## ABSTRACT

Raloxifene is widely exposed to pre-systemic metabolism, mostly glucuronidation. Nevertheless raloxifene's metabolites have much lower affinity towards estrogen receptors and consequently lower biological activity, they are not irrelevant. In plasma raloxifene exists mostly in the form of glucuronides bound to plasma proteins. Mostly metabolites serve as a transport form, that can be split back to raloxifene, which can be than reabsorbed in the inner organs or in the intestinal lumen. With our work we tried to establish which transporters participate in the transport of raloxifene through the mucosa of the intestine of a rat, which transporters participate in the transport of raloxifene's metabolites and if coupling between metabolic enzymes and transporters is present in the case of raloxifene and its metabolites.

Experiments were done on the tissue of rat's intestine that was fasten between two piece assembly of Ussing chambers; vitality of the tissue was observed through electrophysiological parameters. We fastened different type of tissue segments of rat's intestine in the chambers and compared rates of unchanged raloxifene and its metabolites between the segments. We found out that the flow through the membrane of enterocytes differed according to the segment of the intestinal tract of a rat used. The highest transport rate of raloxifene was seen in the ileum, but the highest flow through the membrane of M1 and M2 was seen in the duodenum. We have also found out, that the site of a segment (basolateral/apical) at which the donor solution is placed, influences the extent of metabolites' flow. By the use of inhibitors of specific transporters (P-gp, MRP, OATP and BCRP) we also wanted to find out which are the transporters of raloxifene or its metabolites that play an important role in their transport through the intestinal membrane. Results don't show any involvement of the BCRP transporter in the transport of raloxifene, M1 or M2 over the membrane of the intestinal tract of a rat. On the other hand, we have showed that the secretion of raloxifene is mainly mediated by P-gp transporter and maybe also by OATP transporter. In the former case the results indicate that complex coupling of OATP transporter with the UGT enzyme could exist. In the case of MRP3 the results show, that raloxifene could stimulate the activity of MRP3 transporter, which could be responsible for the transport of both monoglucuronide metabolites.

## ABECEDNI SEZNAM OKRAJŠAV

ATP: adenozin trifosfat  
BCRP: ang. Breast Cancer Resistance Protein  
BCS: the Biopharmaceutics Classification System  
BDDCS: Biopharmaceutics Drug Disposition Classification System  
BSEP: ang. bile salt export pump  
CYP: naddružina citokromov P450  
CŽS: centralno živčni sistem  
DIDS: 4,4'-Diisothiociano-2,2'-stilbenedisulfonic acid  
DMSO: dimetilsulfoksid  
DNK: deoksiribonukleinska kislina  
ER: estrogenski receptor  
GIT:gastrointestinalni trakt  
GLUT2:glukozni prenašalec 2  
LDL (eng. low density lipoprotein): lipoprotein majhne gostote  
M: mukozna stran gastrointestinalnega trakta  
M1: raloksifen-6-glukuronid  
M2: raloksifen-4'-glukuronid  
M3: raloksifen-6,4'-diglukuronid  
MDR1: Multidrug resistant gene  
MRP: ang. multidrug resistance associated protein  
MRP2: ang. multidrug resistance associated protein 2  
MS (ang. mass spectrometry): masna sprekrometrija  
Papp: navidezni permeabilnostni koeficient  
PEPT1:peptidni prenašalec 1  
P-gp: P-glikoprotein  
RAL: raloksifen  
S: serozna stran gastrointestinalnega trakta  
SAR (ang. structure-activity relationship): razmerje med strukturo in aktivnostjo  
UDP: uridindifosfat  
UGT: uridindifosfat-glukuronozil-transferaze  
UHPLC (ang. ultra high performance liquid cromatography): tekočinska kromatografija visoke ločljivosti

# 1 UVOD

## 1.1 Selektivni modulatorji estrogenских receptorjev (SERM)

Selektivni modulatorji estrogenских receptorjev so farmakološka skupina, v katero spadajo učinkovine, ki se z visoko afiniteto vežejo na estrogenске receptorje (ER) in vplivajo na transkripcijo DNK. Uporablja se predvsem v preventivi in zdravljenju osteoporoze pri postmenopavzalnih ženskah, pomen pa imajo tudi pri zmanjšanju incidence raka dojke in hormonski terapiji pri hormonsko odvisnem raku dojke. Njihova pomembna lastnost je, da lahko na ER delujejo kot agonisti ali antagonisti. SERM vplivajo na biološko aktivnost preko intracelularnih estrogenских receptorjev (ER $\alpha$  in ER $\beta$ ), ki imajo po vezavi liganda vlogo transkripcijskega faktorja. Po aktivaciji lahko ER kot represorji ali aktivatorji vplivajo na regulacijo genov na mRNA nivoju. Proteini, ki nastanejo po translaciji mRNA, pa imajo znotraj celice pomembno vlogo pri proliferaciji, diferenciaciji in homeostazi [1]. Na naravo delovanja liganda zaradi zapletenosti molekularnih mehanizmov, ki so vpleteni, vpliva več dejavnikov. Velik pomen ima izraženost estrogenских receptorjev v tkivu ( $\alpha/\beta$ ), pomembna je prisotnost aktivacijskih faktorjev in regulacijskih proteinov [1]. Struktura liganda vpliva na različne učinke, saj imajo lahko različno afiniteto do ER, z njimi tvorijo različne komplekse in različno vplivajo na konformacijske spremembe receptorjev. Vse to pa različno vpliva na medsebojno delovanje ER s koaktivatorji in korepresorji. Povzamemo lahko, da torej različni ligandi vplivajo na različne strukturne spremembe ER, posledično pride do različnega medsebojnega delovanja s koaktivatorji in korepresorji, kar vodi do raznolikosti v biološkem odgovoru [1].

Idealen predstavnik SERM naj bi izkazoval agonistično delovanje v tkivih, kjer je zaželen estrogen podoben učinek (skeletna, kardiovaskularna tkiva, CŽS), ter indiferentno oz. antagonistično delovanje v tkivih, kjer je učinek estrogena nezaželen (dojke, maternica) [2].

Poleg že odobrenega in splošno uporabljenega raloksifena je bil leta 2009 v Evropski uniji (na tržišču v Italiji in Španiji) odobren tudi bazedoksifen [3]. Obe spojini izkazujeta pozitivne učinke na metabolizem kosti in lipidov ter obenem zagotavlja varnost, saj je odsotno agonistično delovanje na tkiva maternice oz. dojk. V 2-letni študiji, v kateri je bilo udeleženih 1.583 postmenopavzalnih žensk z normalno ali nizko MKG, sta tako bazedoksifen kot raloksifen vplivala na manjši upad kostne mase glede na kontrolno

skupino. V skupinah, ki prejemala 40 mg/dan bazedoksifena oz. 60 mg/dan raloksifena, se je glede na kontrolno skupino MKG značilno povečal. Bazedoksifen 40 mg in raloksifen 60 mg sta občutno znižala serumske koncentracije osteokalcina (22 % oz. 27 %) in C-telopeptida (22 % in 32 %) glede na kontrolno skupino. Prav tako sta imela pozitivne učinke na lipidno stanje organizma (skupni holesterol, LDL) [4].

Neželeni stranski učinki, prisotni pri večini SERM, kot so vročinski oblivi in pojav venske tromboze, so se pri obeh spojinah (bazedoksifen, raloksifen) pojavljali občutno večkrat kot pri kontrolni skupini [4].

Zaenkrat so iz skupine SERM odobreni raloksifen, bazedoksifen in tamoksifen. Uporaba tamoksifena je omejena na preventivo invazivnega in neinvazivnega raka dojke, saj izkazuje neželene učinke na endometrij, medtem ko raloksifen zmanjša incidenco le invazivnega raka dojke in je tako kot bazedoksifen namenjen predvsem preventivi osteoporoze [5].

### **1.1.1 Raloksifen**

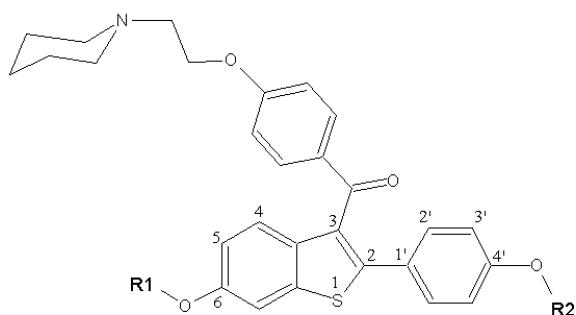
Raloksifen je prva izbira pri preventivi in terapiji osteoporoze pri postmenopavzalnih ženskah, saj deluje kot kompetitivni agonist ER v kostnem tkivu in kot antagonist v tkivih maternice in dojk. Antagonistični učinek namreč vpliva na zmanjšanje proliferacije celic, kar posledično vodi do manj napak pri podvojevanju DNK, manjšega kopičenja mutirane DNK, torej manj motenj v celični rasti [6].

Raloksifen se veže na oba tipa ER, alfa in beta. Učinek raloksifena na estrogenske receptorje je tako odvisen od deleža določenih podvrst ER (alfa/beta) v tkivih, kot tudi od izraženosti kofaktorjev in korepresorjev v celici. Kljub temu da natančen mehanizem delovanja raloksifena še ni znan, predvidevajo, da ima agonističen učinek raloksifen tam, kjer prevladujejo ER-alfa, ter antagonističen učinek, kadar je večina receptorjev tipa beta [6].

### **1.1.2 Farmakokinetika raloksifena**

Raloksifen se po peroralni aplikaciji hitro absorbira. Delež absorbcije je 60 %, vendar je zaradi obsežnega predsistemskega metabolizma absolutna biološka uporabnost le 2 % [7]. Pokazalo se je namreč, da je raloksifen podvržen predvsem obširnemu predsistemskemu metabolizmu II. faze. Encimi skupine CYP imajo pri metabolizmu minimalno vlogo, veliko bolj pomembni pa so encimi UGT [8]. Najpomembnejšo vlogo naj bi imela

glukuronidacijja, pri kateri se tvorita monoglukuronida raloksifen-6-glukuronid (M1) in raloksifen-4'-glukuronid (M2). Metaboliti imajo manjšo afiniteto do estrogenskih receptorjev v primerjavi z estrogenom in posledično majhno biološko aktivnost. Klinične študije so pokazale, da je pri človeku glavni metabolit M2, katerega koncentracije v plazmi so bile do 8-krat večje od M1. Prav tako se tvori diglukuronid na obeh mestih hkrati (raloksifen-6,4'-diglukuronid (M3)), ki pa nastaja v manjšem obsegu [9].



	R1	R2
M1		H
M2	H	
Ral	H	H

Slika 1: Struktura raloksifena in njegovih monoglukuronidov [10]

Kljub nizki absolutni biološki uporabnosti (2 %), v primerjavi z deležem absorpcije (60 %) njegov plazemski razpolovni čas znaša kar 28 ur [7]. Biološka uporabnost raloksifena je torej nizka, vendar je njegovo zadrževanje v telesu dolgotrajno. Na podlagi teh parametrov sklepajo, da je raloksifen vključen v enterohepatično kroženje, ki vključuje vračanje metabolitov, nastalih v enterocitih ozziroma jetrih preko žolča v GIT, njihovo hidrolizo z  $\beta$ -glukuronidazami in ponovno absorpcijo aglikona. V plazmi so zaznali manj kot 1 % nekonjugiranega raloksifena [7].

Večina, kar 95 % raloksifena in njegovih metabolitov, je vezanega na plazemske proteine. Od tega večinoma na albumine in alfa-1-kisli glikoprotein, vendar vezava na globuline spolnih hormonov ni bila opažena. Navidezni porazdelitveni volumen raloksifena je 2.348

L/kg, torej se večina raloksifena v telesu porazdeli v organe in tkiva, kar je za tako lipofilno substanco tudi pričakovano [7]. Raloksifen glede na njegove lastnosti v sistemu BCS (*The Biopharmaceutics Classification System*) in sistemu BDDCS (*Biopharmaceutics Drug Disposition Classification System*) uvrščajo v razred 2 [11, 12, 13] (preglednici 1 in 2).

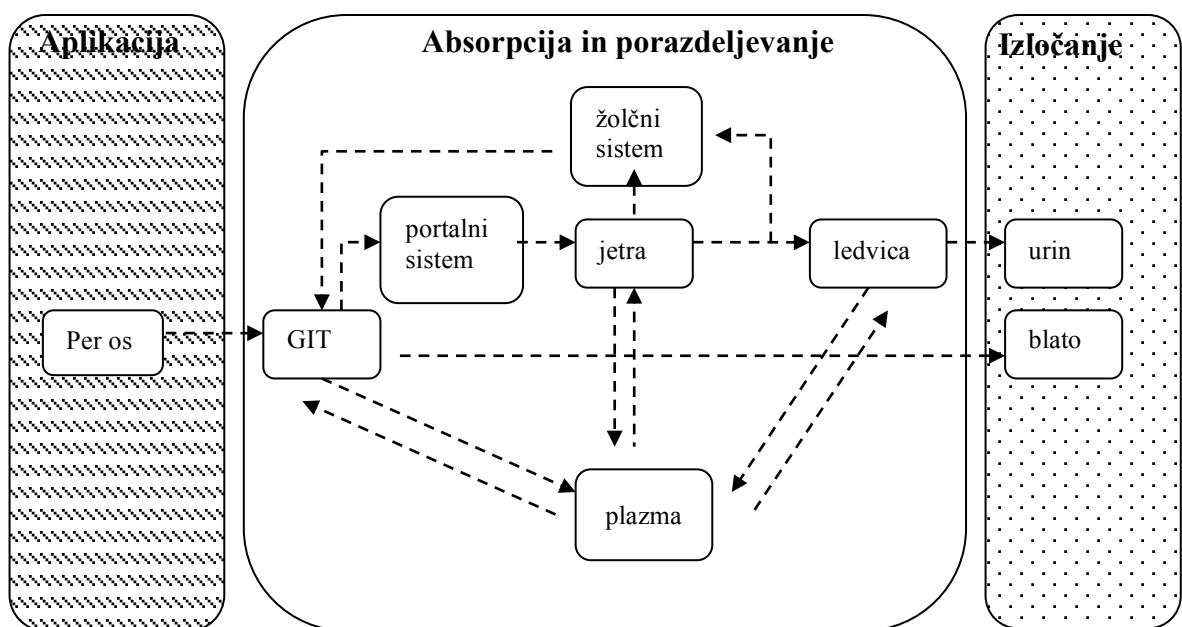
Preglednica 1: Klasifikacijski sistem BCS [11] Preglednica 2: Klasifikacijski sistem BDDCS [13]

	<i>Visoka topnost</i>	<i>Nizka topnost</i>		<i>Visoka topnost</i>	<i>Nizka topnost</i>
<i>Visoka permeabilnost</i>	<u>Razred 1</u> visoka topnost visoka permeabilnost hitro raztopljanje	<u>Razred 2</u> nizka topnost visoka permeabilnost	<i>Obširen metabolizem</i>	<u>Razred 1</u> visoka topnost obširen metabolizem	<u>Razred 2</u> nizka topnost obširen metabolizem
	<u>Razred 3</u> visoka topnost nizka permeabilnost	<u>Razred 4</u> nizka topnost nizka permeabilnost		<u>Razred 3</u> visoka topnost okrnjen metabolizem	<u>Razred 4</u> nizka topnost okrnjen metabolizem

## 1.2 Biološka uporabnost

Večina zdravil se v telo vnaša po peroralni poti, saj le-ta predstavlja najbolj enostaven način aplikacije zdravilne učinkovine in je istočasno tudi cenovno ugodna v primerjavi z npr. intravensko. Tako je že v zgodnjih fazah razvoja zdravila pomembno napovedati peroralno biološko uporabnost učinkovine. Biološka uporabnost učinkovine je namreč zelo pomembna pri razvoju farmacevtske oblike ter pri klinični učinkovitosti zdravila.

Preden lahko ocenujemo klinični učinek zdravila, mora učinkovina izkazovati ustrezne lastnosti v smislu raztplavljanja in prehoda skozi membrane GIT v sistemski krvni obtok. Vsi dejavniki, ki vplivajo na te lastnosti, lahko vplivajo na biološko uporabnost zdravila in s tem na njegov terapevtski učinek.



Slika 2: Pomembnejše poti zdravila po peroralni aplikaciji

V glavnem razdelimo dejavnike, ki vplivajo na biološko uporabnost zdravila, na tiste, ki so povezani s farmacevtsko obliko in fizikalno-kemijskimi lastnostmi učinkovine (velikost delcev, soli, estri, sotopila, lipofilnost ...) ter tiste, povezane z bolnikom (preglednica 3) [14].

Preglednica 3: Faktorji, povezani z bolnikom, ki vplivajo na biološko uporabnost zdravila [14]

<i>Fiziološki parametri</i>	<i>Interakcije</i>
lastnosti segmentov GIT v smislu absorpcije	hrana
različne pH vrednosti tekočin GIT	druga zdravila
praznjenje želodca	volumen tekočin
motilnost GIT	
predsistemske učinek	
starost, spol, teža	
bolezensko stanje	

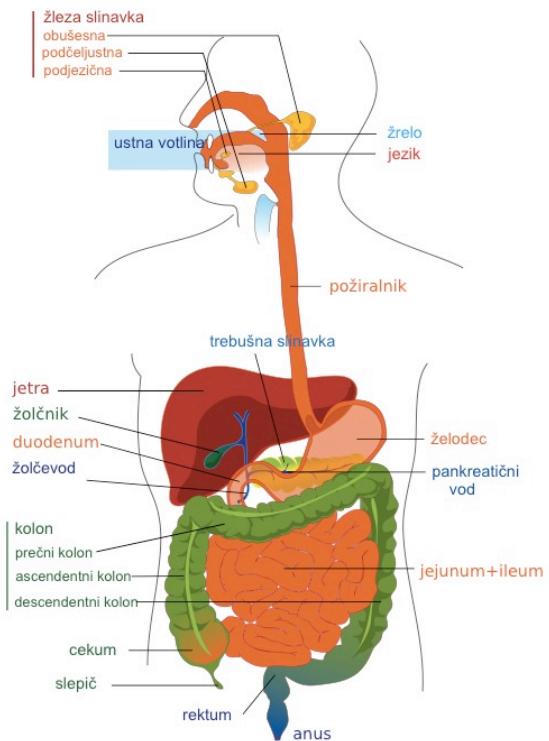
### 1.3 Gastrointestinalni trakt

Med fiziološke parametre, ki vplivajo na absorpcijo, sodita sama anatomija in fiziologija gastrointestinalnega trakta.

Gastrointestinalni trakt (GIT) je razdeljen na tri večje dele: želodec, tanko črevo in debelo črevo. Tanko črevo razdelimo na duodenum, jejunum in ileum, debelo črevo pa na cekum, kolon in rektum (slika 4). Največji del absorpcije snovi, zaužitih peroralno, poteka v tankem črevesu, saj je tam površina največja. Vilusi in na njih prisotni mikrovilusi tako povečajo površino za 200 x. Absorpcija pa je v veliki meri odvisna od tega, kako dolgo se snov zadržuje v delu GIT, kjer naj bi potekala. Ker se absorpcija večine učinkovin dogaja v tankem črevesu, je čas zadrževanja učinkovine v tem predelu GIT precej pomemben (pri podganah in človeku se ta čas giblje med 3–4 urami). Posebej to velja za tiste učinkovine, ki imajo omejeno permeabilnost skozi mukozo, za učinkovine, ki so podvrženemu transportu s prenašalci, učinkovine, ki v tankem črevesu razpadajo (degradacija), oziroma za tiste spojine pri katerih je korak, ki določa hitrost (*rate-determining step*) za sistemsko absorpcijo raztopljanje (npr. spojine po BCS klasifikaciji razreda 2) [15].

Segmenti črevesja imajo zaradi izločanja snovi v lumen različen pH, kar je pomembno za absorpcijo, saj je od pH močno odvisen delež neionizirane/ionizirane spojine. pH vsebine (*chyme*) v želodcu je pri človeku tudi do 2,3, pri podganah pa nekoliko višji, 3,3. Vsebina se v duodenumu nevtralizira zaradi bikarbonata, ki ga izloča trebušna slinavka, in žolča, ki ga sestavlja raztopina bikarbonata in soli kislin. Ko vsebina v črevesju potuje naprej, se pH nekoliko zvišuje, vendar postaja v debelem črevesju ponovno bolj kiselkast, najverjetneje zaradi fermentacije bakterijske mikroflore, ki je v želodcu in zgornjem delu tankega črevesa ni. Bakterijska mikroflora ni pomembna samo z vidika znižanja pH okolja v debelem črevesju,

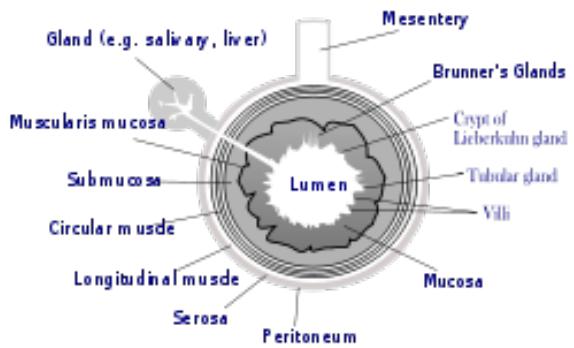
temveč tudi zaradi metabolizma ksenobiotikov, ki vključuje hidrolize, deaminacije, dehidroksilacije, dekarboksilacije in redukcije azidnih skupin. Med bolj pomembne reakcije sodi hidroliza konjugatov glukuronidov, za katero so odgovorni encimi  $\beta$ -glukuronidaze, ki jih izloča bakterijska mikroflora. Pomembno je poudariti, da so nivoji  $\beta$ -glukuronidaz v GIT podgan bistveno višji od tistih pri človeku [15].



Slika 3: Gastrointestinalni trakt [16]

Luminalna površina tankega črevesa je nagubana, steno črevesa pa sestavlja mukoza s submukozo, mišični sloj in serozno. Med vzdolžnim in notranjim krožnim slojem gladkih mišic leži mienterični Auerbachov pletež. V submukozni se nahaja manjše število limfocitov, plazmatk, makrofagov, eozinofilcev, fibrolablastov in mastocitov, ki so obdani z gostim vezivnim tkivom. Učinkovina prehaja iz lumna tankega črevesa preko epitelija in mišične plasti (*muscularis mucosae*) mukoze v submukozo, kjer pride do stika s krvnimi žilami [17].

V plasti submukoze se nahajajo tudi Meissnerjev submukozni pletež, krvne in limfatične žile ter limfatični folikli, ki se v ileumu združujejo v skupke, poznane pod imenom Peyerjeve plošče. Zaradi prisotnosti limfatičnega sistema v stenah črevesa naj bi tudi ta sistem imel pomembno vlogo pri t. i. limfatični absorpciji zelo lipofilnih spojin [17].



Slika 5: Zgradba in plasti tankega črevesa [16]

Prehajanje spojine skozi membrano, torej iz lumna preko mukoze v submukozo, lahko poteka po različnih mehanizmih, ki vključujejo pasivno difuzijo ali aktivni transport.

### 1.3.1 Transport snovi skozi membrano

*Pasivna difuzija* lahko poteka v obliki paracelularnega ali transcelularnega prehoda. *Paracelularno* prehajajo snovi s pomočjo difuzije in pretoka tekočin skozi vodne pore, ki se nahajajo v tesnih stikih med enterociti. Po tej poti se običajno absorbirajo majhne molekule, z molekulsko maso  $< 250$  Da in hidrofilnega značaja ( $\log P < 0$ ), ki izkazujejo pozitiven naboј, saj je neto naboј kompleksa tesnih stikov negativen. Prehajanje snovi po tej poti predstavlja majhen delež mehanizmov absorpcije, ki so na razpolago, saj intercelularna površina predstavlja le do 0,01 % celotne površine membrane tankega črevesa. Poleg tega pa postanejo tesni stiki v smeri od jejunuma do kolona vedno bolj tesni [15].

*Transcelularna difuzija* je namenjena prehajanju bolj lipofilnim spojinam, saj mora snov difundirati skozi lipidno membrano enterocita. Hitrost pasivne transcelularne permeabilnosti določajo fizikalno-kemijske lastnosti absorbirane spojine. Spojine, ki prehajajo transcelularno so neionizirane z molekulsko maso  $> 300$  Da in imajo  $\log P > 0$  ter število donorjev/akceptorjev vodika  $< 10$  oz. 5 (raloksifen: 5/2 [13, 18]). Lipofilne snovi, kot je raloksifen, naj bi prehajale v črevesni epitelij precej hitro in v velikem obsegu, saj se lahko dobro porazdelijo preko celične membrane v intestinalni epitelij. Predvideva se, da transport spojin lipofilnega značaja poteka pasivno transcelularno [15].

*Aktivni transport* je posredovan s prenašalcii in povečuje absorpcijo snovi, kadar gre za prenašalce privzema, ter zmanjšuje absorpcijo, ko govorimo o sekretornih prenašalcih.

### **1.3.1.1 Prenašalci**

Prenašalci so v organizmu pomembni predvsem za snovi, ki pasivno počasi prehajajo skozi biološke bariere. Največkrat so to snovi, ki so preveč hidrofilne, da bi jim bil omogočen prehod skozi fosfolipidni dvosloj. Pomembna vloga prenašalcev je, da pomagajo vnašati v telo nujno potrebne snovi, kot so folna kislina, žolčne kisline, peptidi ali glukoza, kjer imajo vlogo zelo specifični prenašalci (GLUT2, PEPT1), ki po drugi strani zaradi svoje specifičnosti preprečijo prehod škodljivim snovem v organizem. Vstop neznanim (škodljivim) snovem je prav tako otežen s sekretornimi prenašalci, ki pa delujejo kot črpalka, ki črpa škodljive snovi iz notranjosti celice nazaj v lumen [18].

Porazdeljevanje in izločanje nekaterih zdravil je močno odvisno od izraženosti prenašalca v posameznem tkivu, njegove afinitete do substrata in kapacitete prenašalca. Raziskave, opravljene predvsem na prenašalcu P-gp, opisujejo pomembnost časa zadrževanja učinkovine na mestu prenašalca in koncentracijo substrata. Če govorimo o učinkovini, ima pri koncentraciji pomembno vlogo odmerek in hitrost raztopljanja. Ugotovili so, da pri relativno visokih koncentracijah učinkovin prenašalci manj vplivajo na biološko uporabnost, saj takrat pride do njihove nasičenosti. Zato pa imajo toliko večji pomen pri substratih, ki jih dajemo v nizkih peroralnih odmerkah ali pa se kljub visokim peroralnim odmerkom počasi razapljujo oziroma počasi prehajajo skozi celično membrano. Počasna difuzija skozi membrano zmanjša verjetnost, da bo prišlo do zasičenja prenašalca. Zaradi lastnosti prenašalcev in substratov transport snovi poteka kvantitativno različno v različnih organih oziroma tkivih [12, 18]. Dober primer je prebavni sistem, kjer transport substrata (zdravila, metabolita) poteka različno, glede na to, za kateri del prebavnega trakta gre. Prenašalci imajo velik pomen pri farmakokintetiki spojin predvsem v ledvicah, jetrih, tankem črevesu in hemato-encefalni barieri [19].

V glavnem prenašalce delimo na primarne, sekundarne in terciarne aktivne prenašalce. Pri sekundarnih in terciarnih aktivnih prenašalcih je energija ATP potrebna posredno, saj snov črpajo skupaj z intra- ali ekstracelularnim kotransportom ionov. Medtem ko je za primarne prenašalce nujna hidroliza ATP [19]. Z večjim številom odkritih prenašalcev se je pojavila potreba po enotnem sistemu poimenovanja in klasifikacije prenašalcev. Komisija, odgovorna za nomenklaturo človeških genov (*HUGO – Human Gene Nomenclature Committee*), je tako klasificirala in uvedla standardizirana imena prenašalcev. Glavni skupini se tako delita glede na to, ali prenašalec izkorišča energijo v obliki ATP (ABC prenašalci – *ATP Binding Cassete (ABC) transporters*) ali transport preko prenašalca

poteka v obliki kotransporta ionov ( SLC/SLCO prenašalci – *Solute Carrier superfamily*). V preglednici 5 so tako navedeni bolj znani prenašalci pri človeku in podgani, njihova splošno uporabljeni imena in mesto na membrani [12, 18, 19].

Preglednica 4: Prenašalci v jetrih in gastrointestinalnem traktu ter njihovo mesto na membrani

Človek		Podgana	
	Ime	Ime	Mesto prenašalca na membrani celice
ČREVO			
SLC	<i>Peptidni prenašalci</i>		
	PEPT1	Pept1	apikalno (privzem)
	<i>Organski kationski prenašalci</i>		
	MCT1		apikalno (privzem)
			bazolateralno (sekrecija)
	OCT1	Oct1	bazolateralno (privzem)
SLCO	<i>Organski anionski prenašalci</i>		
	OATP1A2	Oatp3	apikalno (privzem)
	OATP2B1		apikalno (privzem)
ABC	<i>Primarni aktivni prenašalci</i>		
	MDR1 (P-gp)	Mdr1	apikalno (sekrecija)
	MRP1		bazolateralno (sekrecija)
	MRP2	Mrp2	apikalno (sekrecija)
	MRP3	Mrp3	bazolateralno (sekrecija)
	MRP4		apikalno (sekrecija)
	BCRP	Bcrp	bazolateralno (sekrecija)

	JETRA	
	Ime	Mesto prenašalca na membrani celice
SLC	<i>Organski kationski prenašalci</i>	
	OCT1	Oct1
SLCO	<i>Organski anionski prenašalci</i>	
	OATP1B1	Oatp1
		sinusoidalno

Človek		Podgana		
	Ime	Mesto prenašalca na membrani celice	Ime	Mesto prenašalca na membrani celice
	OATP1B3	sinusoidalno	Oatp2	sinusoidalno
	OATP-B	sinusoidalno	Oatp4	sinusoidalno
ABC	<i>Primarni aktivni prenašalci</i>			
	MRP1	sinusoidalno	Mrp3	sinusoidalno
	MRP3	sinusoidalno	Mdr1	kanalikularno
	MDR1	kanalikularno		
	BCRP	kanalikularno		

\**APIKALNO* – meji na lumen, votlino črevesja, svetlico; sinonimi: mukozna, luminalna, zunanj stran [20].  
*BAZOLATERALNO* – omogoča pritrjevanje celice na vezivo; sinonimi: serozna, submukozna, notranja stran [20].

### *Pomen poznavanja prenašalcev in njihovih substratov*

Ideja in eden od ciljev raziskovanja prenašalcev je, da bi s poznavanjem in tudi uravnavanjem funkcije prenašalcev lahko razvili zdravila z želenimi farmakokinetičnimi profili. Raziskovalci ugotavljajo, da so akumulacije zdravil v organih (npr. jetrih, ledvicah) močno povezane z izraženostjo in aktivnostjo prenašalcev. Tako so na primer pri spojinah, kot so adefovir, cefalosporini in beta laktamski antibiotiki, ki se kopičijo v tubulih ledvic, ugotovili, da je lahko aktivnost prenašalcev (npr. OAT) direktno povezana z motenim delovanjem (poškodbo) tubulov [19].

Z določanjem izraženosti prenašalcev bi tako lahko prilagodili terapijo posamezniku, ne samo z ustrezno izbiro vrste zdravila in odmerka, temveč tudi z uvedbo inhibitorjev prenašalcev in tako zmanjšali kopičenje določenega zdravila.

### **Primarni prenašalci v enterocitih**

Dobro poznani primarni aktivni sekretorni prenašalci, kot so MDR1 (P-gp), nekateri prenašalci skupine MRP (*Multidrug Resistance associated Protein*), kot so MRP2 in MRP4 ter BCRP (*Breast Cancer Resistance Protein*), se nahajajo na apikalni strani membrane enterocitov. Črevesni apikalni sekretorni prenašalci tako preprečujejo absorpcijo toksičnih snovi, kot so toksini, ki jih proizvajajo bakterije v prebavnem traktu, oziroma preprečujejo absorpcijo ksenobiotikov ter jih črpajo v lumen, kar omejuje njihovo absorpcijo, in če govorimo o zdravilih, njihovo biološko uporabnost [19].

#### a) P-gp (P-glikoprotein)

Najbolje raziskan je prenašalec MDR1 (*Multidrug resistant gene*) imenovan tudi P-gp, oziroma ABCB1 glede na HUGO klasifikacijo. Prenašalec ima največji učinek na absorpcijo v centralni živčni sistem in na izločanje v črevesni lumen in žolč, nahaja pa se tudi v proksimalnih tubulih v ledvicah in v testisih.

P-gp je sestavljen iz glikoproteinske verige, ki jo sestavlja dva homologna dela. Raziskovalci poročajo o najmanj dveh različnih vezavnih mestih za substrat, imenovanih H-vezavno mesto in R-vezavno mesto, ki naj bi vezala Hoechst 33342 (vrsta barvila) oziroma Rodamin 123. Poročajo pa tudi o obstoju tretjega vezavnega mesta, ki ima pozitiven alosteričen učinek na vezavo na drugi dve vezavni mesti [21].

P-gp ima široko substratno specifičnost in tako v lumen črevesja črpa velik spekter snovi, ki so v glavnem lipofilne, planarne molekule, ponavadi nenabite in večinoma amfifilne, saj morajo za doseganje vezavnega mesta najprej prehajati lipidno membrano. Korak, ki določa hitrost za interakcijo vezavnega mesta in substrata, naj bi bilo porazdeljevanje v lipidno membrano, medtem ko je disociacija iz vezavnega mesta povezana s številom in močjo vodikovih vezi, ki se tvorijo med substratom in prenašalcem, saj je vezavno mesto polno skupin, ki so donorji vodika. Tako predlagajo, da naj bi za napovedovanje vezave veljalo »pravilo štirih«, ki pravi, da se spojine, ki imajo najmanj 8 akceptorjev vodikovih vezi, molekulsko maso večjo od 400 Da in  $pK_a > 4$ , dobri substrati za P-gp. Vendar je poleg fizikalno-kemijskih parametrov, s pomočjo katerih je napoved vezave dobra, pomembna pristnost več vezavnih mest, ki poleg ostalih dodatnih dejavnikov zaenkrat onemogočajo določitev SAR [21].

P-gp je vzdolž prebavnega trakta neenakomerno porazdeljen, in sicer njegova gostota raste vzdolž prebavnega trakta, torej ga je najmanj v želodcu in največ v debelem črevesu [18] [19]. Odkritje povezave med visoko izraženim P-gp in zmanjšanjem preživetja po transplantacijskih operacijah, ko so bolniki bili zdravljeni z imunosupresivom (takrolimus), nam dobro ponazoriti kako močno lahko izraženost prenašalca vpliva na biološko uporabnost zdravila, ki je njegov substrat [19].

### **b) MRP (Multidrug Resistance associated Protein)**

Vloga sekretornih prenašalcev MRP je manj raziskana in bolj kompleksna, saj se njihova substratna specifičnost prekriva. Med MRP prenašalci so najbolje raziskani MRP1, MRP2

in MRP3 prenašalci, medtem ko o drugih prenašalcih teh skupine ni veliko znanega. Znano je, da sta MRP4 in MRP5 pomembna pri transportu nukleotidov in njihovih analogov [22].

*MRP1*, imenovan tudi ABCC1 je večinoma izražen na bazolateralni membrani celic. Največja izraženost MRP1 je v pljučih, testisih, ledvicah, pomembno vlogo pa naj bi imel tudi pri omejevanju permeabilnosti učinkovin čez hematoencefalno bariero. V gastrointestinalnem traktu je največja izraženost v kolonu. Vloga MRP1 prenašalca je sekretorna, med substrate pa uvrščajo estron-3-sulfat in estradiol-3 $\beta$ -glukuronid [22].

*MRP2* po HUGO klasifikaciji imenovan ABCC2, se od ostalih MRP prenašalcev razlikuje v tem, da se nahaja na apikalni strani celic. Njegova porazdelitev vzdolž prebavnega trakta je ravno obratna kot pri P-gp, saj ga je v proksimalnem jejunumu največ, najmanj pa v distalnem ileumu. V nasprotju z MRP1 je MRP2 izražen na apikalni membrani celic. Njegovi substrati so v glavnem organski anioni, ki nastanejo s konjugacijo učinkovine z glutationom ali glukuronsko kislino lahko pa so tudi nekonjugirani [22]. Zanimivo je, da je razporeditev MRP2 vzdolž prebavnega trakta podobna razporeditvi konjugacijskih encimov (UDP-glukuronoziltransferaze in glutation-S-transferaze), torej gre najverjetneje za usklajeno delovanje presnove in izločanja pri preprečevanju absorpcije zdravilnih učinkovin in potencialno toksičnih snovi. Aktivnost MRP2 naj bi se tako vzdolž prebavnega trakta zmanjševala [18, 22].

*MRP3*, imenovan tudi ABCC3, je po strukturi in mestu na membrani podoben MRP1. Prav tako se nahaja na bazolateralni strani celic. Največja izraženost MRP3 je v hepatocitih, ledvicah, placenti, v GIT pa je največja izraženost v ileumu in kolonu [22]. Pomembno vlogo naj bi imel v enterohepatičnem kroženju žolčnih soli, v transportiranju endogenih konjugatov steroidov in izločanju toksičnih anionskih organskih konjugatov iz hepatocitov. V primerjavi z MRP1 in MRP2, naj bi imel MRP3 večjo zmožnost transportiranja glukuronidov kot konjugatov z glutationom [22].

### c) BCRP (Breast Cancer Resistance Protein)

Prenašalec BCRP, imenovan tudi ABCG2, je bil odkrit nekoliko kasneje. Zaradi njegove strukture, ki vsebuje samo eno enoto, ki veže ATP, se BCRP omenja tudi kot »polprenašalec«, ki naj bi za delovanje moral homodimerizirati. Za vezavo naj bi bili

odgovorni bazi histidin (His457) in arginin (Ar465). Substrati BCRP so lahko pozitivno ali negativno nabiti, lahko so hidrofilni ali hidrofobni, konjugirani ali ne. Ugotovili so, da je večja verjetnost vezave tistih substratov pri katerih sta prisotni tako hidroksilna kot aminska skupina, ki tvorita vodikove vezi z aminskima skupinama v BCRP vezavnem mestu. Substrati BCRP so tako kot pri ostalih ABC prenašalcih lahko zelo različni in se lahko prenašajo tudi z drugimi prenašalci znotraj družine MRP ter s P-gp prenašalcem. Njegova razporeditev vzdolž prebavnega trakta narašča, doseže maksimum v ileumu in se nato v kolonu ponovno zmanjša [22].

#### d) BSEP (Bile Salt Export Pump)

BSEP, po HUGO klasifikaciji imenovan ABCB11, ki se nahaja na kanalikularni membrani, uravnava izločanje žolčnih soli in ostalih toksičnih sestavin žolča. Ugotovili so, da je BSEP lahko inhibirana posredno preko snovi, ki se prenašajo z MRP2. Metabolit estrogena (E<sub>2</sub>-17 betaG) je tako najprej substrat MRP2, ki metabolit prenese v kanalikularen lumen in šele potem inhibira prenos žolčnih kislin preko BSEP. Jetrna holestaza, ki jo povzročijo nekatera zdravila, je lahko delno posledica inhibicije BSEP, zaradi česar pride do kopičenj žolčnih soli v hepatocitih. [19]

### Sekundarni in terciarni prenašalci

#### a) OATP (Organic Anionic Transporting Polypeptides)

OATP spadajo po HUGO klasifikaciji med SLCO prenašalce. Do danes je bilo odkritih 6 podvrst OATP prenašalcev, ki imajo večinoma širok spekter substratov. Ti so običajno amfifilni. OATP prenašalci tako med drugim prenašajo žolčno kislino, steroide, ščitnične hormone in njihove konjugate. OATP1 prenašalci so izraženi med drugim tudi v jetrih in prebavilih, kjer so na apikalni strani membrane odkrili prenašalec OATP1A2, ki ima precej široko substratno specifičnost, saj lahko prenaša tako kisle kot bazične in nevtralne spojine. Med drugim naj bi prenašal žolčne kisline, sulfate steroidov, ščitnične hormone in prostaglandine [23].

Iz skupine OATP2 prenašalcev se v prebavilih pretežno nahaja prenašalec OATP2B1, ki se nahaja na apikalni strani membrane, predvsem v tankem črevesu. OATP2B1 prenašalci imajo ozko substratno specifičnost, ki pa je zelo odvisna od pH okolja. Ko so namreč poskuse izvajali pri bolj kiselkastem pH, se je substratna specifičnost močno razširila in

tako med substrate OATP2B1 danes uvrščajo statine in diuretike Henleyeve zanke [23, 21].

### **b) OAT (Organic Anionic Transporter)**

Druga vrsta prenašalcev, ki neposredno ne potrebujejo energije ATP, so prenašalci OAT, ki po HUGO klasifikaciji spadajo v skupino SLC prenašalcev. OAT prenašalci se večinoma, tako kot OAT1 in OAT3, nahajajo v ledvicah. Njihovi substrati so večinoma majhni in hidrofilni anioni, kot so zdravila iz skupine NSAID, metotreksat, beta laktamski antibiotiki in protivirusni analogi nukleozidov. Čeprav se OAT prenašalci večinoma nahajajo v ledvicah, so izjema prenašalci OAT2, ki se nahajajo večinoma v jetrih, na bazalni strani hepatocitov. Njihovi substrati so prav tako manjše hidrofilne molekule, kot sta indometacin in salicilati [19].

Na splošno velja, da se amfifilne molekule z višjo molekulsko maso, kot so substrati OATP prenašalcev, izločajo preko jeter z metabolizmom ali/in se izločajo z žolčem, medtem ko se manjše hidrofilne molekule, kot so substrati OAT, izločajo preko urina [19].

### **c) OCT (Organic Cationic Transporter)**

Med SLC prenašalce (HUGO klasifikacija) sodijo tudi OCT prenašalci, ki jih v grobem razdelimo na OCT1, OCT2 in OCT3. Večinoma se ti prenašalci nahajajo v jetrih in ledvicah ter prebavilih, in sicer naj bi se nahajali na bazalni strani epitelijskih celic. Ti prenašalci pri človeku še niso najbolje raziskani, več je znanega o njih pri podganah in miših. Pri miših so tako odkrili, da je Oct1 prenšalec odgovoren za privzem metformina v jetrih, prav tako pa naj bi imel vlogo pri privzemu v gastrointestinalnem traktu [19]

### 3.3.2 Metabolizem

Navkljub zelo dobri absorpciji učinkovine iz GIT je lahko peroralna biološka uporabnost še zmeraj slaba, saj nanjo vpliva tudi metabolizem oz. predsistemska metabolizem. Ko govorimo o predsistemskega metabolizma, imamo v mislih metabolizem, ki mu je učinkovina izpostavljena, medtem ko prehaja iz mesta absorpcije, torej GIT v sistemski krvni obtok. Takrat namreč prvič prečka tanko črevo in jetra.

Biotransformacija ksenobiotikov, med njimi tudi zdravil, je proces, v katerega so vpleteni encimi, ki pretvarjajo v vodi slabo topne snovi v bolj vodotopne, da se tako lažje izločajo iz telesa. V splošnem razdelimo encime in metabolizem snovi v dve faz, ki ni nujno, da si sledita. Tako velja, da metabolična pot neke učinkovine lahko poteče zgolj z encimi ene izmed dveh faz, kot je to v primeru direktno glukuronidacije ksenobiotika.

Znano je, da obstajajo številni inter- in intraindividualni dejavniki, ki vplivajo na metabolizem in njegov obseg. Izmed interindividualnih dejavnikov, med katere spadata tudi spol in genetski faktorji, je predvsem z vidika napovedovanja biološke uporabnosti učinkovine s pomočjo živalskih modelov zelo pomembno poznavanje specifičnosti posameznih bioloških vrst.

#### 1.3.2.1 Encimi I. faze metabolizma

V I. fazi metabolizma večinoma potekajo oksidativne reakcije, ki jih največkrat katalizirajo encimi iz naddružine CYP450. Poleg citokromov P450 so odkrili še druge pomembnejše predstavnike (preglednica 6). Večinoma ti encimi z reakcijami pripravijo učinkovino na naslednjo fazo.

Preglednica 5: Pomembnejši encimi prve faze [24]

Encim	Oznaka	Reakcija	Mesto v celici	Kofaktor
citokromi P450s	CYP	oksidacija ali redukcija	mikrosomalno	NADPH
flavin monooksigenaze	FMO	oksidacija	mikrosomalno	NADPH
monoaminske oksidaze	MAO	oksidacija	mitohondrij	
alkoholna in aldehidna dehidrogenaza	ADH/ALDH	oksidacija in redukcija	citosolno	NAD <sup>+</sup>

### 1.3.2.2 Encimi II. faze metabolizma

Za metabolizem II. faze so značilne konjugacije, kjer encimi pripenjajo endogene snovi preko kovalentne vezi na reaktivno (nukleofilno) skupino ksenobiotikov, kofaktorji encimov pa so nosilci endogene molekule.

Preglednica 6: Pomembnejši encimi druge faze [24]

Encim	Oznaka	Reakcija	Mesto v celici	Kofaktor
UDP-glukuronozil-transferaze	UGT	glukuronidacija	mikrosomalno	UDPGA
sulfotransferaze	SULT	sulfatiranje	citosol	PAPS
glutation S-transferaze	GST	konjugacija z glutationom	citosol in mikrosomalno	Acetil-CoA
N-acetiltransferaze	NAT	N-acetiliranje	citosol	Acetil-CoA
Metiltrasnferaze	MT	metilacija	citosol	S-adenozil metionin

Glukuronidacija je pomembna metabolična pot odstranjevanja ksenobiotikov, pri kateri sodelujejo encimi UDP-glukuronozil-transferaze (UGT). Encimi UGT so izraženi v številnih tkivih, med drugim v jetrih, ledvicah, pljučih in prebavilih. Kljub temu da veljajo jetra kot primarni organ, ki sodeluje pri metabolizmu, novejše raziskave kažejo, da ima tudi intestinalna glukuronidacija pomemben vpliv na farmakokinetiko in biološko uporabnost substratov UGT, zaradi tega je zelo pomembna povezava med *in vitro* metabolično stabilnostjo in *in vivo* farmakokinetičnimi parametri [25]. Študije kažejo, da se veliko učinkovin, ki se uporablja dnevno, v veliki meri (40 %) presnavlja preko glukuronidacije [26].

Konjugati z glukuronidi so večinoma polarni in v ionizirani obliki pri fiziološkem pH. Te lastnosti olajšajo izločanje substrata preko žolča in/ali ledvic. Vendar so glukuronidi zaradi povečane molekulske mase (+176) in velike polarnosti preveliki, da bi lahko pasivno prehajali v žolč oziroma urin. Tukaj imajo pomembno vlogo prenašalci, ki pomagajo pri njihovem transportu skozi membrano.

UGT encime razdelimo v 2 veliki družini: UGT1 in UGT2. Poimenovanju nato sledi črka, ki označuje poddružino (npr. A, B). Humani genom ima 19 aktivnih genov, ki kodirajo za UGT encime. Ti so razdeljeni v poddružine 1A, 2A in 2B. Pri glukuronidaciji učinkovin in ksenobiotikov imata največjo vlogo poddružini 1A in 2B [24].

Prispevek določenih encimov družin UGT1 in UGT2 pri glukuronidaciji substratov je zelo različen. Težava pri raziskovanju vloge določenih UGT encimov pri glukuronidacijah spojin je v tem, da obstajajo velike interindividualne razlike v izraženosti encimov, tako znotraj družine UGT1 (UGT1A1, -1A3, -1A6) kot UGT2 (UGT2B4, -2B7, -2B15) [27]. Prav tako se izraženost razlikuje glede na tkivo.

Poleg jeter in ledvic pa ima pomembno vlogo pri glukuronidaciji ksenobiotikov in pri peroralnem vnosu zdravil gastointestinalni trakt, kjer se izraženost encimov razlikuje glede na segment (preglednica 8) [24].

Preglednica 7: Izraženost UGT1A v gastrointestinalnem traktu ljudi [28]

	Požiralnik	Želodec	Duodenum	Jejunum	Ileum	Kolon
UGT1A1 <sup>a</sup>	-	+/-	+/-	+/-	+/-	+
UGT1A3	-	+/-	+/-	+	+/-	+
UGT1A4	-	-	+/-	+/-	+/-	-
UGT1A6	-	+/-	+/-	+/-	+/-	+
UGT1A7	+	+	-	-	-	-
UGT1A8 <sup>a</sup>	+	-	+/-	+/-	+/-	+
UGT1A9 <sup>a</sup>	+	-	-	-	-	+
UGT1A10 <sup>a</sup>	+	+	+	+	+	+

+, pozitivna raven izraženosti; +/-, polimorfizmi prisotni; -, nezaznavno

\* Izraženost UGT2 ni prikazana.

<sup>a</sup> Encimi pomembni pri metabolizmu raloksifena [29], [9].

Preglednica 8 sicer prikazuje domnevno razporejenost encimov vzdolž GIT, vendar je treba biti pozoren, saj tudi pisci ostalih podobnih člankov opozarjajo na veliko variabilnost med subjekti [28, 30, 31].

Pri napovedovanju metabolizma učinkovin *in vivo* iz *in vitro* poskusov moramo biti pozorni pri izbiri tkiva, saj se izraženosti in aktivnosti encimov močno razlikujejo glede na izvor tkiva (encimov), s katerim izvajamo poskuse (preglednica 9).

Preglednica 8: Izraženost UGT1A mRNA v gastrointestinalnem traktu ljudi, opic, podgan [31]

	Človek		Opica Nishimura et al. (2009)	Podgana Shelby et al.
	Yamana ka et al. (2007)	Ohno and Nakajin (2009)		
UGT1A1	+	+	+	+
UGT1A3	+	+/-	+	+
UGT1A4	+	-	+	+
UGT1A5	+	+	+	+/-
UGT1A6	+	+		+
UGT1A7	-	+/-		+
UGT1A8	+	+		-
UGT1A9	-	+/-		
UGT1A10	+	+		

+, pozitivna raven izraženosti; +/-, šibka raven izraženosti; -, nezaznavno

\* Izraženost UGT2 ni prikazana.

## 2 NAMEN DELA

Namen diplomskega dela je, da bi ugotovili kako se raloksifen presnavlja v sluznici tankega črevesa podgane, kateri prenašalci so udeleženi pri transportu metabolitov raloksifena ter kakšno je morebitno medsebojno delovanje med metabolnimi encimi in prenašalci v primeru raloksifena in njegovih metabolitov.

Predvidevamo naslednje:

- v tankem črevesu podgane nastaja največ metabolitov M1 in M2, metabolita M3 nastaja manj [8,9];
- transport raloksifena in njegovih metabolitov je odvisen od segmenta intestinalnega trakta [12, 18];
- P-gp, MRP, OATP in BCRP prenašalci so vpleteni v prehajanje raloksifena in njegovih metabolitov skozi membrano intestinalnega trakta podgane [18, 21, 22, 23].

Glede na postavljene cilje smo se odločili, da bomo poskuse izvajali na tkivu podganjega črevesja, ki ga bomo vpeli v dvoprostorne difuzijske celice Easy Mount in spremljali njegovo vitalnost s pomočjo elektrofizioloških parametrov. Koncentracije raloksifena in njegovih glavnih metabolitov (raloksifen-4'-glukuronid, raloksifen-6-glukuronid) bomo kvantificirali z UHPLC/MS/MS metodo. Koncentracije bomo merili v celicah na obeh straneh tkiva, tako na donorski kot na akceptorski strani, ter tako spremljali transport v smeri absorbcije (M-S) kot tudi sekrecije (S-M). Med difuzijske celice bomo tako vpenjali različne segmente podganjega črevesja in primerjali deleže nespremenjenega raloksifena in njegovih metabolitov glede na segment. Nato bomo za ugotavljanje vloge različnih prenašalcev uporabili inhibitorje, ki bodo specifični za posamezen prenašalec ali skupino prenašalcev.

## 3 MATERIALI IN METODE

### 3.1 MATERIALI

#### Reagenti

##### a) Preiskovane snovi

- 2,174 mM raztopina raloksifenijevega klorida (Sigma Chemie, Deisenhofen, Nemčija) v DMSO,
- 2,0736 mM raztopina raloksifen-6-glukuronida (M1) (sintetiziran na fakulteti za farmacijo) v DMSO,
- 1,567 mM raztopina raloksifen-4'-glukuronida (M2) (sintetiziran na fakulteti za farmacijo) v DMSO,
- 0,401 mM raztopina raloksifen-6,4'-diglukuronida (M3) (sintetiziran na fakulteti za farmacijo) v DMSO.

##### b) Druge snovi

- bdestilirana voda – mili-Q voda, pridobljena z aparatom Milli-Q Advantage A10 Ultrapure Water Purification System (Millipore, Bedford, ZDA) na Fakulteti za farmacijo, Ljubljana,
- haloperidolov klorid (interni standard), Sigma Chemie (Deisenhofen, Nemčija),
- metanol, Sigma Chemie (Deisenhofen, Nemčija),
- amonijev acetat, Sigma Chemie (Deisenhofen, Nemčija),
- ocetna kislina, Sigma Chemie (Deisenhofen, Nemčija),
- $\beta$ -glukuronidaze, 451.000 enot/g,
- humani serumski albumin (HSA) 200 g/L, Octapharma,
- dimetil sulfoksid (DMSO); 99 %, Kemika, M = 78,13 g/mol,  $\rho$  = 1,099–1,101,
- 1 M NaOH, Sigma Chemie (Deisenhofen, Nemčija),
- ocetna kislina, Sigma Chemie (Deisenhofen, Nemčija),
- manitol, Sigma Chemie (Deisenhofen, Nemčija),
- glukoza, Sigma Chemie (Deisenhofen, Nemčija),
- natrijev hidrogenkarbonat, Merck (Darmstadt, Nemčija),
- natrijev dihidrogenfosfat x H<sub>2</sub>O, Merck (Darmstadt, Nemčija),
- natrijev klorid, Merck (Darmstadt, Nemčija),
- kalijev klorid, Merck (Darmstadt, Nemčija),
- kalcijev klorid x 2 H<sub>2</sub>O, Merck (Darmstadt, Nemčija),
- magnezijev klorid x 6 H<sub>2</sub>O, Merck (Darmstadt, Nemčija),
- dinatrijev hidrogenfosfat x 2 H<sub>2</sub>O, Merck (Darmstadt, Nemčija),
- PSC833 (inhibitor P-gp [12, 32]), Tocris,
- KO143 (inhibitor BCRP [12, 33]), Sigma Aldrich Chemie, Deisenhofen, Nemčija,
- MK-571 (inhibitor MRP1, MRP2, MRP3, MRP4, MRP5 [12, 33]), Sigma Aldrich Chemie, Deisenhofen, Nemčija,
- DIDS (neselektivna inhibicija OATP [33, 35]), Sigma Aldrich Chemie, Deisenhofen, Nemčija

### Raztopine za poskuse z $\beta$ -glukuronidazami

- a) 50 mM amonijev acetat, pH = 5, 200 ml raztopine: 0,7708 g zatehtamo v 200 mL merilno bučko, dodamo bidestilirano vodo in z ocetno kislino uravnamo na pH = 5.
- b) 4.000 e/mL  $\beta$ -glukuronidaz, 3 mL raztopine: 26,6 mg  $\beta$ -glukuronidaz zatehtamo v Eppendorfovem epruvetu (epico) in dodamo 3 mL pufra (50 mM amonijev acetat, pH = 5).
- c) Priprava 60 mM osnovnih raztopin analitov, 900  $\mu$ L:

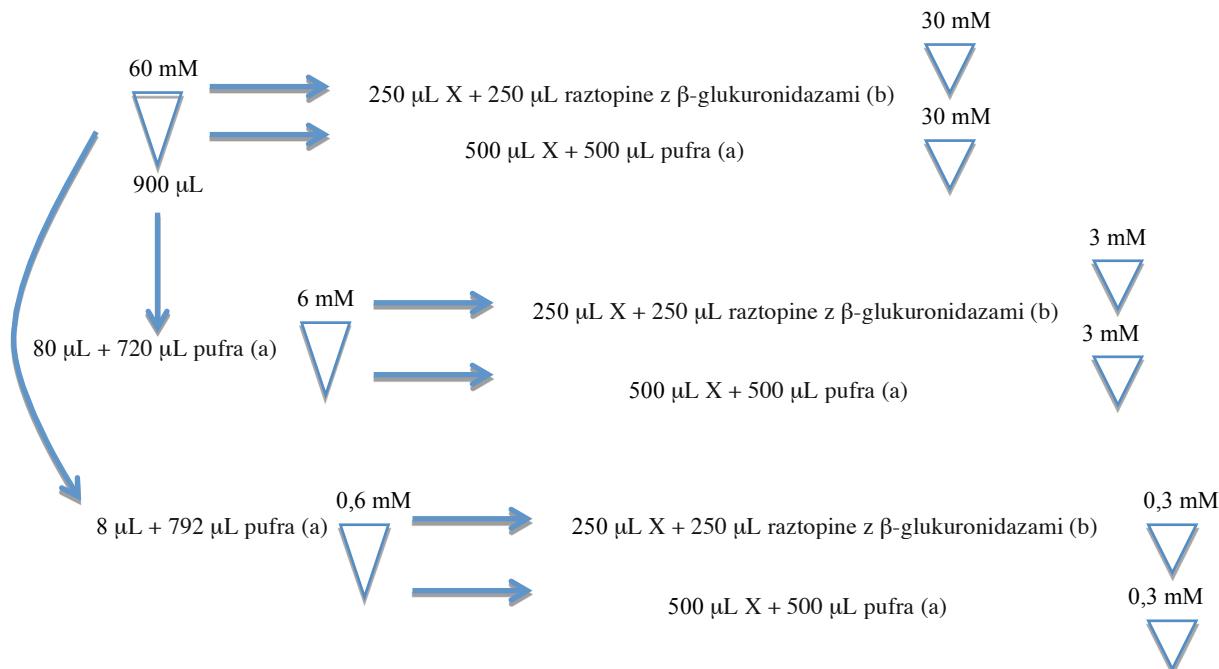
Preglednica 9: Priprava osnovnih raztopin analitov

Preiskovana snov, molalnost	Izračunan V osnovne raztopine ( $\mu$ L)
raloksifenijev klorid (2,174 mM)	24,8
raloksifen-4'-glukuronid (M2) (2,0736 mM)	26
raloksifen-6-glukuronid (M1) (1,567 mM)	34,5
raloksifen-6,4-diglukuronid (M3) (0,401 mM)*	13,5

\* Zaradi majhne količine analita na voljo smo pripravili 3 mM raztopino.

V epico smo odpipetirali izračunan volumen osnovne raztopine ter dodali pufer (50 mM amonijev acetat, pH = 5) do skupnega volumna 900  $\mu$ L.

- d) Priprava 0,3, 3 in 30 mM raztopin analitov:



- e) 0,5 mg/L raztopina metanola s haloperidolom, 50 mL: V 50 mL merilno bučko zatehtamo 0,025 mg haloperidola in dopolnimo z metanolom.

- f) Priprava raztopin za umeritveno krivuljo:

Razredčitev	0x	2x	5x	10x	20x	50x	100x	200x	500x	1000x
Končna koncentracija [mM]	30	15	6	3	1,5	0,6	0,3	0,15	0,06	0,03
Volumen [μL] 30 mM osnovne raztopine z/brez β- glukuronidaz	1000	500	200	100	500	200	100	500	200	100
Volumen [μL] raztopine pufera z/brez β- glukuronidaz	0	500	800	900	500	800	900	500	800	900

\*osenčena polja predstavljajo epice z 1 mL raztopine različnih koncentracij (»Končne koncentracije«), ki smo jih uporabili za umeritveno krivuljo

#### *Raztopine za poskuse na dvoprostornih difuzijskih celicah*

A. Ringerjev pufer, pH = 7,4: reagenti za 2 L raztopine: 4,2 g NaHCO<sub>3</sub>, 0,11 g NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>·H<sub>2</sub>O, 13,082 g NaCl, 0,746 g KCl, 0,352 g CaCl<sub>2</sub>·2 H<sub>2</sub>O, 0,488 g MgCl<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O, 0,569 g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>·2 H<sub>2</sub>O. V 2 L merilno bučko nalijemo vsaj 1,6 L bidestilirane vode in po zapisanem vrstnem redu dodajamo naštete soli. Vsako naslednjo dodamo šele, ko je prejšnja popolnoma raztopljena. Po zadnji raztopljeni soli dopolnimo z bidestilirano vodo do oznake in prepihamo s karbogenom (95 % O<sub>2</sub>, 5 CO<sub>2</sub>), da znižamo pH raztopine na 7,4 in omogočimo, da se natrijev dihidrogenfosfat raztopi.

B. Ringerjev pufer, pH = 6,5: reagenti za 2 L raztopine: 0,21 g NaHCO<sub>3</sub>, 0,966 g NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>·H<sub>2</sub>O, 15,781 g NaCl, 0,746 g KCl, 0,352 g CaCl<sub>2</sub>·2 H<sub>2</sub>O, 0,488 g MgCl<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O, 0,285 g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>·2 H<sub>2</sub>O. V 2 L merilno bučko nalijemo vsaj 1,6 L bidestilirane vode in po zapisanem vrstnem redu dodajamo naštete soli. Vsako naslednjo dodamo šele, ko je prva popolnoma raztopljena. Po zadnji raztopljeni soli

dopolnimo z bidestilirano vodo do oznake. Z 1 M NaOH znižamo pH na 6,95 in prepihamo s karbogenom (95 % O<sub>2</sub>, 5 CO<sub>2</sub>), da znižamo pH raztopine na 6,5.

- C. 625 mM glukoza, 25 mL raztopine: V 25 mL meritni bučki raztopimo 2,815 g glukoze v bidestilirani vodi.
- D. 625 mM manitol, 25 mL raztopine: V 25-mL meritni bučki raztopimo 2,850 g manitola v bidestilirani vodi.
- E. 10 mM glukoza, 100 mL raztopine: V 100-mL meritno bučko odpipetiramo 1,6 mL 625 mM raztopine glukoze, 5 mL raztopine z albumini (200g/L) in dopolnimo z Ringerjevim pufrom.
- F. 10 mM manitol, 100 mL raztopine: V 100-mL meritno bučko odpipetiramo 1,6 mL 625 mM raztopine manitol, 5 mL raztopine z albumini (200g/L) in dopolnimo z Ringerjevim pufrom.

#### G. Osnovna raztopina z raloksifenom na donorski strani tkiva, 100 mL:

Preglednica 10: Priprava osnovne raztopine raloksifena na donorski strani tkiva

	Izračunan V reagenta	Končna koncentracija v 100-mL meritni bučki/celici
albumin (200g/L)	5 mL	10 g/L
MUKOZNA STRAN*:		
glukoza (625 mM)	1,6 mL	10 mM
SEROZNA STRAN*:		
manitol (625 mM)	1,6 mL	10 mM
raloksifenijev klorid (2,174 mM)	2,3 mL	50 µM
Ringerjev pufer	dopolnimo do oznake	

\* Glede na stran tkiva, na kateri se nahaja donorska raztopina, izberemo ustrezен sladkor (manitol ALI glukozo).

V 100-mL merilno bučko odpipetiramo izračunane volumne reagentov in z Ringerjevim pufrom dopolnimo do oznake.

H. Raztopina na akceptorski strani tkiva, 100 mL:

Preglednica 11: Priprava raztopine na akceptorski strani tkiva

	Izračunan V reagenta	Končna koncentracija v 100-mL merilni bučki/celici
albumin (200g/L)	5 mL	10 g/L
MUKOZNA STRAN*:		
glukoza (625 mM)	1,6 mL	10 mM
SEROZNA STRAN*:		
manitol (625 mM)	1,6 mL	10 mM
Ringerjev pufer	dopolnimo do oznake	

\* Glede na stran tkiva, na kateri se nahaja donorska raztopina, izberemo ustrezен sladkor (manitol ALI glukozo).

V 100-mL merilno bučko odpipetiramo izračunane volumne reagentov in z Ringerjevim pufrom dopolnimo do oznake.

- I. 0,5 mg/L raztopina metanola s haloperidolom, 1 L: V 1-mL merilno bučko zatehtamo 0,5 mg haloperidola in dopolnimo z metanolom.

### J. Priprava raztopin za umeritveno krivuljo:

Začetno raztopino, s katero smo pripravljali vse nadaljnje raztopine in prvo točko umeritvene premice, smo pripravili tako, da smo vzeli 200 µL osnovne raztopine z raloksifenom, albumini in manitolom (raztopina pod točko G.) ter dodali 800 µL raztopine z albumini in manitolom (H.). Tako pripravljeno raztopino (označeno z rdečo) smo nato uporabili za pripravo ostalih raztopin. Pri vsaki tretji redčitvi smo pripravili dve paralelki, saj smo eno paralelko uporabili za nadaljnje redčenje.

Razredčitev	0x	2x	5x	10x	20x	50x	100x	200x	500x	1000x
Končna koncentracija [mM]	10	5	2	1	0,5	0,2	0,1	0,05	0,02	0,001
Volumen [µL] 10 mM raztopine	/	500	200	100	500	200	100	500	200	100
Volumen [µL] raztopine z albumini in manitolom (H)	/	500	800	900	500	800	900	500	800	900

\* Osenčena polja predstavljajo epice z 1 mL raztopine različnih koncentracij (»končne koncentracije«), ki smo jih uporabili za umeritveno krivuljo.

### Aparature

- Easy Mount difuzijske celice z napetostnimi in tokovnimi elektrodami ter s 6 ali 8 kanalnim potenciometrom z možnostjo vpenjanja napetosti ter toka (Multichannel voltage-current clamp (VCC MC6 in VCC MC8), Physiologic Instruments, Inc.),
- digitalni termometer DT02, Dalmacija,
- tehnica Mettler toledo AB54-S,
- tehnica Mettler H54AR,
- pH meter Iskra-MA 5750,
- UHPLC/MS/MS sistem:

- UHPLC: Agilent 1290 Infinity (Agilent Technologies, Santa Clara, ZDA),
- MS Agilent 6460 Triple quad (Agilent Technologies, Santa Clara, ZDA),
- centrifuga Eppendorf Centrifuge 5415 R, ZDA,
- ročno mešalo, Tehnica, Vibromix 114,
- pipete Eppendorf Research: 2–20 µL, 20–200 µL, 100–1000 µL, 1–10 µL,
- večkanalna pipeta, Eppendorf Research: 0,5–10 µL, 30–300 µL,
- nastavki za multipipeto, Comitips plus 0,1 mL; 1,0 mL; 5 mL,
- britvice,
- pincete,
- polipropilenski 1,5 µL in 2,0 µL vsebniki (oz. Eppendorfove epruvete—epice),
- mikrotitrskie ploščice Agilent Deep Well,
- mikrotitrskie ploščice Eppendorf Polypropylene Plates.

## 3.2 METODE

### 3.2.1 Določanje faktorja odziva z $\beta$ -glukuronidazami

S poskusi z  $\beta$ -glukuronidazami, ki cepijo metabolite, smo določili faktorje odziva metabolitov glede na raloksifen. Zaradi določevanja različnih analitov na istem sistemu, smo morali preveriti/vesti faktor, ki bi korigiral različno občutljivost sistema na analite. Tako smo 5 ur inkubirali raztopine raloksifena, M1, M2 in M3 ob prisotnosti  $\beta$ -glukuronidaz ter določili faktorje odziva, tako da smo primerjali odzive raztopin ob t = 5 ur (brez prisotnosti  $\beta$ -glukuronidaz) in ob t = 5 ur (po inkubaciji z  $\beta$ -glukuronidazami). Poskuse smo izvajali pri treh različnih koncentracijah raztopin (0,3 mM, 3 mM, 30 mM za M1 in M2 ter 0,3 mM ter 3 mM za M3), tri serije, inkubacijski volumen je bil 100 µL. Po 5 urah smo poskuse ustavili s hladnim metanolom s haloperidolom (300 µL).

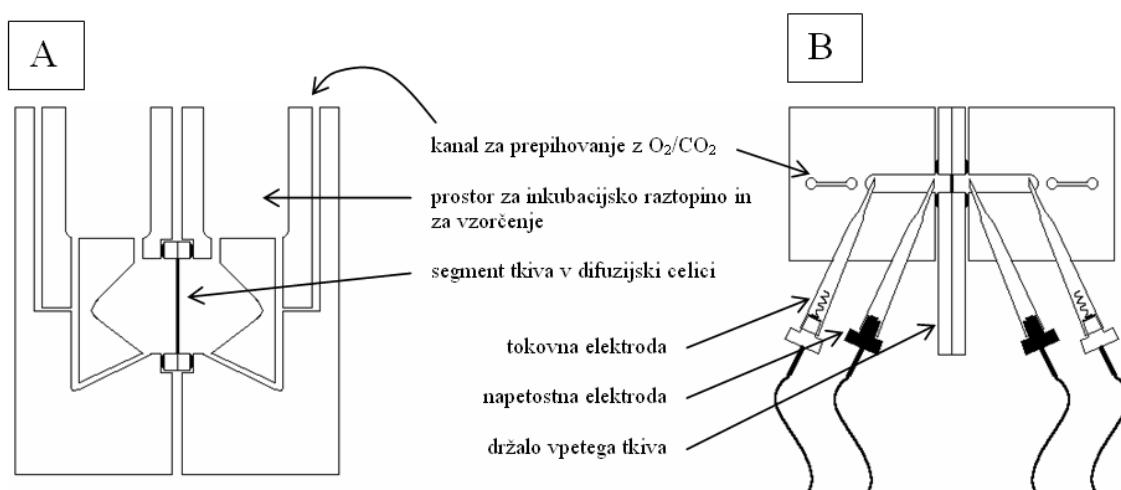
### 3.2.2 Dvoprostorne difuzijske celice

Dvoprostorne difuzijske celice so namenjene proučevanju prehoda učinkovine skozi izoliran segment črevesa. Med dve ločeni polovici difuzijske celice na poseben nastavek (t. i. insert) vpne mo preiskovano tkivo, katerega izpostavljena površina meri 1 cm<sup>2</sup>. Ena polovica celice je namenjena donorski, druga pa akceptorski raztopini. Na donorsko stran tako damo proučevano učinkovino, ki prehaja skozi tkivo na akceptorsko stran. V

določenem intervalu jemljemo določen volumen raztopine in izračunamo količino preiskovane učinkovine, ki preide skozi tkivo v določenem času.

Inkubacijski medij se ves čas poskusa prepihava z mešanico kisika in ogljikovega dioksida (95:5). Prepihavanje omogoča oksigenacijo tkiva in zagotavlja mešanje medija, ki ga ves čas vzdržujemo na optimalni temperaturi med 36 in 37°C. Mešanje raztopine v posamezni celici prepreči nastajanje koncentracijskega gradiента znotraj celice, tako je edini koncentracijski gradient tisti preko membrane. Pomembno je, da ima inkubacijski medij ustrezен pH (med 6 in 8), osmolarnost, in da vsebuje fiziološke ione ter hrnilno snov (npr. glukozo). Mi smo na serozno stran dali glukozo, osmolarnost na mukozni strani pa smo uravnali z manitolom.

Vsaka celica ima odprtine za dva para elektrod za merjenje napetosti in toka, s čimer spremljamo elektrofiziološke parametre med poskusom, ki nam omogočijo spremeljanje živosti izoliranega segmenta črevesa.



Slika 4: Prikaz dvoprostorne difuzijske celice EasyMount™, A) pogled od spredaj; B) pogled od zgoraj. Povzeto z dovoljenjem avtorja po [34].

### 3.2.2.1 Priprava tkiva

Podganje črevo je bilo pridobljeno iz podgan, ki so bile predhodno stradane 18 ur. Strokovno usposobljena oseba je črevo nato prenesla v ledeno hladno Ringerjevo raztopino z 10 mM glukozo. Črevesno tkivo smo narezali na segmente, jih prerezali po mezenterični meji in jih vpeli v inserte. Inserte smo vstavili med dve difuzijski celici.

Transport smo spremljali v obeh smereh, iz mukozne na serozno stran ( $M \rightarrow S$ ) ter obratno, iz serozne na mukozno stran ( $S \rightarrow M$ ).

### **3.2.2.2 Spremljanje elektrofizioloških parametrov**

#### *Pomembni elektrofiziološki parametri*

Določeni epiteljski membranski prenašalci se nahajajo le na apikalni strani (npr.  $Na^+$ /glukoza), določeni pa le na bazolateralni strani ( $Na^+/K^+$  – ATP črpalka), kar imenujemo polarizacija prenašalnih proteinov. Ti prenašalci skrbijo za transport prebitka ionov iz ene strani epitelija na drugo stran in vzpostavijo transepiteljski potencial, katerega vrednost nam pove, kakšna je polarnost membrane. Negativen potencial apikalne glede na bazolateralno stran nam tako lahko pove, da poteka neto absorpcija kationov, neto sekrecija anionov ali pa je rezultat kombinacije transportnih sistemov [20].

Pri vzpostavljenem transepiteljskem potencialu (*steady-state*) poteka kontinuirano izmenjavanje ionov, ni kopičenja določenih ionov na eni strani. Meritev je možna, ko je tok skozi tkivo enak 0. Kadar je torej tkivo nepoškodovano in živo, je sposobno ohranjati transepiteljski potencial.

Potencial apikalne strani glede na bazolateralno stran mora med našim poskusom ostati negativen (najmanj -1 mV), saj nam to pove, da so prenašalci v tkivu aktivni oziroma da je tkivo še živo. Transepiteljski potencial/transepiteljsko napetost (TEP) izmerimo tako, da dve Ag/AgCl elektrodi s tekočino v difuzijskih celicah povežemo prek 3 M KCl in agarjevega mosta [18].

#### *Transtkivna električna upornost (TEU)*

TEU je upornost tkiva pasivnemu pretoku ionov skozi pore v tkivu in je sestavljena iz upora epitelija (celični upor in upor tesnih stikov) in podepitelija. S pomočjo TEU lahko ovrednotimo integriteto tkiva in s tem tudi živost tkiva, saj lahko samo živo tkivo ohranja določeno TEU [18].

#### *Kratkostični tok ( $I_{SC}$ )*

Kratkostični tok predstavlja ves naboj aktivno transportiranih ionov skozi tkivo v enoti časa. Določimo ga tako, da izmerimo tok, ki je potreben za spremembo transepiteljskega potenciala na vrednost 0 V, kadar sta na obeh straneh tkiva enaki raztopini. Pri takšnih

pogojih prehajajo samo ioni, ki se prenašajo aktivno. Vrednosti kratkostičnega toka so v veliki meri odvisne od aktivnosti bazolateralne  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  - ATP črpalke. Nizke vrednosti kažejo na zmanjšano sposobnost tkiva, da bi aktivno prenašalo ione. Nizke vrednosti tako pomenijo tudi manjšo živost tkiva [18].

Torej lahko s spremeljanjem in določevanjem parametrov TEU, TEP in  $I_{SC}$  spremljamo živost vpetega tkiva, saj so ti parametri povezani s sposobnostjo epitelija za opravljanje fizioloških funkcij. V obdelavo podatkov smo vključili rezultate samo tistih tkiv, ki so izkazovala dobro živost, kar smo ocenili na podlagi:

- dviga napetosti ob dodatku glukoze (kot je opisano v točki 18. spodaj) ob koncu poskusa za vsaj 0,3 mV;
- napetosti med poizkusom vsaj -1 mV oziroma manj;
- povprečen upor vsaj  $20 \Omega\text{cm}^2$  [35].

### **3.2.2.3 Potek poskusa na difuzijskih celicah in priprava elektrod**

1. Potenciale uravnamo na 0,0.
2. Na stojala pritrdimo prazne celice z nastavki.
3. Vključimo vodno kopel in aparaturo za merjenje elektrofizioloških parametrov ter počakamo 10 minut, da se segreje.
4. Elektrode speremo s prečiščeno vodo in jih vstavimo v celice. Tokovne elektrode namestimo v odprtine bolj na zunanji strani celic, da je tok skozi celotno tkivo enakomerno porazdeljen. Napetostne elektrode pa namestimo tik ob inserte, da je upornost tekočine čim manjša.
5. Celice napolnimo z Ringerjevim pufrom. Vsako celico napolnimo z 2–3 mL pufra ter termostatiramo in uravnamo tok ter upor na 0,0, s čimer kompenziramo upornost tekočine med napetostnima elektrodama.
6. Priključimo dotok karbogena (95 %  $\text{O}_2$  in 5%  $\text{CO}_2$ ).
7. Upravljalce, na katerih so izhodi za elektrode, nastavimo na OPERATE.
8. Nastavimo FUNCTION na OPEN (zelena lučka) ter METER na VOLTAGE (zelena lučka). Izmerjena napetost je posledica asimetrije med elektrodama. Če je absolutna vrednost asimetrije višja od 10 mV, takšne asimetrije ni možno kompenzirati, zato zamenjamo elektrodi. Za kompenzacijo negativne asimetrije nastavimo OFFSET na

minus (-) (zelena lučka). Z OFFSET potenciometrom naravnamo napetost na 0,0 mV. Za kompenzacijo pozitivne asimetrije pa nastavimo OFFSET na plus (+) (rdeča lučka) ter OFFSET potenciometrom naravnamo napetost na 0,0 mV.

9. METER nastavimo na CURRENT (rdeča lučka) ter pritisnemo testni gumb PUSH TO ADJUST. Tok, ki ga izmerimo, mora biti stabilen, njegova vrednost pa med 60 in 68  $\mu$ A. Če je tok manjši ali če pada, uporabimo novi tokovni elektrodi. Včasih pa je dovolj že, če zamenjamo levo in desno elektrodo med seboj.
10. Kompenziramo upornost raztopine tako, da nastavimo METER na VOLTAGE in med držanjem gumba PUSH TO ADJUST s potenciometrom FLUID RES COMPENSATION nastavimo vrednost na 0,0.
11. Nastavimo FUNCTION na ZERO (ne gori nobena lučka).
12. Z injekcijsko brizgo odstranimo pufer iz difuzijskih celic.
13. Izvlečemo nastavke za tkivo in nanje namestimo tkivo tako, da je z mukozno stranjo obrnjeno proti iglicam.
14. Nastavke za tkivo vstavimo nazaj v celice.
15. V celice dodamo ustrezne raztopine
  - a) Na donorsko stran celice dodamo 3 mL ustrezne raztopine:
    - kadar je donorska stran na mukozni strani, dodamo osnovno raztopino, ki vsebuje manitol,
    - kadar je donorska stran na serozni strani, dodamo osnovno raztopino, ki vsebuje glukozo.
  - b) Na akceptorsko stran celice dodamo 2,5 mL ustrezne raztopine:
    - kadar je akceptorska stran na mukozni strani, dodamo osnovno raztopino, ki vsebuje manitol,
    - kadar je akceptorska stran na serozni strani, dodamo osnovno raztopino, ki vsebuje glukozo.
16. Nastavimo FUNCTION na OPEN ter METER na VOLTAGE, da odčitamo TEP.
17. Nastavimo FUNCTION na CLAMP ter METER na CURRENT, da odčitamo kratkostični tok.
18. Vsakih 20 minut jemljemo vzorce:
  - 200  $\mu$ L iz akceptorske strani in
  - 50  $\mu$ L iz donorske strani.

Na donorsko stran ne vračamo raztopine, medtem ko na akceptorsko stran vračamo 250 µL ustrezne raztopine (10 mM raztopino glukoze (serozna stran) ali 10 mM raztopino manitola (mukozna stran)). Odčitavamo tudi električne parametre, kot je opisano v točkah 16 in 17.

19. Ob koncu poskusa dodamo 100 µL 625 mM raztopine glukoze na mukozno stran in še 10 minut spremljamo električne parametre. Zapišemo najvišjo absolutno vrednost TEP, ki ga v tem času doseže izolirano tkivo.
20. Nastavimo FUNCTION na ZERO in iz celic s pipeto odstranimo pufer. Iz celic vzamemo elektrode in v Ringerjevem pufru izmerimo njihovo asimetrijo, ki je nastala med poskusom. Vrednost asimetrije odštejemo od TEP glukoze. Elektrode speremo s prečiščeno vodo in shranimo v 3 M raztopini KCl v hladilniku.
21. Nastavke, s katerih odstranimo tkivo, in celice očistimo v ultrazvočni kadički. Spiramo jih s prečiščeno vodo in posušimo na sobni temperaturi.

### Pogoji poskusov z difuzijskimi celicami

Najprej smo v prvem delu ugotavljeni metabolizem raloksifena v različnih segmentih intestinalnega trakta podgane in poskusili ugotoviti, za kakšno vrsto transporta gre (aktivni/pasiven transport). Raztopina Ringerjevega pufra z 1 % albuminov in z raloksifenom koncentracije 50 µM je služila kot donorska raztopina.

V drugem delu smo ugotavljeni, kateri prenašalci so lahko vpleteni v aktivnem transportu raloksifena oziroma njegovih dveh metabolitov. Tako smo na stran podganjega črevesja, kjer se je nahajala donorska raztopina, pripravljena enako kot v prvem delu poskusa, dodali inhibitorje različnih prenašalcev:

- inhibitor P-gp (PSC833), koncentracija v raztopini 10 µM,
- inhibitor MRP1, MRP2, MRP3, MRP4, MRP5 (MK-571), koncentracija v raztopini 50 µM,
- inhibitor BCRP (KO143), koncentracija v raztopini 5 µM,
- inhibitor OATP (DIDS), koncentracija v raztopini 500 µM.

V eni seriji poskusov smo naenkrat uporabili le en inhibitor, saj smo želeli čim bolj selektivno inhibirati le eno vrsto prenašalcev.

Vzorčenje je potekalo v obeh delih na vsakih 20 minut. Poskus je trajal 120 minut (6 časovnih točk), iz donorske strani smo vzorčili 50 µL, iz akceptorske pa 250 µL raztopine. Na donorsko stran nismo vračali/nadomeščali raztopine, medtem ko smo na akceptorski strani nadomeščali volumen odvzete raztopine z raztopino Ringerjevega pufra z dodanim ustreznim sladkorjem (manitol – mukozna stran, glukoza - serozna stran). Na koncu poskusa smo količine analitov določili tudi v segmentu črevesa, ki je bil vpet na insert.

### Ravnanje z vzorci

Vzorcem smo takoj dodali ohlajeno raztopino haloperidola v metanolu. Haloperidol je služil kot interni standard, predvsem pa smo z raztopino metanola zaustavili encimske reakcije in izoborili proteine. Vzorce smo zamrznili, odtalili ter oborino odcentrifugirali pri 15.000 g, 5° C, 10 minut ter supernatant zbrali in dali v mikrotitrsko ploščico.

Tkivo, ki je bilo vpete na insert, smo s pinceto odstranili in ga splaknili z Ringerjevim pufrom. Tkivo smo dali v 2 mL epico ter dodali 300 µL Ringerjevega pufra. Vse skupaj smo homogenizirali ter dodali še trojni volumen (900 µL) raztopine metanola s haloperidolom ter po enakem postopku kot zgoraj oborino odcentrifugirali ter supernatant zbrali v mikrotitrskih ploščicah.

Tako pripravljene vzorce smo nato analizirali s pomočjo sklopljene tehnike UHPLC/MS/MS.

#### 3.2.2.3 Analitika

- Sklopljena tehnika UHPLC/MS/MS,
- UHPLC: Agilent 1290 Infinity (Agilent Technologies, Santa Clara, ZDA),
- kolona: Kinetex 2,6 µm C18, 50 × 2,1 mm, (Phenomenex, Torrance, ZDA),
- predkolona Security Guard C18, 4 × 2,0 mm (Phenomenex, Torrance, ZDA),
- ionski izvor: ESI JetStream® v pozitivnem načinu ionizacije,
- masni detektor (MS): Agilent 6460 MSD Triple quadrupole (Agilent Technologies, Santa Clara, ZDA),
- 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,

- gradientno izpiranje:

Preglednica 12: Gradientno izpiranje

Čas od začetka injiciranja (min)	Pretok (mL/min)	% mobilne faze B
0,25	0,8	10
0,5	0,65	20
1	0,65	30
1,25	0,65	50
1,7	0,65	50
1,75	0,65	10

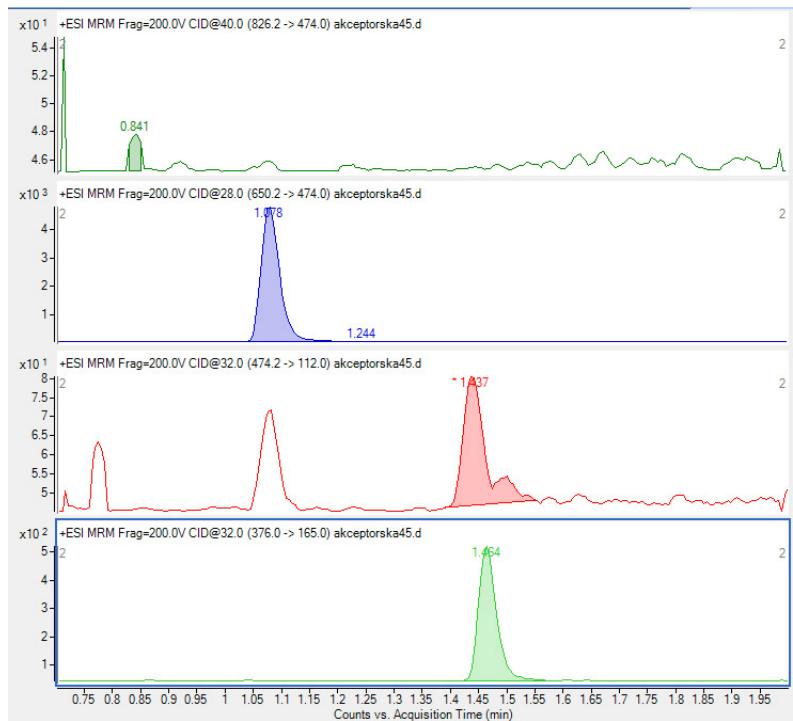
- volumen injiciranja:

- 1  $\mu\text{L}$  akceptorske raztopine,
- 0,1  $\mu\text{L}$  donorske raztopine,
- 0,1  $\mu\text{L}$  lizati tkiva.

Preglednica 13: Identifikacija analitov s sklopljeno tehniko UHPLC/MS/MS

Analit	Masni prehod [m/z]	Masna resolucija [m/z]	Fragmentor [V]	Kolizijska energija [eV]	Polarnost	Retencijski čas [min]
raloksifen	474,2 > 112	2,5	200	32	+	1,433
M1 (raloksifen-6-glukuronid)	650,2 > 474	2,5	200	28	+	1,073
M2 (raloksifen-4'-glukuronid)	650,2 > 474	2,5	200	28	+	1,209
M3 (raloksifen-4'6-diglukuronid)	826,2 > 474	2,5	200	40	+	0,906
haloperidol	376 > 165	0,7	200	30	+	1,469

Parametri, kot so temperatura in tlak sušilnega in pomožnega plina ter energija za fragmentacijo, so bili optimizirani za kar največji možen signal raloksifena in njegovih metabolitov.



Slika 6: Masni kromatogram vzorca akceptorske raztopine. Temno zelena sled pripada diglukuronidu raloksifena (M3), modra obema monoglukuronidoma raloksifena (M1 in M2) in svetlozelena haloperidolu (interni standard).

### **3.2.2.4 Obdelava podatkov**

Koraki obdelave podatkov:

- 1) izračun koncentracije analita,
- 2) izračun pretoka ( $J$ ),
- 3) izračun navideznega permeabilnostnega koeficienta ( $P_{app}$ ).

*Določevanje koncentracije raloksifena in metabolitov v raztopinah in tkivu*

Podatke smo obdelali s programom Microsoft Excel.

#### 1) Izračun koncentracije analita

Najprej smo korigirali variabilnost sistema in morebitne izgube analitov med celotno metodo z upoštevanjem internega standarda (haloperidol), s pomočjo premice umeritvene krivulje smo določili koncentracije analitov ter pri kvantifikaciji metabolitov upoštevali še faktorje odziva. Faktorje odziva smo določili s pomočjo poskusa z  $\beta$ -glukuronidazami.

Preglednica 14: Faktorji odziva, določeni s poskusom z  $\beta$ -glukuronidazami

faktor odziva	0,3 mM	3 mM	30 mM	povprečje
RAL	1,008	0,843	1,039	0,963
M1	0,549	0,497	0,608	0,551
M2	0,189	0,327	0,414	0,370
M3	0,102	0,209	0,221	0,215

## 2) Izračun pretoka (J)

Določitev pretokov nam omogoči tudi, da ocenimo navidezno permeabilnost ( $P_{app}$ ) analita, kadar poznamo donorsko koncentracijo, s primerjavo pretokov v smeri  $S \rightarrow M$  in  $M \rightarrow S$  pa lahko ocenimo, ali prehajanje analita skozi membrano poteka le s pasivno difuzijo ali pa ima učinkovina afiniteto do prenašalcev.

Pretok je definiran kot količina analita, ki prehaja skozi določeno površino (membrano) v določenem času.

$$J = \frac{1}{A} \cdot \frac{dQ}{dt} \quad (1)$$

$J$  ... hitrost pretoka [ $\text{nmol}/\text{h} \cdot \text{cm}^2$ ]

$A$  ... površina membrane [ $\text{cm}^2$ ]

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

Količina analita, ki prehaja skozi membrano, je odvisna od difuzijske konstante in koncentracijskega gradiента skozi membrano. Prehajanje količine učinkovine na enoto časa oziroma hitrost difuzije zapišemo:

$$\frac{dQ}{dt} = k_d \cdot (C_D - C_A) \quad (2)$$

$k_d$  ... konstanta difuzije

$C_D$  ... koncentracija na donorski strani [ $\text{mol}/\text{l}$ ]

$C_A$  ... koncentracija na akceptorski strani [ $\text{mol}/\text{l}$ ]

Vendar se zaradi  $C_D \gg C_A$ , člen  $(C_D - C_A)$  zelo malo spreminja. Tako lahko majhno razliko vključimo v  $k_d'$ :

$$\frac{dQ}{dt} = k'_d \quad (3)$$

$$\int_0^{Q(t)} dQ = k_d' + \int_0^t dt$$

$$Q(t) = k_d' \cdot t + n \quad (4)$$

$Q(t)$  ... količina difundiranega analita na enoto časa [mol/h]

$t$  ... čas [h]

Odsek ( $n$ ) nam pove, kolikšen čas je potreben, da se doseže hitrost v ravnotežnem stanju (*steady-state rate; lag time*). Po tem času se pri *sink* pogojih in v primeru difuzije analit pojavlja na akceptorski strani s konstantno hitrostjo.

Za izračun pretoka ( $J$ ) iz eksperimentalnih podatkov tako lahko s pomočjo odvzetih vzorcev izračunamo  $Q(t)$ :

$$Q(t) = \left( \sum_{n=1}^N V_v \cdot C_{n-1} \right) + C_n \cdot V_r \quad (5)$$

$V_r$  ... volumen raztopine na strani, kjer vzorčimo ob času  $t$

$V_v$  ... volumen vzorca

$n$  ... številka vzorca

$C_n$  ... koncentracija vzorca  $n$

$C_{n-1}$  ... koncentracija vzorca  $n-1$

Ko poznamo kumulativne količine analita v časovnih točkah, lahko s pomočjo linearne regresije izračunamo  $k_d'$  po enačbi (3). S poznanim  $k_d'$  in površino membrane ( $1 \text{ cm}^2$ ) lahko izračunamo pretok ( $J$ ) [18, 36].

### 3) Izračun navideznega permeabilnostnega koeficienta ( $P_{app}$ )

Permeabilnostni koeficient je konstanta, ki povezuje pretok ( $J$ ) in koncentracijski gradient. Termin navidezni uporabljam, kadar smo vrednosti permeabilnostnega koeficiente pridobili eksperimentalno preko pretoka. S tem poudarimo vpliv eksperimentalnih pogojev na njegove vrednosti, saj je permeabilnostni koeficient parameter, specifičen za določene eksperimentalne modele/sisteme (različna sestava lipidov v membrani). Permeabilnostni koeficient je parameter, ki nam med drugim pri primerljivih eksperimentalnih pogojih omogoča primerjavo in kategorizacijo spojin, kar je še posebej pomembno v zgodnjem razvoju zdravilne učinkovine/zdravila (npr. pomemben parameter pri oblikovanju sistemov

za napovedovanje medsebojnega delovanja zdravil; pomen pri dodeljevanju *BCS biowaivers* pri dokazovanju bioekvivalence) [37, 38].

Pretok povzroči premikanje majhne količine analita iz donorske raztopine skozi bariero (membrano) na akceptorsko stran. V primeru, ko je koncentracija na akceptorski strani veliko manjša od koncentracije analita na donorski strani, je koncentracijski gradient skoraj konstanten (koncentracijski gradient se ne spreminja za več kot 10 %). Tudi pretok je v takšnem primeru skoraj konstanten in ga lahko opišemo z enačbo nultega reda. Pretok lahko tako opišemo z enačbo:

$$J = P_{app} \cdot (C_D - C_A); C_D \gg C_A$$

$$J = P_{app} \cdot C_D \Leftrightarrow P_{app} = \frac{J}{C_D}$$

$J$ ... pretok [ $\text{nmol}/\text{h} \cdot \text{cm}^2$ ]

$P_{app}$ ... permeabilnostni koeficient [ $\text{cm}/\text{s}$ ]

$C_D$ ... koncentracija na donorski strani [ $\text{mol}/\text{l}$ ]

$C_A$ ... koncentracija na akceptorski strani [ $\text{mol}/\text{l}$ ]

S poznanimi vrednostmi pretoka ( $J$ ) in začetno koncentracijo na donorski strani lahko na podlagi zgoraj omenjene zveze ocenimo navidezni permeabilnostni koeficient ( $P_{app}$ ) [36].

## 4 REZULTATI IN RAZPRAVA

V odvetih vzorcih smo določevali količine raloksifena in njegovih dveh glavnih metabolitov, ki nastajata pri človeku, M1 (raloksifen-6-glukuronid) in M2 (raloksifen-4'-glukuronid) [7]. Spremljali smo tudi nastanek metabolita M3 (raloksifen-4',6-diglukuronid), vendar so bile njegove količine tudi do 100 x manjše v primerjavi z metabolitoma M1 in M2. Zaradi zelo majhne količine M3 poleg že tako nizke občutljivosti sistema analitike na M3 (faktor odziva 0,215) smo se osredotočili le na metabolita M1 in M2.

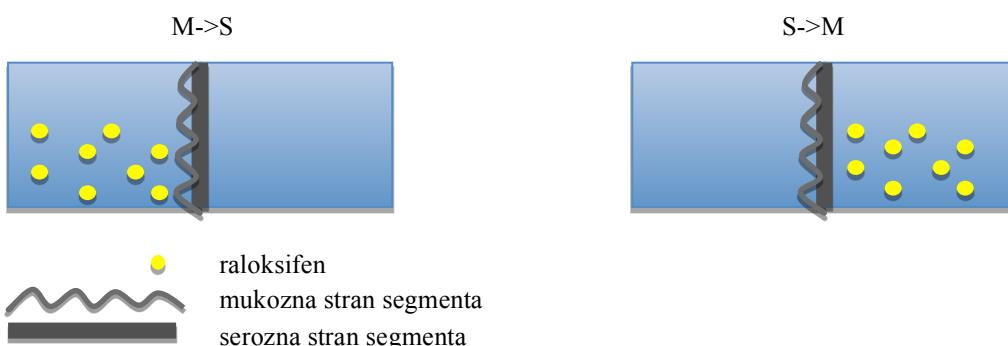
Meritve smo označevali na naslednji način:

M – mukozna stran

S – serozna stran

DON – donorska raztopina

AKC – akceptorska raztopina



Črka, ki je zapisana prva, nam pove, na kateri strani je bila donorska raztopina, torej nam M-S pove, da smo spremljali transport snovi iz mukozne na serozno stran. Torej:

M-S DON: pomeni, da je bila donorska raztopina z raloksifenom na mukozni strani, opravljena meritev pa se nanaša na vzorec na donorski strani (torej na mukozni strani).

S-M AKC: pomeni, da je bila donorska raztopina z raloksifenom na serozni strani, opravljena meritev pa se nanaša na vzorec na akceptorski strani (torej na mukozni strani).

### Topnost raloksifena

V preliminarnih poskusih smo imeli težave s topnostjo raloksifena, saj se je v Ringerju s pH 7,4 začela tvoriti na površini rumena oborina. Raloksifen je sicer dobro topen v DMSO vendar ker smo uporabljali živ sistem, je bila lahko raztopina DMSO največ 1 %, kar pa ni

zadoščalo za pripravo raztopin želenih koncentracij. Tako smo se najprej lotili povečevanja topnosti (preglednica 16).

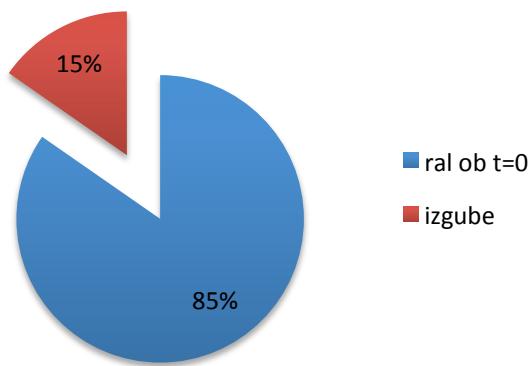
Preglednica 15: Topnost raloksifenijevega klorida

Topnost raloksifenijevega klorida	Medij	Komentar
0,013 mg/mL*	voda	eksperimentalno določena najmanjsa topnost v pH območju 1–7,5 [13]
0,142 mg/mL	prečiščena voda	eksperimentalno določena [10]
0,512 mg/mL	voda	teoretična ocena s programom ALOG PS 2.1 [39]
28 mg/mL	DMSO	podatki dobavitelja Sigma Aldrich; navajajo netopnost v vodi [33]
0,0173 mg/mL	Ringer s pH 7,4	eksperimentalno določena [40]
0,065 mg/mL	Ringer s pH 7,4 in 1 % vsebnostjo albuminov	eksperimentalno ocenjena (mi)
0,047 mg/mL	Ringer s pH 7,4 in 0,1 % vsebnostjo Pluronic	eksperimentalno ocenjena (mi)
0,064 mg/mL	Ringer s pH 7,4 in 0,1 % vsebnostjo Tween 80	eksperimentalno ocenjena (mi)

Nizko topnost raloksifena v Ringerju smo hoteli izboljšati z uporabo površinsko aktivnih snovi oziroma albuminov. Izkazalo se je, da je bila topnost raloksifena povečana s pomočjo vseh omenjenih substanc. Vendar se je pokazalo, da sta Pluronic in Tween 80 močno vplivala na količino nastalih metabolitov, ki je bila veliko manjša oziroma ni toliko naraščala s časom v primerjavi s količino, ki je nastajala pri uporabi albuminov. Najverjetneje sta Tween 80 in Pluronic vplivala na glukuronidacijo raloksifena in s tem na nastajanje metabolitov. Naša ugotovitev se ujema s poskusi na mikrosomih, ki so jih izvedli Kim in sodelavci ter ugotovili, da je bila inhibicija metabolizma signifikantno povečana ob prisotnosti določenih pomožnih snovi, med njimi tudi Tween 80 [8]. Na podlagi tega smo se odločili, da bomo topnost povečali s pomočjo albuminov ter s tem tudi zmanjšali adsorbcijo raloksifena na plastiko. Pri takšnih pogojih smo v difuzijskih celicah po pripravi osnovne raztopine (50 mM), kot je navedeno v poglavju *Materiali in metode*, ob  $t = 0$  min, v raztopinah (donorska + akceptorska stran) določili količino raloksifena, ki je ustrezala približno 85 % teoretične vrednosti (graf 1).

---

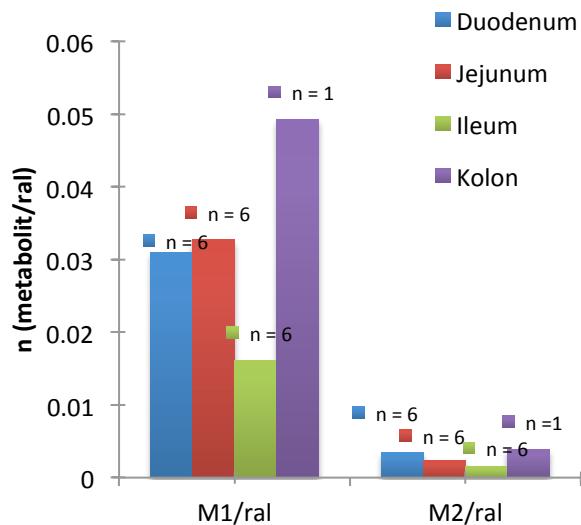
\* topnost izmerjena z največjim odmerkom zdravila (60 mg Keoxifene/Evista)



Graf 1: Izgube raloksifena med pripravo poskusa

Kot je razvidno iz grafa 1, smo približno 15 % raloksifena izgubili med pripravo poskusa. Sklepamo, da gre večino teh izgub pripisati adsorbciji raloksifena na materiale, ki smo jih uporabljali, kljub temu da smo uporabljali materiale, pri katerih je zadrževanje majhno (npr. *low retention* tipse).

#### 4.1 Metabolizem raloksifena v steni tankega črevesa



Graf 2: Povprečne količine metabolitov v raztopinah ob koncu poskusa ( $t = 200$  min) glede na količino prisotnega raloksifena

Graf 2 prikazuje povprečne relativne količine glavnih metabolitov glede na raloksifen, ki smo jih zaznali v vzorcih raztopin (količina v donorski + akceptorski raztopini), ob koncu

poskusa ( $t = 200$  min) v različnih segmentih podganjega črevesja. Iz grafa 2 vidimo, da je ne glede na segment nastajalo več M1 (glukuronid-6-raloksifen) v primerjavi z M2 (glukuronid-4'-raloksifen). V raztopinah, kjer je bil vpet duodenum oz. jejunum, je nastajalo več M1 glede na ileum. Podoben trend, ki pa ni tako izrazit, je viden tudi pri M2, kjer prav tako vidimo, da količina metabolita v raztopini pada vzdolž tankega črevesja.

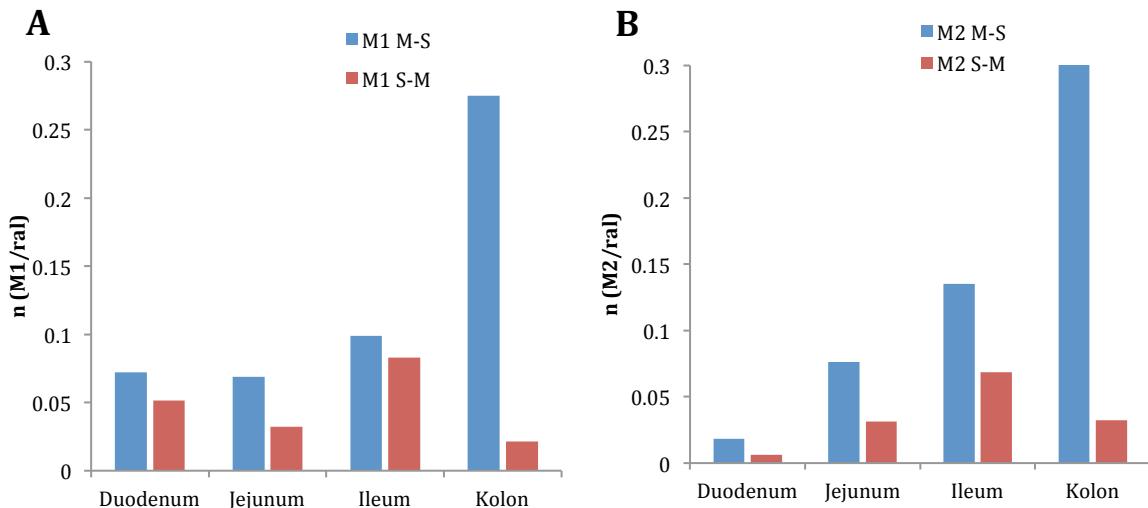
Do sedaj so pokazali, da naj bi bil pri podghanah glavni metabolit M1 [9, 25]. To podpirajo ugotovitve pridobljene tako na bolj enostavnih modelih, kot so izolirani podganji mikrosomi [9], kot tudi tiste na bolj kompleksnih sistemih. Tako so v študiji po peroralno dajanem raloksifenu v portalni plazmi podgan 60 min po zaužitju določili več M1 v primerjavi z M2 in skupno je bilo prisotnih kar 3–8-krat več metabolitov v primerjavi z raloksifenom [25]. Prisotnost glukuronidov v portalni plazmi, ki je bila  $\sim 2,5$ –6-krat večja od raloksifena so pokazali tudi v drugem laboratoriju, prav tako na podghanah [41]. V študijah so pokazali na kompleksnem modelu, da je glavni metabolit encimov v gastrointestinalnem traktu M1. Glukuronidi raloksifena imajo namreč nizko permeabilnost\* ( $M1: 1,406 \cdot 10^{-7}$ ,  $M2: 8,848 \cdot 10^{-8}$ ), torej pod  $1 \cdot 10^{-6}$ , kar nakazuje na nizko absorpcijo ( $M1: \sim 14\%$ ,  $M2: \sim 18\%$ ). Metabolita tako nista bila prispevek jeter, ki so prav tako pomembna pri tvorbi glukuronidov raloksifena [42], torej nista izvirala iz enterohepatičnega kroženja, temveč sta nastala v enterocitih. Tudi naši rezultati so v skladu z omenjenim.

Za glukuronidacijo raloksifena so odgovorni predvsem encimi UGT1A1,-1A8, -1A9, -1A10 [27, 29, 42]. Kot so poročali Shelby in sodelavci, ki so določali izraženost mRNA UGT v 10 vzorcih tkiva podgane, vključno z GIT, so izmed družine UGT1A, ki je odgovorna za glukuronidacijo metabolitov [41], v podgani dobro izraženi UGT1A1-1A3 ter UGT1A6 in UGT1A7, UGT1A8 pa ni bil izražen. Komura poroča, da je v podghanah gen za UGT1A9 sicer prisoten, vendar ni funkcionalen (psevdogen) [31]. Jeong in sodelavci pa so ugotovili, da ima glavno vlogo pri nastanku M2 UGT1A10, ki v podghanah ni izražen. To je tudi eden izmed razlogov, da pri človeku v nasprotju s podgano nastaja v glavnem M2 (5,6–14,2-krat več kot M1) [31].

Tako glede na naše rezultate in zbrane podatke lahko z veliko verjetnostjo rečemo, da je za nastanek metabolitov pri podgani odgovoren UGT1A1.

---

\* Izmerili s PAMPA v laboratoriju (postopek ni opisan).



Graf 3: Prikaz razmerja količine metabolitov v lizatih različnih segmentov glede na raloksifen.

Poleg določevanja analitov v raztopinah smo določevali tudi njihovo prisotnost v lizatih, kjer nismo opazili večje razlike v količini prisotnih metabolitov (graf 3). Graf 3A in 3B prikazuje razmerje količine M1 oz. M2 glede na raloksifen v lizatih. Rezultati pridobljeni iz lizatov, potrjujejo zgoraj opisano domnevo, da je za metabolizem pri naših podganah v glavnem odgovoren encim UGT1A1, saj sta intrinzična očistka UGT1A1 za M1 in M2 precej enakovredna (~20 µL/min/mg za M1 in ~21 µL/min/mg za M2 [10]).

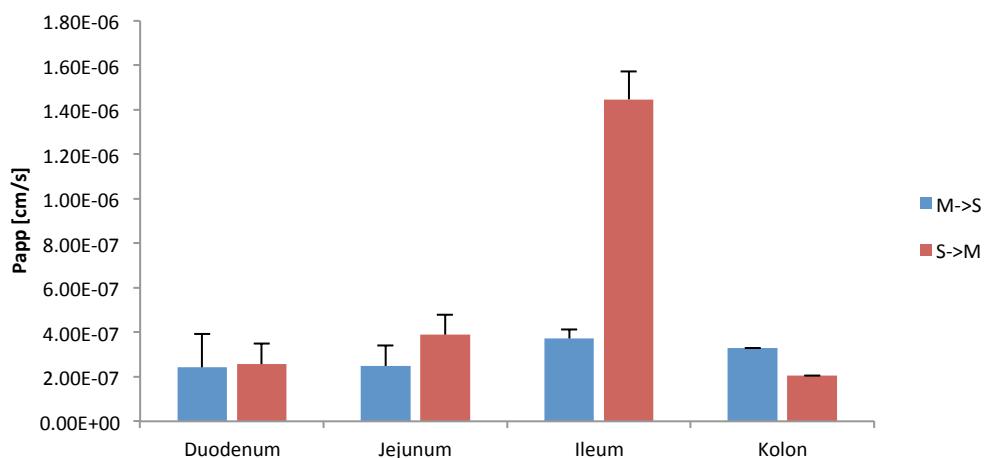
Z ozirom na segmente vidimo, da se v primeru M2 količina metabolita vzdolž prebavnega sistema povečuje, kar nakazuje na možno povečano aktivnost/prisotnost UGT encimov.

Razmerja količin metabolitov v raztopinah in lizatih (enterocitih) so torej različna. V raztopinah močno prevladuje M1, medtem ko so količine obeh metabolitov v enterocitih precej bolj podobne. Razmerje M1 : M2 pri raztopinah je približno 6 : 1, v primeru lizatov pa je to razmerje bližje 1. Ti podatki nam nakazujejo, da ni nujno, da nam količine, določene v raztopinah, odražajo metabolne poti, ki se odvijajo v enterocitih. Razlika v razmerju metabolitov, prisotnih v lizatih in raztopinah, nas opozarja na vlogo prenašalcev. Prenašalci, njihova aktivnost in afiniteta do posameznega metabolita so tako lahko vplivali na drugačne količine metabolitov v raztopinah glede na lizate (enterocite). Prenašalci so prav tako lahko vplivali na količino že nastalih metabolitov, saj so velikokrat aktivnosti metaboličnih encimov in prenašalcev tesno povezane in imajo medsebojen vpliv [31, 9].

## 4.2 Aktivni transport raloksifena in njegovih dveh metabolitov

Transport raloksifena in njegovih dveh metabolitov smo spremljali v obeh smereh, tako iz mukozne na serozno stran kot obratno. Transport smo vrednotili s pretokom ( $J$ ) oziroma tudi z navideznim permeabilnostnim koeficientom ( $P_{app}$ ) v primeru raloksifena, saj smo le pri raloksifenu poznali koncentracije začetne/donorske raztopine. Postopki izračunavanja parametrov so opisani v poglavju *Materiali in metode*. Osredotočili smo se na aktivne prenašalce, za katere poročajo, da so prisotni v GIT človeka oziroma podgane (BCRP, P-gp, OATP, MRP2, MRP3) in imajo afiniteto do ksenobiotikov.

### Raloksifen



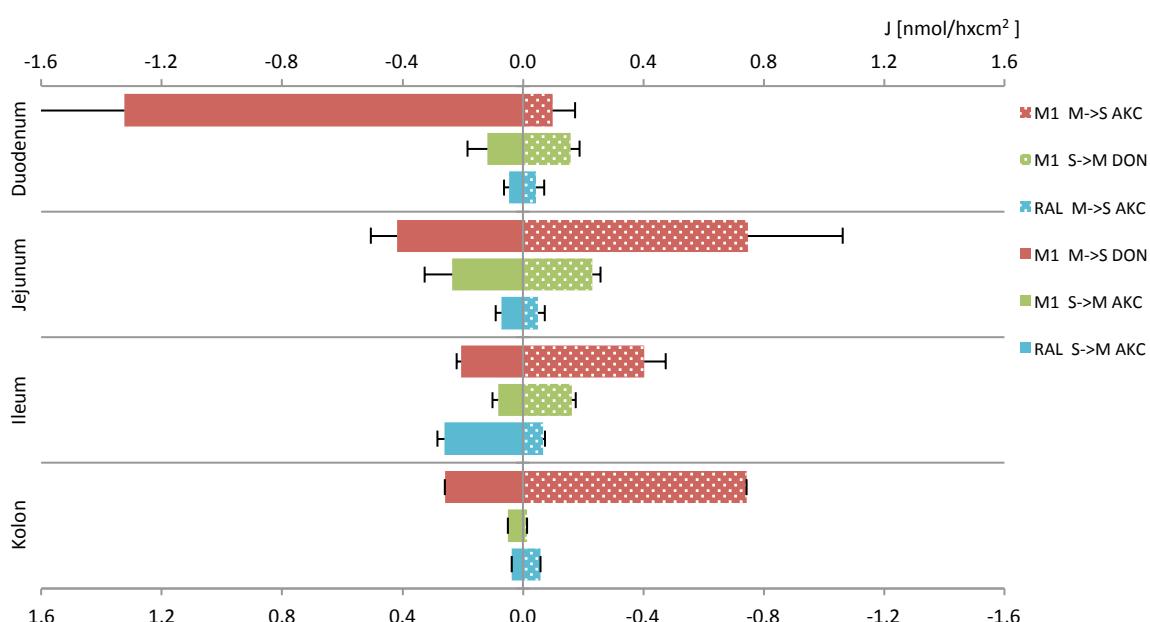
Graf 4: Permeabilnostni koeficienti raloksifena iz mukozne na serozno stran (M->S) in iz serozne na mukozno stran (S->M) glede na segmente črevesja.

Snovi, ki prehajajo membrane le s pasivno difuzijo, imajo podobne vrednosti permeabilnostnih koeficientov v obe smeri (smeri sekrecije in privzema) in je torej njihovo razmerje M->S : S->M enako oziroma podobno 1. Za snovi, ki kažejo afiniteto do aktivnih prenašalcev, to razmerje običajno ni več enako 1. Snovi, ki imajo torej razmerje  $> 1$ , najverjetneje interagirajo predvsem s sekretornimi prenašalci, saj je transport snovi v S->M smeri večji. Iz grafa 4 lahko vidimo, da se razlika permeabilnostnih koeficientov ( $P_{app}$ ) raloksifena vzdolž prebavnega trakta veča v prid S->M. Predvidevamo lahko torej, da v duodenumu skoraj ni prisotnega aktivnega transporta v S->M smeri, in da raloksifen prehaja enterocite zgolj pasivno. V jejunumu je razlika med permeabilnostnima koeficientoma v transportu raloksifena že večja, v prid sekretorne smeri (S->M). V ileumu se razlika že signifikantno poveča ( $t(5) = 0,0005$ ,  $p < 0,05$ ). Tako lahko pri teh dveh

segmentih sumimo na vpletenost apikalnih sekretornih prenašalcev, kot sta BCRP in P-gp pri transportu raloksifena skozi enterocite v ileumu.

Preučevanje vpletenosti prenašalcev v primeru metabolitov otežuje dejstvo, da metaboliti niso prisotni na začetku poskusa, temveč nastajajo med poskusom v enterocitih ter se nato transportirajo preko membrane na mukozno oziroma serozno stran. V transport metabolitov so najverjetneje močno vpleteni prenašalci, saj so glukuronidi bolj polarni v primerjavi z raloksifenom, kar oteži njihovo pasivno prehajanje; to smo uspeli preveriti s poskusi na PAMPA, kjer je bila permeabilnost obeh metabolitov nizka (kot navajamo že v poglavju *Metabolizem raloksifena v steni tankega črevesa*). Transport metabolitov tako lahko poteka v večji meri le s pomočjo prenašalcev.

### M1 (raloksifen-6-glukuronid)

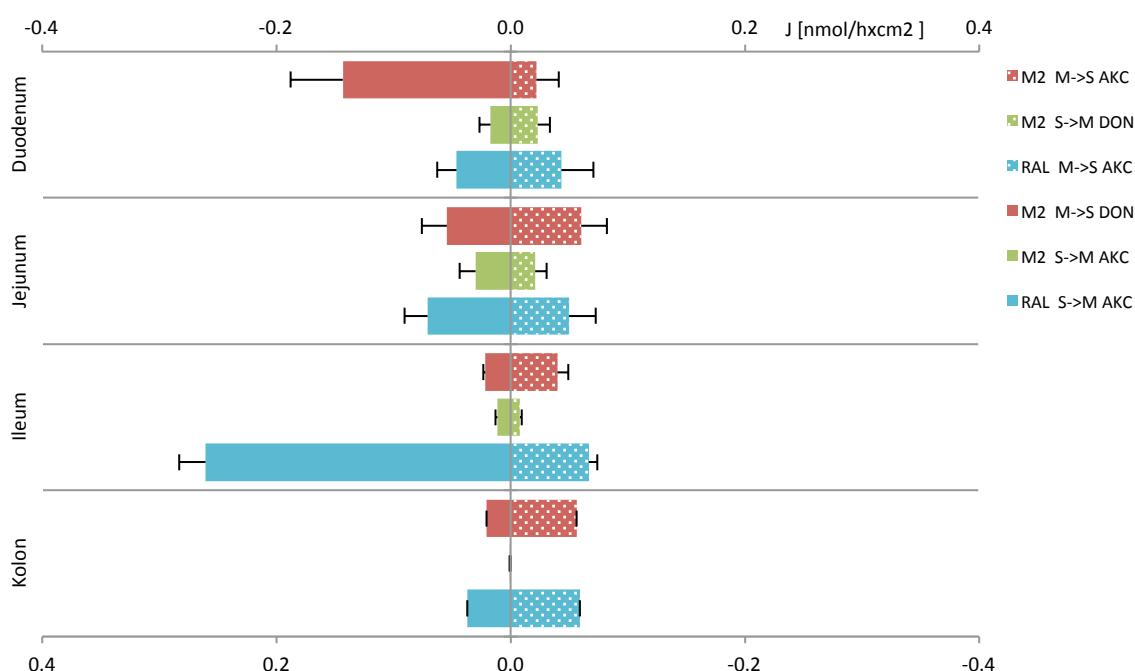


Graf 5: Vrednosti pretoka (J) M1 glede na segmente črevesja.

Na grafu 5 so z rdečo barvo označeni stolpci, kjer je bila donorska raztopina raloksifena na mukozni strani (M->S). Zelene barve so stolpci, kjer je bila donorska raztopina raloksifena na serozni strani (S->M). Z modro barvo so za primerjavo prikazani pretoki raloksifena. Desna polovica grafa (pikčasti stolpci) prikazuje pretoke na serozno stran, medtem ko se leva polovica nanaša na pretoke na mukozno stran (stolpci brez vzorca).

Iz grafa 5 je razvidno, da so pretoki M1 večji, kadar je bila donorska raztopina raloksifena na mukozni strani (rdeči stolpci), v primerjavi z donorsko raztopino na serozni strani (zeleni stolci). Glede na segment in glede na meritve, opravljene v primeru, ko je donorska raztopina bila na mukozni strani, lahko vidimo, da je bil transport M1 najbolj povečan v duodenumu, kjer je bila razlika v smereh transporta največja, v prid transportu S->M in signifikantna ( $t(5) = 0,0372$ ,  $p < 0,05$ ). Sklepamo lahko torej, da je transport M1 iz enterocita povezan z apikalnim sekretornim prenašalcem, katerega razporeditev vzdolž prebavnega trakta pada, kot je to v primeru prenašalca MRP2. V segmentih, ki sledijo, je transport M1 povečan v obratni smeri, S->M, torej je možna vpletjenost tudi bazolateralnega sekretornega prenašalca MRP3.

### M2 (raloksifen-4'-glukuronid)



Graf 6: Vrednosti pretoka (J) M2 glede na segmente črevesja.

Barve in vzorci grafa 6 imajo enak pomen, kot pri grafu 5. V grafu 6, torej v primeru M2, opazimo podobne tende kot pri M1 (graf 5). Prav tako je v duodenumu razlika v transportu M2 signifikantno večja v smeri M->S ( $t(4) = 0,0425$ ,  $p < 0,05$ ), vendar so v primerjavi z M1 vrednosti pretokov (J) veliko (4 x) manjše. Zanimivo je, da so vrednosti pretokov veliko manjše kot v primeru M1, kljub temu, da je bila prisotnost obeh

metabolitov v lizatih tkiva primerljiva. V primeru M2 gre torej najverjetneje za kompleksno medsebojno delovanje encimov (UGT) in prenašalcev.

### **Poskusi z inhibitorji**

Poskuse z inhibitorji smo izvedli na enak način in ob podobnih pogojih, kot v prvem delu, le da smo dodali še inhibitorje različnih prenašalcev.

V naslednjih grafih (grafi 7-9) smo uporabljali naslednje okrajšave:

Ref.#1 (pH = 7,5): referenčne vrednosti  $P_{app}$ , dobljene pri pogojih, kjer je poskus potekal z donorsko raztopino raloksifena (50 mM) brez dodanega inhibitorja, ob pH Ringerjeve raztopine 7,5;

BCRP inh. (Ko143): vrednosti  $P_{app}$  pri poskusu, kjer so bili prisotni enaki pogoji kot pri referenci 1 (donorska raztopina raloksifena (50 mM), pH Ringerjeve raztopine 7,5), poleg omenjenega je bil prisoten še inhibitor BCRP prenašalca (Ko143);

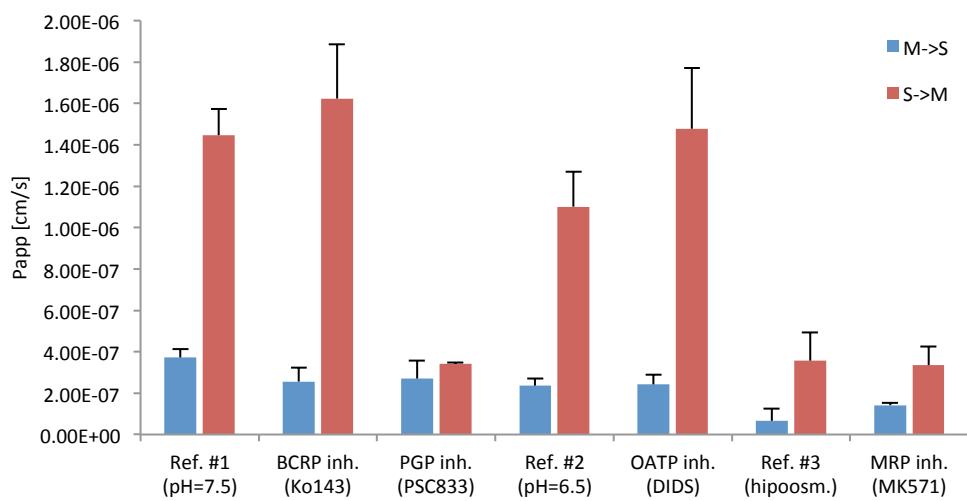
P-gp inh. (PSC833): vrednosti  $P_{app}$  pri poskusu, kjer so bili prisotni enaki pogoji kot pri referenci 1 (donorska raztopina raloksifena (50 mM), pH Ringerjeve raztopine 7,5), poleg omenjenega je bil prisoten še inhibitor P-gp prenašalca (PSC833);

Ref.#2 (pH = 6,5): referenčne vrednosti  $P_{app}$ , dobljene pri pogojih, kjer je poskus potekal z donorsko raztopino raloksifena (50 mM) brez dodanega inhibitorja, ob pH Ringerjeve raztopine 6,5 (razširjena substratna specifičnost OATP prenašalcev);

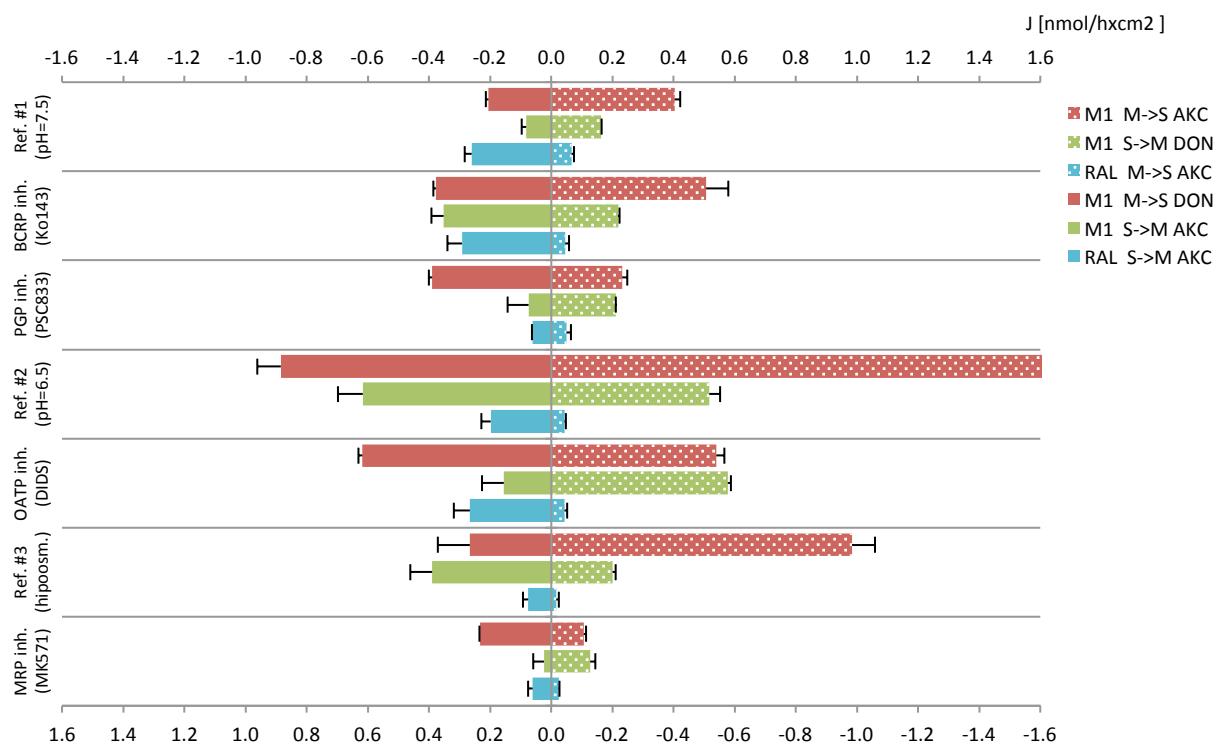
OATP inh. (DIDS): vrednosti  $P_{app}$  pri poskusu, kjer so bili prisotni enaki pogoji kot pri referenci 2 (donorska raztopina raloksifena (50 mM), pH Ringerjeve raztopine 6,5), poleg omenjenega je bil prisoten še inhibitor OATP prenašalca (DIDS);

Ref.#3 (hipoosmol.): referenčne vrednosti  $P_{app}$ , dobljene pri pogojih, kjer je poskus potekal z donorsko raztopino raloksifena (50 mM) brez dodanega inhibitorja, ob hipoosmolarni Ringerjevi raztopini (aktivacija MRP prenašalcev);

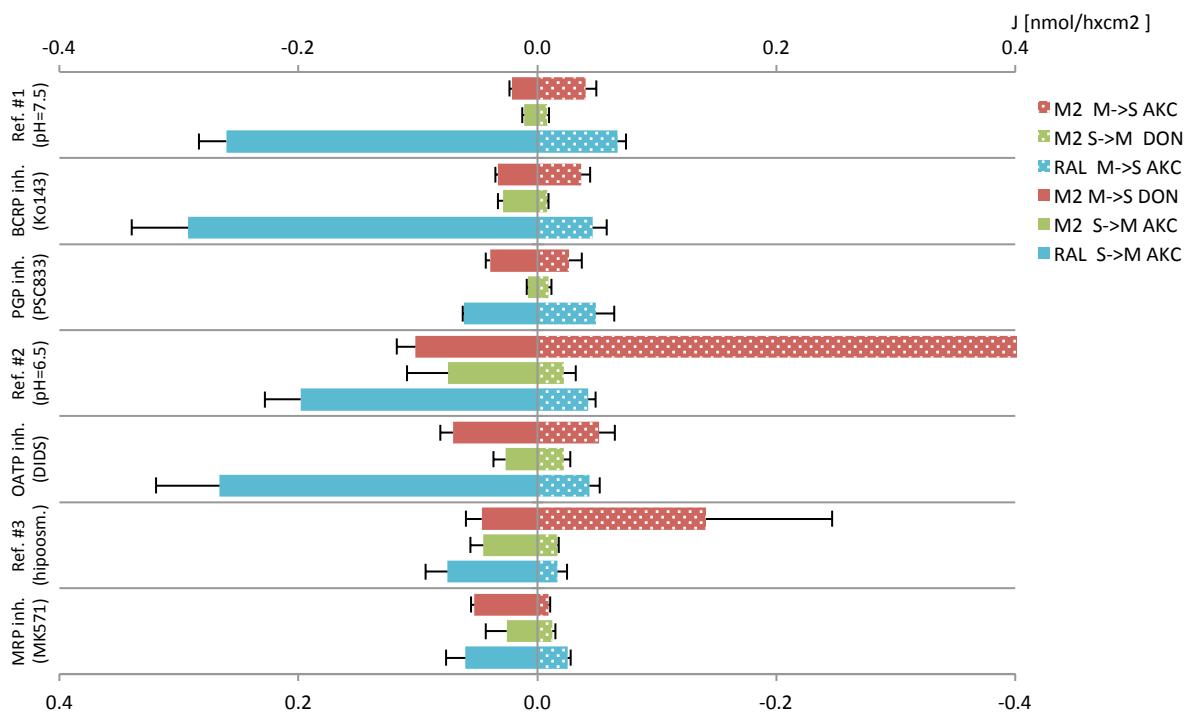
MRP inh. (MK571): vrednosti  $P_{app}$  pri poskusu, kjer so bili prisotni enaki pogoji kot pri referenci 3 (donorska raztopina raloksifena (50 mM), hipoosmolarna Ringerjeva raztopina), poleg omenjenega je bil prisoten še inhibitor MRP prenašalca (MK571)



Graf 7: Permeabilnostni koeficient raloksifena ob prisotnosti inhibitorjev prenašalcev.



Graf 8: Pretok M1 in raloksifena ob prisotnosti inhibitorjev prenašalcev.



Graf 9: Pretok M2 in raloksifena ob prisotnosti inhibitorjev prenašalcev.

Pri grafih 8 in 9 velja, da so z rdečo barvo označeni stolci, kjer je bila donorska raztopina raloksifena na mukozni strani (M->S). Zelene barve so stolci, kjer je bila donorska raztopina raloksifena na serozni strani (S->M). Z modro barvo so za primerjavo prikazani pretoki raloksifena. Desna polovica grafa (pikčasti stolci) prikazuje preteke na serozno stran, medtem ko se leva polovica nanaša na preteke na mukozno stran (stolci brez vzorca).

### P-gp, apikalni sekretoren prenašalec

*Raloksifen:* Ob prisotnosti različnih inhibitorjev (graf 7) je bil permeabilnostni koeficient najbolj izrazito znižan pri inhibiciji P-gp sekretornega prenašalca, v primerjavi z referenco #1, ko inhibitor ni bil prisoten. Razmerje permeabilnostnega koeficiente M-S/S-M se je močno znižalo na 1,3 (pri referenci #1 je bilo to razmerje blizu 4), kar nakazuje, da je bila dosežena skoraj popolna inhibicija P-gp. Ob prisotnosti inhibitorja P-gp prenašalca razlika  $P_{app}$  v S->M in M->S ni bila signifikantna ( $t(3) = 0,5677, p < 0,05$ ). Tudi drugi laboratoriji poročajo, da je raloksifen substrat P-gp prenašalca [43, 44]. Rezultati se torej ujemajo z določenimi permeabilnostnimi koeficienti raloksifena glede na segmente, ki se vzdolž prebavnega trakta povečujejo v smeri iz mukozne na serozno stran. Vzdolž prebavnega

trakta podgane ter tudi človeka se namreč povečuje tudi prisotnost prenašalca P-gp [18, [19].

*Metaboliti:* Pri prehajanju M1 in M2 ni opaziti večjih sprememb glede na referenco #1 (graf 8,9). Prenašalec P-gp torej najverjetneje ni odgovoren za transport metabolitov.

### **BCRP, apikalni sekretoren prenašalec**

*Raloksifen in metabolita:* Ni opaziti razlik med referenco #1 in inhibicijo prenašalca (graf 7-9). Primerjava pretokov (J) S->M/M->S tudi ob prisotnosti inhibitorja kaže signifikantno razliko pri vseh analitih (RAL:  $t(3) = 0,0073$ ; M1:  $t(3) = 0,0266$ ; M2:  $t(3) = 0,0004$  pri  $p < 0,05$ ). Glede na znano o vezavnem mestu za BCRP, bi domnevali, da sta glukuronida dobra substrata za BCRP. Za vezavo naj bi namreč bila odgovorna histidin in arginin, posledično naj bi bila večja verjetnost vezave substratov, pri katerih sta prisotni -OH ali NH<sub>2</sub> skupini (tvorba vodikovih vezi z aminskima skupinama Arg in His) [21]. Naši rezultati kažejo nasprotno, da torej raloksifen in metabolita niso substrati BCRP prenašalca.

### **OATP, apikalni prenašalec privzema**

*Raloksifen:* Pri inhibiciji OATP je opazno rahlo povečanje transporta v smeri na serozno stran, medtem ko v smeri privzema (M->S) ne opazimo razlik glede na referenco #2 (graf 7).

*Metabolita:* Pretok (J) metabolitov pri referenci #2 je močno povečan (M1:  $t(3) = 0,0407$ ; M2:  $t(3) = 0,0119$  pri  $p < 0,05$ ) predvsem na serozno stran (M->S AKC) ter se tako v primeru M1 kot M2 zmanjša za več kot 7 x v prisotnosti inhibitorja OATP (razmerje pretokov blizu 1) (M1:  $t(4) = 0,6467$ ; M2:  $t(3) = 0,0066$  pri  $p < 0,05$ ) (graf 8 in 9).

Tukaj gre najverjetneje za funkcionalno povezanost prenašalca OATP in encimov glukuronidacije. Raloksifen bi namreč lahko bil substrat OATP, ki poveča privzem raloksifena v enterocite, kjer pa ga encimi UGT takoj po aktivnem privzemu pretvorijo v glukuronide, ki se nato z bazalnim sekretornim prenašalcem prenesejo na serozno stran.

Tako ne opazimo zmanjšanja raloksifena na apikalni strani ob prisotnosti inhibitorja OATP, temveč zmanjšano nastajanje metabolitov na bazolateralni strani (vpletenost metabolizma II. faze). Povečana prisotnost metabolitov je tako opažena v lizatih pri referenci #2, ko je bila donorska raztopina raloksifena na mukozni strani, predvsem

izrazita pa je pri M1 (graf 8). Navedeno torej podpira zgoraj omenjeno, torej lahko gre za indukcijo UGT encimov, ki je povzročena z aktivnostjo prenašalca OATP.

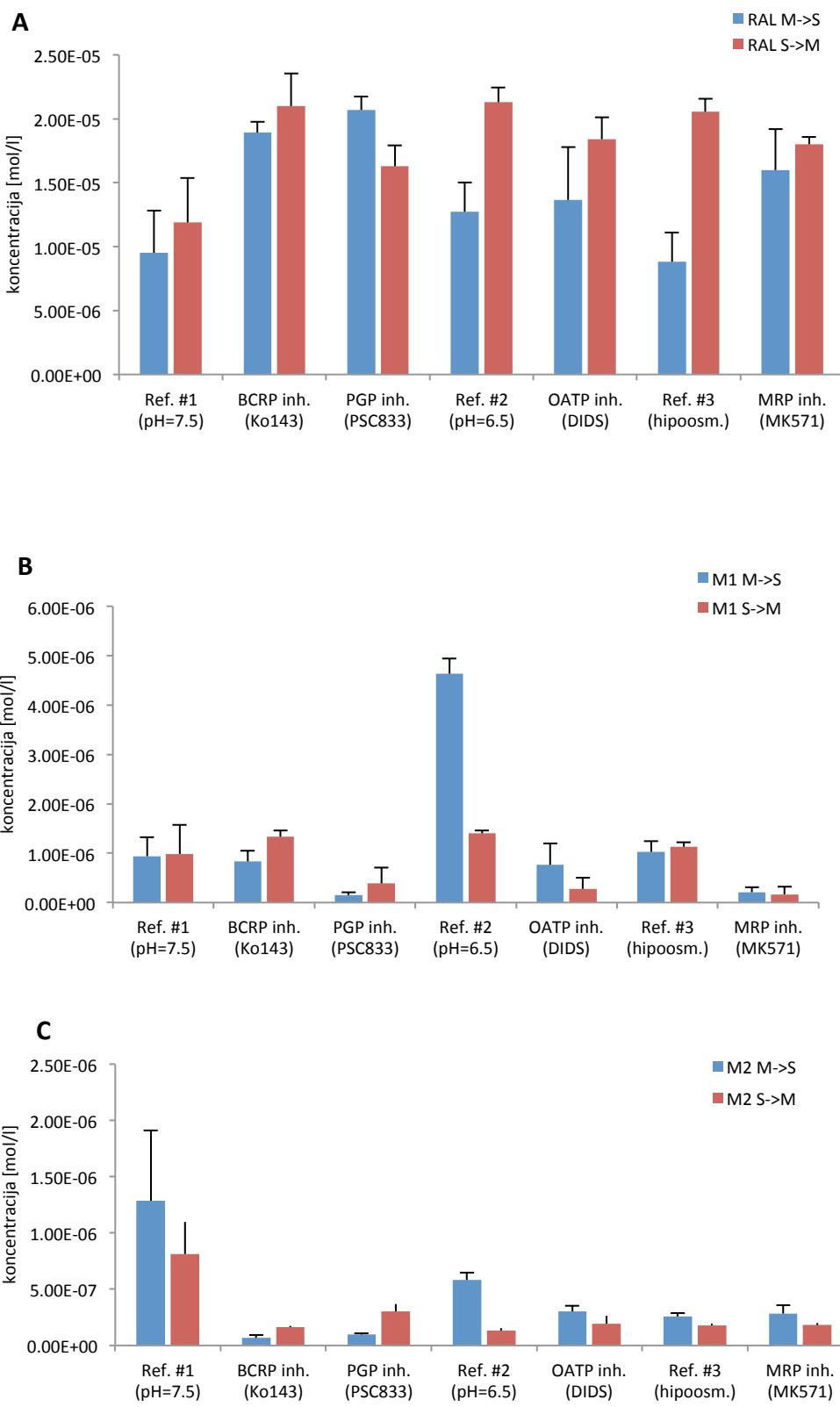
Zelo izrazito povečanje pretoka metabolitov na serozno stran pri referenci #2 v primerjavi z referenco #1 (graf 8 in 9) je lahko posledica različnih vplivov pH ob apikalni membrani enterocitov, med katere sodi že poznana razširjena substratna specifičnost prenašalcev OATP (OATP2B1) ob kiselkastem pH, torej povečanja privzema raloksifena v enterocite [23].

### **MRP, apikalni in bazolateralni sekretorni prenašalci**

*Raloksifen:* Permeabilnostni koeficient ( $P_{app}$ ) se ob inhibiciji MRP prenašalcev ne spremeni. Ni torej videti, da bi bil raloksifen substrat MRP2 niti MRP3 prenašalcev (graf 7).

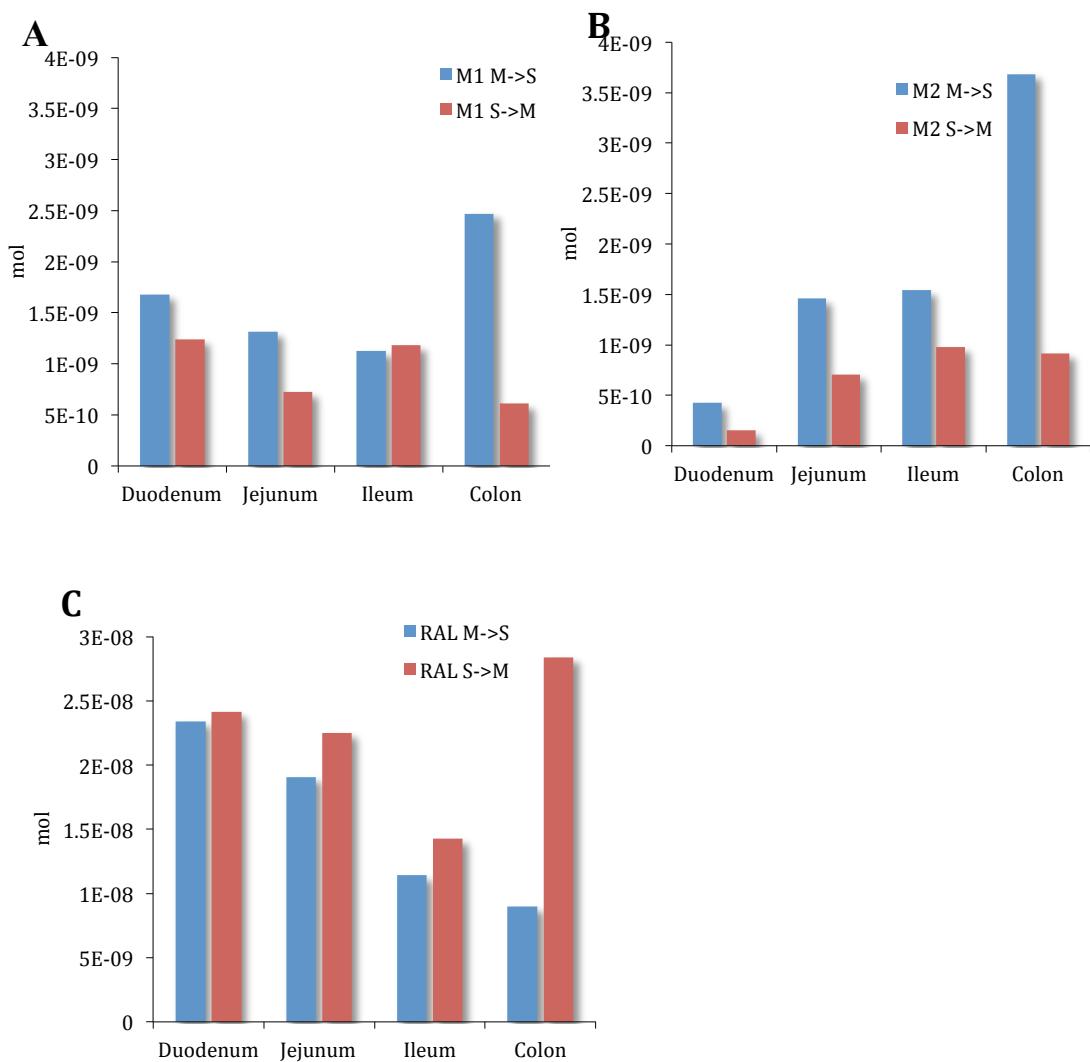
*Metaboliti:* Pretok (J) na serozno stran je v hipoosmolarnem okolju (referenca #3) povečan v primerjavi s pretokom ob uporabi inhibitorja MRP prenašalcev (graf 8 in 9). Pretoka torej nakazujeta na povečano sekrecijo metabolitov na serozno stran ob aktivaciji (hipoosmolarnem okolju) MRP prenašalcev.

Ob pregledu količine analitov v lizatih tkiva (graf 10) opazimo, da se v primeru MRP inhibicije zmanjša prisotnost M1 v tkivu, obenem pa se povečajo količine raloksifena v primerjavi z referenco #3. Možen je torej pozitiven vpliv (indukcija) raloksifena na aktivnost prenašalca MRP3, katerega substrata sta oba metabolita, saj je njun pretok na serozni strani ob aktivaciji MRP prenašalcev povečan. Ob inhibiciji MRP prenašalcev pa se njun pretok močno zmanjša v primerjavi z referenco #3, obenem pa se poveča količina raloksifena v lizatih tkiva.



Graf 10: Koncentracije raloksifena (A), M1 (B) in M2 (C) v lizatih ob prisotnosti inhibitorjev prenašalcev.

Raloksifen, prisoten na mukozni strani, najverjetneje pospešuje izločanje samega sebe iz enterocitov tako z metabolizmom kot tudi s sekrecijo. To podpirata grafa 5 in 6 kjer je razvidno, da so pretoki metabolitov bili večji, kadar je bila donorska raztopina raloksifena na mukozni strani (rdeči stolpci), v primerjavi z donorsko raztopino na serozni strani (zeleni stolpci). Prav tako je bilo v primeru, ko je bila donorska raztopina raloksifena na mukozni strani, v tkivu manj raloksifena, količine (nastajanje) metabolitov pa povečane (graf 11). Tesno povezanost raloksifena, njegovega transporta ter metabolizma podpira tudi zgoraj omenjeno medsebojno delovanje v primeru OATP in MRP prenašalcev.



Graf 11: Količina raloksifena (C) in dveh njegovih metabolitov (A,B) v lizatih tkiva glede na segment; M->S: vzorci tkiva, ko je bila donorska raztopina raloksifena na mukozni strani; S->M: vzorci tkiva, ko je bila donorska raztopina raloksifena na serozni strani.

## 5 SKLEP

Z našim delom smo torej uspeli najti pogoje, pri katerih je bila topnost raloksifena, brez uporabe organskih topil in brez večjih težav z adsorpcijo, dovolj velika, da je omogočala delo z živim tkivom. Z uporabo primerne analitske metode nam je uspelo ločiti in kvantificirati raloksifen ter M1 (raloksifen-6-glukuronid) in M2 (raloksifen-4'-glukuronid). S poskusi na dvoprostornih difuzijskih celicah na različnih segmentih intestinalnega trakta podgane smo zaključili naslednje:

- V podganjem intestinalnem traktu najverjetnej z UGT1A1 nastajajo primerljive količine M1 in M2. Izločanje M1 in M2 iz enterocitov na apikalno in na bazolateralno stran pa je različno. Pri naših podghanah je skozi membrano prehajalo več M1 v primerjavi z M2, kar bi lahko pripisali drugačni interakciji metabolitov s prenašalcem.
- Ugotovili smo, da se je pretok skozi membrano enterocitov razlikoval glede na uporabljen segment intestinalnega trakta podgane. Največjo permeabilnost raloksifena smo opazili v ileumu, medtem ko je bilo največje prehajanje metabolitov skozi membrano opaženo v duodenumu. Prav tako smo ugotovili, da je za velikost pretokov metabolitov pomembno, na kateri strani segmenta (bazolateralni/apikalni) se nahaja donorska raztopina.
- Aktivni transport je v primeru raloksifena in njegovih dveh metabolitov pomemben pri difuziji skozi membrano intestinalnega trakta podgane. Največji vpliv prenašalcev na transport raloksifena iz enterocitov je v ileumu, pri M1 in M2 pa v duodenumu.
- Dobljeni podatki kažejo, da prenašalec BCRP pri transportu raloksifena, M1 in M2 skozi membrano intestinalnega trakta podgane ne sodeluje. Pokazali smo, da je za izločanje raloksifena iz enterocitov večinoma odgovoren P-gp, pri privzemu pa je najverjetnejše udeležen OATP. V primeru prenašalca OATP gre najverjetnej za kompleksno medsebojno delovanje prenašalca z encimom UGT. V primeru prenašalca MRP3 pa rezultati nakazujejo, da bi lahko raloksifen spodbujal aktivnost MRP3, s katerim se morda prenašata oba metabolita.

Z našo zasnovno poskusov smo pridobili vse informacije, o pasivnem in aktivnem transportu raloksifena in njegovih metabolitov v *in vitro* pogojih, ki jih je možno pridobiti

glede na trenutno stanje tehnike. Potrdili smo vpletost nekaterih predvidenih aktivnih poti transporta in odprli veliko novih vprašanj. Predvsem so rezultati pokazali kompleksnost delovanja in medsebojne funkcionalne povezanosti encimov in prenašalcev.

## 6 LITERATURA

- [1] McDonnell P, Hall JM. Selective estrogen receptor modulators: From bench, to bedside and back again. *Menopausal medicine* 2008; 16 (1): 1-5.
- [2] Hochner-Celniker D. Pharmacokinetics of raloxifene and its clinical application. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 1999; 85 (1): 23-29.
- [3] EMA (Evropska agencija za zdravila), [Elektronski vir]. Dostopno: [http://www.emea.europa.eu/ema/index.jsp?curl=pages/medicines/human/medicines/000913/human\\_med\\_000723.jsp](http://www.emea.europa.eu/ema/index.jsp?curl=pages/medicines/human/medicines/000913/human_med_000723.jsp). [Poskus dostopa 16 april 2012].
- [4] Miller PD et al. Effects of bazedoxifene on BMD and bone turnover in postmenopausal women: 2-yr results of a randomized, double-blind, placebo-, and active-controlled study. *J Bone Miner Res* 2008; 23 (4): 1923-1934.
- [5] Cummings SR. The effect of raloxifene on risk of breast cancer in postmenopausal women: results from the MORE randomized trial. *JAMA* 1999; 281 (23): 2189-2197.
- [6] Sporn MB et al. Role of raloxifene in breast cancer prevention in posrtmenopausal women: clinical evidence and potential mechanisms of action. *Clin Ther* 2004; 26 (6): 830-840.
- [7] EMA (European Medicine Agency), [Elektronski vir]. Dostopno: [http://www.ema.europa.eu/ema/index.jsp?curl=pages/medicines/human/medicines/000184/human\\_med\\_000772.jsp&mid=WC0b01ac058001d124](http://www.ema.europa.eu/ema/index.jsp?curl=pages/medicines/human/medicines/000184/human_med_000772.jsp&mid=WC0b01ac058001d124). [Poskus dostopa 18 marec 2012].
- [8] Kim AR et al. Metabolic inhibition and kinetics of raloxifene by pharmaceutical excipients in human liver microsomes. *Int J Pharm* 2009; 368 (1-2): 37-44.
- [9] Jeong EJ et al. Species- and disposition model-dependent metabolism of raloxifene in gut and liver: role of UGT1A10. *Drug Metab Disp* 2005; 33 (6): 785-794.
- [10] Trontelj J. *Raziskave metabolizma raloksifena z eksperimentalnimi modeli naraščajoče kompleksnosti*; doktorska disertacija, Fakulteta za farmacijo, Univerza v Ljubljani, 2007.
- [11] Benet LZ, Wu C. Predicting Drug Disposition via Application of BCS: Transport/Absorption/Elimination Interplay and Development of a Biopharmaceutics Drug Disposition Classification System. *Pharm Res* 2005; 22 (1): 11-23.
- [12] Benet LZ, Shugarts S. The Role of Transporters in the Pharmacokinetics of Orally Administered Drugs. *Pharm Res* 2009; 26 (9): 2039-2054.
- [13] Benet LZ et al. BDDCS applied to over 900 drugs. *AAPS J* 2011; 13 (4): 519-547.
- [14] Makoid MC et al. Basic Pharmacokinetics. The Virtual University; 1999: 8/1-8/6.
- [15] El-Kattan A et al. Impact of physiological, physicochemical and biopharmaceutical factors in absorption and metabolism mechanisms on the drug oral bioavailability of rats and humans. *Exp Opin Drug Metab Toxicol* 2007; 3 (4): 469-489.
- [16] Wikipedia, [Elektronski vir]. Dostopno: „<http://en.wikipedia.org/>“. [Poskus dostopa 10 Marec 2012].
- [17] Kocijančič A. Interna medicina. Littera Picta, 2005.
- [18] Legen I. *Absorpcijske bariere za monokarboksilne učinkovine v tankem črevesu*; doktorska disertacija, Fakulteta za farmacijo, Univerza v Ljubljani, 2003.
- [19] Mizuno N et al. Impact of drug transporter studies on drug discovery and development. *Pharmacol Rev* 2003; 55 (3): 425-461.
- [20] Cotton CU, Reuss L. Epithelial transport: a guide to methods and experimental analysis; Characterization of epithelial ion transport. Chapman & Hall 1996: 71-92.
- [21] El-Kattan A et al. Targeting intestinal transporters for optimizing oral drug absorption. *Curr Drug Metab* 2010; 11 (9): 730-742.
- [22] Cole CSP et al. The MRP-Related and BCRP/ABCG2 Multidrug Resistance Proteins: Biology, Substrate Specificity and Regulation. *Curr Drug Metab* 2004; 5 (1): 21-53.
- [23] Hagenbuch B, Gui C. Xenobiotic transporters of the human organic anion transporting polypeptides (OATP) family. *Xenobiotica* 2008; 38 (7-8): 778-801.
- [24] Kaivosaari S. *N-glucuronidation of drugs and othe xenobiotics*; doktorska disertacija, Helsinki, 2010.
- [25] Furukawa T et al. Quantitative prediction of intestinal glucuronidation of drugs in rats using in vitro metabolic clearance data. *Drug Metab Pharmacokinet* 2011; 27 (2): 171-180.

- [26] Chang JH et al. The role of pH in the glucuronidation of raloxifene, mycophenolic acid and ezetimibe. *Mol Pharm* 2009; 6 (4): 1216-1227.
- [27] Tukey RH, Strassburg CP. Human UDP-glucuronosyltransferases: metabolism, expression, and disease. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 2000; 40: 581-616.
- [28] Gregory PA et al. Regulation of UDP glucuronosyltransferases in the gastrointestinal tract. *Toxicol Appl Phar* 2004; 199 (3): 354-363.
- [29] Mizuma T. Intestinal glucuronidation metabolism may have a greater impact on oral bioavailability than hepatic glucuronidation metabolism in humans: a study with raloxifene, substrate for UGT1A1, 1A8, 1A9, and 1A10. *Int J Pharm* 2009; 378: 140-14.
- [30] Ritter PK. Intestinal UGTs as potential modifiers of pharmacokinetics and biological responses to drug xenobiotics. *Expert Opin Drug Metab Toxicol* 2007; 3 (1): 93-107.
- [31] Komura H, Iwaki M. In vitro and in vivo small intestinal metabolism of CYP3A and UGT substrates in preclinical animals species and humans: species differences. *Drug Metab Rev* 2011; 43 (4): 476-498.
- [32] Tocris [Elektronski vir]. Dostopno: <http://www.tocris.com/dispprod.php?ItemId=274496>. [Poskus dostopa 16 aprila 2012].
- [33] Sigma Aldrich [Elektronski vir]. Dostopno: <http://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sigma/k2144?lang=en&region=SI>. [Poskus dostopa 16 aprila 2012].
- [34] Žakelj S. *Permeabilnost nekaterih spojin skozi tanko črevo podgane v različnih pogojih "in vitro"*; doktorska disertacija, Fakulteta za farmacijo, Univerza v Ljubljani, 2006.
- [35] Ferbežar M. *In vitro vpliv staranega česnovega vodnega izvlečka na permeabilnost izbranih učinkovin za krvnožilni sistem*; diplomsko delo, Fakulteta za farmacijo, Univerza v Ljubljana 2009.
- [36] Steffansen B et al. Molecular Biopharmaceutics: Aspects of drug characterisation, drug delivery and dosage form; *Passive diffusion of drug substances: the concepts of flux and permeability*. Pharmaceutical Press 2009: 135-152.
- [37] Girish S et al. AAPS workshop report: strategies to address therapeutic protein-drug interactions during clinical development. *AAPS J* 2011; 13 (3): 405-416.
- [38] EMA (European Medicines Agency), 20 January 2010. [Elektronski vir]. Dostopno: [http://www.emea.europa.eu/docs/en\\_GB/document\\_library/Scientific\\_guideline/2010/01/WC500070039.pdf](http://www.emea.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Scientific_guideline/2010/01/WC500070039.pdf). [Poskus dostopa 15 aprila 2012].
- [39] Baza podatkov o učinkovinah/zdravilih, [Elektronski vir]. Dostopno: <http://www.drugbank.ca/drugs/DB00481>. [Poskus dostopa 15 April 2012].
- [40] Trontelj J et al. Raloxifene pre-systemic metabolic clearance in the intestinal wall and in the liver. *Farm vestn* 2008; 59: 59-60.
- [41] Kosaka K. Impact of intestinal glucuronidation on the pharmacokinetics of raloxifene. *Drug Metab Dispos* 2011; 39 (9): 1495-1502.
- [42] Kemp DC et al. Characterization of Raloxifene glucuronidation in vitro: contribution of intestinal metabolism to presystemic clearance. *Drug Metab Dispos* 2002; 30 (6): 694-700.
- [43] Chang JH et al. The role of P-glycoprotein in the bioactivation of raloxifene. *Drug Metab Dispos* 2006; 34 (12): 2073-2078.
- [44] Jeong EJ et al. Disposition mechanisms of raloxifene in the human intestinal Caco-2 model. *J Pharmacol Exp Ther* 2004; 310 (1): 376-385.
- [45] Pachot JI et al. Experimental estimation of the role of P-Glycoprotein in the pharmacokinetic behaviour of telithromycin, a novel ketolide, in comparison with roxithromycin and other macrolides using the Caco-2 cell model. *J Pharm Pharm Sci* 2003; 6 (1): 1-12.
- [46] Benet LZ, Chang JH. Glucuronidation and the transport of the glucuronide metabolites in LLC-PK1 cells. *Mol Pharm* 2005; 2 (5): 428-434.
- [47] Shelby MK et al. Tissue mRNA expression of the rat UDP-Glucuronosyltransferase gene family. *Drug Metab Dispos* 2003; 31 (3): 326-333.
- [48] Lušin TT et al. Raloxifene glucuronidation in human intestine, kidney, and liver microsomes and in human liver microsomes genotyped for the UGT1A1\*28 polymorphism. *Drug Metab Dispos* 2011; 39 (12): 2347-2354.
- [49] Fischer V et al. Efflux transporters and their clinical relevance. *Mini Rev Med Chem* 2005; 5: 183-195.

- [50] Muntane J. Regulation of drug metabolism and transporters. *Curr Drug Metab* 2009; 10: 932-945.
- [51] Hu M et al. Metabolism of flavonoids via enteric recycling: mechanistic studies of disposition of apigenin in the caco-2 cell culture model. *J Pharmacol Exp Ther* 2003; 307 (1): 314-321.
- [52] Bao T et al. Chemoprevention of breast cancers: tamoxifen, reloxifene, and beyond. *Am J Ther* 2006; 13 (4): 337-348.