

UNIVERZA V LJUBLJANI  
FAKULTETA ZA FARMACIJO

DEJA KUCLAR

**RAZISKAVA EKSPERIMENTALNIH POGOJEV TER DOLOČITEV  
PERMEABILNOSTNIH LASTNOSTI DASATINIBA, NILOTINIBA IN  
BOSUTINIBA NA PODGANJEM ČREVESU *IN VITRO***

**RESEARCH OF EXPERIMENTAL CONDITIONS AND  
PERMEABILITY PROPERTIES OF DASATINIB, NILOTINIB AND  
BOSUTINIB ON RAT INTESTINE *IN VITRO* MODEL**

DIPLOMSKA NALOGA  
UNIVERZITETNI ŠTUDIJ FARMACIJE

Ljubljana, 2012

Diplomsko delo sem opravljala na Fakulteti za farmacijo pod mentorstvom doc. dr. Simona Žaklja.

## Zahvala

Želim se zahvaliti mentorju doc. dr. Simonu Žaklju za strokovno vodenje, pomoč in zaupanje pri nastajanju diplomske naloge.

Zahvalila bi se tudi ostalim zaposlenim na Katedri za biofarmacijo in farmakokinetiko, še posebej Nevenki Lilik za pomoč pri delu.

Posebna zahvala gre moji družini za pomoč in podporo v času študija, Igorju, ker mi je ves čas študija stal ob strani in bil pripravljen v vsakem trenutku priskočiti na pomoč ter prijateljem, ki me vedno znajo pomiriti in sprostiti.

## Izjava

Izjavljam, da sem diplomsko nalogo samostojno izdelala pod mentorstvom doc. dr. Simona Žaklja.

Deja Kuclar

Ljubljana, junij 2012

Predsednik diplomske komisije: prof. dr. Janko Kos

Član diplomske komisije: prof. dr. Jožko Cesar

# Kazalo

Kazalo.....	III
Povzetek .....	VI
Abstract.....	VII
Seznam okrajšav .....	VIII
1 Uvod.....	1
1.1 Inhibitorji tirozinskih kinaz in kronična mieloična levkemija.....	1
1.2 Dasatinib .....	2
1.3 Nilotinib .....	3
1.4 Bosutinib .....	5
1.5 Adsorpcija na trdne površine .....	6
1.6 Laboratorijski materiali.....	7
1.6.1 Steklo .....	7
1.6.2 Plastične mase .....	7
1.7 Absorpcija .....	9
1.7.1 Prebavni trakt.....	9
1.7.2 Absorpcijska bariera in transport učinkovin.....	11
1.7.3 Podganje črevo .....	14
1.7.4 Transport dasatiniba, nilotiniba in bosutiniba .....	15
1.8 Določanje permeabilnosti .....	15
1.8.1 Sweetana-Grass difuzijske celice .....	16
1.8.2 Biofarmacevtski klasifikacijski sistem (BCS).....	17
2 Namen dela.....	18
3 Materiali in metode .....	20
3.1 Učinkovine in druge snovi.....	20
3.2 Preizkušan laboratorijski material .....	20

---

3.3	Raztopine .....	21
3.4	Določanje okvirne topnosti .....	23
3.5	Določanje nespecifične vezave na vsebnike za vzorčenje .....	24
3.5.1	Priprava raztopin.....	24
3.5.2	Postopek določanja nespecifične vezave.....	25
3.6	Potek poskusa permeabilnosti na podganjem črevu in vitro.....	25
3.6.1	Priprava tkiva.....	25
3.6.2	Elektrofiziološki parametri in vitalnost tkiva .....	26
3.6.3	Vzorčenje ter določanje $P_{app}$ .....	27
3.7	Analizne metode .....	28
3.8	Statistična obdelava podatkov .....	30
4	Rezultati .....	33
4.1	Topnost .....	33
4.1.1	Nilotinib.....	33
4.1.2	Dasatinib.....	34
4.3.1.	Bosutinib.....	35
4.2	Nespecifična vezava na vsebnike za vzorčenje .....	35
4.2.1	Nilotinib.....	36
4.2.2	Dasatinib.....	37
4.2.3	Bosutinib.....	38
4.3	Permeabilnost.....	39
4.3.1	Dasatinib.....	39
4.3.2	Nilotinib.....	43
4.3.3	Bosutinib.....	44
5	Razprava.....	46
5.1	Opredelitev eksperimentalnih pogojev .....	46
5.2	Permeabilnost.....	50

6	Sklep.....	55
7	Literatura .....	57

# Povzetek

Dasatinib, nilotinib in bosutinib so inhibitorji tirozinskih kinaz, ki se uporabljajo v terapiji kronične mieloične levkemije, še posebej pri rezistenci na imatinib. Njihova sposobnost za prehajanje celičnih membran iz apikalne na bazolateralno stran celice in v nasprotni smeri pomembno vpliva na obseg učinkovine, ki prehaja v krvni obtok in nato v tarčno celico. Ker gre za velike lipofilne molekule, je lahko njihova absorpcija omejena. Poleg tega se takšne lastnosti izražajo v slabi topnosti v vodnih medijih in nespecifični vezavi na laboratorijske materiale, kar nam otežuje merjenje njihovih permeabilnostnih lastnosti *in vitro* in slabša *in vivo-in vitro* korelacijo.

V diplomskem delu smo raziskovali pogoje, ki bi bili najprimernejši za določanje permeabilnostnih lastnosti dasatiniba, nilotiniba in bosutiniba. Preverjali smo njihovo topnost v različnih medijih ter ocenili vezavo na različne plastične in steklene vsebnike, ki jih uporabljamo pri meritvah permeabilnosti. Pod izbranimi pogoji smo nato določali njihove *in vitro* permeabilnostne lastnosti skozi izolirano tkivo podganjega črevesa na Sweetana-Grass sistemu difuzijskih celic. Naš namen je bil določiti permeabilnostne koeficiente izbranih spojin v odvisnosti od regije črevesa in absorptivne ali sekretorne smeri prehajanja.

Pri raziskavi eksperimentalnih pogojev smo za medij poskusa permeabilnosti za dasatinib izbrali Ringerjev pufer, za nilotinib in bosutinib pa Ringerjev pufer s tauroholatom in lecitinom. Kot vsebnike za vzorčenje smo izbrali steklene vialo, na katere so se učinkovine najmanj vezale.

V naših poskusih na podganjem črevesu smo ugotovili nižje *in vitro* permeabilnostne koeficiente dasatiniba, nilotiniba in bosutiniba, kot bi jih pričakovali glede na *in vivo* farmakokinetične lastnosti. Pri dasatinibu smo potrdili prisotnost aktivnega transporta v sekretorni smeri, ki je najbolj izražen v ileumu. Na osnovi nizkih vrednosti *in vitro* permeabilnostnih koeficientov v kombinaciji s farmakokinetičnimi lastnostmi te učinkovine tudi predvidevamo, da so v absorpcijo dasatiniba pri človeku vključeni aktivni absorptivni prenašalci.

# Abstract

Dasatinib, nilotinib and bosutinib are tyrosine kinase inhibitors (TKIs), used in a chronic myeloid leukemia treatment, especially for patients with imatinib resistance. Their ability to cross the cell membrane from apical to basolateral side and in the opposite direction strongly influences the amount of drug absorbed in blood stream and later in a target cell. Because of the lipophilicity and greater size of these molecules, the absorption may be limited. Moreover, such molecular properties exhibit poor water solubility and these drugs are likely to be adsorbed on laboratory materials or accumulate in adsorption barriers. This makes *in vitro* permeability measuring difficult and provides poor *in vivo-in vitro* correlation.

In this thesis we investigated the best conditions for *in vitro* research of dasatinib, nilotinib and bosutinib permeability properties. Within this investigation, solubility in various media and adsorption to plastic and glass containers used in permeability experiments were examined. After that, under the chosen conditions, the *in vitro* permeability properties of examined TKIs on excised rat intestinal tissues were determined, using a Sweetana-Grass diffusion cell system. Our aim was to determine their permeability coefficients in relevance to intestinal regions and absorptive or secretive direction of diffusion.

Ringer buffer was chosen as an incubation medium for dasatinib permeability experiment. Alternatively, Ringer buffer with addition of sodium taurocholate and lecithin was chosen as a medium for nilotinib and bosutinib. Due to lowest adsorption glass vials were used for collecting and storing of the samples.

Our investigations on excised rat intestine tissues showed lower dasatinib, nilotinib and bosutinib permeability coefficients than could be expected based on known *in vivo* pharmacokinetic data. Further, with dasatinib we confirmed the presence of active secretion transport with increasing expression in ileum. Due to low *in vitro* permeability coefficients of dasatinib and in combination with other pharmacokinetic data for this drug, we suggest that active transport mechanisms are involved in its absorption.

# Seznam okrajšav

ABC .....ang.: *ATP-Binding Cassette*

ALL .....ang.: *Acute Lymphoblastic Leukemia* = akutna limfoblastna levkemija

ATP.....adenozin trifosfat

AUC.....ang.: *Area Under Curve* = površina pod krivuljo

Bcr .....ang.: *Breakpoint Cluster Region*

BCRP .....ang.: *Breast Cancer Resistance Protein* = protein odpornosti na rak dojke

BCS.....ang.: *Biopharmaceutical Classification System* = biofarmacevtski klasifikacijski sistem

c-KIT .....receptor za rastni faktor matičnih celic

CYP .....ang.: *Cytochrome P* = citokrom P

DMSO.....dimetilsulfoksid

Eph.....ang.: *ephrin* = efrin

EtOH.....etanol

FDA .....ang.: *Food and Drug Administration* = Uprava za prehrano in zdravila

Fyn.....ang.: *Proto-Oncogene Tyrosine-Protein Kinase* = proto-onkogeno tirozinska kinaza

GIT .....gastrointestinalni trakt

HPLC.....ang.: *High-Performance Liquid Chromatography* = visoko zmogljiva tekočinska kromatografija

KML .....Kronična Mieloična Levkemija

Lck.....ang.: *Leukocyte-Specific Protein Tyrosine Kinase* = tirozinska kinaza specifična na levkocite

MDR.....ang.: *Multidrug Resistance Proteins* = proteini za odpornost na več zdravil

MRP.....ang.: *Multidrug Resistance Proteins of group ABCC* = proteini za odpornost na več zdravil skupine ABCC

M-S .....iz mukozne na serozno stran

OAT .....ang.: *Organic Anion Transporter* = organski anionski transporterji

OATP.....ang.: *Organic Anion-Transporting Polypeptide* = polipeptidi ki prenašajo organske anione

OCT .....ang.: *Organic Cation Transporter* = organski kationski transporterji



- P .....permeabilnostni koeficient
- $P_{app}$  .....navidezni permeabilnostni koeficient
- PBS .....izotonični fosfatni pufer
- PDGF .....ang.: *Platelet-Derived Growth Factor* = trombocitni rastni faktor
- PE-LD .....ang. Low Density Polyethylene = polietilen z majhno gostoto
- P-gp.....P-glikoprotein
- Ph.....Philadelphia kromosom
- Ph+.....Philadelphia kromosom pozitivno
- PP.....polipropilen
- SEM.....ang.: *Standard Error of Mean* = standardna napaka aritmetične sredine
- SLC.....ang.: *Solute Carrier* =prenašalec topljencev
- S-M.....iz serozne na mukozno stran
- Src.....družina sarkoma tirozinskih kinaz
- TEER .....ang.: *Trans Epithelial Electrica Resistance* = transepitelijski električni upor
- TKI .....Inhibitorji Tirozinske Kinaze
- WHO.....ang.: *World Health Organisation* = Svetovna zdravstvena organizacija
- Yes.....ang.: *Oncogenic protein encoded by the Yamaguchi 73 and Esh avian sarcoma virus* = onkogeni protein kodiran z Yamaguchi 73 in Esh avian sarkoma virusom

# 1 Uvod

## 1.1 Inhibitorji tirozinskih kinaz in kronična mieloična levkemija

Kronična mieloična levkemija (KML) je maligna novotvorba, ki prizadene krvotvorne matične celice. Spada med eno od štirih najpogostejših oblik levkemij in je med njimi zastopana v 15-20%. Izvira iz genske motnje, translokacije imenovane kromosom Philadelphia (Ph). Omenjena translokacija vodi v povezovanje Abl (Abl tirozinska kinaza) in Bcr (*breakpoint cluster region*) gena dveh različnih kromosomov. Pri tem nastane zliti gen Bcr-Abl, ki kodira Bcr-Abl transkripte in proteine z nenavadno tirozinsko-kinazno aktivnostjo (1,2). Slednji sodelujejo v signalnih poteh v celici, ki uravnavajo celično rast, metabolizem, diferenciacijo, adhezijo in apoptozo (3). Bolezen napreduje v treh različnih fazah. Navadno jo odkrijemo v prvem, kroničnem obdobju, sledi pospešeno obdobje, to pa vodi v stanje enako akutni levkemiji, imenovano blastna preobrazba (2).

Inhibitorji tirozinske kinaze (TKI) so učinkovine, ki se aplicirajo peroralno in so namenjene terapiji kronične mieloične levkemije. So učinkovine z več tarčnimi mesti, ki imajo veliko afiniteto do le nekaj družin tirozinskih kinaz receptorske in nereceptorske oblike, kar jim omogoča dobro selektivnost. Delujejo tako, da se kompetitivno vežejo na vezavno mesto za adenozin trifosfat (ATP) na tirozinski kinazi. S tem zavirajo avtofosforilacijo in tako prekinejo kaskado reakcij, ki bi povzročile rast in angiogenezo tumorja (3).

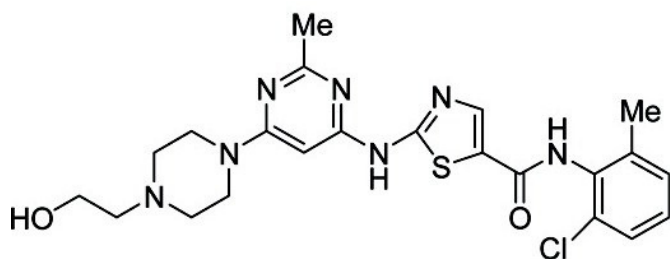
Trenutno je po svetu odobrenih 9 TKI: imatinib, dasatinib, nilotinib, erlotinib, gefitinib, sunitinib, sorafenib, lapatinib in pazopanib (4). Prvi registriran TKI je bil imatinib (Gleevec®, Novartis), ki je pokazal zelo dobre odstotke remisije KML pri pacientih in le malo neželenih učinkov, kateri le redko dosežejo mesto 3 ali 4 na lestvici WHO. Imatinib je tako postal primarna terapija pri zdravljenju bolnikov s KML predvsem v kroničnem obdobju bolezni. V zadnjih letih je FDA za zdravljenje bolnikov s KML, ki so pokazali odpornost na imatinib ali pa ga ne prenašajo, med drugimi odobrila dasatinib in nilotinib. Bosutinib, o katerem bomo v diplomi tudi govorili, je trenutno še v procesu registracije (1,2).

Nove generacije TKI so predvsem zelo uporabne zaradi pojava odpornosti na zdravljenje z imatinibom, saj delujejo na širši razpon nastalih mutacij. Najpomembnejša dejavnika za pojav odpornosti sta klonska evolucija in pojav točkovnih mutacij v kinazni domeni gena Bcr-Abl. Pri pacientih je lahko prisotna primarna odpornost, katero določimo v primeru, da že od začetka zdravljenja ne dosežemo želenih odgovorov. O sekundarni odpornosti pa govorimo, ko bolniki sprva dosežejo ustrezne odgovore, vendar kasneje preide do ponovnega poslabšanja, ker se na zdravilo ne odzivajo več (2).

## 1.2 Dasatinib

Dasatinib (Sprycel®) podjetja Bristol-Myers Squibb je bil s strani FDA odobren leta 2006 (2). Dasatinib učinkovito zavira aktivno in za razliko od imatiniba tudi neaktivno konformacijo Bcr-Abl tirozinske kinaze (3). Poleg nje zavira tudi pet tirozinskih kinaz sarkoma (Src) družine (Src, Lck, Yes, Fyn), c-KIT (receptor za rastni faktor matičnih celic) receptorsko kinazo, EphA2 (efrin-A2) receptorsko kinazo in PDGF- $\beta$  (trombocitni rastni faktor  $\beta$ ) receptorsko kinazo, ki so prav tako povezane z različnimi oblikami malignosti pri človeku (5,8). Dokazano je bilo, da dasatinib 325-krat močneje inhibira nemutirano Bcr-Abl tirozinsko kinazo kot imatinib in je učinkovit proti mnogim mutacijam Bcr-Abl odpornih na imatinib, razen proti mutaciji T315I. To je tudi eden glavnih razlogov učinkovitosti spojine pri bolnikih odpornih na imatinib (8). Uporablja se za zdravljenje kronične in pospešene faze Philadelphia kromosom pozitivne (Ph+) KML, kot tudi za zdravljenje Ph+ akutne limfoblastne levkemije (ALL) (3).

Dasatinib ali N-(2-kloro-6-metil-fenil)-2-(6-(4-(2-hidroksietil)piperazin-1-il)-2-metilpirimidin-4-ilamino)thiazol-5-karboksamid ima molekulsko maso 488,01 g/mol. Spojina ima bazični pKa vrednosti 6,8 in 3,1 ter šibko kislo pKa vrednost okoli 10,9. Izkazuje izrazito od pH odvisno topnost v vodi. Raztapljanje v vodi je večje pri nižjih pH vrednostih. Pri pH 2,6 je topnost 18,4 mg/mL, pri pH 4,5 je ta le še 0,08 mg/mL, pri pH 7,0 pa dodatno pade na 1  $\mu$ g/mL. Drugi podatki o topnosti navajajo še rahlo topnost v etanolu, metanolu, polietilenglikolu 400 in propilenglikolu ter slabšo topnost v acetonu in acetonitrilu. Dasatinib je po Biofarmaceutskem klasifikacijskem sistemu (BCS) uvrščen v II. razred, kar pomeni, da je v telesu slabo topen, vendar pa izkazuje dobro permeabilnost. Topnost je torej omejujoč dejavnik pri njegovi absorpciji (5,9).



Slika 1: Struktura dasatiniba

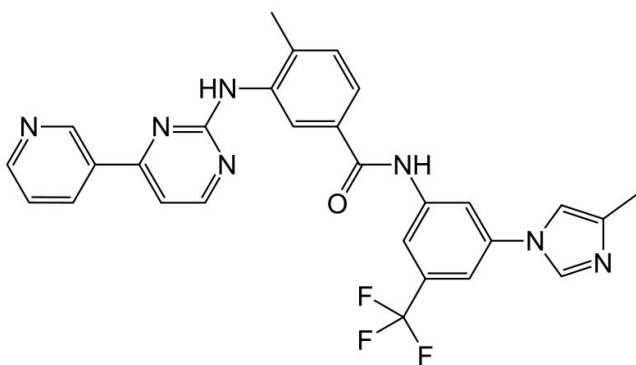
Po peroralni aplikaciji pri zdravih osebah in rakavih bolnikih se dasatinib hitro absorbira, s časom maksimalne koncentracije med 0,5 in 3 ure. Biološka uporabnost pri človeku ni znana, bila pa je ugotovljena na živalih. Pri miših je bila izmerjena biološka uporabnost med 14% in 51%, pri psih pa 34%. Podatki zdravih oseb pri aplikaciji učinkovine 30 min po zaužitju visoko kaloričnega obroka kažejo na 14% porast AUC, pri aplikaciji 30 min po zaužitju nizko kaloričnega obroka pa na 21% porast AUC. Vendar pa te vrednosti niso dovolj visoke, da bi bile klinično relevantne. Opažena je bila tudi visoka interindividualna in intraindividualna variabilnost absorpcije in biološke uporabnosti dasatiniba. Volumen distribucije učinkovine je 30-krat večji od celotnega volumna vode v telesu, kar lahko nakazuje na ekstravaskularno distribucijo učinkovine ali pa na nizko biološko uporabnost le te. Dasatinib v manjših količinah prehaja hematoencefalno bariero in se kopiči v intrakranialnih tumorjih. Vezava na serumske proteine je pri človeku 94%. Študije so pokazale, da se primarno metabolizira v jetrih, v največji meri preko encima citokrom P450 3A4 (CYP3A4). V 85% se eliminira s fecesom, večinoma v obliki metabolitov, v 4% pa z urinom. S fecesom se eliminira le 19% nespremenjenega dasatiniba, kar tudi kaže na to, da se po peroralni aplikaciji učinkovina dobro absorbira (3,5).

### 1.3 Nilotinib

Nilotinib je Novartisov strukturni derivat imatiniba, registriran pod imenom Tasigna® in je bil s strani FDA odobren oktobra 2007 (2). Proti neaktivni konformaciji Bcr-Abl tirozinske kinaze, občutljive tudi na imatinib, deluje 43- do 60-krat močnejše kot sam imatinib, poleg tega pa je učinkovit tudi proti na imatinib odpornim oblikam. Izjema je le T315I oblika kromosoma Philadelphia, ki je rezistentna tudi na druge inhibitorje tirozinske kinaze. Nilotinib inhibira še PDGF receptorsko tirozinsko kinazo, c-KIT receptorsko kinazo in kinazno domeno efrinskih receptorjev EphB1, EphB2 in EphB4. Uporablja se za

zdravljenje bolnikov v kronični in pospešeni fazi KML s prisotnim Philadelphia kromosomom (2,3,6).

Kemijsko ime nilotiniba je 4-metil-N-[3-(4-metil-1H-imidazol-1-il)-5(trifluorometil)fenil]-3-[(4-piridin-3-ilpirimidin-2-il)amino]benzamid. Njegova molekulska masa je 529,52 g/mol. Nilotinib ima dve pKa vrednosti, prva je 2,1 in druga okoli 5,4. Porazdelitveni koeficient v n-oktanol/0,1 N HCl pufer, ki je bil določen pri 37°C, znaša 0,08 (logP=-1,1). Njegova topnost v vodnih raztopinah je odvisna od pH in narašča z nižanjem pH vrednosti. V puferskih raztopinah s pH 4,5 in več praktično ni več topen. Literatura navaja še skromno topnost v etanolu in metanolu. Nilotinib je uvrščen v razred BCS IV, torej spada med slabo topne in slabo permeabilne učinkovine (6).



Slika 2: Struktura nilotiniba

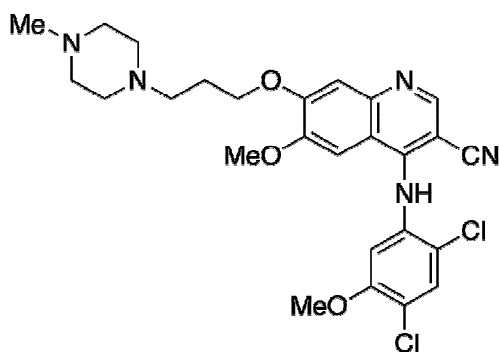
Po peroralni aplikaciji se nilotinib hitro, vendar le v približno 30% absorbira iz prebavnega trakta. Čas maksimalne koncentracije doseže po približno 3 urah. Po ocenjevanju absorpcije ob zaužitju hrane so dokazali, da se biološka razpoložljivost poveča kar za 82% ob odmerjanju nilotiniba po visoko kaloričnem obroku in za 29% ob aplikaciji 30 min po nizko kaloričnem obroku. Predvidevamo lahko, da je to odraz povečanja raztapljanja v prebavnem traktu. Opažena je bila tudi velika interindividualna variabilnost v biološki razpoložljivosti nilotiniba, kar si lahko delno razlagamo z njegovo slabo topnostjo in nizko biološko uporabnostjo. Nilotinib ima tako kot dasatinib velik volumen distribucije, ki je kar 10-krat večji od celotnega volumna vode v telesu. Pri človeku se v 98% veže na plazemske proteine. Metabolizira se pretežno preko encima CYP3A4 in delno preko CYP2C8. Metabolizem je njegov glavni način eliminacije, saj se kar 21% odmerka izloča v obliki metabolitov v feces in le 4,5% preko ledvic. 69% s fecesom izločenega odmerka predstavlja nespremenjen nilotinib, kar na osnovi teorije BDDCS

(Biofarmacevtskega klasifikacijskega sistema o porazdeljevanju učinkovine) odraža slabo absorpcijo (3,6,7). Wu in Benet sta namreč ugotovila, da dobro permeabilne učinkovine, ki se v prebavnem traktu hitro absorbirajo, tudi dobro prehajajo v jetra in se tam metabolizirajo. Te se zato izločajo pretežno v metabolizirani obliki (7).

## 1.4 Bosutinib

Bosutinib je močan kompetitivni inhibitor Src in Bcr-Abl tirozinskih kinaz podjetja Pfizer Inc. in je trenutno v postopku registracije. V primerjavi z imatinibom 100-krat bolj učinkovito zavira Bcr-Abl tirozinsko kinazo. Učinkovit je tudi proti vsem na imatinib odpornim mutacijam, razen proti mutaciji T314I. Za razliko od imatiniba, dasatiniba in nilotiniba izkazuje povsem nov profil inhibicije. Ta več ne vključuje inhibicije PDGF in c-KIT receptorske kinaze, pri tem pa je inhibicija Src kinazne družine močnejša. Številne študije ugotavljajo, da je ta kinazna družina v veliki meri odgovorna za maligne spremembe celic, napredovanje tumorja in razširjanje metastaz. Zelo verjetno je nov zožen profil tarčnih mest odgovoren tudi za manj opaženih stranskih učinkov pri pacientih (10).

Bosutinib ali 4-[(2,4-dikloro-5-metoksifenil)amino]-6-metoksi-7-[3-(4-metil-1-piperazinil)propoksi]-3-kinolinkarbonitril monohidrat, ima molekulsko maso 530,45 g/mol (10). Ima od pH odvisen topnostni profil in je pri visokih pH vrednostih zelo slabo topen. Njegova struktura vsebuje štiri mesta, kjer se lahko protonira, njihove pKa konstante pa so 11,2, 7,92, 4,75 in 3,79. V želodčnem mediju je tako prisoten v tri-kationski obliki, kar ga naredi v želodcu zelo dobro topnega. V razmerah v tankem črevesu se nahaja v mono-, di- in tri-protonirani obliki, kar pa lahko ovira njegovo permeabilnost skozi črevesno sluznico, saj je prehod navadno omejen na nenabito obliko učinkovine. Bosutinib je po BCS vseeno uvrščen v II. razred in je tako okarakteriziran kot slabo topna in dobro permeabilna učinkovina (12).



Slika 3: Struktura bosutiniba

Farmakokinetične študije kažejo na relativno počasno absorpcijo bosutiniba z dosegom maksimalne koncentracije po približno 6 urah. Ob odmerjanju po visoko kaloričnem obroku se AUC, v primerjavi z razmerami na tešče, poveča za kar 1,5-krat. Te rezultate si lahko razlagamo s povečanjem topnosti v prebavnem traktu. V študijah za zdaj še ni bilo ugotovljeno, kako visoka je njegova biološka uporabnost, vendar pa lahko zaradi velikega povečanja AUC ob odmerjanju s hrano sklepamo, da je ta nepopolna in razmeroma nizka. Njegov volumen distribucije je relativno velik in nakazuje na veliko porazdeljevanje v telesna tkiva. Bosutinib se primarno izloča preko jeter, saj je bilo določeno le 1% izločanje preko ledvic. Glavni encim za metabolizem je CYP3A4 (11).

## 1.5 Adsorpcija na trdne površine

Adsorpcija je proces vezave molekul ene faze (adsorbat) na površino druge faze (adsorbent), ki se zgodi zaradi neuravnoveženosti sil na fazni meji. Takšna vezava je lahko kemijska ali fizikalna. Prva temelji na kovalentnih vezeh med molekulami obeh faz in jo imenujemo kemisorpcija, druga pa je rezultat šibkejših van der Waalsovih interakcij. Imenujemo jo fizisorpcija in zanjo je značilno, da je reverzibilna in poteka dokler ni doseženo ravnovesje sil (13,15).

V praksi se velikokrat srečamo s pojavom adsorpcije molekul tekočine na trdno površino. V tem primeru sile molekul trdne faze na molekule na medfazni liniji prevladajo nad silami molekul tekoče faze. Navadno imamo vpletene celo tri faze: topilo, topljenec in trdna snov. Pri tem je večinoma topljenec tisti, ki se adsorbira. Na količino adsorbirane spojine na površini adsorbenta vplivajo:

- Temperatura: adsorpcija je manjša pri višjih temperaturah.

- pH: vpliva na ioniziranost in s tem na topnost topljenca. V vodnih raztopinah je adsorpcija navadno večja, če je topljenec v neionizirani obliki.
- Topnost topljenca: večja je afiniteta topljenca do topila (večja topnost), manjša je afiniteta topljenca do trdne faze, kar vodi v manjšo adsorpcijo.
- Narava adsorbenta:
  - Velikost površine adsorbenta
  - Polarnost oz. nepolarnost: pri prvih prevladujejo ionske in vodikove vezi, pri drugih pa interakcije med disperzijskimi silami.
- Narava adsorbata: na polarne površine se bodo adsorbirale polarne, ionizirane molekule. Nasprotno bo adsorpcija na nepolarne površine največja pri učinkovinah, ki so lipofilne in imajo veliko molekulsko maso (13,15).

## 1.6 Laboratorijski materiali

### 1.6.1 Steklo

Steklo je amorfna podhlajena talina iz zmesi t.i. steklotvornih oksidov. Ti so  $\text{SiO}_2$ ,  $\text{B}_2\text{O}_3$ ,  $\text{Al}_2\text{O}_3$ ,  $\text{P}_4\text{O}_{10}$  in alkalijski ali zemljoalkalijski oksidi. Navadno steklo ima kemijsko formulo  $6\text{SiO}_2 \cdot \text{Me}_2\text{O} \cdot \text{CaO}$ , pri kateri Me predstavlja K in Na v enakem razmerju. Da bi navadnemu steklu izboljšali kemično, mehansko in temperaturno odpornost mu navadno dodajajo še MgO, CaO, BaO,  $\text{SiO}_2$ ,  $\text{B}_2\text{O}_3$ ,  $\text{Al}_2\text{O}_3$  in  $\text{P}_4\text{O}_{10}$  (19). Na steklo se najlažje adsorbirajo kationske učinkovine (15).

### 1.6.2 Plastične mase

Plastične mase so dolgoverižne polimerne snovi naravnega ali sintetičnega izvora, ki jih lahko s toploto in pritiskom plastično oblikujemo. Umetne plastične mase pridobivamo s polimerizacijo nizkomolekularnih organskih spojin (monomerov). Plastični materiali navadno vsebujejo tudi pomožne snovi in aditive, ki spreminjajo njihove kemične ali fizikalne lastnosti. Polimerne molekule so lahko v dolgi nerazvejani obliki (linearni polimeri), razvejani obliki ali v tridimenzionalni premreženi obliki. Glede na obnašanje pri segrevanju jih delimo na termoplaste in duroplaste (16,19).

- Termoplasti se ob segrevanju zmehčajo, v takem stanju jih oblikujemo in nato ohladimo, da se strdijo. Postopek lahko večkrat ponovimo. Mednje spadajo:



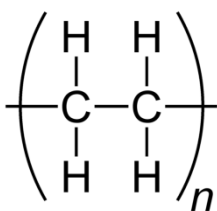
polietilen, polivinilklorid, polistiren, polipropilen, najlon, poliester, poliviniliden klorid in polikarbonat (16).

- Duroplasti se po vlivanju taline strdijo in ostanejo v stalni obliki. V primeru segrevanja duroplasti razpadejo, ne da bi se prej znehčali. Pomembni predstavniki so: fenoplasti, aminoplasti, zamrežene epoksidne smole, zamreženi poliuretani, zamrežene silikonske smole in zamreženi poliestri (19).

V diplomski nalogi se bomo osredotočili na termoplastična polimera polietilen z majhno gostoto in polipropilen. Sta namreč materiala mikroepruvet (epic) in mikrotiterske plošče, ki smo jih uporabljali pri laboratorijskem delu (16).

#### *Polietilen z majhno gostoto (PE-LD)*

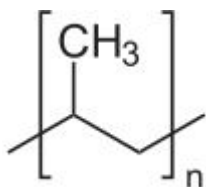
PE-LD je ena od štirih vrst polietilena, ki nastanejo s polimerizacijo etena. V to kategorijo spadajo polietileni z gostoto od 0,91-0,925 g/cm<sup>3</sup>. Ima razvejane verige in omejeno kristaliničnost. Je mehak in prožen material, prosojen in brezbarven ter ima dobro odpornost na stiskanje in nizko temperaturo tališča. Delež kristaliničnosti proti amorfности je 3:2 (16).



Slika 4: Struktura polietilena

#### *Polipropilen (PP)*

PP obstaja kot homopolimer propena ali pa v kopolimerni obliki s etilenom in drugimi ogljikovodiki. Je eden od polimerov z najnižjo gostoto, bel ali brezbarven ter visoko kristalinične strukture. Ima slabo odpornost pri nizki temperaturi, kar pa se je zelo izboljšalo s kopolimerizacijo z etilenom (16).



Slika 5: Struktura polipropilena

## 1.7 Absorpcija

Po peroralni aplikaciji zdravila ta potuje v prebavni trakt, kjer se mora učinkovina iz farmacevtske oblike najprej sprostiti, raztopiti v gastrointestinalni tekočini, nato pa sledi absorpcija učinkovine skozi sluznico prebavil ter njen prehod v krvni obtok. Učinkovina s krvnim obtokom najprej prehaja jetra, se nato porazdeljuje po tkivih in se končno veže na tarčno mesto. Če predpostavimo, da imamo pripravek s hitrim sproščanjem, je prvi omejujoč dejavnik pri biološki uporabnosti učinkovine njeno raztapljanje v tekočinah prebavnega trakta, saj se lahko le v takšni obliki kasneje absorbira. Drugi zelo pomemben in omejujoč dejavnik pa je absorpcija oz. permeabilnost učinkovine skozi črevesno sluznico. Ta je odvisna od fizikalno-kemijskih lastnosti učinkovine, okolja v prebavnem traktu (hrana, druge prisotne snovi) ter anatomije in fiziologije prebavnega trakta (22).

### 1.7.1 Prebavni trakt

Glavne naloge gastrointestinalnega trakta (GIT) so prebava hrane, absorpcija hranil ter vzdolžno potiskanje in mešanje vsebine. Kljub temu da je namenjen temu, da omogoča prehod snovi v krvni obtok, so vse aplicirane učinkovine izpostavljene raznolikemu okolju, ki lahko olajšuje ali pa otežuje njihovo absorpcijo. Zgornji prebavni trakt sestavljajo usta, žrelo, požiralnik in želodec, spodnji del prebavnega trakta pa predstavljajo tanko in debelo črevo ter zadnjik (20,21). V nadaljevanju bomo na kratko predstavili segmente GIT, najpomembnejše za absorpcijo.

#### *Želodec*

V želodcu se pod vplivom mišičnih kontrakcij hrana meša z encimi in klorovodikovo kislino, ki jih izločajo celice želodčnega epitelijskega tkiva. Učinkovina je v njem izpostavljena zelo kislim pogojem (pH=1-3). Ti pogoji bazičnim učinkovinam omogočajo, da se v njem raztopijo, vendar pa se na tem mestu ne absorbirajo, saj se v teh razmerah nahajajo v

ionizirani obliki. Absorpcija v želodcu je teoretično možna, če imamo kislo učinkovino, ki je že v tekoči obliki ali pa se v želodcu raztaplja ter je dovolj lipofilna, da lahko prehaja želodčni epitelij. Predvsem zaradi majhne epiteljske površine, pa je absorpcija iz želodca pogosto zanemarljiva (20,21).

#### *Tanko črevo*

Tanko črevo je glavno mesto prebave in absorpcije hranil, elektrolitov in vode. Glavno vlogo pri tem ima struktura mukozne površine črevesne stene. Površina črevesne stene je močno povečana zaradi črevesnih resic, ki oblikujejo epitelij. Tega sestavljajo celice, imenovane enterociti, ki imajo svojo apikalno stran oblikovano v strukturo mikro resic, katere še dodatno povečajo površino črevesne sluznice. Takšna morfološka struktura poveča površino na voljo za absorpcijo za kar 600-krat (20,21).

Tanko črevo delimo na duodenum, jejunum in ileum. Ti se med seboj razlikujejo po dolžini in izraženosti prenašalnih proteinov. Po prehodu iz želodca preko pilorusa učinkovina preide najprej duodenum, nato jejunum in nazadnje ileum. Izločanje žolča in sokov trebušne sluznice v duodenum dvigne pH tankega črevesa na okoli 5-7. Zaradi tega se tu raztopijo kisle učinkovine, še vedno pa je pH dovolj nizek, da ne povzroči obarjanja večine šibko bazičnih učinkovin. Močne kisline in baze so pri tem pH v veliki meri ionizirane, kar pa lahko omejuje njihovo absorpcijo. Z veliko verjetnostjo se tako dobro absorbirajo učinkovine z zadostno topnostjo in z ionizacijo pri pH 7-8. Žolčne soli zaradi svoje površinske napetosti tudi pomembno pripomorejo k raztapljanju lipofilnih spojin (20).

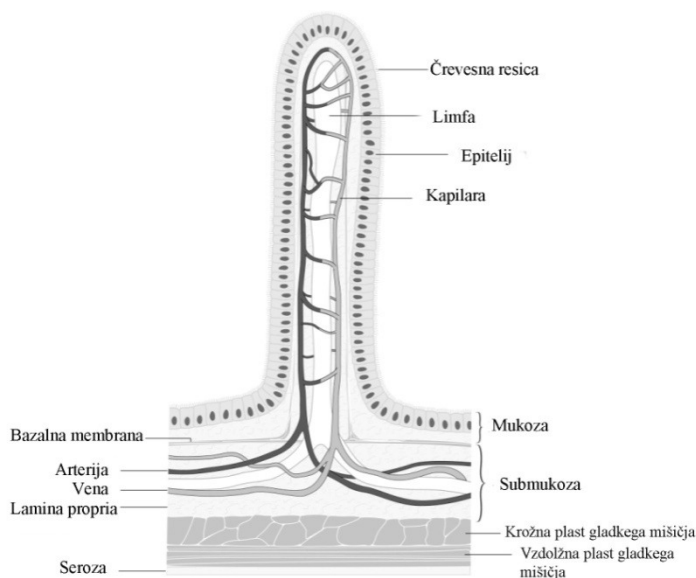
V različnih delih tankega črevesa so različno izražene posamezne skupine absorptivnih in sekretornih prenašalcev. Za ileum je značilno, da ima visoko efluksno razmerje, kar kaže na veliko izraženost sekretornih transportnih proteinov v tem delu tankega črevesa. Vrstni red izraženosti ABC (*ATP-binding cassette*) sekretornih prenašalcev je v ileumu naslednji: P-gp>MRP3>>MRP1>MRP2. Ekspresija prenašalcev v duodenumu je: MRP3>>P-gp>MRP2>MRP1, v jejunumu pa: BCRP $\cong$ MRP2>P-gp $\cong$ MRP3 $\cong$ MRP1. Tudi v debelem črevesu se nahajajo ABC sekretorni prenašalci. Ti so izraženi v vrstnem redu: MRP3>>P-gp>MRP1>>MRP2 (22).

### *Debelo črevo ali kolon*

Površina sluznice v debelem črevesu je zopet manjša, saj ne vsebuje črevesnih resic in mikro resic. Zanj je značilna aktivna bakterijska mikroflora, ki razgrajuje hranila. pH vrednost v debelem črevesu ostaja nevtralna do rahlo kisla (pH=5-7). V debelem črevesu poteka absorpcija vode, elektrolitov in spojin, ki se še niso absorbirale v tankem črevesu ali pa so se tvorile z bakterijsko razgradnjo. Kljub temu je absorpcija v debelem črevesu manj učinkovita kot v tankem črevesu, poleg tega pa lahko bakterije v njem učinkovine tudi razgradijo (20,21).

#### 1.7.2 Absorpcijska bariera in transport učinkovin

Celoten prebavni trakt je prekrit z mukusom, pod njim pa leži mukozna plast, ki služi kot prva bariera pri prehodu učinkovine v krvni obtok. Mukozo sestavljajo epiteljska plast z epiteljskimi celicami (enterociti v tankem črevesu) in mehko vezivno tkivo *lamina propria*, v kateri se nahajajo krvne in limfne kapilare. Pri absorpciji morajo tako učinkovine, da dosežejo krvni obtok, najprej preiti epitelij, tkivo lamine proprie in končno steno kapilar (21). Učinkovine lahko preidejo epitelij transcelularno (skozi celice) ali pa paracelularno (med celicami). Paracelularno se prenašajo majhne hidrofilne in ionizirane učinkovine, vendar pa je tak način absorpcije redek, saj jo otežujejo tesni stiki med celicami. Pri transcelularnem prehodu mora spojina preiti apikalno in bazolateralno celično membrano, ki ju sestavlja lipidni dvosloj, zgrajen iz fosfolipidov, maščobnih kislin in sterolov. V celični membrani se nahajajo tudi ekstrinzični in intrinzični proteini. Slednji lahko tvorijo kanale, prenašalne sisteme ali črpalke, ki omogočajo polarnim molekulam, da prehajajo membrano. Membranski transport se lahko vrši na dva načina: pasivno ali aktivno (20).



Slika 6: Morfološka sestava črevesne stene (21)

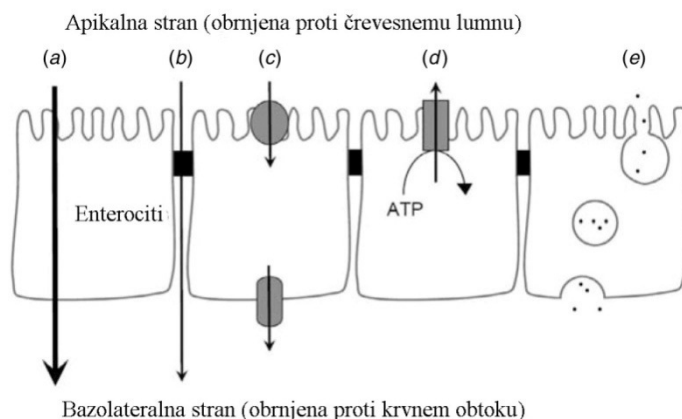
Pasivna difuzija je odvisna od topnosti spojine v lipidih in koncentracijskega gradienta. Ta način prehoda je odgovoren za absorpcijo večine snovi. Lipidni dvosloj najlažje prehajajo lipofilne molekule v raztopljeni in neionizirani obliki (20).

Veliko spojin lahko prehaja membrane v nasprotni smeri koncentracijskega gradienta ali pa se absorbirajo v večji meri, kot bi predvideli iz podatkov o topnosti in permeabilnosti. To zagotavljajo prenašalni proteini v celični membrani, ki lahko vršijo aktivni transport. Med aktivni transport štejemo:

- a) Kanale: poznamo vodne in ionske kanale. Slednji so lahko napetostni ali odvisni od ligandov.
- b) Olajšana difuzija: vrši se proti koncentracijskemu gradientu. Transport je stereospecifičen in pri njemu lahko pride do saturacije. Na tak način se v celico prenašajo sladkorji in aminokisliline.
- c) Črpalke: prenašajo ione proti elektrokemijskem gradientu, pri čemer izkoriščajo ATP kot vir energije.
- d) Kotransport in antiport: za prenos substrata izkoriščajo ionski gradient posameznih ionov.
- e) Absorptivni in sekretorni prenašalci: so substratno specifični prenašalci. V črevesu se nahajata dve družini prenašalnih proteinov:
  - družina ABC (*ATP-binding cassette*) transporterjev

- MDR (*Multidrug resistance proteins*): Predstavnik v črevesu je MDR1 (ali P-gp; ABCB1) in vrši sekrecijo velikega števila spojin. Nahaja se na apikalni membrani enterocitov, njegova ekspresija pa narašča od duodenuma proti kolonu.
  - MRP (*Multidrug resistance proteins* skupine ABCC): MRP1 in 3 (ali ABCC1, 3) se nahajata na apikalni membrani, MRP2 (ali ABCC2) pa na bazolateralni membrani enterocitov in vršijo sekrecijo.
  - BCRP (ali ABCG2; *Breast cancer resistance protein*): Nahaja se na apikalni membrani tankega in debelega črevesa in vrši sekrecijo spojin nazaj v lumen črevesa. Najbolj je izražen v jejunumu.
- družina SLC (*solute carrier*) transporterjev
- OATP (polipeptidi ki prenašajo organske anione): nahajajo se na apikalni membrani enterocitov in so odgovorni za absorpcijo spojin.
  - PepT1: je absorptivni prenašalec za zelo različne substrate, ki se v največji meri nahaja v duodenumu, na apikalni strani enterocitov.
  - OCT (organski kationski transporterji): vršijo privzem organskih kationov v celice. Primarno se nahajajo v jetrih, ledvičnih tubulih in srcu, v manjši meri pa so prisotni tudi v črevesu.
  - OAT (organski anionski transporterji): glavno vlogo imajo pri uravnavanju ledvične absorpcije in izločanja učinkovin, ksenobiotikov in endogenih metabolitov. V manjši meri se nahajajo tudi v črevesu.
- f) Pinocitoza in endocitoza: nespecifičen način transporta z vihanjem celične membrane in tvorbo membranskih veziklov (20,22).

Ti prenašalni sistemi se nahajajo tako v celicah stene prebavil, kot tudi v celicah jeter, ledvic in drugih organov ter v steni tarčnih celic. Večina naštetih prenašalnih sistemov (MDR, MRP, BCRP, OCT) na ravni prebavnega trakta vrši sekrecijo. Pri tem je potrebno biti pozoren, da prenašalci, kot so OCT, ki vršijo privzem na bazolateralni strani, na ravni tarčnih celic opravljajo absorpcijo, na ravni prebavnega trakta pa je privzem spojin iz krvi v celico del procesa sekrecije.



Slika 7: Vrste transporta skozi črevesni epitelij. (a) pasivna transcelularna difuzija. (b) paracelularni transport. (c) absorpcija preko prenašalnih proteinov. (d) sekrecija preko prenašalnih proteinov. (e) transcitoza (22)

### 1.7.3 Podganje črevo

Pri podganah predstavlja tanko črevo 83% celotne dolžine črevesnega trakta. Od tega obsega 90% tankega črevesa jejunum, kar je precej večji delež kot pri človeku, kjer jejunum predstavlja le 31% tankega črevesa. Druga velika razlika je delež cekuma, kjer se dogaja bakterijska razgradnja. Ta predstavlja pri podgani kar 26% dolžine debelega črevesa, pri človeku pa le 5%. Poleg tega podgane nimajo sigmoidnega kolona. Dolžina njihovega tankega črevesa je 125 cm, debelega črevesa pa 25 cm. V tankem črevesu predstavlja prvih 9,5-10 cm duodenum, drugih 90-135 cm jejunum in zadnjih 2,5-3,5 cm ileum. V debelem črevesu predstavlja prvih 5-7 cm cekum, naslednjih 9-11 cm kolon in zadnji del rektum. Lumen podganjega črevesa je prekrit z resicami in mikro resicami, nima pa za človeško telo značilnih večjih gub mukoze. To je tudi vzrok za kar 200-krat manjšo površino črevesnega epitelija v primerjavi s človekom, čeprav je dolžina črevesa pri podgani le 5-krat manjša (21). Kljub precejšnjim razlikam v anatomiji GIT se je z izkušnjami izkazalo, da poskusi na podganah dobro napovejo permeabilnost pri človeku (20). V črevesu pogane se nahajajo tudi nekateri prenašalni proteini, značilni za človeški črevesni epitelij. Odkrili so ekspresijo proteinov P-gp, PepT-1 in OATP, vendar se je pri OATP prenašalcih izkazalo, da ne prenašajo povsem istega spektra substratov. Natančna napoved aktivnega transporta v človeku na modelu podgane je zato vprašljiva (22).

#### 1.7.4 Transport dasatiniba, nilotiniba in bosutiniba

Do sedaj permeabilnostne študije na *in vitro* modelu izoliranega tkiva z uporabo difuzijskih celic za dasatinib, nilotinib in bosutinib še niso bile narejene. Večina študij preučuje aktivni transport teh učinkovin na K526 celičnih kulturah z različno izraženimi posameznimi prenašalnimi proteini. Ti prenašalci so izraženi tako v črevesni steni in vplivajo na absorpcijo, kot tudi v celični steni normalnih in rakavih krvotvornih matičnih celic in uravnavajo privzem snovi vanje. Ugotovili so, da mutacije Bcr-Abl kinazne domene ne predstavljajo glavnega vzroka za rezistenco pacientov na imatinib. V veliki meri je namreč odgovorno prav aktivno izločanje, ki ga vršijo ti proteini (23,25,26,27). V študijah so preučevali transport preko prenašalcev OCT-1, -2 in -3, ki vršijo privzem v celice ter transport preko efluksnih prenašalcev P-gp, BCRP in MRP1.

V študijah ugotavljajo, da bi lahko bil transport dasatiniba v celice pasiven proces, kar se tudi sklada s podatkom, da je bolj lipofilen kot njegov predhodnik imatinib. Raziskave so namreč pokazale, da privzem dasatiniba v celice ni odvisen od prenašalcev OCT-1, -2 in -3, vendar pa ne moremo izključiti morebitnega aktivnega privzema preko drugih prenašalnih proteinov (4,23,27). Absorpcijo otežujeta proteina P-gp in BCRP, saj je dasatinib njun substrat in se tako aktivno prenaša iz črevesnih epiteljskih in krvotvornih matičnih celic (23,24,25,26,27).

Privzem nilotiniba se prav tako ne vrši s pomočjo OCT-1, -2 in -3 proteinov, vendar pa ugotavljajo, da bi za privzem nilotiniba v celice lahko bili odgovorni drugi prenašalni sistemi in da njegov transport ni popolnoma pasiven (4,28). Nilotinib je substrat za P-gp in BCRP, ne pa za MRP1, torej se v veliki meri aktivno izloča iz celic (4,25,26,28).

Na bosutinibu zaenkrat še ni bilo narejeno veliko raziskav. Znani so le rezultati študije na P-gp in BCRP prenašalcih, ki kažejo na to, da bosutinib ni substrat za tovrstne efluksne prenašalce. Ta lastnost bosutiniba lahko pomembno vpliva na zmanjšano rezistenco pri pacientih odpornih na imatinib in večjo učinkovitost pri zdravljenju KML (26).

### 1.8 Določanje permeabilnosti

FDA smernice za industrijo okvirno določajo metode, s katerimi se lahko določa permeabilnost spojin za uvrstitev učinkovine v BCS razrede za namene določanja



bioekvivalence. Permeabilnost se lahko določa na človeku z uporabo masne bilance, absolutne biološke uporabnosti ali metode, s katerimi se določi črevesna perfuzija. Alternativno lahko permeabilnost na človeku predvidimo z uporabo ustreznih metod na živalih. Sem spadajo *in vivo* ali *in situ* metode določanja črevesne perfuzije na ustreznih modelih živali ter *in vitro* metode z uporabo izoliranega tkiva črevesne stene ali z uporabo kultivirane plasti ustreznih epiteljskih celic. Pri tem je potrebno biti pozoren, da za učinkovine, ki se prenašajo z aktivnim transportom, izberemo metodo, ki bo takšen prenos spojin omogočala (14).

### 1.8.1 Sweetana-Grass difuzijske celice

Sweetana-Grass dvoprostorske difuzijske celice so ena od *in vitro* metod, s katerimi določamo prehod učinkovin horizontalno (side-by-side). Izhajajo iz sistema Ussingovih difuzijskih celic. Sestavljene so iz akceptorskega in donorskega prostora z inkubacijskih medijem. Vertikalno med prostoroma je napeto tkivo, preko katerega poteka transport preučevane učinkovine. S pomočjo grelca in termostata se v celicah vzdržuje stalna temperatura 37°C. Stalen dovod karbogenega ( $O_2:CO_2=95:5$ ) omogoča stalno oksigenacijo tkiva in zagotavlja tok tekočine paralelen površini tkiva, kot je prisoten *in vivo* (17,18).

Napetostno tokovni izvir (ang.: "Voltage-current clamp") omogoča spremljanje vitalnosti tkiva med poskusom. Ta proizvaja kratkostični tok ( $I_{sc}$ ) in ga preko dveh srebrnih tokovnih elektrod v vsakem sistemu difuzijskih celic pošilja v celice tkiva. Difuzijska celica je opremljena še z dvema Ag/AgCl napetostnima elektrodama, preko katerih "voltage clamp" meter meri transepiteljski potencial (Pd). Ker celice v tkivu potrebujejo energijo v obliki ATP za ionski transport, sta Pd in  $I_{sc}$  merilo za vitalost tkiva oz. delovanje  $Na^+/K^+$ -črpalke (17,18).



Slika 8: Shematski prikaz Sweetana-Grass difuzijske celice (levo) in priključka elektrod v celico (desno) (37)

### 1.8.2 Biofarmacevtski klasifikacijski sistem (BCS)

Namen Biofarmacevtskega klasifikacijskega sistema je razdelitev učinkovin v razrede na osnovi njihove topnosti v vodi in črevesne permeabilnosti. To sta namreč glavna dejavnika, ki vplivata na absorpcijo učinkovine. Ti okvirji v splošnem služijo za pomoč pri uveljavljanju opustitve bioekvivalenčnih študij. Po BCS se učinkovine razdelijo v štiri razrede:

1. razred: dobra topnost, dobra permeabilnost
2. razred: slaba topnost, dobra permeabilnost
3. razred: dobra topnost, slaba permeabilnost
4. razred: slaba topnost, slaba permeabilnost

Učinkovina je dobro topna, ko se njen največji odmerek raztoplja v 250 ml ali manj vodnega medija, v celotnem pH intervalu od 1 do 7,5. Dobro permeabilna je tista učinkovina, ki se v človeku absorbira v najmanj 90% apliciranega odmerka, določenega na podlagi masne bilance ali v primerjavi z intravensko aplikacijo (14).

## 2 Namen dela

Osnovni namen tega diplomskega dela je preučevati permeabilnost dasatiniba, nilotiniba in bosutiniba, treh inhibitorjev tirozinske kinaze druge generacije, ki se uporabljajo za zdravljenje kronične mieloične levkemije. Naš cilj je ugotoviti osnovne lastnosti njihove absorpcije *in vitro*, ki je odvisna tako od privzema, kot tudi od izločanja nazaj v lumen črevesa. Osredotočili se bomo na določitev splošne permeabilnosti izbranih inhibitorjev tirozinskih kinaz na osnovi katerih bomo lahko *in vitro* permeabilnost učinkovin klasificirali po biofarmaceutskem klasifikacijskem sistemu. Iz dobljenih rezultatov bomo naredili prvo oceno o tem ali v absorpciji teh učinkovin prevladuje pasivna difuzija ali aktivni prenos s pomočjo prenašalnih proteinov.

Najprej bomo morali raziskati eksperimentalne pogoje, ki bi bili najprimernejši za določanje permeabilnosti izbranih TKI. Gre namreč za lipofilne učinkovine z veliko molekularno maso in bi lahko bile z vidika topnosti in vezave na vsebnike problematične. Tudi izkušnje iz predhodnih raziskav na predhodniku teh molekul, imatinibu, so pokazale, da se v velikem odstotku veže na laboratorijske materiale, še posebej na mikroeprevete in polipropilensko mikrotitersko ploščo (30). Vezava lahko predstavlja velik problem, saj se pri poskusih permeabilnosti srečujemo z majhnimi koncentracijami vzorcev, še posebej, če je permeabilnost nizka, in lahko razlike zaradi vezave na vsebnik pomembno vplivajo na končni rezultat. Naš namen je torej za vsako od učinkovin preveriti topnost v različnih medijih in oceniti vezavo na različne plastične in steklene vsebnike, ki jih uporabljamo pri meritvah permeabilnosti. Na podlagi teh ugotovitev bomo postavili eksperimentalne pogoje za določanje permeabilnosti na podganjem črevesu *in vitro* za posamezno učinkovino.

Pri izbranih eksperimentalnih pogojih bomo izvajali *in vitro* permeabilnostne poskuse na izoliranem tkivu podganjega črevesa. Ocenili bomo prehajanje učinkovin v absorptivni smeri iz mukozne na serozno stran (M-S) in v eliminatorni smeri iz serozne na mukozno stran (S-M). Poskuse bomo izvajali na posameznih regijah tankega črevesa in kolonu ter tako opredelili regionalno odvisnost absorpcije in izločanja posamezne učinkovine ter poskusili najti povezavo s podatki o izraženosti prenašalnih proteinov v posameznem delu črevesa. Na podlagi tega bomo lahko tudi približno ocenili, ali se učinkovina prenaša s

pasivnim ali aktivnim transportom. Za vsako od učinkovin bomo naredili več poskusov, da dobimo dovolj velik nabor podatkov za določitev permeabilnostnega koeficienta v posamezni regiji in smeri prehoda. Rezultate bomo kritično ocenili z vidika ujemanja s farmakokinetičnimi parametri iz literaturnih virov in jih primerjali z rezultati, predhodno pridobljenimi v istem laboratoriju za imatinib, ki je bil prvi terapevtsko uspešen inhibitor tirozinskih kinaz.

## 3 Materiali in metode

### 3.1 Učinkovine in druge snovi

- dasatinib: ekstrahiran iz tablet z vročim etanolom in iz etanola prekristaliziran; stopnja čistosti: >99% vrha v HPLC-UV, pri  $\lambda=254$  nm pripada učinkovini
- nilotinib: ekstrahiran iz tablet z vročim etanolom in iz etanola prekristaliziran; stopnja čistosti: >99% vrha v HPLC-UV, pri  $\lambda=254$  nm pripada učinkovini
- bosutinib: stopnja čistosti: >99%; LC Laboratories, ZDA
- furosemid: stopnja čistosti:  $\geq 98$  %; Sigma Aldrich, Nemčija
- natrijev hidrogenkarbonat: stopnja čistosti: p.a.; Merck KGaA, Nemčija
- natrijev hidrogenfosfat monohidrat: stopnja čistosti: p.a.; Alkaloid, Makedonija
- dinatrijev hidrogenfosfat dihidrat: stopnja čistosti: p.a.; Merck KGaA, Nemčija
- natrijev klorid: stopnja čistosti: p.a.; Merck KGaA, Nemčija
- kalijev klorid: stopnja čistosti: p.a.; Carlo Erba Reagenti, Francija
- kalcijev klorid dihidrat: stopnja čistosti: p.a.; Merck KGaA, Nemčija
- magnezijev klorid heksahidrat: stopnja čistosti: p.a.; Riedel-de Haën, Nemčija
- humani albumin: 200mg/ml; Octapharma, Švica
- natrijev tauroholat: stopnja čistosti: p.a.; Sigma Aldrich, Nemčija
- lecitin E PC S: jajčni; Lipoid GMBH, Nemčija
- kalijev hidrogenfosfat: stopnja čistosti: p.a.; Kemika, Hrvaška
- glukoza: stopnja čistosti: p.a.; Sigma Aldrich, Nemčija
- manitol: stopnja čistosti: p.a.; Sigma Aldrich, Nemčija
- amonijev acetat: stopnja čistosti: p.a.; Merck KGaA, Nemčija
- orto-fosforjeva kislina, 85%: stopnja čistosti: p.a.; Merck KGaA, Nemčija
- očetna kislina, 100%: stopnja čistosti: p.a.; Merck KGaA, Nemčija
- amoniak, 25%: stopnja čistosti: p.a.; POCH SA, Poljska

### 3.2 Preizkušan laboratorijski material

- mikrotitrne ploščice s 96 luknjicami (polipropilen); Agilent Technologies, ZDA
- mikroeprevete 1,5 mL (polietilen); Brand GmbH + Co KG, Nemčija

- steklene vialo 1,5 mL; SMI-LabHut Ltd., Velika Britanija

### 3.3 Raztopine

#### *Ringerjev pufer; pH 7,4*

Sestava: 4,2 g  $\text{NaHCO}_3$ , 0,11 g  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \times \text{H}_2\text{O}$ , 13,082 g  $\text{NaCl}$ , 0,746 g  $\text{KCl}$ , 0,352 g  $\text{CaCl}_2 \times 2\text{H}_2\text{O}$ , 0,488 g  $\text{MgCl}_2 \times 6\text{H}_2\text{O}$ , 0,569 g  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$ .

Priprava: 2-litrsko bučo napolnimo z bidestilirano vodo do približno treh četrtin oznake, jo opremimo z magnetom in postavimo na mešalo. Nato postopoma po predpisanem zaporedju dodajamo navedene soli. Raztopina naj se tekom priprave ves čas meša. Na koncu dopolnimo z bidestilirano vodo do 2 L.

#### *PBS*

Sestava: 8 g  $\text{NaCl}$ , 0,2 g  $\text{KCl}$ , 1,44 g  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , 0,24 g  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ .

Priprava: V 1-litrsko bučo natočimo približno 800 mL bidestilirane vode. Bučo opremimo z magnetnim mešalom ter jo postavimo na mešalo. V predpisanem zaporedju dodamo navedene soli. Raztopina naj se tekom priprave ves čas meša. Po raztopitvi soli raztopini s  $\text{HCl}$  ali  $\text{NaOH}$  nastavimo pH na 7,4. Nato dodamo bidestilirano vodo do 1 L.

#### *Brezfosfatni Ringerjev pufer*

Sestava: 2,1 g  $\text{NaHCO}_3$ , 6,541 g  $\text{NaCl}$ , 0,373 g  $\text{KCl}$ , 0,176 g  $\text{CaCl}_2 \times 2\text{H}_2\text{O}$ , 0,244 g  $\text{MgCl}_2 \times 6\text{H}_2\text{O}$ .

Priprava: 1-litrsko bučo napolnimo z bidestilirano vodo do približno treh četrtin oznake, jo opremimo z magnetnim mešalom in postavimo na mešalo. Nato postopoma po predpisanem zaporedju dodajamo navedene soli. Pozorni smo, da vsako naslednjo dodamo šele, ko se je predhodna popolnoma raztopila. Raztopina naj se tekom priprave ves čas meša. Nato dopolnimo z bidestilirano vodo do 1 L in raztopino preprihomo s karbogenom (95:5 =  $\text{O}_2:\text{CO}_2$ ). Raztopini pomerimo pH, ki mora biti približno 7.

#### *625 mM glukoza*

2,815 g glukoze raztopimo v 25 mL bidestilirane vode.

*625 mM manitol*

2,850 g manitola raztopimo v 25 mL bidestilirane vode.

*10 mM raztopina glukoze/manitola v Ringerjevemu pufru*

1600  $\mu$ L 625 mM raztopine glukoze/manitola damo v 100-mililitersko bučko in dopolnimo z Ringerjevim pufrom do 100 mL.

*100  $\mu$ M dasatinib/nilotinib/bosutinib v Ringerjevemu pufru s tauroholatom in lecitinom*

V mikroepruveto natehtamo 50 mg lecitina in 200 mg natrijevega tauroholata ter ju dispergiramo v 1 mL etanola. V drugo mikroepruveto natehtamo približno 4 mg dasatiniba, nilotiniba ali bosutiniba ter natehti dodamo ustrezen volumen disperzije tauroholata in lecitina v etanolu, tako da je koncentracija učinkovine 10 mmol/l. 250 $\mu$ L te disperzije odpipetiramo v 25-mililitersko bučko in dopolnimo z Ringerjevim pufrom do oznake.

*Ringerjev pufer z 1% albuminov*

V 25-mililitersko bučko odpipetiramo 1,25 mL 200mg/mL raztopine humanega albumina ter bučko dopolnimo z Ringerjevim pufrom do oznake.

*Ringerjev pufer z 2% etanola*

V 25-mililitersko bučko odpipetiramo 500  $\mu$ L etanola in dopolnimo z Ringerjevim pufrom do oznake.

*Osnovna 10 mM raztopina dasatiniba*

4,9 mg dasatiniba raztopimo v 1 mL DMSO:etanol (1:1).

*Osnovna 10 mM raztopina nilotiniba*

5,3 mg dasatiniba raztopimo v 1 mL DMSO:etanol (1:1).

*Osnovna 10 mM raztopina bosutiniba*

5,3 mg dasatiniba raztopimo v 1 mL DMSO:etanol (1:1).

*Osnovna 20 mM raztopina furosemida*

6,62 mg furosemida raztopimo v 1 mL etanola.

*Amonijev acetat, pH 5,0*

Steklenico opremimo z magnetom in jo napolnimo z 1 L bidestilirane vode. Steklenico postavimo na mešalo in dodamo 3,85 g amonijevega acetata. Raztopini izmerimo pH in ga s 100% očetno kislino umerimo na 5,0.

*Amonijev fosfat, pH 7,0*

Steklenico opremimo z magnetom in jo napolnimo z 1 L bidestilirane vode. Steklenico postavimo na mešalo in dodamo 2,5 mL ortofosforjeve kisline. Raztopini izmerimo pH in ga z amonijakom umerimo na 7,0.

*Amonijev fosfat, pH 3,0*

Postopek je enak kot za »Amonijev fosfat, pH 7,0«, le da pH umerimo na 3,0.

### 3.4 Določanje okvirne topnosti

Okvirno topnost učinkovin v različnih medijih smo preverjali na način, kot je opisano v metodi za določanje bistrosti raztopin po Ph.Eur (2.2.1.). Določali smo bistrost raztopin učinkovin različnih koncentracij v različnih medijih. Pri tem smo pripravili raztopine v identičnih vialah iz brezbarvnega, prosojnega stekla. Najmanj 5 minut po pripravi raztopine, smo jo primerjali z vzorcem vode v enaki viali, na dnevni svetlobi ali pod lučjo, tako da smo gledali proti črnemu ozadju. Raztopino smo ocenili kot bistro, če je bila bistrost enaka vodi. Najprej smo poiskali topilo, v katerem je bila topna 10mM učinkovina, nato pa smo to raztopino redčili do 100  $\mu\text{mol/L}$  v nadaljnjih topilih primernih za uporabo v *in vitro* testu določanja permeabilnosti na podganjem črevesu. Za preizkus topnosti 10  $\mu\text{M}$  raztopine smo osnovno 10 mM raztopino najprej redčili 10-krat v istem topilu, nato pa še 100-krat v preiskovanem topilu. Na enak način smo preizkušali topnost 1  $\mu\text{M}$  raztopine, le da smo v prvem koraku s topilom osnovne raztopine redčili 100-krat.

V primeru, da zaradi zelo nizkih koncentracij ali obarvanih raztopin bistrosti s prostim očesom nismo mogli določiti, smo raztopino centrifugirali, nato pa supernatant 10-krat redčili v 2% etanolu v Ringerjevemu pufru. Raztopinam smo nato pomerili odziv s HPLC in jim na podlagi odzivov referenčnih raztopin določili koncentracijo ter ocenili koliko učinkovine se je v preiskovanem topilu raztopilo.



## 3.5 Določanje nespecifične vezave na vsebnike za vzorčenje

### 3.5.1 Priprava raztopin

Vse raztopine učinkovin smo pripravili sveže na dan poskusa. Do uporabe smo jih hranili v steklenih bučkah. 100 $\mu$ M referenčne raztopine smo pripravili tako, da smo osnovno raztopino 100-krat redčili s posameznim topilom. Za pripravo 1  $\mu$ M referenčnih raztopin smo osnovno raztopino najprej 100-krat redčili z DMSO:etanol (1:1), nato pa še 100-krat redčili s posameznim topilom. Vezavo učinkovin na laboratorijske materiale, ki smo jih uporabljali pri meritvah permeabilnosti, smo za vsako učinkovino izvajali v 4 različnih raztopinah. Koncentracija in sestava raztopin je bila izbrana glede na predvidene potrebe pri poskusih permeabilnosti. Raztopine v katerih smo izvajali poskus vezave, so našteje v spodnji preglednici.

Preglednica I: Seznam raztopin v katerih smo preizkušali vezavo

DASATINIB	
koncentracija	preskušana raztopina
100 $\mu$ M	Ringerjev pufer
	Ringerjev pufer z 1% albuminov
1 $\mu$ M	Ringerjev pufer
	Ringerjev pufer z 1% albuminov
NILOTINIB	
koncentracija	preskušana raztopina
100 $\mu$ M	Ringerjev pufer s tauroholatom in lecitinom
	Ringerjev pufer z 1% albuminov
1 $\mu$ M	Ringerjev pufer z 2% etanola
	Ringerjev pufer z 1% albuminov
BOSUTINIB	
koncentracija	preskušana raztopina
100 $\mu$ M	Ringerjev pufer s tauroholatom in lecitinom
	Ringerjev pufer z 1% albuminov
1 $\mu$ M	Ringerjev pufer z 2% etanola
	Ringerjev pufer z 1% albuminov

### 3.5.2 Postopek določanja nespecifične vezave

Določali smo vezavo na tri različne vsebnike: polipropilenske (PP) mikrotiterske ploščice, mikroepruvete (epice) in steklene viale.

Izvajali smo 3 paralelne teste. Prvi volumen, ki smo ga odpipetirali v rumeni nastavek, smo zavrgli, da bi se izognili morebitnim izgubam zaradi vezave na nastavek. 600  $\mu\text{L}$  referenčne raztopine smo najprej odpipetirali v vialo namenjeno za analizo. Ta vzorec je predstavljal začetno koncentracijo referenčne raztopine. Nato smo odpipetirali 800  $\mu\text{L}$  referenčne raztopine v posamezni testni vsebnik/luknjico testne ploščice. Z istim nastavkom v razmaku 10 min smo še trikrat prepipetirali istih 800  $\mu\text{L}$  raztopine iz predhodnega v nov vsebnik/luknjico. Po 10 min v zadnjem vsebniku/luknjici smo odpipetirali 600  $\mu\text{L}$  končne raztopine v vialo namenjeno za analizo.

## 3.6 Potek poskusa permeabilnosti na podganjem črevu in vitro

Za merjenje permeabilnosti dasatiniba, nilotiniba in bosutinba na podganjem črevu smo uporabili modificirane dvoprostorne difuzijske celice tipa Sweetana Grass; Easy mount. Volumen posamezne difuzijske celice znaša 2,5 mL, površina tkiva pa je  $1\text{cm}^2$ .

### 3.6.1 Priprava tkiva

Med transportom in pripravo tkiva smo podganje črevo hranili v 10 mM raztopini glukoze v ledeno hladnem Ringerjevem puftru, s stalnim dovodom zmesi karbogene ( $\text{O}_2:\text{CO}_2=95:5$ ). Črevo smo najprej razrezali na meji med tankim in debelim črevesom. Iz obeh delov črevesa smo nato s hladnim Ringerjevim pufrom sprali luminalno vsebino. Tanko črevo smo razrezali po posameznih segmentih na podlagi znanih dolžin regij v prebavni cevi pri podganah. Posamezne segmente tankega črevesa in debelo črevo smo razrezali na približno 3 cm dolge dele, pri čemer smo se izogibali Peyerjevim ploščam, ter jih nato odprli vzdolž mezenterija. Pri razrezu smo bili pozorni na to, da smo uporabili osrednje dele segmentov, za katere lahko z veliko gotovostjo trdimo, da odražajo lastnosti, značilne za obravnavan segment črevesa. Razrezane dele smo previdno vpeli med dve akrilni ploščici Sweetana Grass difuzijske celice in jih vstavili med oba prostora tako, da je bila mukozna oz.

apikalna stran črevesa obrnjena proti levi in serozna oz. bazolateralna stran proti desni. Oba prostora difuzijskih celic smo takoj za tem napolnili z inkubacijskim medijem.

Pri poskusu z dasatinibom je bil medij na donorski strani Ringerjev pufer, na akceptorski strani pa Ringerjev pufer z 1% etanola. Na mukozni strani je medij vseboval še 10mM manitol, na serozni strani pa 10mM glukozo. Glede na preučevan proces (absorpcija ali sekrecija) sta bila akceptorski in donorski medij razvrščena na ustrezno mukozno ali serozno stran. Pri poskusu z bosutinbom in nilotinibom smo bili na donorski strani, zaradi njune slabe topnosti primorani uporabiti Ringerjev pufer s tauroholatom in lecitinom. Akceptorski medij je bil pri tem Ringerjev pufer z 2% etanola. Ker je uporabljeni medij toksičen, če ga dodamo na serozno stran tkiva, smo lahko opazovali le prehod učinkovine z mukozne strani na serozno. Medij na donorski oz. mukozni strani je vseboval še 10 mM manitol, medij na akceptorski oz. serozni strani pa 10 mM glukozo.

Vitalnost tkiva je bilo potrebno tekom poskusa skrbno vzdrževati. S termostatom povezanim s celicami smo ohranjali temperaturo raztopin med 36 in 37°C, stalni dovod karbogenea ( $O_2:CO_2=95:5$ ) pa je omogočal pomembno oksigenacijo tkiva, ustrezno mešanje raztopin ter vzdrževal pH vrednost bikarbonatnega pufru. Po 30-minutni stabilizaciji tkiva v *in vitro* pogojih smo na donorsko stran dodali preučevano učinkovino v obliki 10mM osnovne raztopine v DMSO:etanol (1:1). Z začetkom poskusa je tako donorska raztopina vsebovala učinkovino v koncentraciji 100  $\mu\text{mol/L}$ , medtem ko je bila akceptorska raztopina brez učinkovine. Pri poskusu z nilotinibom in bosutinibom smo v donorsko raztopino dodali še 25  $\mu\text{L}$  20 mM internega standarda furosemda v etanolu.

### 3.6.2 Elektrofiziološki parametri in vitalnost tkiva

Potencial smo pred vstavitvijo tkiva nastavili na 0 in s tem izničili potencial zunanjih dejavnikov in upor tekočine (17). Transepitelijski potencial (v mV) in kratkostični tok (v  $\mu\text{A}$ ) smo spremljali pred začetkom in tekom poskusa, pred vsakim vzorčenjem. Iz zbranih podatkov smo na podlagi Ohmovega zakona po enačbi 1 izračunali transepitelijski električni upor (TEER v  $\Omega \times \text{cm}^2$ ), ki je merilo integritete tkiva. Izračunani TEER predstavlja skupen upor tkiva, na katerega vplivata skupna površina epitelijske ter upor posameznih celic in tesnih stikov. S trajanjem poskusa se celotna epitelijska površina zmanjšuje, tesni stiki pa se rahljajo. Rezultat vsote obeh pojavov je sprememba integritete tkiva (29). Vitalnosti tkiva na koncu poskusa smo okarakterizirali na podlagi dviga

potenciala ob dodatku 100  $\mu\text{L}$  645 mM glukoze na mukozno stran, ki kaže zmožnosti tkiva za kotransport  $\text{Na}^+$  in glukoze.

$$TEER[\Omega \times \text{cm}^2] = \frac{Pd[\text{mV}] \cdot 1000}{Isc[\mu\text{A}]}$$

### *Enačba 1*

Da bi se izognili lažni visoki permeabilnosti zaradi zmanjšane vitalnosti tkiva in/ali poškodb tkiva, smo pridobljene podatke o prehodu učinkovine skozi tkivo v posamezni difuzijski celici upoštevali le v časovnem intervalu, ko je bila vitalnost tkiva dobra. Kot kriterije sposobnosti tkiva za transport učinkovine smo upoštevali vrednosti potencialov, TEER in dvig potenciala ob dodatku glukoze. Kjer se je absolutna vrednost potenciala po dodatku glukoze dvignila za najmanj 0,2 mV, kar je nakazovalo na živost tkiva tudi na koncu, smo obravnavali vse podatke celotnega poskusa iz difuzijske celice. V serijah, kjer tkivo na koncu poskusa ni bilo več živo, pa smo izključili podatke od vzorčenja, ko je potencial padel pod 1 mV in je bil hkrati opažen padec TEER pod  $20 \Omega \times \text{cm}^2$ , dalje.

### 3.6.3 Vzorčenje ter določanje $P_{app}$

Glede na pogosto hiter upad vitalnosti tkiva smo se odločili za dolžino poskusa 120min. Vzorčili smo z akceptorske strani vsakih 20 min, kar je na koncu nanese 6 vzorcev v enem nizu, ki smo jih shranili za nadaljnjo analizo. Volumen vzorčenja je znašal 250  $\mu\text{L}$ , le tega pa smo po vsakem vzorčenju v primeru dasatiniba nadomestili z enakim volumnom raztopine Ringerjevega pufru z 1% etanola in 10 mM glukozo oz. manitolom (odvisno od tega, ali se je akceptorska raztopina nahajala na mukozni ali serozni strani). Pri poskusu z nilotinibom ali bosutinibom smo izgubljeni volumen nadomestili z Ringerjevim pufrom z 2% etanolom in 10 mM glukozo. Pred prvim in pred zadnjim vzorčenjem akceptorske raztopine smo vzorčili tudi 50  $\mu\text{L}$  donorske raztopine in jo pred analizo 10-krat redčili z vodo. Vzorcem akceptorskih in donorskih raztopin smo s HPLC določili vsebnost preiskovane učinkovine.

Permeabilnostni koeficient ( $P_{app}$ ) smo izračunali na podlagi naraščajoče množine učinkovine na akceptorski strani. Množino učinkovine, ki preide skozi membrano v časovni enoti ( $Q_t$ ) smo izračunali iz izmerjenih koncentracij v posameznih časovnih točkah

( $C_t$ ) s pomočjo enačbe 2 v kateri je  $V_A$  volumen akceptorske raztopine,  $V_s$  volumen vzorca,  $C_i$  pa so koncentracije izmerjene v prejšnjih vzorcih.

$$Q_t = \left( \sum_{i=1}^{N-1} V_s \cdot C_i \right) + C_t \cdot V_A$$

*Enačba 2*

S pomočjo linearne regresije smo določili naklon ( $k_d$ ) premice  $Q_t$  v odvisnosti od časa, ki smo ga nato uporabili za izračun pretoka ( $J$ ) po enačbi 3, kjer predstavlja  $A$  površino tkiva na voljo za difuzijo. Na podlagi pretoka smo s pomočjo enačbe 4 izračunali  $P_{app}$ . Za koncentracijo donorske raztopine ( $C_d$ ) smo uporabili povprečje začetnih donorskih koncentracij, ki so bile izmerjene v tem poskusu. Za obdelavo podatkov smo uporabljali program Microsoft Office Excel 2007.

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

*Enačba 3*

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

*Enačba 4*

### 3.7 Analizne metode

Metode za analizo vzorcev po poskusih nespecifične vezave na vsebnike in po poskusih ugotavljanja permeabilnosti se niso razlikovale. Vzorce smo analizirali s pomočjo HPLC z detektorjem z nizom diod. Uporabljena je bila kolona Kinetex 2,6 $\mu$  XB-C18, velikosti 30  $\times$  2,10 mm.

Z izjemo vzorcev v 1% raztopini serumskih albuminov, so bili vzorci takoj po poskusu pripravljene za analizo. Vzorce z albumini smo v razmerju 1:3 oborili z ledenomrzlim metanolom ter jih čez noč shranili na temperaturi -20°C. Naslednji dan smo vzorce 10 min centrifugirali pri 4°C in 16000 g. Supernatant smo nato odpipetirali in ga v primeru dasatiniba 4-krat redčili z vodo, nilotinib in bosutinib pa smo z vodo redčili 2-krat. Vzorce bosutiniba smo nato zaradi previsokega deleža metanola glede na delež organske faze v mobilni fazi, z vodo redčili še 2-krat. Tako pripravljene vzorce smo analizirali s HPLC.

Iz površin odzivov smo s pomočjo umeritvene krivulje izračunali koncentracije vzorcev. Za umeritveno krivuljo smo na dan poskusa pripravili 10 standardnih raztopin posamezne

učinkovine v koncentracijah od 0,02 do 20  $\mu\text{mol/L}$ . Raztopinam znanih koncentracij smo nato izmerili odzive na HPLC. Za izračun enačbe premice odziva v odvisnosti od koncentracije (umeritvene krivulje) smo uporabili le odzive v velikostnem območju odzivov izmerjenih vzorcev.

Preglednica II: Analizni parametri pri določevanju dasatiniba

pretok	T	vodna faza	organska faza	gradient organske faze		$\lambda$	$t_R$
				0 min	15,0 %		
1,4 mL/min	50 °C	amonijev acetat, pH 5,0	acetonitril	1,5 min	50,0 %	320 nm	1,2 min
				2,0 min	50,0 %		
				$V_{inj}$			
Določanje permeabilnosti			100 $\mu\text{L}$				
Določanje vezave			5 $\mu\text{L}$				

Preglednica III: Analizni parametri pri določevanju nilotiniba

pretok	T	vodna faza	organska faza	gradient organske faze		$\lambda$	$t_R$
				0 min	35,0 %		
1,4 mL/min	50 °C	amonijev fosfat, pH 7,0	acetonitril	1,5 min	65,0 %	260 nm	1,2 min
				$V_{inj}$			
Določanje permeabilnosti			100 $\mu\text{L}$				
Določanje vezave			5 $\mu\text{L}$				

Preglednica IV: Analizni parametri pri določevanju bosutiniba

pretok	T	vodna faza	organska faza	gradient organske faze		$\lambda$	$t_R$
				0 min	15,0 %		
1,5 mL/min	50 °C	amonijev fosfat, pH 3,0	acetonitril	2,0 min	50,0 %	266 nm	1,2 min
				$V_{inj}$			
Določanje permeabilnosti			100 $\mu\text{L}$				
Določanje vezave			5 $\mu\text{L}$				

Preglednica V: Analizni parametri vzorcev, ki so vsebovali bosutinib in furosemid

pretok	T	vodna faza	organska faza	gradient organske faze		V <sub>inj</sub>
1,4 mL/min	50 °C	amonijev fosfat, pH 3,0	acetonitril	0 min	10 %	100 µL
				0,2 min	10 %	
				3 min	50%	
				4 min	70%	
spojina	λ	t <sub>R</sub>				
bosutinib	266 nm	2,1 min				
furosemid	274 nm	1,9 min				

Preglednica VI: Analizni parametri vzorcev, ki so vsebovali nilotinib in furosemid

nilotinib								
pretok	T	vodna faza	organska faza	gradient organske faze		λ	t <sub>R</sub>	V <sub>inj</sub>
1,4 mL/min	50 °C	amonijev fosfat, pH 7,0	acetonitril	0 min	35,0 %	260 nm	1,2 min	100 µL
				1,5 min	65,0 %			
furosemid								
pretok	T	vodna faza	organska faza	gradient organske faze		λ	t <sub>R</sub>	V <sub>inj</sub>
1,4 mL/min	50 °C	amonijev fosfat, pH 3,0	acetonitril	0 min	10 %	274 nm	1,9 min	100 µL
				0,2 min	10 %			
				3 min	50%			
				4 min	70%			

### 3.8 Statistična obdelava podatkov

Podatke, pridobljene z *in vitro* poskusom permeabilnosti na podganjem črevesu smo statistično ovrednotili. Razlike med prehodom v M-S smeri (z mukozne na serozno stran tkiva) in prehodom v S-M smeri (z serozne na mukozno stran tkiva) smo vrednotili s F-testom in Studentovim t-testom ter z efluksnim razmerjem. Efluksno razmerje (označeno z *R*) predstavlja merilo celokupnega prehoda čez črevesno sluznico in je razmerje med povprečnim P<sub>app</sub> prehoda v smeri s serozne na mukozno stran in P<sub>app</sub> prehoda z mukozne na serozno stran (enačba 5).

$$R = \frac{P_{app}(S-M)}{P_{app}(M-S)}$$

*Enačba 5*

Zanimale so nas tudi razlike v procesu absorpcije med različnimi regijami v črevesu. S F-testom in Studentovim t-testom smo preverili, ali so razlike med regijami značilne. Podatke smo statistično obdelovali s programom Microsoft Office Excel 2007. Uporabljen kriterij za značilnost razlike je bil  $p < 0,05$  ( $\alpha = 0,05$ ).

Za statistično vrednotenje smo postavili hipotezo o enakosti aritmetičnih sredin ( $\bar{x}$  in  $\bar{y}$ ) permeabilnostnih koeficientov ( $P_{app}$ ):

$$H_0: \bar{x} = \bar{y}$$

$$H_1: \bar{x} \neq \bar{y}$$

Da bi vedeli kateri t-test uporabiti, smo s F-testom najprej ugotavljali ali se varianci med dvema skupinama vzorcev razlikujeta. Postavili smo ničelno hipotezo, ki pravi, da se varianci dveh skupin vzorcev ne razlikujeta in alternativno hipotezo, ki pravi, da se varianci razlikujeta. Variance so bile izračunane po enačbi 6, F-test pa je bil izveden po enačbi 7. Pri tem  $s^2$  predstavlja varianco,  $x_i$  posamezen izmerjen  $P_{app}$  in  $n$  velikost vzorca.

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

*Enačba 6*

$$F = \frac{s_x^2}{s_y^2}$$

*Enačba 7*

Če je bil eksperimentalni F ( $F_{exp}$ ) manjši od tabelarnega ( $F_{tab}$ ) oz. je bila izračunana verjetnost ( $p$ ) večja od kriterija  $\alpha = 0,05$ , ničelne hipoteze nismo zavrnili in smo privzeli, da sta varianci enaki. V tem primeru smo za ugotavljanje enakosti aritmetičnih sredin uporabili Studentov t-test za enake variance in uporabili naslednjo enačbo:

$$t = \frac{\bar{x} - \bar{y}}{s} \sqrt{\frac{mn}{m+n}}$$

*Enačba 8*



Če smo ugotovili, da je  $F_{exp}$  večji od  $F_{tab}$  in je  $p < \alpha$ , smo ničelno hipotezo zavrnili in privzeli, da sta varianci različni. V tem primeru smo uporabili Studentov t-test za različne variance in računali po enačbi 9. Pri enačbah 7, 8 in 9 sta  $m$  in  $n$  velikosti vzorcev  $x$  in  $y$ ,  $s_x^2$  in  $s_y^2$  njuni varianci,  $\bar{x}$  in  $\bar{y}$  pa sta povprečji vzorcev.

$$t = \frac{\bar{x} - \bar{y}}{\sqrt{\frac{s_x^2}{m} + \frac{s_y^2}{n}}}$$

#### *Enačba 9*

V primeru, da je bil  $t_{exp}$  manjši od  $t_{tab}$  in  $p$  večji od  $\alpha$ , smo ničelno hipotezo o enakosti aritmetičnih sredin sprejeli in s tem ugotovili, da se povprečja  $P_{app}$  med preiskovanimi regijami ali smerjo prehoda ne razlikujejo značilno. Nasprotno smo razlike med  $P_{app}$  lahko potrdili, kadar je bila izračunana verjetnost manjša od  $\alpha$ , kar pomeni da je bil  $t_{exp}$  večji od  $t_{tab}$ .

## 4 Rezultati

### 4.1 Topnost

Da bi lahko izvedli poskus permeabilnosti, smo morali najprej ugotoviti, v katerem topilu je posamezna učinkovina topna. Preverjali smo topnost v topilih in v koncentracijah, ki so bile uporabne za nadaljnje poskuse.

#### 4.1.1 Nilotinib

Za začetek smo potrebovali topilo, v katerem je nilotinib topen v koncentraciji 10 mmol/L, za pripravo osnovne raztopine, ki bi jo lahko dalje redčili. Ugotovili smo, da v etanolu nilotinib ni dovolj topen, zato smo preizkusili mešanico topil DMSO:etanol v razmerju 1:1. V tem topilu se je učinkovina raztopila.

Osnovno 10mM raztopino nilotiniba v DMSO:etanol (1:1) smo redčili s topili, ki bi bila primerna za *in vitro* poskus na podganjem črevesu. V preglednici VII so predstavljeni rezultati topnosti v preizkušanih topilih pri koncentracijah nilotiniba, ki so bile za nas pomembne. Prazna polja v preglednici pomenijo, da topnosti pri tej koncentraciji nismo preverjali, navadno iz razloga, ker topilo za nas ni bilo več zanimivo.

Preglednica VII: Topnost nilotiniba v preizkušenih topilih

Topilo	Bistrost 100 $\mu$ M raztopine učinkovine	Bistrost 10 $\mu$ M raztopine učinkovine	Bistrost 1 $\mu$ M raztopine učinkovine
Voda z 1% EtOH	ne		da
Voda z 2% EtOH	da		da
Ringerjev p. z 2% EtOH	ne		
Voda z 1% (DMSO:EtOH =1:1)	ne	da	da
Ringerjev p. z 1% (DMSO:EtOH =1:1)	ne	ne	ne
Ringerjev p. z 2% EtOH in 1% (DMSO:EtOH =1:1)			da
Brezfosfatni Ringerjev pufer, pH=7,4 z 1% (DMSO:EtOH =1:1)	ne	ne	
PBS z 10% MeOH in 1% (DMSO:EtOH =1:1)	ne		
PBS z 20% MeOH in 1% (DMSO:EtOH =1:1)	ne		
Ringerjev p. s tauroholatom in lecitinom z 1% (DMSO:EtOH =1:1)	da	da	da
Ringerjev p. z 1% albuminov	da	da	da

#### 4.1.2 Dasatinib

Pri iskanju topila za osnovno 10 mM raztopino smo ugotovili, da v etanolu dasatinib v tej koncentraciji ni topen. Glede na šibko bazičnost učinkovine smo kot topilo preizkusili tudi 0,01M raztopino HCl, vendar se tudi tu dasatinib ni raztopil. Nazadnje smo spoznali, da se dasatinib, prav tako kot nilotinib topi v mešanici topil DMSO:etanol (1:1). Za osnovno raztopino smo torej izbrali 10 mM dasatinib v DMSO:etanol (1:1), ki smo ga dalje redčili s primernimi topili. Pri tem nam dasatinib ni povzročal težav, saj se je v vseh izbranih topilih topil že pri koncentraciji 100  $\mu$ mol/L. Rezultati topnosti v preizkušenih topilih so predstavljeni v preglednici VIII.

Preglednica VIII: Topnost dasatiniba v preizkušenih topilih

Topilo	Bistrost 100 $\mu$ M raztopine učinkovine
Voda z 1%( DMSO:EtOH =1:1)	da
Ringerjev p. z 1%( DMSO:EtOH =1:1)	da
PBS z 10% MeOH in 1% (DMSO:EtOH =1:1)	da
Ringerjev p. z 1% albuminov	da

### 4.3.1. Bosutinib

Kljub ugotovitvi, da je bosutinib v 10 mM koncentraciji topen tudi v etanolu, smo zaradi primerljivosti metod dela za osnovno raztopino izbrali 10 mM bosutinib v DMSO:etanol (1:1). Rezultati nadaljnjega redčenja so predstavljeni v preglednici IX. Prazna polja v preglednici pomenijo, da topnosti pri tej koncentraciji nismo preverjali.

Preglednica IX: Topnost bosutiniba v preizkušanih topilih

Topilo	Bistrost 100 $\mu$ m raztopine učinkovine	Bistrost 50 $\mu$ m raztopine učinkovine	Bistrost 1 $\mu$ m raztopine učinkovine
Voda z 1%( DMSO:EtOH =1:1)	da	da	da
Ringerjev p. z 1%( DMSO:EtOH =1:1)	ne	ne	
Ringerjev p. s tauroholatom in lecitinom z 1% (DMSO:EtOH =1:1)	da	da	da
Ringerjev p. z 1% albuminov	da	da	da
Ringerjev p. z 2% EtOH in 1% (DMSO:EtOH =1:1)			da

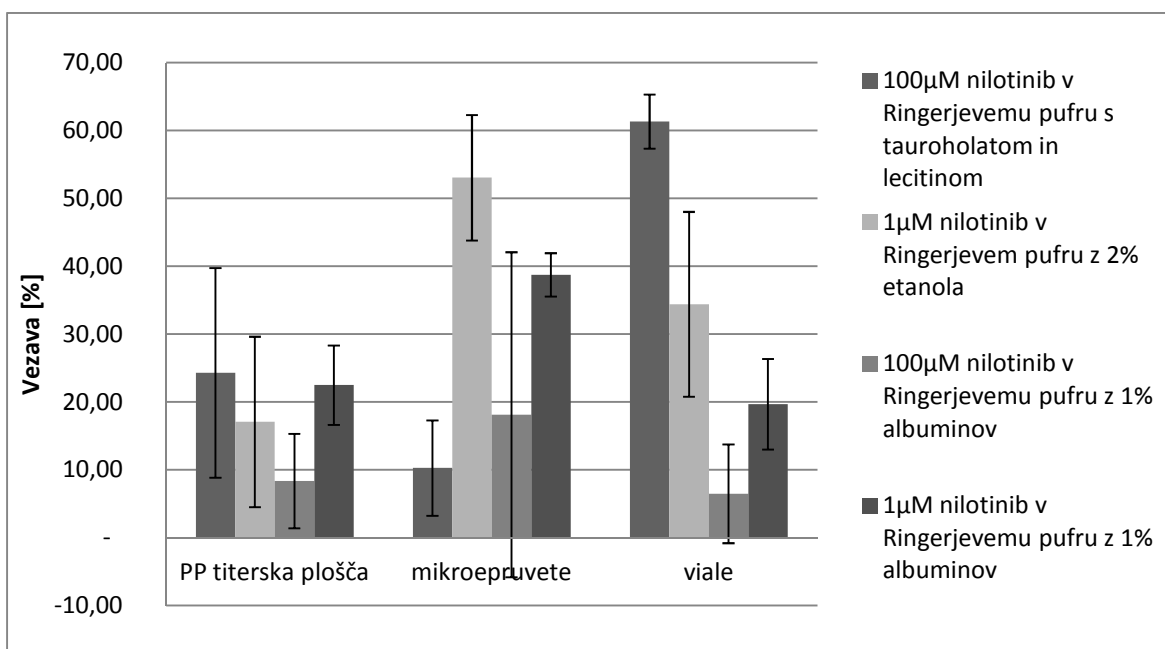
## 4.2 Nespecifična vezava na vsebnike za vzorčenje

V preglednicah X-XII smo predstavili delež vezave posamezne učinkovine v različnih koncentracijah in raztopinah na steno treh različnih vsebnikov ter standardni odklon treh paralelnih vzorcev. Preizkus smo izvajali v polipropilenski mikrotiterski ploščici, mikroprugetah (epicah) in steklenih vialah. Delež vezave predstavlja odstopanje koncentracij raztopin po 50-minutni inkubaciji v vsebnikih od začetne koncentracije. Rezultate smo prikazali tudi grafično (graf 1-3). Kot napako smo v grafu uporabili standardno napako aritmetične sredine.

## 4.2.1 Nilotinib

Preglednica X: Delež vezave nilotiniba v posameznih raztopinah in standardni odklon (SD)

		PP plošča	mikro- eprovete	viale
<b>100<math>\mu</math>M nilotinib v Ringerjevemu pufru s tauroholatom in lecitinom</b>	<b>odstopanje od začetne konc. [%]</b>	24	10	61
	<b>SD</b>	26	12	7
<b>1<math>\mu</math>M nilotinib v Ringerjevem pufru z 2% etanola</b>	<b>odstopanje od začetne konc. [%]</b>	17	53	34
	<b>SD</b>	22	16	24
<b>100<math>\mu</math>M nilotinib v Ringerjevemu pufru z 1% albuminov</b>	<b>odstopanje od začetne konc. [%]</b>	8	18	7
	<b>SD</b>	12	42	13
<b>1<math>\mu</math>M nilotinib v Ringerjevemu pufru z 1% albuminov</b>	<b>odstopanje od začetne konc. [%]</b>	23	39	20
	<b>SD</b>	10	6	12

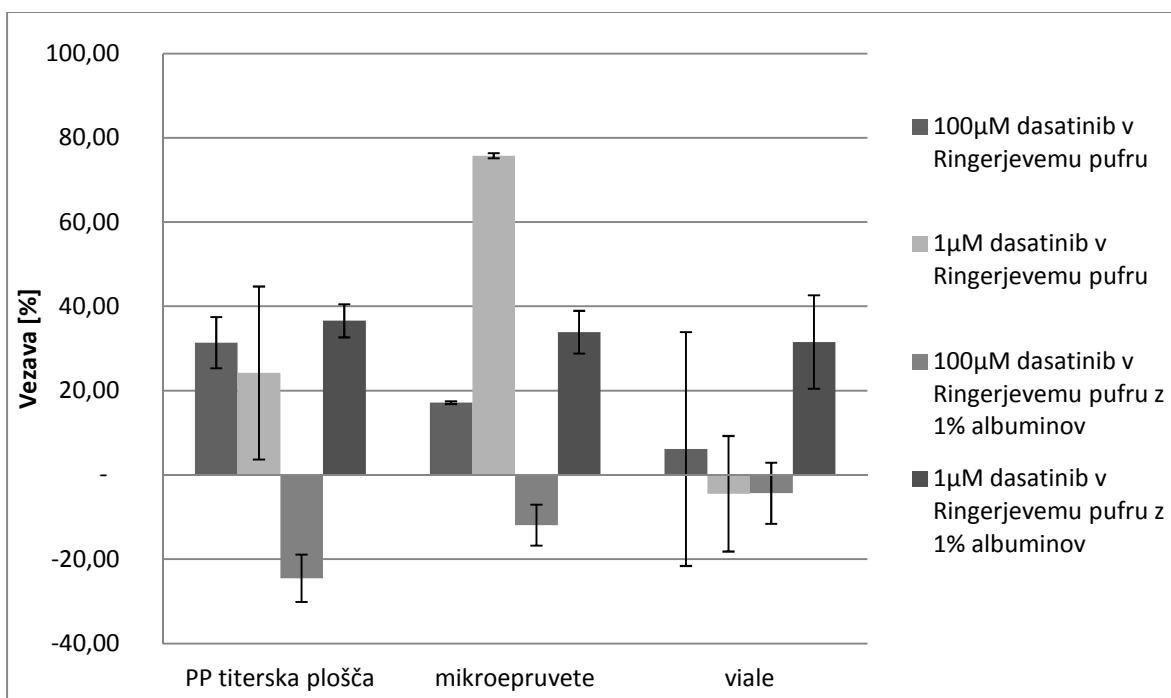


Graf 1: Delež vezave nilotiniba v posameznih raztopinah

## 4.2.2 Dasatinib

Preglednica XI: Delež vezave dasatiniba v posameznih raztopinah in standardni odklon (SD)

		PP plošča	mikro-epruvete	viale
<b>100<math>\mu</math>M dasatinib v Ringerjevemu pufu</b>	odstopanje od začetne konc. [%]	31	17	6
	SD	11	0,5	48
<b>1<math>\mu</math>M dasatinib v Ringerjevemu pufu</b>	odstopanje od začetne konc. [%]	24	76	-4
	SD	36	1	24
<b>100<math>\mu</math>M dasatinib v Ringerjevemu pufu z 1% albuminov</b>	odstopanje od začetne konc. [%]	-25	-12	-4
	SD	10	8	13
<b>1<math>\mu</math>M dasatinib v Ringerjevemu pufu z 1% albuminov</b>	odstopanje od začetne konc. [%]	37	34	32
	SD	7	9	19

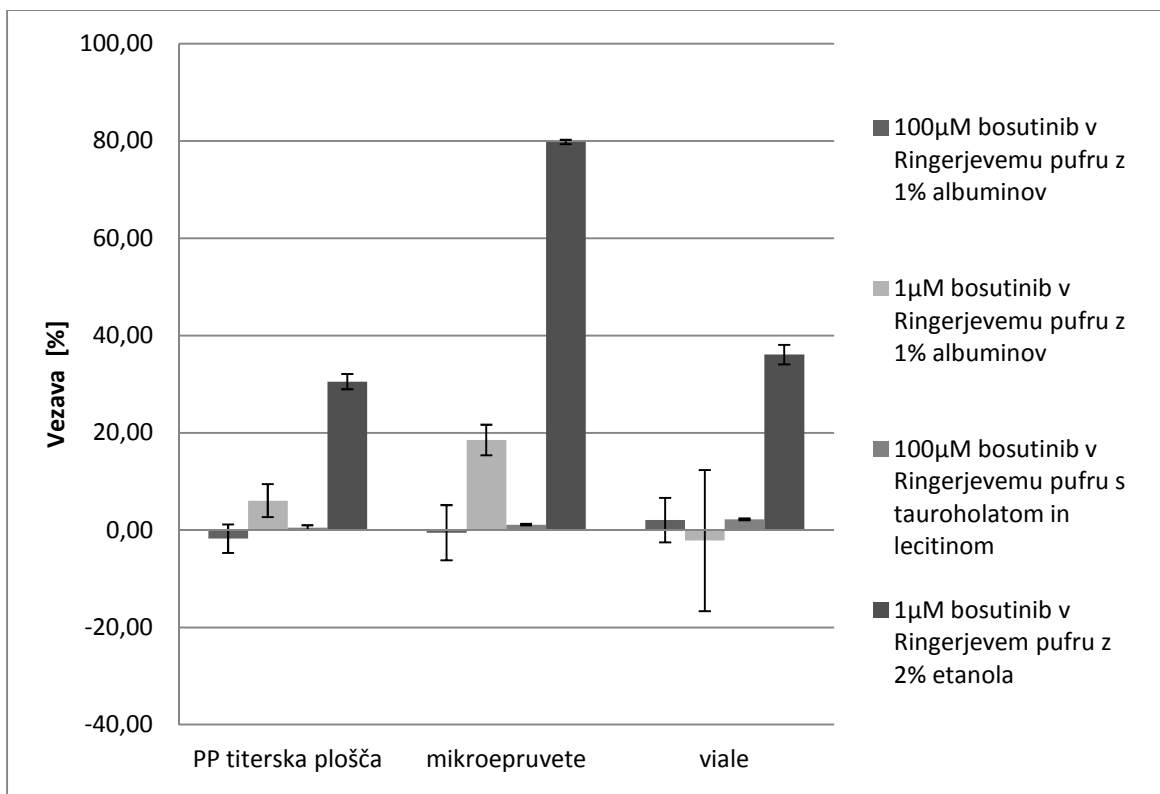


Graf 2: Delež vezave dasatiniba v posameznih raztopinah

## 4.2.3 Bosutinib

Preglednica XII: Delež vezave dasatiniba v posameznih raztopinah in standardni odklon (SD)

		PP plošča	mikro- epruvete	viale
<b>100<math>\mu</math>M bosutinib v Ringerjevemu pufru z 1% albuminov</b>	<b>odstopanje od začetne konc. [%]</b>	-2	-0,5	2
	<b>SD</b>	5	10	8
<b>1<math>\mu</math>M bosutinib v Ringerjevemu pufru z 1% albuminov</b>	<b>odstopanje od začetne konc. [%]</b>	6	19	-2
	<b>SD</b>	6	5	25
<b>100<math>\mu</math>M bosutinib v Ringerjevemu pufru s tauroholatom in lecitinom</b>	<b>odstopanje od začetne konc. [%]</b>	0,5	1	2
	<b>SD</b>	1	0,3	0,3
<b>1<math>\mu</math>M bosutinib v Ringerjevem pufru z 2% etanola</b>	<b>odstopanje od začetne konc. [%]</b>	31	80	36
	<b>SD</b>	3	1	3



Graf 3: Delež vezave bosutiniba v posameznih raztopinah

## 4.3 Permeabilnost

### 4.3.1 Dasatinib

*In vitro* poskus permeabilnosti smo najprej izvajali z dasatinibom, saj je bila od vseh treh učinkovin le ta topna v Ringerjevemu puftru, kar nam je omogočalo možnost preizkušanja prehoda učinkovine v M-S in S-M smeri. Zanimala nas je odvisnost permeabilnosti glede na različne regije črevesa (duodenum, jejunum, ileum in kolon). V preglednicah XIII - XVI so zbrani izračuni permeabilnostnih koeficientov po posameznih regijah iz 6 posameznih poskusov, ki smo jih izračunali na podlagi zbranih podatkov prehoda učinkovin čez tkiva, katera so ohranila dovolj dobro vitalnost. Zaradi različnega števila vzorcev smo v preglednicah in grafu navajali standardno napako aritmetične sredine (SEM). Povprečja in standardne napake permeabilnostnih koeficientov iz vsake regije ter opazovane smeri prehoda učinkovine so zbrani v preglednici XVII in predstavljeni v grafu 4.

Legenda oznak v preglednicah XIII do XVII:

$k_d$  – naklon premice  $Q_t(t)$  ( $Q_t$  je množina učinkovine, ki je v času  $t$  prešla skozi tkivo)

R – korelacijski koeficient premice  $Q_t(t)$

J – pretok učinkovine skozi tkivo

$P_{app}$  – navidezni permeabilnostni koeficient

AS – aritmetična sredina oz. povprečje

SEM – standardna napaka aritmetične sredine

S-M – prehod s serozne na mukozno stran tkiva oz. sekrecija

M-S – prehod z mukozne na serozno stran tkiva oz. absorpcija

Preglednica XIII: Zbrane stopnje izračunov permeabilnostnih koeficientov na duodenumu po posameznih paralelah

	Duodenum, M-S			
<b><math>k_d</math> [mol/h]</b>	2,34E-10	9,43E-11	6,60E-10	1,40E-10
<b>R</b>	0,987	1,000	0,998	0,985
<b>J [nmol/(h*cm<sup>2</sup>)]</b>	0,234	0,094	0,660	0,140
<b><math>P_{app}</math> [cm/s]</b>	7,68E-07	2,46E-07	6,40E-07	1,30E-07
<b><math>P_{app}[\times 10^{-6}</math> cm/s]</b>	0,77	0,25	0,64	0,13



<b>Duodenum, S-M</b>			
<b>k<sub>d</sub> [mol/h]</b>	2,00E-11	5,17E-10	1,90E-10
<b>R</b>	1,000	0,996	0,921
<b>J [nmol/(h*cm<sup>2</sup>)]</b>	0,020	0,517	0,190
<b>P<sub>app</sub> [cm/s]</b>	5,93E-08	1,35E-06	6,25E-07
<b>P<sub>app</sub>[×10<sup>-6</sup> cm/s]</b>	0,059	1,3	0,63

Preglednica XIV: Zbrane stopnje izračunov permeabilnostnih koeficientov na jejunum po posameznih paralelah

<b>Jejunum, M-S</b>						
<b>k<sub>d</sub> [mol/h]</b>	1,94E-10	2,98E-10	2,38E-10	4,10E-10	3,21E-10	5,06E-10
<b>R</b>	0,988	0,968	0,996	0,894	0,990	0,977
<b>J [nmol/(h*cm<sup>2</sup>)]</b>	0,194	0,298	0,238	0,410	0,321	0,506
<b>P<sub>app</sub> [cm/s]</b>	6,37E-07	9,81E-07	2,31E-07	3,98E-07	2,98E-07	4,70E-07
<b>P<sub>app</sub>[×10<sup>-6</sup> cm/s]</b>	0,64	0,98	0,23	0,40	0,30	0,47

<b>Jejunum, S-M</b>						
<b>k<sub>d</sub> [mol/h]</b>	3,25E-10	6,98E-10	4,05E-10	1,55E-10	2,87E-10	1,78E-10
<b>R</b>	0,989	0,991	0,957	0,893	0,964	0,930
<b>J [nmol/(h*cm<sup>2</sup>)]</b>	0,325	0,698	0,405	0,155	0,287	0,178
<b>P<sub>app</sub> [cm/s]</b>	2,91E-06	2,30E-06	1,33E-06	4,59E-07	2,78E-07	1,73E-07
<b>P<sub>app</sub>[×10<sup>-6</sup> cm/s]</b>	2,9	2,3	1,3	0,46	0,28	0,17

Preglednica XV: Zbrane stopnje izračunov permeabilnostnih koeficientov na ileumu po posameznih paralelah

<b>Ileum, M-S</b>				
<b>k<sub>d</sub> [mol/h]</b>	3,22E-10	5,60E-10	2,02E-10	7,39E-11
<b>R</b>	0,988	0,996	0,996	0,906
<b>J [nmol/(h*cm<sup>2</sup>)]</b>	0,322	0,560	0,202	0,074
<b>P<sub>app</sub> [cm/s]</b>	9,53E-07	7,39E-07	2,66E-07	2,43E-07
<b>P<sub>app</sub>[×10<sup>-6</sup> cm/s]</b>	0,95	0,74	0,27	0,24

<b>Ileum, S-M</b>			
<b>k<sub>d</sub> [mol/h]</b>	7,15E-10	1,50E-09	3,96E-09
<b>R</b>	0,985	0,976	0,957
<b>J [nmol/(h*cm<sup>2</sup>)]</b>	0,715	1,502	3,958
<b>P<sub>app</sub> [cm/s]</b>	2,12E-06	4,94E-06	5,22E-06
<b>P<sub>app</sub>[×10<sup>-6</sup> cm/s]</b>	2,1	4,9	5,2

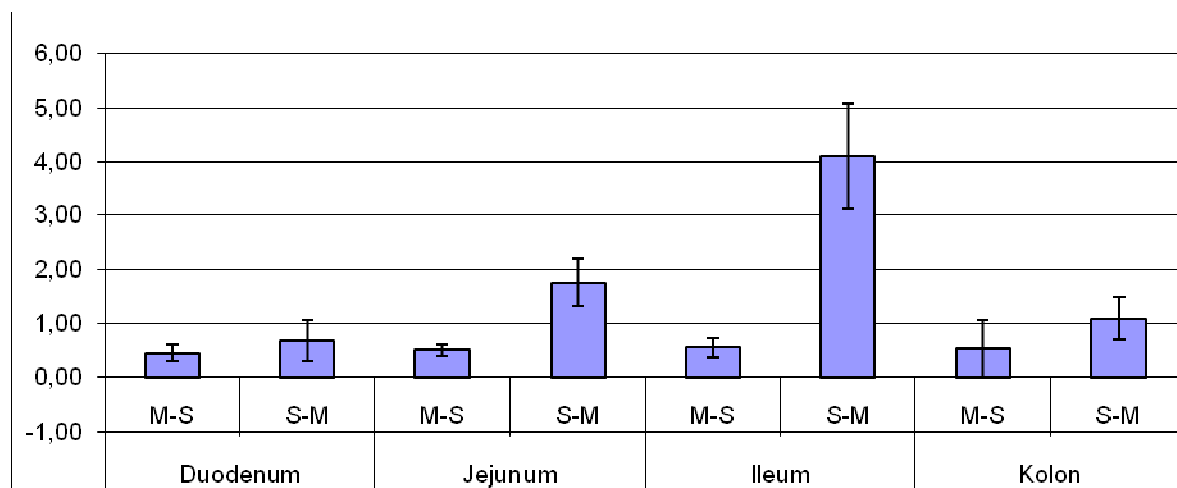
Preglednica XVI: Zbrane stopnje izračunov permeabilnostnih koeficientov na kolonu po posameznih paralelah. \* Pod mejo določitve (LOQ=0,1  $\mu$ M).

Kolon, M-S				
kd [mol/h]	6,20E-11	5,91E-10	0,00E+00	0,00E+00
R	0,583	0,993	/	/
J [nmol/(h*cm <sup>2</sup> )]	0,062	0,591	0,000	0,000
Papp [cm/s]	1,62E-07	1,94E-06	0,00E+00	0,00E+00
Papp[ $\times 10^{-6}$ cm/s]	0,16	1,9	0*	0*

Kolon, S-M			
kd [mol/h]	3,44E-10	2,11E-10	5,56E-10
R	0,955	0,995	0,996
J [nmol/(h*cm <sup>2</sup> )]	0,344	0,211	0,556
Papp [cm/s]	8,98E-07	5,50E-07	1,83E-06
Papp[ $\times 10^{-6}$ cm/s]	0,90	0,55	1,8

Preglednica XVII: Povprečne vrednosti in standardna napaka permeabilnostnih koeficientov ( $P_{app}$  [ $\times 10^{-6}$  cm/s]) dasatiniba v različnih regijah podganjega črevesa

Papp	Duodenum		Jejunum		Ileum		Kolon	
	M-S	S-M	M-S	S-M	M-S	S-M	M-S	S-M
AS [ $\times 10^{-6}$ cm/s]	0,45	0,68	0,50	1,75	0,55	4,09	0,53	1,09
SEM	0,15	0,37	0,11	0,44	0,18	0,99	0,54	0,38



Graf 4: Povprečne vrednosti permeabilnostnih koeficientov ( $P_{app}$  [ $\times 10^{-6}$  cm/s]) dasatiniba

Razlike med permeabilnostnimi koeficienti smo statistično ovrednotili. Primerjali smo permeabilnostne koeficiente izmerjene v obeh smereh skozi tanko črevo podgane po posameznih regijah (preglednica XVIII). Poleg tega nas je glede na opaženo povečanje permeabilnostnih koeficientov v jejunumu in ileumu zanimalo, ali se permeabilnostni koeficient v S-M smeri v jejunumu tudi statistično značilno razlikuje od tistih v duodenumu in kolonu (preglednica XIX) in ali se permeabilnostni koeficient v S-M smeri v ileumu značilno razlikuje od tistih izmerjenih v ostalih treh regijah črevesa (preglednica XX). V preglednicah XVIII do XX so predstavljene verjetnosti v povezavi s F-testom in Studentovim t-testom ter efluksno razmerje (R), ki je razmerje med povprečnim  $P_{app}$  prehoda v smeri s serozne na mukozno stran in  $P_{app}$  prehoda z mukozne na serozno stran. Oznaka Sig v preglednicah predstavlja značilno razliko, NSig pa pomeni, da razlika ni značilna.

Preglednica XVIII: Razlika med  $P_{app}$  v M-S in  $P_{app}$  v S-M smeri v posameznih regijah

<b>Razlika med M-S in S-M</b>				
	<b>Duodenum</b>	<b>Jejunum</b>	<b>Ileum</b>	<b>Kolon</b>
<b>R</b>	1,52	3,48	7,44	2,08
<b>F-test</b>	0,25	0,01	0,03	0,69
<b>T-test</b>	0,55	0,18	0,07	0,42
	NSig	NSig	Sig	NSig

Preglednica XIX: Primerjava  $P_{app}$  v S-M smeri v jejunumu s  $P_{app}$  v S-M smeri v duodenumu in kolonu

<b>Razlika jejunum, S-M z:</b>	<b>duodenum S-M</b>	<b>kolon S-M</b>
<b>F-test</b>	0,516	0,534
<b>T-test</b>	0,232	0,422
	NSig	NSig

Preglednica XX: Primerjava  $P_{app}$  v S-M smeri v ileumu s  $P_{app}$  v S-M smeri v duodenumu, jejunumu in kolonu

<b>Razlika ileum, S-M z:</b>	<b>duodenum S-M</b>	<b>jejunum S-M</b>	<b>kolon S-M</b>
<b>F-test</b>	0,248	0,405	0,258
<b>T-test</b>	0,016	0,010	0,024
	Sig	Sig	Sig

Z namenom, da bi imeli vpogled v masno bilanco učinkovine, smo pri dasatinibu vzorčili tudi začetne in končne donorske raztopine. Gre namreč za lipofilno učinkovino, ki ima afiniteto do vezave na plastične materiale difuzijskih celic in do akumulacije v tkivu. Iz izmerjenih koncentracij začetne in končne donorske raztopine ter končne akceptorske raztopine smo izračunali odstotek izgubljene učinkovine na račun akumulacije in nespecifične vezave na steno vsebnika.

Preglednica XXI: Razlika v množini dasatiniba v začetni donorski raztopini in množini v končni donorski in akceptorski raztopini. Razlika predstavlja odstotek izgubljene učinkovine. (AS -aritmetična sredina; SEM – standardna napaka aritmetične sredine)

Masna bilanca	Duodenum		Jejunum		Ileum		Kolon	
	M-S	S-M	M-S	S-M	M-S	S-M	M-S	S-M
AS [%]	49,7	57,6	65,5	69,8	51,5	79,7	59,4	60,6
SEM	8,5	12,7	6,9	10,5	9,0	9,8	12,2	4,0

#### 4.3.2 Nilotinib

Da bi ugotovili permeabilnost nilotiniba, smo *in vitro* poskus izvajali z medijem, ki je vseboval tauroholat in lecitin, zaradi česar smo lahko permeabilnostni koeficient izmerili le v absorptivni (M-S) smeri. Permeabilnost smo ugotavljali le na predelu ileuma, saj smo na tem predelu pričakovali največjo permeabilnost. Pri poskusu smo opazovali tudi prehod nizko permeabilnega internega standarda, furosemida.

Količine nilotiniba v akceptorski raztopini so bile pod mejo zaznave (LOD=0,02  $\mu$ M), kar pomeni, da je nilotinib skozi tkivo zelo slabo prehajal. Izračuni permeabilnostnih koeficientov furosemida v ileumu v M-S smeri ter njihovo povprečje smo predstavili v preglednici XXII. Permeabilnostni koeficient furosemida, predhodno izmerjen v tem laboratoriju, znaša  $5,9 \pm 3,0 \times 10^{-6}$  cm/s. Pri poskusu izmerjen permeabilnostni koeficient furosemida se sklada s tem podatkom, kar pomeni, da je bil *in vitro* poskus permeabilnosti ustrezen.

Preglednica XXII: Poskus z nilotinibom: zbrane stopnje izračunov permeabilnostnih koeficientov internega standarda furosemida v ileumu in v M-S smeri ter njihovo povprečje in standardni odklon

	<b>Furosemid</b>			
<b>kd [mol/h]</b>	1,86E-09	3,08E-09	2,18E-09	2,51E-09
<b>R</b>	0,993	0,985	0,989	1,000
<b>J [nmol/(h*cm<sup>2</sup>)]</b>	1,855	3,082	2,183	2,511
<b>P<sub>app</sub> [cm/s]</b>	2,58E-06	4,28E-06	3,03E-06	3,49E-06
<b>P<sub>app</sub>[×10<sup>-6</sup> cm/s]</b>	2,577	4,281	3,032	3,488

<b>AS [×10<sup>-6</sup> cm/s]</b>	3,34
<b>SD</b>	0,727

#### 4.3.3 Bosutinib

Pri bosutinibu smo prav tako kot pri nilotinibu za donorski medij uporabili Ringerjev pufer s tauroholatom in lecitinom. Poskus smo torej izvajali le v M-S smeri in prav tako smo se odločili, da uporabimo le ileum. Sočasno smo v istih difuzijskih celicah spremljali prehod internega standarda za nizko permeabilne učinkovine, furosemida.

Kot pri nilotinibu je bila množina bosutiniba, ki je prešla tkivo v 120 min, na HPLC pod mejo zaznave (LOD=0,07 μM), kar kaže na zelo slabo *in vitro* permeabilnost bosutiniba. Povprečje permeabilnostnih koeficientov furosemida izmerjenih v tem poskusu je bilo  $5,63 \times 10^{-6}$  cm/s, kar ustreza podatku  $P_{app}$  furosemida izmerjenega v preteklih testiranjih v tem laboratoriju, ki znaša  $5,9 \pm 3,0 \times 10^{-6}$  cm/s. Poskus je bil torej ustrezen.

Preglednica XXIII: Poskus z bosutinibom: zbrane stopnje izračunov permeabilnostnih koeficientov internega standarda furosevida v ileumu in v M-S smeri ter njihovo povprečje in standardni odklon

	<b>Furosemid</b>						
<b>kd [mol/h]</b>	4,73 E-09	3,44 E-09	3,83 E-09	3,24 E-09	4,12 E-09	3,96 E-09	5,05 E-09
<b>R</b>	0,998	0,999	0,999	0,984	0,994	0,998	0,998
<b>J [nmol/(h*cm<sup>2</sup>)]</b>	4,733	3,443	3,826	3,244	4,120	3,963	5,053
<b>Papp [cm/s]</b>	6,57 E-06	4,78 E-06	5,31 E-06	4,51 E-06	5,72 E-06	5,50 E-06	7,02 E-06
<b>Papp [<math>\times 10^{-6}</math> cm/s]</b>	6,574	4,781	5,314	4,506	5,722	5,504	7,019

<b>AS [<math>\times 10^{-6}</math> cm/s]</b>	5,631
<b>SD</b>	0,906

# 5 Razprava

## 5.1 Opredelitev eksperimentalnih pogojev

Osnovni namen diplomske naloge je bil določiti permeabilnost dasatiniba, nilotiniba in bosutiniba, vendar pa smo pri delu s temi učinkovinami naleteli na kar nekaj ovir. Te temeljijo na lipofilni naravi inhibitorjev tirozinskih kinaz, zaradi katere se učinkovine slabo topijo v vodnih medijih, ki so ključni za merjenje permeabilnosti na *in vitro* modelu z izoliranim tkivom. Poleg tega imajo lipofilne učinkovine veliko afiniteto do vezave na laboratorijske materiale ter do porazdeljevanja in akumulacije v tkivu. Dobra postavitve eksperimentalnih pogojev je bila zato ključnega pomena za ustrezno določitev permeabilnostnih lastnosti teh učinkovin.

Že iz literaturnih virov lahko vidimo, da je topnost nilotiniba, dasatiniba in bosutiniba v vodi problematična in zelo odvisna od pH vrednosti pufra. Prav tako naj bi bile te spojine le malo topne v etanolu in metanolu (5,6,12). Pri določanju eksperimentalnih pogojev smo morali pripraviti 10 mM osnovne raztopine vsake od učinkovin, katere smo kasneje lahko redčili z ustreznim medijem za *in vitro* poskus na tkivu. Pri tem smo ugotovili, da v etanolu, v katerem smo jih nameravali raztopiti, dasatinib in nilotinib nista dovolj topna. Izkazalo se je, da se vse učinkovine v tej koncentraciji raztopijo, če dodamo etanolu kot sotopilo DMSO v razmerju 1:1. Kot topilo za osnovne 10 mM raztopine smo zato za vse tri učinkovine izbrali DMSO:etanol (1:1).

Pri *in vitro* poskusu permeabilnosti je pri izbiri medija potrebno biti pozoren na ohranjanje vitalnosti tkiva. Pri tovrstnih poskutih se zato navadno uporablja Ringerjev puffer ali drugi pufri, ki pa se od Ringerjevega pufra le nekoliko razlikujejo v koncentracijah  $\text{Na}^+$ ,  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{Cl}^-$  ali fosfatov. Možne so tudi različice, katere ne vsebujejo nekaterih ionov (31). Kljub temu, da se v *in vivo* pogojih pH vzdolž prebavnega trakta spreminja, se zaradi pravilnejših meritev elektrofizioloških parametrov tkiva *in vitro* navadno poslužujemo medijev s pH vrednostjo 7,4 (32). Pri *in vitro* poskusu permeabilnosti bi tako dasatinib, nilotinib in bosutinib morali biti raztopljeni v Ringerjevemu puftru s pH 7,4. Koncentracija donorskih raztopin bi, zaradi možnosti kvantifikacije vzorcev akceptorske raztopine na HPLC, morala biti vsaj 100  $\mu\text{mol/L}$ . Ob redčenju osnovnih raztopin posameznih učinkovin

z Ringerjevim pufrom smo ugotovili, da se v tem mediju v koncentraciji 100  $\mu\text{mol/L}$ , topi le dasatinib. Dovolj dobra topnost dasatiniba nam je omogočala izvedbo *in vitro* poskusov permeabilnosti v M-S in S-M smeri. Za medij smo na donorski strani uporabili Ringerjev pufer, ki je zaradi dodatka osnovne raztopine učinkovine vseboval še 0,5% DMSO in 0,5% etanola. Na akceptorski strani smo Ringerjevemu pufru dodali 1% etanola in s tem zmanjšali možnost obarjanja dasatiniba po prehodu skozi tkivo.

Ugotovitev, da se nilotinib in dasatinib v 100 $\mu\text{M}$  koncentraciji ne raztapljata v Ringerjevemu pufru, nas je spodbudila k iskanju novih ustreznih medijev. Preizkusili smo topnost nilotiniba v brezfosfatnem Ringerjevem pufru (pH 7,4), vendar se tudi tu ni raztapljal. Skladno s tem je v javnem poročilu Evropske agencije za zdravila (EMA) navedeno, da se nilotinib v raztopinah s pH vrednostjo, večjo od 4,5 praktično ne topi (6). Podobno slabo topnost pri visokih pH vrednostih izkazuje tudi bosutinib, zato smo predvideli, da prav tako ni topen v brezfosfatnem Ringerjevem pufru.

V zadnjem času na trg prihaja vedno več lipofilnih učinkovin, ki se tako kot nilotinib in bosutinib v tovrstnih medijih ne raztapljajo. V veliko raziskavah se je pri določanju permeabilnosti v teh primerih vključevalo naravne (npr. žolčne soli) in nenaravne površinsko aktivne snovi. Znano je, da v črevesu žolčne soli raztapljajo slabo topne snovi tako, da z njimi tvorijo micelle. Najbolj pogosto se tako v eksperimentalnih pogojih kot komponenti žolčnih soli dodajata tauroholat in lecitin. Kljub temu, da dodatek površinsko aktivne snovi raztopi slabo topno učinkovino, pa so mnenja glede vpliva na njeno permeabilnost deljena. Mnogi poročajo o povečani permeabilnosti zaradi zmanjšanja integritete tkiva, nasprotno pa se permeabilnost lahko zmanjša, saj tvorba micelov zmanjša delež proste učinkovine na voljo za absorpcijo (32).

Za lipofilne učinkovine je tudi značilno, da se zaradi svoje visoke afinitete do celične membrane in slabe topnosti, po porazdeljevanju v celice v njih zadržujejo in ne prehajajo v akceptorski medij. Nekatere raziskave zato predlagajo dodatek plazemskih proteinov v medij na bazolateralni strani. V *in vivo* pogojih se namreč lipofilne učinkovine po absorpciji vežejo na plazemske proteine in se na tak način raztapljajo v krvi. Dodatek plazemskih proteinov na serozno stran bi tako povečal topnost učinkovin v akceptorskem mediju in s tem povečal njihov prehod iz tkiva v akceptorski medij. Za namene boljšega raztapljanja bi plazemske proteine lahko dodali tudi v donorski medij, vendar pa bi se s tem zmanjšal delež proste učinkovine, kar bi vplivalo na zmanjšano izmerjeno



permeabilnost. V takšnem primeru je problematično tudi ugotavljanje deleža za absorpcijo uporabne učinkovine (32). Za takšen način dela bi se odločili, če bi morali raziskovati aktivni transport in bi zato morali imeti na obeh straneh tkiva podobne pogoje za vezavo preiskovane učinkovine, obenem pa bi tako omogočili tudi solubilizacijo za S-M tip poskusa.

Nilotinib, bosutinib in dasatinib so se dobro topili tako v Ringerjevemu pufru, ki smo mu dodali tauroholat v koncentraciji 2 g/L in lecitin v koncentraciji 500 mg/L, kot tudi v 1% raztopini humanega albumina v Ringerjevemu pufru. Tudi sicer naj bi bila vezava na plazemske albumine v *in vivo* pogojih za dasatinib in nilotinib 94% in 98% (5,6). Vključitev albuminov v medij se zdi pri lipofilnih učinkovinah zelo uporabna, vendar moramo ob takšnem načinu dela uvesti dodatno fazo priprave vzorcev (obarjanje proteinov), zaradi redčenja vzorcev in velikega deleža organskega modifikatorja v njih pa ponavadi analiza s HPLC-UV ni dovolj občutljiva. Poleg tega je delež proste učinkovine v raztopini z albumini verjetno veliko manjši kot v raztopini s tauroholatom in lecitinom. Na podlagi navedenih razlogov smo se odločili, da bomo v *in vitro* poskusu določanja permeabilnosti nilotiniba in bosutiniba na donorski strani uporabili medij z žolčnimi solmi. Iz izkušenj v tem laboratoriju vemo, da tauroholat in lecitin, aplicirana na serozno stran, takoj poškodujeta tkivo, ob njuni prisotnosti na mukozni strani pa se vitalnost tkiva ohranja dlje časa. Razlog bi lahko bila prisotnost mukusa na mukozni strani, ki lahko določen čas tkivo ščiti. Da bi omogočili primerno vitalnost tkiva med poskusom, smo zato raziskovali prenos učinkovin le v smeri iz mukozne na serozno stran tkiva. Da bi zagotovili topnost učinkovin na serozni strani smo za akceptorski medij uporabili Ringerjev pufer z dodatkom 2% etanola. Iz izkušenj v tem laboratoriju vemo, da ta delež etanola še ne vpliva na vitalnost in permeabilnostne lastnosti tkiva. Predhodno smo v ta namen preverili tudi topnost 1  $\mu$ M nilotiniba in bosutiniba v Ringerjevemu pufru z 2% etanola, ki sta se v tej koncentraciji v mediju izkazala za topna.

Kot smo že omenili, imajo lipofilne učinkovine težnjo do vezave na laboratorijske materiale in akumulacijo v absorpcijske bariere, kar navadno privede do določitve manjše *in vitro* permeabilnosti učinkovine, kot je ta v *in vivo* pogojih. Že raziskave prvega inhibitorja tirozinskih kinaz, imatiniba, v tem laboratoriju so pokazale, da se ta v velikem odstotku veže na mikrotitersko ploščico in na mikroeprevete (30). Velika verjetnost je torej obstajala, da imajo nilotinib, dasatinib in bosutinib prav tako težnjo do nespecifične vezave

na vsebnike in Sweetana-Grass difuzijske celice ter do akumulacije v tkivu. Naš namen je zato bil, kolikor je bilo to mogoče, zmanjšati tovrstne vplive. Vezavi na difuzijske celice in v tkivo se pri tem ni bilo moč izogniti, preverili pa smo lahko, v katere vsebnike je najbolje vzorčiti raztopine, da bi bila izguba učinkovin čim manjša.

Delež adsorpcije na trdne površine je v našem primeru odvisen od narave adsorbenta, topljenca in medija. Pri mediju so pomembne predvsem njegove hidrofilne/lipofilne lastnosti in njegov pH, ki vpliva na ionizacijo učinkovine. Zaradi lipofilnosti učinkovine bo ta v hidrofilnem mediju imela večjo afiniteto do porazdeljevanja na površino vsebnika ali v bolj lipofilno tkivo.

- Pri dasatinibu je bil za nas najpomembnejši delež vezave v Ringerjevemu pufru, ki je bil medij donorske in akceptorske raztopine. V tem mediju je v 100  $\mu\text{M}$  in 1  $\mu\text{M}$  koncentraciji izkazoval dokaj majhen delež vezave v steklenih vialah (6% v 100  $\mu\text{M}$  raztopini), medtem ko se ga je kar nekaj vezalo na polipropilensko mikrotitersko ploščo (približni 30% pri obeh koncentracijah) in mikroeprevete (17% v 100  $\mu\text{M}$  koncentraciji in 75% v 1  $\mu\text{M}$  koncentraciji).
- Nilotinib se v Ringerjevemu pufru z lecitinom in tauroholatom ter Ringerjevemu pufru z 2% etanola najmanj (približno 25% v prvem in 17% v drugem) veže na polipropilensko mikrotitersko ploščo, vendar pa so bila pri teh meritvah velika odstopanja. V Ringerjevemu pufru z 2% etanola, ki je za nas ključna raztopina, saj je to medij vzorcev z akceptorske strani, se je nilotinib na vialo vezal v približno 34%.
- Podobno se je bosutinib v Ringerjevemu pufru z 2% etanola najmanj vezal na polipropilensko mikrotitersko ploščo (31%) in na steklene vialo (36%). Opazili smo, da tauroholat in lecitin v Ringerjevemu pufru izničita afiniteto bosutiniba do vezave na plastične in steklene vsebnike.

Dodatek albuminov je znatno zmanjšal vezavo vseh treh učinkovin na laboratorijske materiale. Albumini namreč vežejo lipofilno učinkovino in s tem povečajo njeno afiniteto do medija (32). Podobno verjetno delujeta tudi lecitin in tauroholat v primeru bosutiniba, zanimivo pa je, da vendarle ne zmanjšata vezave nilotiniba.

V večini primerov so se steklene vialo izkazale za najboljši vsebnik za vzorčenje teh treh učinkovin in zaradi enotnosti načina dela smo se odločili za uporabo le teh pri shranjevanju

vzorcev. Za prihodnje raziskave vseeno priporočamo vzorčenje nilotiniba v polipropilenske mikrotiterske plošče, ki naj bi bila po rezultatih vezave sodeč še boljša izbira. S tem bi najbolj zmanjšali izgube in izboljšali ponovljivost.

Da bi dobili informacijo, kolikšna je bila vezava učinkovine na difuzijske celice oz. njeno zadrževanje v tkivu, smo vzorčili začetne in končne donorske raztopine ter izračunali masno bilanco. Omenjene izračune smo naredili le za dasatinib, saj iz previdnostnih razlogov nismo želeli meriti vzorcev s tauroholatom in lecitinom, ker bi ti lahko uničili kolono na HPLC. Po pričakovanjih je bila izguba dasatiniba precej obsežna in tudi zelo variabilna (50-80%). Pričakujemo, da je le nekaj te izgube zaradi nespecifične vezave na površino difuzijskih celic, večinoma pa je odgovorno zadrževanje učinkovine v celicah tkiva. Ta pojav bi lahko zmanjšali z dodatkom plazemskih albuminov v akceptorsko raztopino, ki bi vezali absorbirani dasatinib in s tem povečali afiniteto dasatiniba do vodnega medija.

## 5.2 Permeabilnost

Permeabilnostne lastnosti smo lahko najobsežneje izmerili za dasatinib. Izbira Ringerjevega pufra kot medija nam je omogočala merjenje prehoda v M-S in S-M smeri. Zanimala nas je regijska odvisnost permeabilnosti v obeh smereh prehoda. Kot prvo smo lahko iz izmerjenih  $P_{app}$  vrednosti opazili dokaj visoko variabilnost, kar pa je za tako nizke izmerjene vrednosti povsem normalno. Ugotovili smo, da je  $P_{app}$  v M-S smeri v vseh regijah zelo podobna in se povprečja  $P_{app}$  gibljejo okoli  $0,5 \times 10^{-6}$  cm/s. Če pogledamo vrednosti  $P_{app}$  v smeri S-M, opazimo naraščanje  $P_{app}$  v smeri od duodenuma proti ileumu in ponoven upad v kolonu. Značilno večji od ostalih je kljub temu le  $P_{app}$  v M-S smeri v regiji ileuma. Prav tako smo opazili, da v vseh regijah efluksno razmerje kaže v prid transporta v S-M smeri nad M-S smerjo, a je ta razlika značilna le v ileumu. Sklepamo lahko, da je dasatinib substrat za efluksne prenašalne proteine, ki se v podganjem črevesu v največji meri izražajo v ileumu. To je tudi pokazatelj, da obseg absorpcije dasatiniba ni odvisen le od pasivne difuzije, ampak tudi od aktivnega sekretornega transporta.

Na podlagi določenih  $P_{app}$  smo želeli dasatinib umestiti v Biofarmaceutski klasifikacijski sistem (BCS). Pri tem smo uporabili eksterne standarde, pridobljene v predhodnih raziskavah v tem laboratoriju (preglednica XXIV) (33). Za njihovo uporabo smo se odločili zaradi pričakovanja aktivnega transporta pri tej učinkovini, katerega bi lahko

interni standard motil. Iz povprečnih vrednosti  $P_{app}$  v M-S in S-M smeri lahko opazimo, da so te nižje od katerega koli navedenega nizko permeabilnega eksterne standarda. To je razlog, da lahko dasatinib, sodeč po meritvah permeabilnosti na *in vitro* modelu na izoliranih tkivih podganjega črevesa, uvrstimo med slabo permeabilne spojine. Praviloma se spojine v BCS razrede uvršča na podlagi izmerjene biološke uporabnosti v človeku in na podlagi tovrstnih meritev dasatinib spada v 2. razred po BCS (slaba topnost, dobra permeabilnost) (5). Naše *in vitro* meritve se torej ne skladajo z *in vivo* izmerjeno permeabilnostjo, kar je še dodaten dokaz, da so v absorpcijo dasatiniba vpleteni aktivni prenašalni sistemi. Ti se morda ne izražajo v črevesni steni podgane, morda je njihova aktivnost v *in vitro* pogojih bistveno manjša kot v *in vivo* pogojih, ali pa so istovrstni prenašalci v podgani prisotni, vendar ti ne prenašajo povsem enakega spektra substratov kot prenašalci prisotni pri človeku. Že Lennernaes v svoji raziskavi govori o tem, da je za dobro permeabilne učinkovine, ki se prenašajo z aktivnim transport, *in vitro* izmerjena permeabilnost podcenjena. Veliko boljše je mogoče *in vivo* permeabilnost na osnovi *in vitro* testov napovedati učinkovinam, ki so pasivno permeabilne (34).

Preglednica XXIV: Permeabilnosti eksternih standardov v našem laboratoriju (33)

Drug	Permeability classification	% absorbed or BA*	$P_{app}$ [ $\times 10^{-6}$ cm/s]		R	Sig/NSig ( $\alpha=0.05$ )
			M-S	S-M		
Antipyrine	High	100	24.7 $\pm$ 3.2	29.5 $\pm$ 4.9	1.2	NSig
Caffeine	High	100	41.5 $\pm$ 1.4	41.2 $\pm$ 3.4	1.0	NSig
Carbamazepine	High	92*	15.8 $\pm$ 0.2	18.4 $\pm$ 1.5	1.2	NSig
Fluvastatin	High	90-100	4.3 $\pm$ 1.6	23.7 $\pm$ 3.0	5.4	Sig
Ketoprofen	High	100	16.9 $\pm$ 4.0	21.1 $\pm$ 7.6	1.2	NSig
Metoprolol	High	95-100	19.9 $\pm$ 5.9	26.1 $\pm$ 3.9	1.3	NSig
Naproxen	High	94-99	37.3 $\pm$ 5.2	18.8 $\pm$ 1.0	0.5	Sig
Propranolol	High	90-100	11.1 $\pm$ 2.3	21.5 $\pm$ 2.3	1.9	Sig
Theophylline	High	96	15.5 $\pm$ 0.7	28.2 $\pm$ 1.2	1.8	Sig
Atenolol	Low	50	3.7 $\pm$ 1.2	6.5 $\pm$ 0.8	1.8	Sig
Furosemide	Low	61	5.9 $\pm$ 3.0	27.9 $\pm$ 4.7	4.7	Sig
Hydrochlorothiazide	Low	65-72	4.4 $\pm$ 0.6	12.6 $\pm$ 0.6	2.9	Sig
Methyldopa	Low	41	2.3 $\pm$ 0.3	4.3 $\pm$ 0.7	1.9	Sig
Ranitidine	Low	50-61	4.0 $\pm$ 1.1	12.9 $\pm$ 0.1	3.2	Sig

Znano je, da je sekrecijo v *in vitro* pogojih veliko lažje določiti kot absorpcijo. Eden od razlogov je verjetno ta, da za zdaj poznamo veliko več sekrecijskih kot absorpcijskih prenašalnih sistemov. Poleg tega pa se absorpcijski proteini iz neznanih razlogov v manjši meri izražajo v tkivih *in vitro* ali pa so v teh pogojih manj aktivni ali celo neaktivni. Kot

smo že omenili, Hiwase in ostali menijo, da dasatinib v celico prehaja s pasivno difuzijo, obenem pa ne izključujejo vpletenosti aktivnih procesov. Dobljeni permeabilnostni koeficienti v M-S smeri so po vsej verjetnosti res odraz pasivne difuzije dasatiniba. Učinkovina torej v manjši meri tudi pasivno prehaja celično membrano, vendar pa lahko iz razlike med *in vitro* in *in vivo* permeabilnostjo trdimo, da je absorpcija dasatiniba pretežno aktiven proces.

Pri opazovanju prehoda v smeri sekrecije smo ugotovili, da je dasatinib substrat za aktivne efluksne prenašalce, kar je podprto tudi z rezultati drugih študij, ki so ugotovile, da se dasatinib iz celic izloča preko P-gp in BCRP prenašalnih proteinov (4,23,24,26). Povečana permeabilnost v S-M smeri v ileumu bi lahko bila pokazatelj, da je dasatinib substrat za P-gp in/ali BCRP prenašalce. Izraženost P-gp in BCRP je namreč največja v ileumu (22,35). Pri poskusu na istem sevu podgan kot pri nas, so Žakelj in ostali v ileumu opazili tudi veliko izraženost OCT-1. Kljub možni prisotnosti OCT-1, pa so v različnih študijah ugotovili, da dasatinib ni substrat za ta prenašalec (4,23,27) in je zato njegova vpletenost v transport dasatiniba skozi črevesno sluznico manj verjetna. V nadaljnje bi lahko na predelu ileuma s specifičnimi inhibicijami posameznih skupin prenašalnih proteinov natančneje določili prenašalce, ki so vpleteni v sekrecijo dasatiniba.

Permeabilnost nilotiniba in bosutiniba smo iz prej navedenih razlogov merili le v absorpcijski (M-S) smeri. Najprej smo meritve opravili na ileumu, na osnovi pridobljenih rezultatov pa smo se odločili, da poskusa na drugih regijah nismo izvajali. Zaradi spremenjenih pogojev meritev so eksterni standardi manj uporabni in smo v donorsko raztopino poleg učinkovine dodali še nizko permeabilni interni standard, furosemid. Izmerjena permeabilnost furosemida je tako v poskusu z nilotinibom, kot v poskusu z bosutinibom ustrezala referenčnim vrednostim izmerjenim v tem laboratoriju. To odraža ustreznost obeh poskusov in dobljenih rezultatov za obe učinkovini.

Ugotovili smo, da je bila koncentracija nilotiniba in bosutiniba v vzorcih akceptorske raztopine nemerljiva, kar pomeni, da učinkovini zelo slabo prehajata absorpcijsko bariero. Po obsegu absorpcije v človeku nilotinib uvrščajo v 4. razred po BCS (6), kar ga tudi uvršča med slabo permeabilne učinkovine. Vendar če bi naše *in vitro* ugotovitve, tudi v resnici odražale dejansko stanje *in vivo*, bi to verjetno pomenilo premajhen obseg absorpcije za dosego učinkovite koncentracije v krvi. Bosutinib je pri tem celo uvrščen

med dobro permeabilne učinkovine (12), kjer se zopet kaže, da naše *in vitro* meritve ne predstavljajo dobre korelacije s stanjem *in vivo*.

Razlogov za tako nizko izmerjeno *in vitro* permeabilnost je lahko več. Eden od njih je, da bi lahko lecitin in tauroholat z nilotinibom in bosutinibom tvorila micide in s tem zmanjšala delež njune proste oblike, na voljo za absorpcijo. Pri tem so bili permeabilnostni koeficienti furosemida ustrezni, torej bi bila možnost le, da se furosemid v iste micide ne vključuje. Kljub vsemu so žolčne soli v *in vivo* pogojih prisotne, kar pomeni, da tak medij odraža običajne pogoje, v katerih bi se učinkovina znašla v človeškem črevesu.

K izmerjeni slabi permeabilnosti zelo verjetno nekoliko prispeva slaba afiniteta nilotiniba in bosutiniba do dokaj polarnega akceptorskega medija in posledično njuna akumulacija v tkivu. Manj učinkovine tako prehaja v akceptorski medij, zaradi česar izmerimo prenizke koncentracije učinkovine v akceptorskem mediju.

Glavni razlog za nizke  $P_{app}$  pa je verjetno aktivni način transporta skozi celično membrano za ti dve učinkovini. Kot smo že pri dasatinibu ugotovili, podganje črevo zelo verjetno nima izraženih ali pa v *in vitro* pogojih aktivnih prenašalnih proteinov, katerih substrat so naše preiskovane učinkovine. Skoraj z gotovostjo lahko trdimo, da tovrstni absorptivni prenašalci v človeškem črevesnem epiteliju obstajajo, saj v nasprotnem primeru učinkovit terapevtski odmerek v krvi ne bi bil dosežen, bosutinib pa ne bi mogel biti uvrščen v 2. razred po BCS.

Kot lahko vidimo pri dasatinibu, *in vitro* metoda z izoliranim tkivom podganjega črevesa slabo oceni absorpcijo učinkovin, ki se absorbirajo z aktivnim transportom. Pri tem opazimo, da je dasatinib vsaj nekoliko pasivno permeabilen, medtem ko sta nilotinib in bosutinib molekuli, ki težko pasivno prehajata lipidni dvosloj.

Različne študije potrjujejo, da je nilotinib substrat za BCRP in P-gp sekretorne prenašalce (4,25,26,28), zaradi česar pričakujemo, da bi bila permeabilnost nilotiniba izmerjena v S-M smeri večja. Da so v *in vitro* pogojih na izoliranem tkivu aktivni nekateri sekretorni prenašalci, ki bi lahko omogočili njegov transport skozi tkivo, smo potrdili že pri dasatinibu. Da bi lahko v nadaljnjih raziskavah opazovali prehod nilotiniba in bosutiniba v S-M smeri, bi bilo potrebno poskus izvesti z medijem, ki bi namesto tauroholata in lecitina vseboval albumine.

Če primerjamo permeabilnost dasatiniba, nilotiniba in bosutiniba z rezultati poskusa na imatinibu v tem laboratoriju (37), ugotovimo, da so njegovi permeabilnostni koeficienti v M-S smeri v duodenumu, kjer ni substrat za absorptivne prenašalce, podobno slabi kot pri naših treh preiskovanih učinkovinah ( $P_{app}$  imatiniba v duodenumu je 0,16). Povečani absorpcijski  $P_{app}$  v ileumu kažejo na to, da ima imatinib »absorpcijsko okno«, pri dasatinibu pa te razlike v absorpciji med regijami ni. Dasatinib in imatinib tako nista substrata za iste absorptivne prenašalne proteine, ki se izražajo v izoliranem tkivu podganjega črevesa. Sekretija imatiniba, se, kot pri dasatinibu, povečuje od duodenuma proti ileumu, kar kaže na to, da sta substrata za podoben spekter sekretornih prenašalnih sistemov.

## 6 Sklep

Lipinski s svojo opredelitvijo »drug like« lastnosti ocenjuje molekulsko maso nad 500 g/mol kot nezaželeno lastnost, ko želimo dobro topnost in dobro permeabilnost učinkovine (38). Dejstvo je, da gre pri dasatinibu, nilotinibu in bosutinibu za velike učinkovine z molekulsko maso, ki je pri dasatinibu rahlo pod, pri nilotinibu in bosutinibu pa rahlo nad to mejo. To že na samem začetku napoveduje probleme z njihovo pasivno difuzijo skozi celične stene in topnostjo.

Slaba topnost učinkovin v vodnih medijih je pri našem delu močno vplivala na omejeno izbiro medijev za izvajanje *in vitro* poskusa permeabilnosti. Izkazalo se je tudi, da se te učinkovine v velikem deležu vežejo na steno vsebnikov in se zelo verjetno zadržujejo v tkivu. Okoliščine so nas tako prisilile v skrbno izbiro medijev in vsebnikov za vzorčenje.

V diplomskem delu smo na *in vitro* poskusu na izoliranem podganjem črevesu pokazali, da je permeabilnost dasatiniba v smeri absorpcije zelo nizka, permeabilnost nilotiniba in bosutiniba pa celo tako majhna, da ni merljiva. Neskladje z literaturnimi podatki o dobri *in vivo* permeabilnosti dasatiniba in bosutiniba kaže na to, da se pretežno absorbirata s pomočjo aktivnih prenašalnih sistemov, ki pa se v podganjem črevesu ne izražajo, ali je njihova aktivnost v *in vitro* pogojih bistveno manjša kot v pogojih *in vivo*, ali pa istovrstni prenašalci pri podgani ne prenašajo enakega spektra substratov kot ti pri človeku.

Na dasatinibu smo uspeli pokazati, da na njegov obseg absorpcije vplivajo tudi sekretorni prenašalci, ki so pretežno izraženi v ileumu.

Za natančnejšo opredelitev deleža pasivnega in aktivnega transporta dasatiniba, bi bilo potrebno določiti še permeabilnost pri temperaturi 4°C. Dalje, bi bilo z uporabo inhibitorjev posameznih prenašalcev možno ugotavljanje, kateri transportni sistemi so odgovorni za sekrecijo dasatiniba.

Za raziskovanje permeabilnosti nilotiniba in bosutiniba bi pri *in vitro* metodi določanja permeabilnosti na podganjem črevesu lahko poskusili še z dodatkom albuminov na mukozno in serozno stran tkiva in s tem ugotovili, ali se pri tem poveča permeabilnost zaradi manjše akumulacije v tkivu. Lahko bi tudi preizkusili Caco-2 celične kulture ali pa



delali poskuse na živi podgani. S slednjim bi lahko pokazali, ali je vzrok nizke *in vitro* permeabilnosti slaba aktivnosti prenašalnih proteinov v *in vitro* pogojih.

Dasatinib, nilotinib in bosutinib niso učinkovine, ki bi izkazovale idealne lastnosti za doseg dobre biološke uporabnosti in naš *in vitro* poskus to tudi dobro pokaže. Vendar pa je dejstvo, da te učinkovine v človeškem telesu dosegajo dovolj visoke koncentracije v krvi in dokazano učinkujejo pri zdravljenju KML in nekaterih drugih malignih bolezni. Da bi lahko bolj natančno ugotovili, kakšen je njihov mehanizem absorpcije, bodo potrebne študije na različnih modelih z različno stopnjo podobnosti s črevesno steno v človeku *in vivo*.

## 7 Literatura

1. Hehlmann, R., Hochhaus, A., Baccarani, M. *Chronic myeloid leukaemia*. The Lancet, 2007, 370: 342-350
2. Združenje hematologov Slovenije, Zupan, I.P., Pajič, T. *Smernice za odkrivanje in zdravljenje kronične mieloične levkemije*. Zdrav Vestn 2008; 77: 5–10
3. Di Gion, P., Kanefendt, F., Lindauer, A., Scheffler, M. et al. *Clinical pharmacokinetics of tyrosine kinase inhibitors*. Clin Pharmacokinet, 2011, 50 (9): 551-603
4. Scholler, J., Levêque, D. *Molecular pharmacokinetic determinants of anticancer kinase inhibitors in humans*. Oncol Rev, 2011, 5: 77–92
5. *Sprycel : EPAR - Scientific Discussion*. EMA, 2006,  
[http://www.ema.europa.eu/docs/en\\_GB/document\\_library/EPAR\\_-\\_Scientific\\_Discussion/human/000709/WC500056995.pdf](http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/EPAR_-_Scientific_Discussion/human/000709/WC500056995.pdf)
6. *Tasigna : EPAR - Scientific Discussion*. EMA, 2007,  
[http://www.ema.europa.eu/docs/en\\_GB/document\\_library/EPAR\\_-\\_Scientific\\_Discussion/human/000798/WC500034398.pdf](http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/EPAR_-_Scientific_Discussion/human/000798/WC500034398.pdf)
7. Wu, C., Benet, L.Z. *Predicting drug disposition via application of BCS: transport/absorption/elimination interplay and development of a biopharmaceutics drug disposition classification system*. Pharmaceutical Research, 2005, 22, No. 1
8. Lindauer, M., Hochhaus, A. *Dasatinib*. Recent Results in Cancer Research, 2010, 184, Part 1: 83-102
9. Fish, W.P., Young, J., Shah, P., Gao, Z. *The use of experimental design principles in dissolution method development: development of a discriminating dissolution method for sprycel film-coated tablets*. J Pharm Innov, 2009, 4:165–173
10. Keller, G., Schafhausen, P., Brümmendorf, T.H. *Bosutinib*. Recent Results in Cancer Research, 2010, 184, Part 1: 119-127
11. Abbas, R., Hug, B. A., Leister, C., El Gaaloul, M. et al. *A phase I ascending single-dose study of the safety, tolerability, and pharmacokinetics of bosutinib (SKI-606) in healthy adult subjects*. Cancer Chemother Pharmacol, 2012, 69:221–227
12. Boxa, K.J., Donkor, R.E., Jupp, P.A., Leader I.P. et al. *The chemistry of multiprotic drugs Part 1: A potentiometric, multi-wavelength UV and NMR pH*

- titrimetric study of the micro-speciation of SKI-606*. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, 2008, 47: 303–311
13. Buckton G. *Interfacial Phenomena in Drug Delivery and Targeting*. Harwood Academic Publishers, 1995, 60-63, 74-78
  14. *Guidance for industry: Waiver of in vivo bioavailability and bioequivalence studies for immediate-release solid oral dosage forms based on a biopharmaceutics classification system*. FDA, 2000
  15. Swarbrick, J., Boylan, J.C. *Encyclopedia of Pharmaceutical Tehnology*. Marcel Dekker, Inc., Vol.1
  16. Dean, D.A., Evans, E.R., Hall, I.H. *Pharmaceutical packaging tehnology*. Taylor & Francis, 2000
  17. Borchardt, R.T., Smith, P.L. in Wilson, G. *Models for assessing drug absorption and metabolism*. New York ; London : Plenum, cop. 1996
  18. Sutton, S.C., Forbes, A.E., Cargill, R. et al. *Simultaneous in Vitro Measurement of Intestinal Tissue Permeability and Transepithelial Electrical Resistance (TEER) Using Sweetana–Grass Diffusion Cells*. Pharmaceutical Research, 1992, vol. 9, 3: 316-319
  19. Kmetec, V., Roškar, R. *Vaje iz stabilnosti zdravil*. Fakulteta za farmacijo, Katedra za biofarmacijo in farmakokinetiko, 2002
  20. Welling, P.G. *Pharmacokinetics*. 2. izdaja, American Chemical Society, 1997
  21. DeSesso, J.M., Jacobson, C.F. *Anatomical and physiological parameters affecting gastrointestinal absorption in humans and rats*. Food Chem Toxicol 2001, 39:209-228
  22. You, G., Morris, M.E. *Drug transporters: Molecular characterization and role in drug disposition*. John Wiley & Sons, Inc., 2007
  23. Hiwase, D.K., Saunders, V., Hewett, D. et al. *Dasatinib cellular uptake and efflux in chronicmyeloid leukemia cells: therapeutic implications*. Clin Cancer Res, 2008, 14:3881-3888
  24. Chen, Y., Agarwal, S., Shaik, N.M. et al. *P-glycoprotein and breast cancer resistance protein influence brain distribution of dasatinib*. The journal of pharmacology and experimental therapeutics, 2009, 330:956–963

25. Dohse, M., Scharenberg, C., Shukla, S. et al. *Comparison of ATP-binding cassette transporter interactions with the tyrosine kinase inhibitors imatinib, nilotinib and dasatinib*. Drug metabolism and disposition, 2010, 38:1371–1380
26. Hegedu, C., Özvegy-Laczka, C., Apáti, A. et al. *Interaction of nilotinib, dasatinib and bosutinib with ABCB1 and ABCG2: implications for altered anti-cancer effects and pharmacological properties*. British Journal of Pharmacology, 2009, 158, 1153–1164
27. Giannoudis, A., Davies, A., Lucas, C.M. et al. *Effective dasatinib uptake may occur without human organic cation transporter 1 (hOCT1): implications for the treatment of imatinib-resistant chronic myeloid leukemia*. Blood, 2008, 112: 3348-3354
28. White, D.L., Saunders, V.A., Dang, P. et al. *OCT-1-mediated influx is a key determinant of the intracellular uptake of imatinib but not nilotinib (AMN107): reduced OCT-1 activity is the cause of low in vitro sensitivity to imatinib*. Blood, 2006, 108: 697-704
29. Polentarutti, B.I., Peterson, A.L., Sjöberg, A.K. et al. *Evaluation of viability of excised rat intestinal segments in the Ussing chamber: Investigation of morphology, electrical parameters, and permeability characteristics*. Pharmaceutical Research, 1999, 16, 3
30. Lilik, N. *Nespecifična vezava nekaterih učinkovin na laboratorijske materiale pri določanju permeabilnosti*. Diplomsko delo, Univerza v Ljubljani, Fakulteta za kemijo in kemijsko tehnologijo, 2010
31. Žakelj, S., Legen, I., Veber, M., Kristl, A. *The influence of buffer composition on tissue integrity during permeability experiments "in vitro"*. International Journal of Pharmaceutics, 2004, 272: 173–180
32. Buckley, S.T., Fischer, S.M., Fricker, G., Brandl, M. *In vitro models to evaluate the permeability of poorly soluble drug entities: Challenges and perspectives*. European Journal of Pharmaceutical Sciences, 2012, 45: 235–250
33. Žakelj, S., Berginc, K., Roškar, R., Kralj, B., Kristl, A. *Do the recommended standards for in vitro biopharmaceutical classification of drug permeability meet the "passive transport" criterion for biowaivers?* Curr Drug Metab., 2012 [Epub ahead of print]

34. Lennernäs, H. *Human Intestinal Permeability*. Journal of Pharmaceutical Sciences, 1998, 87, No. 4
35. Tanaka, Y., Slitt, A.L., Leazer, T.M. et al. *Tissue distribution and hormonal regulation of the breast cancer resistance protein (Bcrp/Abcg2) in rats and mice*. Biochemical and Biophysical Research Communications, 2004, 326, 1: 181-187
36. Žakelj, S., Šturm, K., Kristl, A. *Ciprofloxacin permeability and its active secretion through rat small intestine in vitro*. International Journal of Pharmaceutics, 2006, 313:175–180
37. Šenica, P., Temova, B. *Intestinalna absorbcija imatiniba in njegov aktivni transport s prenašalci P-gp, BCRP in OCT1 v eliminatorni smeri in vitro*. Raziskovalna naloga, Univerza v Ljubljani, Fakulteta za farmacijo, 2011
38. Lipinski, C.A., Lombardo, F., Dominy, B.W., Feeney, P.J. *Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings*. Advanced Drug Delivery Reviews, 2001, 46: 3–26