

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO

MARKO VIDAK

DIPLOMSKA NALOGA

UNIVERZITETNI ŠTUDIJ FARMACIJE

Ljubljana, 2012

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO

MARKO VIDAK

**VPLIV FLAVONOIDOV V PREHRANSKIH DOPOLNILIH
NA PERMEABILNOST LEVOTIROKSINA SKOZI
MONOSLOJ CELIC Caco-2**

**INFLUENCE OF FLAVONOIDS IN DIETARY
SUPPLEMENTS ON THE PERMEABILITY OF
LEVOTHYROXINE THROUGH Caco-2 MONOLAYER**

Ljubljana, 2012

Zahvala

Zahvaljujem se svojemu mentorju, prof. dr. Albinu Kristlu, ki je pregledal celotno besedilo moje precej dolge naloge ter mi svetoval končne popravke in izboljšave.

Te naloge ne bi bilo brez pomoči somentorice asist. dr. Katje Berginc (ki je pred kratkim drugič postala mamica), ki je pripravila celične monosloje za moje poskuse ter mi pomagala pri njihovi izvedbi (in pokazala veliko potrpežljivosti ob moji občasni nerodnosti). Prav tako mi je s strokovnimi nasveti pomagala pri pisanju naloge, še posebej pri opisovanju značilnosti celičnih kultur, ki so njen raziskovalno področje.

Te naloge tudi ne bi bilo brez asist. dr. Jurija Trontlja, ki me je napeljal k odločitvi, da opravljam svoje diplomsko delo na Katedri za biofarmacijo in farmakokinetiko. Veliko je prispeval tudi k razvoju raziskovalnega načrta za mojo nalogu, njegov največji prispevek pa je bila HPLC/MS analiza vzorcev.

Zahvalil bi se tudi asist. (in bodoči dr.) Evi Tavčar iz Katedre za farmacevtsko biologijo, ki nam je priskrbela vzorce prehranskih dopolnil za naše poskuse, hkrati pa mi pomagala z nasveti pri pisanju tistega dela naloge, ki posega na strokovno področje njene katedre.

Na koncu (*last but not least*) pa se najlepše zahvaljujem mami, očetu, sestri in vsem prijateljem, ki so mi stali ob strani med študijem farmacije.

Izjava

Diplomsko nalogu sem opravljal na Katedri za biofarmacijo in farmakokinetiko Fakultete za farmacijo v Ljubljani, pod mentorstvom prof. dr. Albina Kristla in somentorstvom asist. dr. Katje Berginc.

Marko Vidak

Predsednica diplomske komisije: prof. dr. Janja Marc

Član diplomske komisije: doc. dr. Tomaž Bratkovič

Ljubljana, september 2012

Kazalo vsebine

Zahvala.....	2
Izjava.....	2
Kazalo vsebine	3
Kazalo slik	4
Povzetek	5
Abstract	6
Abecedni seznam kratic.....	7
1. Uvod	9
1.1 Ščitnica in endogeni ščitnični hormoni.....	9
1.2. Eksogeni levotiroksin.....	12
1.3. Absorptivni in sekretorni prenašalci za levotiroksin	15
1.4. Celice Caco-2	19
1.5. Prehranska dopolnila.....	20
1.6. Flavonoidi	23
1.7. Kvercetin.....	25
1.8. Izvleček listov zelenega čaja	26
1.9. Piknogenol in izvleček lubja bele jelke	29
1.10. Izvleček plodov pegastega badlja	31
1.11. Mehanizmi interakcij med flavonoidi in levotiroksinom.....	33
2. Namen dela	35
3. Materiali	38
3.1. Aparature in druga oprema.....	41
4. Metode	43
4.1. Gojenje celic Caco-2	43
4.2. Določanje navideznega permeabilnostnega koeficiente	45
4.3. Izračun in analiza rezultatov.....	57
5. Rezultati.....	63
5.1. Permeabilnost estron-3-sulfata.....	63
5.2. Permeabilnost levotiroksina v AP → BL smeri.....	67
5.3. Permeabilnost levotiroksina v BL → AP smeri.....	72
6. Razprava	78
6.1. Izraženost sekretornih in absorptivnih prenašalcev.....	78
6.2. Vpliv pH na permeabilnost levotiroksina	79
6.3. Vpliv kvercetina in izvlečka plodov pegastega badlja na permeabilnost levotiroksina	81
6.4. Vpliv izvlečka listov zelenega čaja na permeabilnost levotiroksina	83
6.5. Vpliv piknogenola in izvlečka lubja bele jelke na permeabilnost levotiroksina	85
6.6. Vpliv prehranskih dopolnil na transepiteljsko električno upornost	86
6.7. Pomen vpliva prehranskih dopolnil na permeabilnost levotiroksina.....	88
6.8. Nadaljnje raziskave.....	90
7. Sklep	92
8. Seznam virov.....	93

Kazalo slik

Slika 1: Struktura molekule levotiroksina	13
Slika 2: Shematski prikaz absorpcije LT iz prebavil.....	18
Slika 3: Shematski prikaz komore za poskuse s celicami Caco-2 in monosloja celic Caco-2	20
Slika 4: Osnovna struktura flavonoidov kromanskega tipa	24
Slika 5: Avroni imajo petčlenski furanov obroč namesto šestčlenskega piranovega.....	24
Slika 6: Pri halkonih je piranov obroč prekinjen.....	24
Slika 7: Osnovne strukturne formule nekaterih tipov flavonoidov	24
Slika 8: Sestava prehranskega dopolnila Quercetin Forte®	26
Slika 9: Vsebnik prehranskega dopolnila Super Quercetin Forte®	26
Slika 10: Antocianidin nastane z oksidacijo in cepitvijo proantocianidinov.	27
Slika 11: Vsebnik prehranskega dopolnila Reflex Green Tea®	28
Slika 12: Silibin in silikristin sta predstavnika flavolignanov.....	31
Slika 13: Strukturna formula DIDS.....	37
Slika 14: Strukturna formula E3S.....	37
Slika 15: Shema komore za izvajanje poskusov na celicah Caco-2	47
Slika 16: Primera kromatogramov za LT in E3S	55
Slika 17: Graf umeritvene premice za LT (serija 1).....	56
Slika 18: Graf umeritvene premice za LT (serija 2).....	57
Slika 19: Graf umeritvene premice za E3S.....	57
Slika 20: P_{app} pri poskusih z E3S [nm/s]	66
Slika 21: P_{app} [nm/s] pri poskusih z LT v obeh smereh.....	76
Slika 22: Relativna sprememba P_{app} (v % glede na kontrolo) pri poskusih z LT v obeh smereh....	76
Slika 23: Sprememba TEER med poskusi z LT v obeh smereh	77
Slika 24: Shematski prikaz razlage rezultatov poskusov s celicami Caco-2	91

Povzetek

V diplomski nalogi smo proučevali vpliv petih prehranskih dopolnil (izvleček listov zelenega čaja, izvleček lubja bele jelke, izvleček plodov pegastega badlja, kvercetin in piknogenol), ki vsebujejo flavonoide, na permeabilnost levotiroksina (LT) skozi monosloj celic Caco-2, ki je služil kot *in vitro* model za človeške enterocite.

Kvercetin in izvleček pegastega badlja sta značilno znižala permeabilnost LT tako v sekretorni kot v absorptivni smeri, izvleček zelenega čaja pa je značilno povišal permeabilnost LT v obeh smereh. Piknogenol in izvleček bele jelke nista v nobeni smeri značilno vplivala na permeabilnosti LT.

Spremembe sekretorne permeabilnosti LT so bile najverjetneje posledica delovanja flavonoidov na sekretorne prenašalce. Kvercetin in silimarín (poglavitna sestavina izvlečka pegastega badlja) sta najverjetneje kompetitivno inhibirala sekretorne prenašalce in tako znižala sekretorno permeabilnost LT, flavan-3-oli iz izvlečka zelenega čaja pa so najverjetneje alosterično stimulirali sekretorne prenašalce in tako povišali sekretorno permeabilnost LT. Bazolateralno aplicirani flavonoidi so bolj vplivali na sekretorne prenašalce kot apikalno aplicirani, saj je privzem bazolateralno apliciranih flavonoidov skozi apikalno membrano v notranjost celic Caco-2 (kjer se substrati vežejo na sekretorne prenašalce) višji od privzema skozi apikalno membrano.

Spremembe absorptivne permeabilnosti LT so bile najverjetneje posledica sprememb fluidnosti apikalne membrane, ki so bodisi zvišale ali znižale pasivno transcelularno difuzijo LT. Kvercetin in silimarín sta znižala transcelularno difuzijo in posledično absorptivno permeabilnost LT, flavan-3-oli iz izvlečka zelenega čaja pa so zvišali transcelularno difuzijo in absorptivno permeabilnost LT. Prispevek transcelularne difuzije k celotni absorptivni permeabilnosti LT je bil najverjetneje pomembnejši od vpliva absorptivnih prenašalcev zaradi nizke izraženosti absorptivnih prenašalcev v celicah Caco-2.

Ob zaužitju enkratnega odmerka prehranskega dopolnila, ki vsebuje flavonoide, bi lahko flavonoidi dosegli visoke intraluminalne koncentracije. Rezultati naših poskusov kažejo, da lahko ob sočasnem zaužitju takšnega prehranskega dopolnila in pripravka z LT pričakujemo spremenjeno absorpcijo LT iz prebavil, vendar bi morali preveriti klinično pomembnost opaženih interakcij še na bolj kompleksnih modelih.

Abstract

Caco-2 cells were used as an *in vitro* model of human intestine to study the influences of five flavonoids-containing dietary supplements (green tea leaves extract, white fir bark extract, milk thistle fruits extract, quercetin and maritime pine bark extract, also known as Pycnogenol®) on levothyroxine (LT) permeability.

Quercetin and milk thistle extract significantly decreased the LT permeabilities in the absorptive and secretory directions, while green tea extract significantly increased the LT permeabilities in both directions. Pycnogenol® and white fir extract had no significant impact on LT permeability in either direction.

Changes of the secretory LT permeabilities were most likely induced by the effects of flavonoids on secretory transporters. Quercetin and silymarin (main ingredient of milk thistle extract) most likely competitively inhibited secretory transporters and thus decreased secretory LT permeability, while flavan-3-ols from green tea extract allosterically stimulated secretory transporters, thus increasing secretory LT permeability. Basolaterally applied flavonoids had a more pronounced effect on secretory transporters than apically applied ones, since the basolateral membrane allows higher uptake of flavonoids in the interior of Caco-2 cells (where substrates bind to secretory transporters) than the apical membrane.

Changes of the absorptive LT permeabilities were most likely induced by the altered fluidity of the apical membrane that resulted either in increased or decreased passive transcellular LT diffusion. Quercetin and silymarin decreased transcellular diffusion and thus lowered absorptive LT permeability, while flavan-3-ols from green tea extract increased transcellular diffusion and absorptive LT permeability. The contribution of transcellular diffusion to the overall absorptive LT permeability was most probably higher than that of absorptive/uptake transporters because of a low expression of uptake transporters in Caco-2 cells.

Flavonoids may attain high intraluminal concentrations when a single dose of a flavonoids-containing supplement is ingested. Results of our experiments indicate that intestinal LT absorption may be altered, if such supplements are taken simultaneously with an LT-containing preparation. The clinical relevance of the observed interactions should further be confirmed with more complex models.

Abecedni seznam kratic

ABC	<i>ATP Binding Cassette transporters</i> (prenašalci z domeno za vezavo adenozintrifosfata)
AP	apikalna stran monosloja celic Caco-2
ATP	adenozintrifosfat
BCRP	<i>Breast Cancer Resistance Protein</i> (protein, povezan z odpornostjo proti učinkovinam za terapijo raka dojke)
BCS	<i>Biopharmaceutics Classification System</i> (biofarmacevtski sistem razvrščanja)
BL	bazolateralna stran monosloja celic Caco-2
Caco-2	Caco = <i>cancer of colon</i> (celična linija iz tumorskih celic raka debelega črevesa)
CYP	encimi sistema citokromov
DIDS	4,4'-diizotiociano-2,2'-stilbendisulfonska kislina
DMSO	dimetilsulfoksid
E3S	estrон-3-sulfat
EC	epikatehin
ECG	epikatehin galat
EGC	epigalokatehin
EGCG	epigalokatehin galat
FFA	Fakulteta za farmacijo Univerze v Ljubljani
HPLC	<i>High Performance Liquid Chromatography</i> (tekočinska kromatografija visoke zmogljivosti)
KV	koeficient variabilnosti
LAF	<i>Laminar Air Flow chamber</i> (komora z laminarnim pretokom zraka)
LT	levotiroksin
MCT	<i>Monocarboxylate Transporter</i> (monokarboksilatni prenašalec)
mRNA	<i>messenger Ribonucleic Acid</i> (informacijska ribonukleinska kislina)
MRP	<i>(human) Multidrug Resistance-Associated Protein</i> (človeški prenašalni protein, povezan z odpornostjo proti več učinkovinam)
MS	masna spektrometrija
NIS	Na^+/I^- <i>Symporter</i> (ščitnični prenašalec za natrijeve in jodidne ione)
OATP	<i>(human) Organic Anion Transporting</i>

	<i>Polypeptide</i> (človeški prenašalni polipeptid za organske anione)
p. a.	<i>pro analysi</i> (za analizo)
P _{app}	navidezni permeabilnostni koeficient
PD	prehransko dopolnilo
PEG 400	polietilenglikol 400
rT3	reverzni trijodotironin
SGLT	<i>Sodium-Glucose Transport protein</i> (od natrijevih ionov odvisni prenašalni protein za glukozo)
SLC	<i>Solute Carrier transporters</i> (prenašalci za topljence)
SULT	sulfotransferaza
T2	dijodotironin
T3	trijodotironin
T4	tiroksin
TBG	<i>Thyroxine Binding Globuline</i> (tiroksin vežoči globulin)
TEER	<i>Transepithelial Electrical Resistance</i> (transepiteljska električna upornost)
TSH	<i>Thyroid Stimulating Hormone</i> (tirotropin – hipofizni hormon, ki spodbuja delovanje ščitnice)
TTR	transtiretin
UGT	uridildifosfat-glukuronozil-transferaza
WHO	<i>World Health Organization</i> (Svetovna zdravstvena organizacija)

1. Uvod

1.1 Ščitnica in endogeni ščitnični hormoni

Ščitnica je endokrina žleza, ki se nahaja na sprednji strani človeškega vratu. V krvni obtok izloča hormone kalcitonin, tiroksin (T4) in trijodotironin (T3). Kalcitonin sodeluje pri uravnavanju plazemske koncentracije kalcija in izgradnji kostnine (1). Pomembnejša sta T4 in T3, ki uravnavata intenzivnost celotnega metabolizma. Pod njunim vplivom se hitrost bazalnega metabolizma poveča in organizem proizvede več toplotne. Izzoveta tudi povečano izražanje adrenergičnih receptorjev, zato se okrepi učinek kateholaminov (2). V času embrionalnega razvoja in otroštva sta nujno potrebna za normalni razvoj možganov (1).

Zaradi pomembnosti T4 in T3 za delovanje organizma lahko patološke spremembe njunih plazemskih koncentracij povzročijo resne zdravstvene težave. Patološko povišanje plazemskih koncentracij ščitničnih hormonov se imenuje hipertiroza in je lahko posledica Basedowove bolezni, pri kateri nastanejo protitelesa, ki se vežejo na receptor za hipofizni hormon tirotropin (*Thyroid Stimulating Hormone* – TSH) in imajo enak učinek kot fiziološki ligand TSH, saj spodbujajo sintezo T4 in T3 (3). V ščitničnem tkivu lahko nastanejo vozliči, ki niso pod nadzorom hipofize in avtonomno proizvajajo hormone (3). Prevelik vnos joda lahko prav tako spodbudi izločanje T3 in T4, vendar se po nekajdnevnom uživanju velikih količin joda sinteza ščitničnih hormonov izrazito zmanjša. Hipertiroza lahko nastopi tudi zaradi patološko povečanega izločanja hipofiznega hormona TSH in hipotalamusnega hormona tiroliberina (tiroliberin spodbuja izločanje TSH iz hipofize), ki neposredno ali posredno spodbujata ščitnično sintezo T4 in T3. Znaki hipertiroze so nemir, razdražljivost, pospešeno bitje srca in hujšanje kljub povečanemu apetitu (2).

Hipotiroza je patološko znižanje plazemskih koncentracij T4 in T3. Pogost vzrok za hipotirozo je avtoimunska Hashimotova bolezen, pri kateri se tvorijo protitelesa, ki se vežejo na receptor za TSH, vendar vezava protiteles ne sproži povečanja sinteze ščitničnih hormonov kot pri Basedowovi bolezni, ampak zgolj prepreči vezavo TSH na receptor, zato je delovanje ščitnice zavrto (2). Hipotiroza je lahko tudi posledica premajhnega vnosa joda, potrebnega za sintezo T4 in T3. Pri pomanjkanju joda se ščitnični folikli, ki sintetizirajo hormona T4 in T3, povečajo in razrastejo (hipertrofija in

hiperplazija), kar začasno kompenzira pomanjkanje T4 in T3 (3). Povečanje ščitnice opazimo kot golšo na vratu. Stanje je bilo v preteklosti pogosto v celinskih krajih, kjer niso uporabljali z jodom bogate morske soli. Sprožijo ga lahko tudi rastlinski inhibitorji presnove joda, npr. saponini iz stročnic (2). V primeru dolgotrajnega pomanjkanja joda ščitnica kljub hipertrofiji in hiperplaziji ne more več proizvesti ustreznih količin hormonov, zato nastopi hipotiroza. Vzrok hipotiroze so lahko tudi motnje v delovanju hipotalamus (znižano izločanje tiroliberina) in hipofize (znižano izločanje TSH) ter kirurška odstranitev ščitničnega tkiva, kar je pogost način zdravljenja hipertiroze in ščitničnega raka (4).

Znaki hipotiroze so kronična utrujenost, zaspanost in brezvoljnost. Bolniki pridobivajo telesno težo kljub manjši želji po hrani in težje prenašajo mraz (4). Ščitnični hormoni vplivajo tudi na sintezo proteinov medceličnine, zato se pri dolgotrajni hipotirozi pojavijo edemi zaradi porušene integritete podkožne medceličnine. Nezdravljeni hipotiroza lahko povzroči komo in smrt bolnika (2). Edina možnost zdravljenja hipotiroze je nadomestna hormonska terapija, običajno s sintetično eksogeno obliko T4, ki se imenuje levotiroksin (LT) (5).

Prirojena hipotiroza pri novorojenčkih je relativno pogosta (1 primer na 4000 otrok), zato novorojenčkom takoj po porodu izmerijo plazemske koncentracije T4, da diagnosticirajo morebitno hipotirozo (pri hipotirozi je koncentracija T4 znižana). Pri odraslih je hipotiroza desetkrat bolj razširjena med ženskami (bolelih je približno 2 % odraslih žensk) kot pri moških (0,2 % bolelih). S starostjo frekvenca bolelih narašča, tako da je delovanje ščitnice zmanjšano pri skoraj 20 % žensk, starejših od 60 let, vendar se pri vseh primerih zmanjšanega delovanja ščitnice ne pojavi klinična hipotiroza, pri kateri je potrebno zdravljenje z LT. Frekvenca bolelih je povisana na območjih, onesnaženih s polikloriranimi bifenili (iz pesticidov), dioksim (iz herbicidov) ter nitrati in nitriti (iz umetnih gnojil). Zaradi vpliva industrijskih kemikalij na pojav hipotiroze sodi LT v industrijskih državah (tudi v Sloveniji) med najpogosteje predpisovane učinkovine in je uvrščen na seznam osnovnih zdravil Svetovne zdravstvene organizacije (*World Health Organization – WHO*). Zaradi naraščanja frekvence hipotiroze s starostjo LT pogosteje predpisujejo starejšim, ki pogosto že uživajo številna druga zdravila in

prehranska dopolnila, zato se lahko pojavijo klinično pomembne interakcije med LT in sestavinami drugih pripravkov (1).

Endogena T4 in T3 nastajata v medceličnini med ščitničnimi folikli z jodiranjem ostankov aminokisline tirozina v proteinu tiroglobinu. Za to reakcijo potreben jod se v obliki jodidnih ionov prenese iz krvnega obtoka v ščitnične folikle. Prenos v ščitnico poteka preko prenašalca NIS ($Na^+ / I^- Symporter$). Jodidni ioni se v ščitnici s pomočjo encima jodidne peroksidaze oksidirajo v molekulske jod in izločijo v medceličnino med folikli, kjer se atomi joda kovalentno vežejo na tirozinske ostanke. Jodirani tiroglobin se prenese nazaj v folikle, kjer se tirozinski ostanki povežejo med seboj in ločijo od proteina (6). Na tiroglobinu vezani tirozinski ostanki so lahko enkrat ali dvakrat jodirani (mono- in dijodotironin). Pri povezavi dijodiranih tirozinskih ostankov nastane T4, pri povezavi monoijodotironina z dijodotironinom pa nastane T3 (2). Med povezovanjem so tirozinski ostanki še vedno vezani na protein.

Hormona se iz foliklov izločita v krvni obtok in se z njim preneseta do mest delovanja in metabolizma (6). Mesta njunega delovanja so predvsem srce, možgani, spolni organi in jetra. V plazmi je veliko več T4 kot T3, vendar se več kot 99 % T4 zaradi vezave na plazemske proteine ne more vezati na receptor za ščitnične hormone (2). Samo nevezana frakcija lahko vstopa v tkiva in se tam pretvori v T3 (5). Najvišjo afiniteto do tiroksina ima plazemski protein TBG (*Thyroxine Binding Globuline*, tiroksin vežoči globulin). Albumin ima višjo plazemsko koncentracijo od ostalih proteinov, zato je njegova vezavna kapaciteta za T4 visoka kljub nižji afiniteti (2). T4 se veže tudi na protein transtiretin (TTR) (7).

Pri metabolizmu T4 in T3 imajo pomembno vlogo tri skupine encimov: dejodaze, glukuroniltransferaze in sulfotransferaze. Encime vseh treh skupin najdemo v jetrih, ki so najpomembnejše presnovno mesto ščitničnih hormonov. V hepatocitih se nahajajo encimi 5'-dejodaza I, 5'-dejodaza II in 5-dejodaza, ki katalizirajo odcep joda z molekul teh dveh hormonov (dejodiranje). Od mesta odcepa je odvisno, ali bo dejodiranje povzročilo aktivacijo ali inaktivacijo ščitničnih hormonov. Izoencima 5'-dejodaza I in 5'-dejodaza II pretvorita prohormon T4 v aktivno obliko T3, 5-dejodaza pa pretvarja T4 v neaktivni metabolit rT3 ter katalizira pretvorbo T3 in rT3 v prav tako neaktivni dijodotironin (T2) (8). Jetrna encima uridildifosfat-glukuronozil-transferaza 1A1 (UGT 1A1) in UGT 1A3

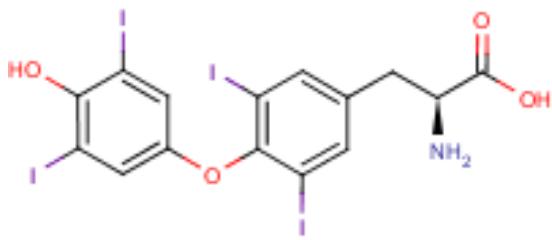
preneseta glukuronid na fenolno hidroksilno skupino T3 in T4, pri čemer nastaneta neaktivna konjugata. UGT 1A3 lahko katalizira tudi aciliranje karboksilne skupine T4 in T3, pri katerem prav tako nastaneta neaktivna konjugata (9). Encime UGT sicer najdemo tudi v drugih tkivih. V prebavilih prisotna encima UGT 1A8 in 1A10 lahko razgradita eksogeni levotiroksin pred sistemsko absorpcijo (10). Sulfotransferaze (SULT) inaktivirajo ščitnične hormone s tvorbo sulfatnih estrov. Za jetrno presnovo T4 in T3 je najpomembnejši podtip SULT 1A1, v metabolizem ščitničnih hormonov pa sta vpletena tudi podtipa SULT 1B1 in 1E1, slednji je pogost v fetalnih jetrih (11, 12). Sulfatirani, glukuronidirani in dejodirani derivati ščitničnih hormonov se iz organizma izločijo z urinom in žolčem (9). Izločanje v žolč omogočajo jetrni prenašalci MRP 2 (*Multidrug Resistance-Associated Protein* – protein, povezan z odpornostjo proti več učinkovinam), črevesni prenašalci MRP 2 pa lahko zmanjšajo biološko uporabnost eksogenega LT z njegovim izločanjem iz enterocitov pred sistemsko absorpcijo. T4, T3 in LT v literaturi niso omenjeni kot substrati za encimski sistem citokromov CYP ter za prenašalca P-glikoprotein in BCRP (*Breast Cancer Resistance Protein* – protein, povezan z odpornostjo proti učinkovinam za terapijo raka dojke) (13).

1.2. *Eksogeni levotiroksin*

LT je po kemizmu jodirana aminokislina (derivat tirozina) z dvema kislima in enim bazičnim centrom. Kisla centra sta fenolna hidroksilna skupina (pK_a 10,1) in karboksilna skupina (pK_a 6,7), bazični center pa je amino skupina (pK_a 2,2). Topnost LT je odvisna od pH in je zaradi amfoternosti višja tako pri močno kislem kot pri močno bazičnem pH, najnižja pa je pri pH 3–6 (14). V tem intervalu pH se večina raztopljenega LT nahaja v neionizirani obliki, kar olajšuje absorpcijo te spojine s pasivno transcelularno difuzijo.

V farmacevtskih pripravkih se levotiroksin nahaja v obliki natrijeve soli (natrijev levotiroksinat). Po merilih Evropske farmakopeje sodi natrijev levotiroksinat med zelo težko topljive snovi (*very slightly soluble* – 1 gram topljenca se raztopi v več kot 1 L in manj kot 10 L topila), saj se 1 gram levotiroksina raztopi v 6,7 L destilirane vode (pH 7), kar pomeni topnost 150 mg/L. Natrijev levotiroksinat je lipofilen, saj znaša logaritem porazdelitvenega koeficiente ($\log P$) za sistem oktanol/voda 7,31 (15).

Na osnovi topnosti in intestinalne permeabilnosti razvrščamo učinkovine v sistem BCS (*Biopharmaceutics Classification System*). Po topnosti delimo učinkovine na slabo in dobro topne, po permeabilnosti pa na slabo in dobro permeabilne. Učinkovina velja za dobro topno, če se v 0,25 L vodnega medija (približek volumna črevesnega soka na tešče) v širokem pH območju (pH 1–7,5) raztopi najvišji dovoljeni enkratni odmerek učinkovine, vgrajene v pripravek s takojšnjim sproščanjem. Pri intestinalni permeabilnosti veljajo za dobro permeabilne tiste učinkovine, pri katerih se v širokem pH območju (pH 1–7,5) absorbira v sistemski obtok več kot 90 odstotkov peroralno apliciranega odmerka. Natrijev levotiroksin sodi v razred I sistema BCS, kar pomeni dobro topnost in dobro intestinalno permeabilnost (15).



Slika 1: Struktura molekule levotiroksina (vir 15)

V Sloveniji registrirana pripravka z LT (v obliki natrijevega levotiroksinata heptahidrata z molsko maso 888,95 g/mol) sta Euthyrox® in Eltroxin®. Pri prvem znašajo odmerki natrijevega levotiroksinata (preračunani na brezvodni natrijev levotiroksinat z molsko maso 798,1 g/mol) 25, 50, 100 in 150 mikrogramov, drugi pa je na voljo le v tabletah po 50 mikrogramov. Pri obeh pripravkih je predpisano uživanje na tešče, saj lahko pri uživanju s hrano prehranske vlaknine zmanjšajo absorpcijo. Najvišji dnevni odmerek LT pri kronični nadomestni terapiji hipotiroze je 200 mikrogramov, kar je tudi najvišji enkratni odmerek, saj se dnevni odmerek lahko predpiše kot enkratni. Višji dnevni in enkratni odmerki (do 300 µg) so dovoljeni pri supresijski terapiji po operaciji raka na ščitnici, kjer želimo s kratkotrajno aplikacijo visokih odmerkov LT

sprožiti negativno povratno zvezo v hipotalamusu in hipofizi ter tako znižati izločanje tiroliberina in TSH. Zaradi znižanega izločanja TSH se v ščitnici zmanjša sinteza endogenih T3 in T4, ki ostane zavrta tudi po prekinitvi supresijske terapije, saj je normalizacija izločanja TSH počasna (2, 16, 17).

Razlika med minimalnim učinkovitim in maksimalnim varnim odmerkom (terapevtsko okno) pri LT je majhna. Nizki odmerki natrijevega levotiroksinata ne zadostujejo za nadomeščanje pomanjkanja endogenih ščitničnih hormonov, visoki odmerki pa so kardiotoksični in lahko povzročijo znakom hipotiroze podobne stranske učinke (1, 5, 18). Pri posameznem pacientu je zato potrebno pred postavitvijo primerne terapevtske sheme preizkušati različne jakosti dnevnih/enkratnih odmerkov. Vzdrževalni dnevni/enkratni odmerki pri odraslih pacientih s hipotirozo se nahajajo v razponu 100–200 µg (17).

V primeru popolne raztopitve na tešče zaužitega najvišjega enkratnega odmerka natrijevega levotiroksinata (200 µg) bi intraluminalna koncentracija znašala 0,8 mg/L (če predpostavimo, da volumen črevesnega soka na tešče znaša 0,25 L). Pri pH 7 znaša topnost natrijevega levotiroksinata približno 150 mg/L (15), zato se aplicirani LT v celoti raztopi v črevesnem soku pri fiziološkem pH. Zaradi nizkih apliciranih odmerkov topnost v črevesnem soku ne ovira absorpcije LT iz prebavil. Zato natrijev levotiroksinat v sistemu BCS uvrščamo med dobro topne učinkovine, čeprav po merilih Evropske farmakopeje sodi med zelo težko topljive snovi zaradi svoje nizke absolutne topnosti.

Ob sočasnem zaužitju železovih ionov in LT lahko železovi ioni v prebavilih kompleksirajo LT in zmanjšajo njegovo absorpcijo (19). Interakcija je lahko klinično pomembna, zato se prehransko dopolnilo z vitaminimi in minerali za nosečnice Elevit Pronatal®, pri katerem vsaka tableta vsebuje 400 mg železa, odsvetuje nosečnicam, ki redno uživajo LT (20). Hipotiroza pri nosečnicah bi lahko povzročila hude okvare ploda, saj je LT nujno potreben za normalni embrionalni razvoj.

Adsorpcija raztopljenega LT na plastične površine otežuje izvajanje raziskav v *in vitro* modelih, vendar nima pomembnejšega vpliva na farmakokinetiko LT pri ljudeh, saj v človeškem organizmu običajno ne najdemo plastičnih površin, kljub temu pa so v človeških prebavilih prisotni proteini, ki lahko vežejo LT. Za dosego konstantnih koncentracij LT v plastične vsebnike dodamo albumine, ki vežejo LT. Vezana frakcija je

v ravnotežju s prosto in se med absorpcijo prostega LT počasi sprošča z albuminov. Pred analizo moramo albumine oboriti in odstraniti. Adsorpcijo LT na laboratorijsko opremo lahko zmanjšamo tudi z uporabo teflonske ali steklene opreme namesto plastične (21).

1.3. Absorptivni in sekretorni prenašalci za levetiroksin

LT se lahko absorbira iz prebavil s pasivno transcelularno difuzijo, pasivno paracelularno difuzijo in prenosom s prenašalci, ki je lahko bodisi pasiven ali aktiven (22). Prenos s prenašalci poteka po zakonitostih encimske kinetike. Če je substrat v prebitku glede na koncentracijo prenašalca, bodo vsi razpoložljivi prenašalci zasedeni in proces absorpcije bo dosegel svojo maksimalno hitrost. Nadaljnje povečevanje koncentracije substrata ne pospeši absorpcije (23).

Nekatere snovi delujejo na prenašalce kot reverzibilni kompetitivni ali nekompetitivni inhibitorji. V prvem primeru se inhibitor prenaša z istim prenašalcem kot učinkovina, zato pride med njima do tekmovanja za vezavna mesta. Inhibitor izpodrini učinkovino s teh mest in posledično se njena absorpcija zmanjša. Če povečamo koncentracijo učinkovine, lahko kljub prisotnosti inhibitorja dosežemo enako maksimalno hitrost absorpcije kot ob odsotnosti inhibicije. V drugem primeru pa inhibitor ni substrat, ampak z alosteričnim delovanjem spremeni konformacijo prenašalca. Posledica takšne spremembe je običajno nižja maksimalna hitrost prenosa, tudi kadar je koncentracija substrata v visokem prebitku glede na koncentraciji prenašalca in inhibitorja (23). Zaradi alosteričnega učinka lahko pride tudi do stimulacije prenosa in povečanja maksimalne hitrosti (24). Če prenehamo z aplikacijo reverzibilnega inhibitorja, njegov učinek na prenašalce po določenem času izzveni, ker se molekule inhibitorja sprostijo z vezavnega mesta, prenašalec pa se povrne v prvotno konformacijo. V primeru ireverzibilne (kompetitivne ali nekompetitivne) inhibicije pa se inhibitor kovalentno veže na encim in s tem trajno spremeni njegovo strukturo (23, 25).

Pri intestinalni absorpciji LT so udeleženi prenašalni polipeptidi za organske anione (OATP – *Organic Anion Transporting Polypeptide*) iz družine prenašalcev za topljence (SLC – *Solute Carrier*). Prenos s prenašalci OATP je oblika olajšanega pasivnega transporta, ki poteka v smer koncentracijskega gradiента in je neodvisen od membranskega potenciala, adenozintrifosfata (ATP) ter gradientov natrijevih, kalijevih in

kloridnih ionov (26). Prenos v nasprotni smeri koncentracijskega gradiента pri prenašalcih OATP poteka samo v obliki sekundarnega aktivnega transporta, pri katerem je absorpcija organskih anionov v celico (nasprotna smer koncentracijskega gradiента) sklopljena s sekrecijo hidroksilnih in hidrogenkarbonatnih ionov iz celice (smer koncentracijskega gradienta), skupna sprememba proste energije za vsoto sklopljenih procesov (absorpcije in sekrecije) pa je negativna, zato lahko absorpcija v nasprotno smer koncentracijskega gradienta poteka brez razgradnje ATP (26, 27). Učinkovitost prenosa je najvišja pri šibko kislem pH mikroklime na apikalni strani enterocitov, ki se lahko razlikuje od pH črevesnega soka v osrednjem delu lumna (27).

Za poimenovanje prenašalcev OATP bomo uporabljali nomenklaturo Hagenbucha in Meierja iz leta 2003 (28). LT je substrat za več podtipov OATP, med katerimi so najpomembnejši 1C1, 1A2, 1B1 in 1B3, manj pomembni pa so podtipi 3A1, 4A1 in 4C1 (22, 26). OATP 1C1 ima med vsemi prenašalci OATP najvišjo afiniteto do LT (22). Nahaja se predvsem v krvno-možganski pregradi in v modih, kjer olajša privzem LT iz sistemskega obtoka v možgane in spolne organe, kar omogoča normalno delovanje možganov in spolni razvoj (26, 29). Prenašalci OATP 1C1 niso prisotni v prebavilih in jetrih, zato niso udeleženi pri absorpciji in metabolizmu LT. Podtipa OATP 1B1 in 1B3 sta prisotna skoraj izključno v jetrih, kjer sta izražena na sinusoidalni membrani hepatocitov. S prenosom LT v hepatocite omogočata njegovo presnovo (30). Prenašalci podtipa 4C1 prenašajo LT in druge substrate iz krvnega obtoka v ledvični proksimalni tubul (26).

LT je tudi substrat za prenašalce OATP 1A2, 3A1 in 4A1, ki se izražajo tudi na apikalni membrani enterocitov. Prenašalci 1A2 niso specifični za prebavila, ampak se nahajajo tudi v jetrih, ledvicah in možganih, podtipa 3A1 in 4A1 pa sta prisotna v vseh tkivih (26, 30). V enterocitih so odkrili informacijsko ribonukleinsko kislino (*messenger Ribonucleic Acid* – mRNA) za OATP 1B1, ki naj bi bil specifični jetrni prenašalec. Zato bi se podtip 1B1 lahko v manjši meri izražal tudi v prebavilih (30). V literaturi ni navedb, da bi bil LT substrat za prenašalce OATP 2B1, ki se med drugim nahajajo na sinusoidalni membrani hepatocitov in apikalni membrani enterocitov (26, 30). Prenašalci OATP 2B1 imajo sicer podoben nabor substratov (feksofenadin, statini) in inhibitorjev (flavonoidi)

kot prenašalci OATP 1A2, ki dokazano prenašajo LT in so izraženi v enterocitih. Zato najverjetneje tudi podtip 2B1 sodeluje pri privzemu LT v enterocite (30, 31).

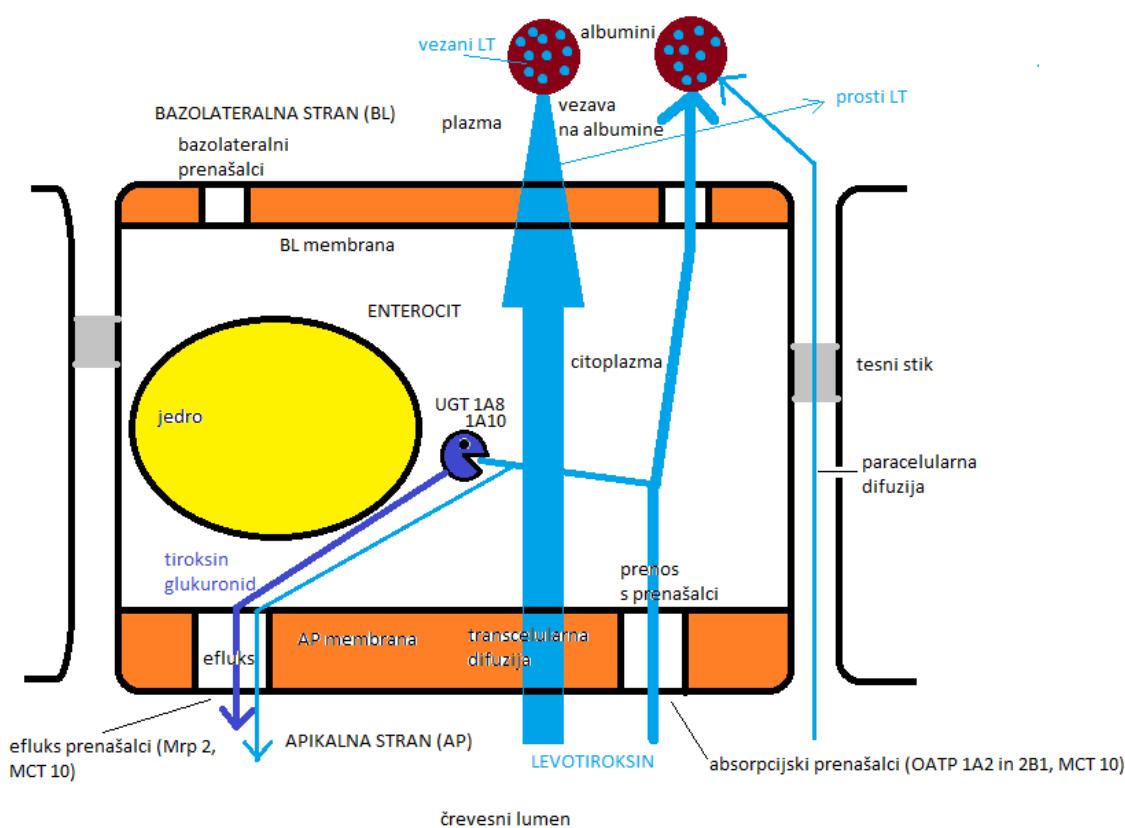
LT je substrat za monokarboksilatne prenašalce (MCT – *Monocarboxylate Transporter*) MCT 10, ki so udeleženi tako pri absorpciji aromatskih aminokislin v celice kot pri njihovi sekreciji iz celic, vendar so pomembnejši za sekrecijo kot za absorpcijo aromatskih aminokislin. Sekrecija aromatskih aminokislin preko teh prenašalcev, ki poteka v smeri koncentracijskega gradienta in je oblika olajšanega pasivnega transporta, je sklopljena z absorpcijo T4 (ozioroma njegovega sintetičnega analoga LT) in T3 v celično notranjost, ki poteka v nasprotni smeri koncentracijskega gradienta in je oblika sekundarnega aktivnega transporta. Prenašalci MCT 10 torej sodelujejo predvsem pri absorpciji ščitničnih hormonov v celice, vendar jih lahko tudi izločajo iz celic v primeru skloplitve prenosa ščitničnih hormonov z absorpcijo aromatskih aminokislin (22). Prenašalci MCT 10 so visoko izraženi v podganjem jejunumu, zato se ti prenašalci najverjetneje izražajo tudi v človeških prebavilih, kjer bi lahko prispevali k absorpciji LT skozi apikalno membrano iz črevesnega lumna v notranjost enterocita (32). LT je tudi substrat za prenašalce MCT 8, ki se ne izražajo v prebavilih, temveč v jetrih, ledvicah, srcu, skeletnih mišicah, možganih in ščitnici (22).

Poleg absorptivnih so v enterocitih tudi sekretorni (*efflux*) prenašalci, ki izločajo molekule svojih substratov iz citoplazme v črevesni lumen in tako nasprotujejo delovanju absorpcijskih prenašalcev. LT in njegovi presnovki (T4 glukuronid) so substrati za sekrecijske prenašalce MRP 2 iz družine ABC (*ATP Binding Cassette transporters* – prenašalci z domeno za vezavo ATP) (13, 30). Prenos substratov s prenašalcem MRP 2 je oblika aktivnega transporta, ki porablja z razpadom ATP pridobljeno energijo in lahko poteka proti koncentracijskemu gradientu (33). Delovanje prenašalcev MRP 2 je neodvisno od pH in koncentracije natrijevih ionov (34, 35).

V človeških prebavilih se prenašalci MRP 2 nahajajo na apikalni strani enterocitov ter izločajo v lumen anionske snovi in konjugirane metabolite ksenobiotikov (13, 34). Izraženost črevesnih prenašalcev MRP 2 je najvišja v dvanajstniku in se postopoma zmanjšuje proti kolonu (36). Stopnja izraženosti prenašalcev MRP 2 je višja kot pri drugih sekrecijskih proteinih v človeškem jejunumu z izjemo prenašalcev BCRP, pri katerih je stopnja izraženosti približno enaka kot pri MRP 2 (34). Enak vzorec ekspresije

kot črevesni prenašalci MRP 2 imajo enterocitni encimi UGT, odgovorni za nastanek glukuronidov, ki so substrati za prenašalce MRP 2. Prenašalci MRP 2 se nahajajo tudi v jetrih (v kanalikularni membrani hepatocitov), kjer izločajo glukuronidne konjugate v žolč (30).

Neto absorpcija LT v posameznem enterocitu je odvisna od vrste, števila in kapacitete prenašalcev, izraženih na apikalni (mukozni) enterocitni membrani. Ob prevladujočem vplivu sekretornih prenašalcev MRP 2 se bo LT izločal iz enterocitov, ob prevladi absorptivnih prenašalcev OATP pa bo absorpcija LT presegla izločanje. Raziskava Makheya in sodelavcev (35) je pokazala, da je pri človeških enterocitih izločanje substratov za MRP 2 etopozida, verapamila in vinblastina statistično značilno večje od njihove absorpcije.



Slika 2: Shematski prikaz absorpcije LT iz prebavil. Svetlo modre puščice ponazarjajo transport LT. Debelina puščic je v sorazmerju s pomembnostjo procesov.

1.4. Celice Caco-2

Celične kulture delimo na primarne celične linije (celice nerakastega izvora) in na rakaste celične kulture. Rakave celice se po določenem številu delitev diferencirajo v omejenem obsegu in postanejo podobne (vendar ne identične) normalnim celicam nekaterih človeških tkiv. Človeškim enterocitom se najbolj približajo celice Caco-2 (Caco je okrajšava za *cancer of colon*, rak debelega črevesa). Čeprav celice izvirajo iz tumorja na debelem črevesu, se po približno treh tednih z delitvami iz matične linije razvijejo v konfluentne celice, ki posnemajo značilnosti enterocitov jejunuma. Oblikuje se monosloj celic Caco-2 s ščetkastim obrobkom, vendar brez gub, značilnih za epitelij črevesne sluznice, zato je za absorpcijo razpoložljiva površina pri celicah Caco-2 manjša kot pri normalnih človeških enterocitih (37).

Hilgendorf in sodelavci so opravili raziskavo (38), kjer so primerjali izražanje prenašalnih proteinov med celicami Caco-2 in človeškim jejunumom. Visok kvadrat Pearsonovega koeficiente korelacije ($R^2 = 0,87$) pomeni, da celice Caco-2 zadovoljivo posnemajo človeško tkivo. Celice Caco-2 izražajo tudi absorptivne in sekretorne prenašalce, ki sodelujejo pri absorpciji LT (OATP 1A2, 1B1, 1B3 in 2B1 ter MRP 2). Prenašalci MRP 2 se v celicah Caco-2 izražajo veliko bolje kot katerikoli podtip prenašalcev OATP.

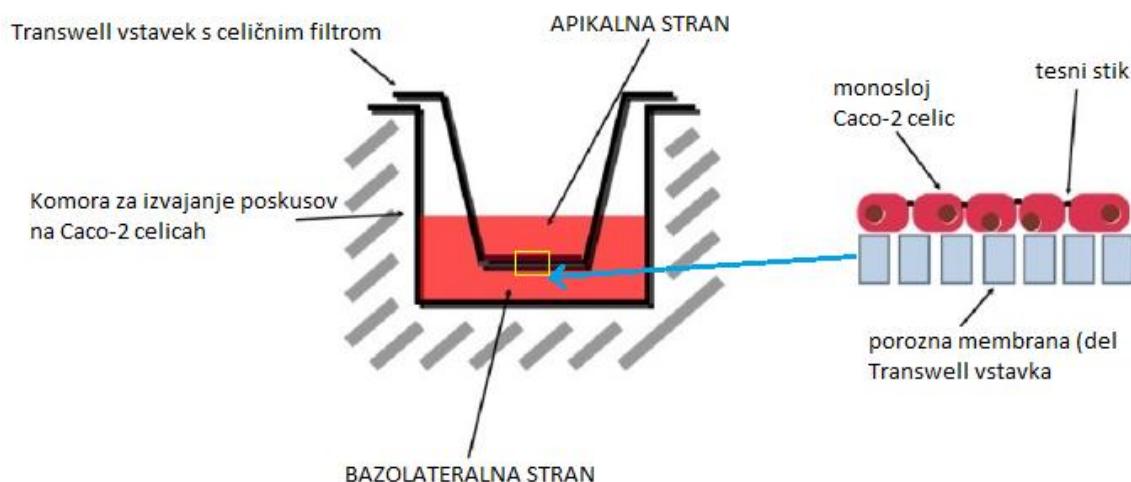
Matična linija rakavih celic Caco-2 je heterogena in vsebuje celice, ki se lahko medsebojno razlikujejo v izražanju prenašalcev ali permeabilnosti. Z delitvami celic matične linije lahko nastanejo različne hčerinske (klonalne) linije. Razlike med uporabljenimi celičnimi linijami lahko bistveno vplivajo na rezultate in onemogočijo njihovo primerjavo med različnimi laboratoriji (39). Zato z uporabo standardiziranih protokolov gojenja, presajanja in shranjevanja celic Caco-2 ter izvajanja poskusov na njih zagotavljamo celično kakovost in zmanjšujemo variabilnost. S tem omogočamo njihovo široko uporabo v *in vitro* raziskavah absorpcije (37).

Pri gojenju celic Caco-2 uporabljamo pasaže matičnih celic s podobnimi številkami, da zagotovimo čim večjo podobnost klonalnih linij (40). Previdni moramo biti pri uporabi organskih topil in površinsko aktivnih snovi, ki porušijo integriteto monosloja celic Caco-2. Takšni snovi sta polietilenglikol 400 (PEG 400) in dimetilsulfoksid

(DMSO) (41). Slednjega zato uporabljamo le v koncentracijah do 1 %, čeprav v literaturi zasledimo podatke, da celice Caco-2 prenesejo največ 2 % koncentracijo DMSO (40, 42).

Kakovost celic Caco-2 nadzorujemo z meritvami transepitelijске električne upornosti (*Transepithelial Electrical Resistance – TEER*), ki predstavlja upornost paracelularne difuzije skozi tesne stike med celicami v monosloju (43). Če je TEER monosloja nižja od $200 \Omega/\text{cm}^2$, je najverjetneje prišlo do celičnih poškodb, zato takšen monosloj ni primeren za izvajanje poskusov (37).

Če se iskane interakcije ne pokažejo ob pravilni izvedbi *in vitro* raziskav na celicah Caco-2, se najverjetneje ne bi pokazale tudi pri *in vivo* raziskavah. Če pa se iskane interakcije pokažejo *in vitro*, moramo potrditi njihovo klinično pomembnost z *in vivo* raziskavami (klinične študije) (44).



Slika 3: Shematski prikaz komore za poskuse s celicami Caco-2 (levo) in monosloja celic Caco-2 (desno) (vir 45).

1.5. Prehranska dopolnila

V Sloveniji področje prehranskih dopolnil (PD) ureja Pravilnik o prehranskih dopolnilih (v nadaljevanju Pravilnik o PD) (46), usklajen z direktivo Evropskega parlamenta in Sveta Evropske unije iz leta 2002 (47). Predpise o PD najdemo tudi v Pravilniku o razvrstitvi zdravilnih rastlin (48) in v Pravilniku o razvrstitvi vitaminskih in mineralnih izdelkov za peroralno uporabo med zdravila (49).

Po definiciji iz Pravilnika o PD so prehranska dopolnila izdelki za dopolnjevanje zdrave in uravnotežene prehrane. PD niso namenjena za preprečevanje in zdravljenje bolezni, zato jih je prepovedano oglaševati kot zdravila. PD morajo ustrezi predpisom, ki veljajo za prehranske izdelke, poleg tega pa morajo izpolnjevati še dodatne zahteve. Na njihovi embalaži morajo biti podatki o sestavi PD in priporočenem dnevnom odmerku, skupaj z opozorilom, da se priporočenega dnevnega odmerka ne sme prekoračiti. Obvezni sta tudi opozorili, da je potrebno PD shranjevati nedosegljivo otrokom in da PD ni nadomestilo za zdravo in uravnoteženo prehrano (46). Predpisana je največja vsebnost posameznih vitaminov, mineralov in drugih snovi, ki jih PD še lahko vsebujejo (50). Če vsebnost teh snovi v izdelku presega zgornjo mejo, je potrebno izdelek registrirati kot zdravilo (49).

Proizvajalec ali uvoznik PD morata pred začetkom prodaje PD na slovenskem tržišču obvestiti Ministrstvo za zdravje in mu posredovati proizvodno specifikacijo (če je PD slovenskega porekla) oziroma izvirno označbo s predlogom označbe v slovenskem jeziku (če je PD uvoženo iz tujine). Ministrstvo lahko od proizvajalca ali uvoznika zahteva dodatno strokovno dokumentacijo, da gre pri izdelku za PD. Na spletni strani Ministrstva za zdravje je objavljen seznam PD na slovenskem tržišču (46).

Ministrstvo za zdravje izvaja analize PD, ki so na tržišču, vendar analizirajo le mikrobiološko kontaminacijo ter vsebnost pesticidov in težkih kovin. Če na osnovi rezultatov analize ali drugih novih dejstev obstaja utemeljen sum, da PD, ki je vstopilo na tržišče v skladu s Pravilnikom, predstavlja nevarnost za zdravje ljudi, lahko Ministrstvo za zdravje začasno prepove ali omeji promet s tem izdelkom in o tem obvesti Evropsko komisijo (46).

PD, ki vsebujejo rastline, njihove dele ali ekstrakte, se lahko močno razlikujejo v vsebnosti snovi, ki lahko vplivajo na delovanje človeškega organizma. Vsebnosti posameznih sestavin v različnih rastlinah iste vrste in celo v različnih delih iste rastline (listi, steblo, korenine itd.) se pogosto razlikujejo, zato je variabilna tudi vsebnost teh sestavin v pripravkih, proizvedenih iz rastlin iste vrste. Pri kontrolah vsebnosti nadzorni organi pogosto odkrijejo večja neskladja med deklarirano in dejansko vsebnostjo (51, 52).

PD naj bi vsebovala snovi, ki jih najdemo v običajni človeški prehrani (npr. vitamini, maščobne kisline in minerali), zato naj bi morebitne interakcije pri njihovem uživanju ostale v okviru običajnih in predvidljivih interakcij med hrano in zdravili. Vsa PD pa ne vsebujejo sestavin, ki jih uživamo vsakodnevno. Zakonodaja namreč omogoča, da se tudi rastlinski pripravki registrirajo kot PD (46, 48). Med njimi so tudi rastline z dokazanim farmakodinamskim delovanjem, ki niso del običajne prehrane, ampak jih uživamo izključno v terapevtske namene (npr. pegasti badelj, šentjanževka). V takšnih rastlinah je lahko več potencialno farmakološko aktivnih snovi, zato obstaja možnost sinergističnega delovanja, ko ima zmes učinkov močnejši farmakodinamski učinek kot posamezna izolirana sestavina (53). Pri PD rastlinskega izvora zato ne moremo izključiti možnosti resnejših in klinično pomembnih interakcij z zdravili.

Uživanje PD v razvitem svetu narašča zaradi več vzrokov. Prvi je nezdrav način življenja in prehranjevanja. Čeprav po definiciji niso namenjena temu, ljudje uživajo PD, da bi jih obvarovala pred posledicami njihovih razvad. Primer je jemanje pegastega badlja pri ljudeh, ki prekomerno uživajo alkohol (54). Druga skupina uživalcev so ljudje, ki so nezadovoljni s svojim telesom in bi radi s pomočjo PD spremenili kakšno za njih motečo telesno lastnost (debelost, plešavost, znaki staranja, nizka mišična masa in težave z erekcijo pri moških, majhne prsi pri ženskah) (55, 56, 57, 58). Tretja skupina so ljudje, ki bi radi z uživanjem PD izboljšali svoje razpoloženje ali imunske odpornosti. Sem sodijo uživalci vitaminov, mineralov, rastlinskih poživil (ginseng – *Panax ginseng*), pomirjeval (baldrijan – *Valeriana officinalis*), antidepresivov (šentjanževka – *Hypericum perforatum*) in spodbujevalcev imunskega sistema (ameriški slamnik – *Echinacea purpurea*) (53, 59). Četrta skupina so zagovorniki tradicionalne in alternativne medicine, ki ne zaupajo dosežkom sodobne farmacevtske kemije. Prepričani so, da imajo samo kemično pridobljena zdravila stranske učinke, medtem ko naj bi naravni izvor izdelka avtomatično zagotavljal njegovo varnost (51, 53, 60). V to skupino sodijo tudi ljudje, ki trpijo zaradi kroničnih bolezni in pri katerih konvencionalna terapija ni izboljšala kakovosti življenja, zato so se zatekli k jemanju PD. Proizvajalci PD kljub zakonski prepovedi svoje izdelke pogosto oglašujejo na podoben način kot zdravila (zlasti na internetu) in v oglasih zatrjujejo, da so bolniki z uživanjem teh PD premagali raka ali druge resne bolezni (60). Seveda je takšno oglaševanje zavajajoče in lahko spodbudi

paciente k opustitvi predpisanih zdravil. Peta skupina uživalcev so ljudje, ki uživajo PD preventivno kot zaščito pred rakom, kapjo in podobnimi življenjsko nevarnimi stanji (59, 60). V to skupino sodijo uživalci rastlinskih flavonoidov in drugih antioksidantov.

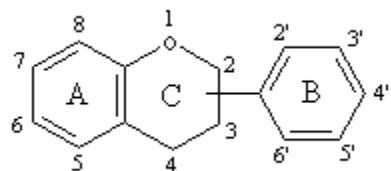
1.6. Flavonoidi

Flavonoidi so rastlinski sekundarni metaboliti iz skupine polifenolov. Rastline ščitijo pred ultravijoličnim sevanjem in drugimi dejavniki oksidativnega stresa. So tudi sestavina rastlinskih pigmentov in dajejo barvo cvetovom, ki privablja žuželke opraševalke (61). Kemijsko je za njih značilna struktura iz dveh kondenziranih šestčlenskih obročev, benzenovega in piranovega, ki tvorita heterocikel kroman. V redkih primerih je na benzenov obroč kondenziran petčlenski obroč (avroni) ali pa je piranov obroč prekinjen (halkoni) (glej slike 4–6). V piranovem obroču so lahko dvojne vezi, na kromanski del molekule pa so lahko pripete hidroksilne in keto skupine ter fenilni substituent (62). Flavonoidni monomeri se povezujejo med seboj v dimere in oligomere. Na hidroksilnih skupinah lahko pride do nastanka etrskih vezi s sladkorji ali tvorbe estrov z galno kislino. V prvem primeru nastanejo glikozidi, v drugem galati (61).

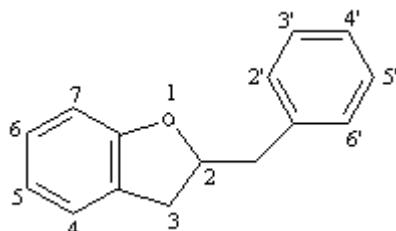
Obseg intestinalne absorpcije flavonoidov je majhen zaradi nizke permeabilnosti flavonoidnih glikozidov skozi apikalno enterocitno membrano in visoke stopnje glukuronidacije aglikonov (ki lažje prehajajo skozi apikalno membrano) v citoplazmi enterocitov. Pri tem nastali konjugati flavonoidov so substrati za črevesne sekrecijske prenašalce MRP 2, s katerimi se lahko izločijo tudi absorbirani flavonoidni glikozidi, ki se v enterocitih niso presnovili. Cikel absorpcije v enterocite, konjugacije, sekrecije nazaj v lumen in razpada konjugatov v lumnu se lahko večkrat ponovi, preden se flavonoidi in njihovi presnovki absorbirajo v plazmo (36).

Farmakokinetika flavonoidnih glikozidov se razlikuje od farmakokinetike aglikonov. Glikozidi so značilno večji od aglikonov, zato težje pasivno difundirajo skozi enterocitno membrano. Glikozidi se lahko s slatkornim delom vežejo na prenašalec za glukozo SGLT 1 (*Sodium-Glucose Transport protein 1*) in se z njegovo pomočjo prenesejo v enterocit, kjer se lahko konjugirajo, nastali konjugati pa s pomočjo sekretornih prenašalcev potujejo nazaj v črevesni lumen (63, 64). Encimi bakterijske flore debelega črevesja sicer razgrajujejo glikozidno vez, vendar je poglavitno mesto absorpcije

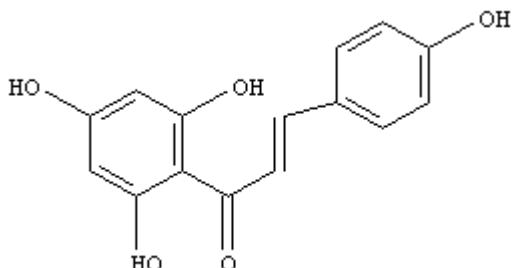
flavonoidov v tankem črevesju. Če flavonoide apliciramo v obliki glikozidov, bodo v tankem črevesju večinoma še vedno v tej obliki (65, 66).



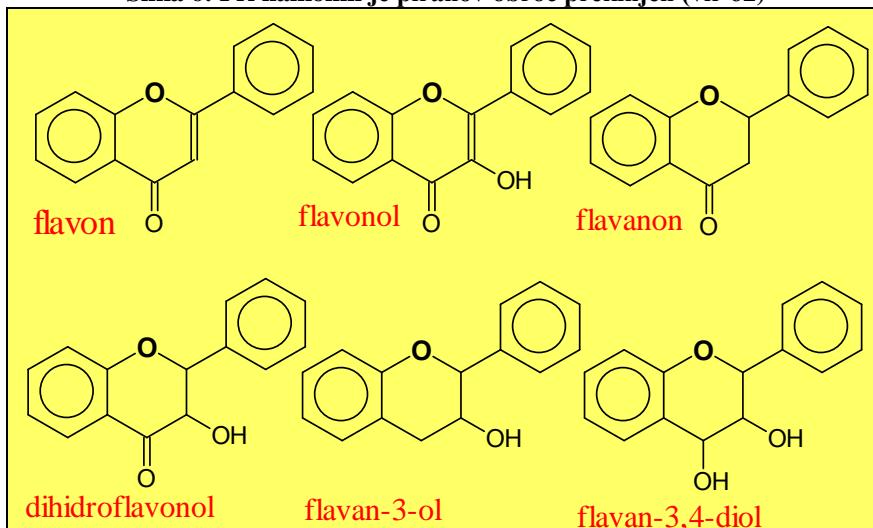
Slika 4: Osnovna struktura flavonoidov kromanskega tipa (vir 62)



Slika 5: Avroni imajo petčlenski furanov obroč namesto šestčlenskega piranovega (vir 62)



Slika 6: Pri halkonih je piranov obroč prekinjen (vir 62)



Slika 7: Osnovne strukturne formule nekaterih tipov flavonoidov (vir 61)

V nadaljevanju bomo predstavili prehranska dopolnila, ki jih bomo uporabili pri poskusih z LT na celicah Caco-2. To so kvercetin, izveček listov zelenega čaja, piknogenol, izvleček lubja bele jelke in izvleček plodov pegastega badlja. Pri posameznih PD se bomo osredotočili na najvišje enkratne odmerke, ker je pri zaužitju takšnih odmerkov največja možnost značilnega vpliva flavonoidov iz PD na permeabilnost LT.

1.7. Kvercetin

Flavonoli so skupina flavonoidov, za katero so značilni fenilni substituent na mestu 2, dvojna vez na mestu 2-3 in keto skupina na mestu 4 (glej sliko 7). Predstavnik flavonolnih aglikonov je kvercetin, ki mu zaradi antioksidativnih lastnosti pripisujejo zaščitno delovanje proti vnetju, malignim spremembam in boleznim srčno-žilnega sistema (67). Njegovi kristali so značilne živorumene barve. Kot PD je kvercetin na voljo v kapsulah različnih proizvajalcev in v različnih odmerkih.

Pri pregledu svetovnega spletja smo naleteli na izdelke proizvajalca Bevko, ki ponuja izdelka Quercetin Forte® in Super Quercetin Forte®. Pri prvem gre za kapsule s 500 mg kvercetina v obliki čistega aglikona, pri drugem pa vsaka kapsula vsebuje kar 900 miligramov kvercetina in še 200 mg izvlečka grozdnih pečk (*grape seed extract*), ki ima veliko vsebnost proantocianidinov (68). Avgusta 2011 je bil Quercetin Forte (500 mg) umaknjen iz spletne prodaje, 900-miligramske kapsule pa so še vedno na voljo. Vzrok za umik najverjetneje ni povezan z varnostjo pripravka, ampak s premajhnim povpraševanjem kupcev, ki verjetno raje kupujejo 900-miligramske kapsule v prepričanju, da je višji odmerek bolj učinkovit. Najvišji priporočeni dnevni odmerek kvercetina je 1 gram (69).

Supplement Facts		
Serving Size:	1 Capsule	
Servings per Container: 240		
Amount per Serving		% DV
Quercitin Dihydrate	500 mg	*
Bilberry (fruit, standardized (to a 25 % anthocyanidins)	25 mg	*
Rutin	25 mg	*

* Daily Value not established.

Other Ingredients: gelatin (capsule), cellulose and vegetable stearate.

Slika 8: Sestava prehranskega dopolnila Quercetin Forte® (vir 68)



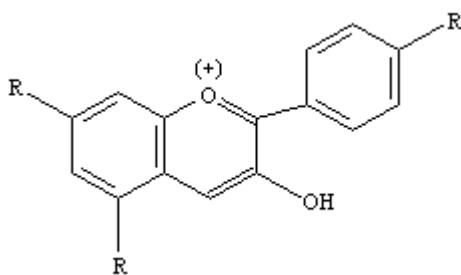
Slika 9: Vsebnik prehranskega dopolnila Super Quercetin Forte® (vir 68)

Čisti kvercetin je po merilih Evropske farmakopeje skoraj netopljiv (*practically insoluble*) v destilirani vodi pri sobni temperaturi in pH 7 (za raztopljanje 1 g kvercetina potrebujemo več kot 10 L vode), zato je ob aplikaciji odmerkov kvercetina, ki jih najdemo v PD proizvajalca Bevko, najverjetneje presežena nasičena topnost kvercetina v črevesnem soku. Nizka topnost kvercetina znižuje njegovo biološko uporabnost, saj se neraztopljeni kvercetin ne more absorbirati iz prebavil. Topnost kvercetina lahko povečajo žolčne kisline, ki delujejo kot emulgator, in površinsko aktivne pomožne snovi v kapsulah kvercetina, na primer polietilenglikol in drugi solubilizatorji (70, 71). Večina absorbiranega kvercetina se že v enterocitih konjugira z glukuronosko kislino, zato v sistemskem obtoku ne najdemo več prostih aglikonov. Konjugati nimajo farmakološkega učinka, vendar se lahko v tarčnih tkivih s pomočjo encimov v tkivih metabolizirajo nazaj do prostega aglikona, ki je nosilec antioksidativnega delovanja (72).

1.8. Izvleček listov zelenega čaja

Flavonoidi brez keto skupine na mestu 4, z enojno vezjo na mestu 2-3, fenilnim substituentom na mestu 2 in hidroksilno skupino na mestu 3 se imenujejo flavan-3-oli

(glej sliko 7) in imajo antioksidativne lastnosti (72). Flavan-3-oli se lahko medsebojno povezujejo v dimere, oligomere in polimere. Polimeri se imenujejo proantocianidini in so čreslovine kondenziranega tipa, kjer so monomerne enote medsebojno povezane z vezmi med dvema ogljikovima atomoma (C-C vezi). Monomerna enota ima na mestu 2 fenilni substituent, ki je različno substituiran s hidroksilnimi skupinami. Proantocianidini s 4'-hidroksifenilnim substituentom na mestu 2 monomerne enote se imenujejo propelargonidini, tisti s 3',4'-dihidroksifenilnim substituentom se imenujejo procianidini, prodelfnidini pa imajo 3',4',5'-trihidroksifenilni substituent. Pri oksidaciji proantocianidinov v kislem se cepijo vezi med monomernimi enotami, piranov obroč pa dobi permanentni pozitivni naboj, ki je porazdeljen po oblaku π -elektronov. Nastali kationi se imenujejo antocianidini (skupno ime za cianidine, delfnidine in pelargonidine), njihovi glikozidi pa antocianini (61, 62).



Slika 10: Antocianidin nastane z oksidacijo in cepitvijo proantocianidinov. Antocianidini se delijo na pelargonidine (ena hidroksilna skupina na fenilnem substituentu), cianidine (dve hidroksilni skupini) in delfnidine (tri hidroksilne skupine) (vir 62)

V PD se nahajajo predvsem flavan-3-oli iz listov zelenega čaja (*Camellia sinensis*) in skorje iglavcev, npr. obmorskega bora (*Pinus pinaster* subsp. *atlantica*). Flavan-3-ole najdemo tudi v rdečem vinu, kakavu in jabolkih (73). Zeleni čaj je tradicionalna kulturna rastlina južne in vzhodne Azije. Listi vsebujejo flavan-3-ole katehin, epikatehin (EC), epigalokatehin (EGC), epikatehin galat (ECG) in epigalokatehin galat (EGCG) (74).

Med pripravki iz zelenega čaja imata najvišji priporočeni enkratni odmerek Reflex Green Tea Extract® in Now Foods EGCG Green Tea Extract®. Reflex je kitajskega izvora, na voljo je v 300-miligramskih kapsulah in je dostopen tudi v Sloveniji, kjer ga po spletu trži podjetje Vo2 Sport. Naenkrat naj bi zaužili največ dve kapsuli oziroma 600 mg ekstrakta. Izdelek naj bi se uporabljal za hujšanje, ker naj bi stimuliral katabolizem maščob, vendar na spletni strani Vo2 Sport najdemo komentarje uporabnikov, da jim

uživanje tega PD ni pomagalo pri hujšanju (75). Pri izvlečku Now Foods lahko naenkrat zaužijemo le eno 400-miligramsko kapsulo. Proizvajalec priporoča zaužitje PD s hrano in oglašuje svoj izdelek kot izvrstni lovilec prostih radikalov (76). Poleg običajnih izvlečkov zelenega čaja, ki vsebujejo okrog 80 odstotkov flavan-3-olov, je na tržišču naprodaj tudi patentirano PD Polyphenon E®, ki vsebuje izolirano flavan-3-olno frakcijo izvlečka (77). Polyphenon E® je leta 2008 v Združenih državah Amerike celo dobil status zdravila sirote za terapijo kronične limfocitne levkemije. Zdravilo sirota (*orphan drug*) je namenjeno za zdravljenje redkih bolezni. Razvoj zdravil za take bolezni ni ekonomsko upravičen, saj prihodki od prodaje zdravila v času trajanja patenta ne bi pokrili stroškov razvoja in registracije zdravila, zato proizvajalci takšnih zdravil uživajo posebne ugodnosti (podaljšan čas trajanja patentne zaščite, davčne olajšave in subvencioniranje kliničnih raziskav) (78).



Slika 11: Vsebnik prehranskega dopolnila Reflex Green Tea® (vir 75)

Biološka uporabnost katehinov zelenega čaja je variabilna, vendar v splošnem nizka. Zaradi dviga želodčnega pH po obroku lahko ob zaužitju PD s hrano pride do razpada katehinov že med prehodom skozi želodec, saj so katehini občutljivi na povišan pH. Večina zaužitih katehinov se metabolizira v črevesju, še pred prvim prehodom jeter (79). Izjema sta oba galata (ECG in EGCG), pri katerih se večina absorbirane frakcije ne presnovi, zato se v plazmi nahajata pretežno v nespremenjeni obliki (66, 80). Kljub temu sta njuni plazemski koncentraciji precej nižji od najmanjših koncentracij, pri katerih so v *in vitro* poskusih zaznali antioksidativni učinek (80). Sekretorni prenašalci lahko aktivno izločajo katehine zelenega čaja in njihove glukuronide iz enterocitov v črevesni lumen. Glukuronidiranje katehinov v enterocitih poteka hitreje ob zaužitju katehinov s hrano ali takoj po obroku, saj je hrana vir prekurzorjev glukuronske kisline, s katero se konjugirajo katehini (80). ECG je substrat za sekretorne prenašalce MRP 2, zato bi lahko kompetitivno inhibiral izločanje LT, ki je prav tako substrat za te prenašalce (81).

Flavan-3-oli iz izvlečka zelenega čaja zavirajo absorpcijo feksofenadina, estron-3-sulfata (E3S) in drugih snovi, ki vstopajo v enterocite in hepatocite preko absorptivnih prenašalcev OATP podtipov 1A2, 1B1, 1B3 in 2B1 (ti podtipi transportirajo tudi LT). Izjema je transport E3S s pomočjo jetrnega prenašalca OATP 1B3, kjer je EGCG povečal privzem substrata, vendar je deloval inhibitorno na druge substrate, torej na tem prenašalcu najverjetneje obstajajo različna vezavna mesta za substrate. Najmočnejša inhibitorja absorptivnih prenašalcev OATP sta galata ECG in EGCG, ki sta hkrati tudi substrata OATP 1A2 in 1B3, ne pa tudi OATP 1B1 in 2B1. Pri podtipih 1A2 in 1B3 je mehanizem delovanja ECG in EGCG najverjetneje kompetitivna inhibicija, pri podtipih 1B1 in 2B1 pa alosterična (24).

1.9. Pknogenol in izvleček lubja bele jelke

Izvleček iz skorje obmorskega bora, ki raste na plantažah ob atlantski obali južne Francije, se trži pod zaščitenim imenom Pycnogenol® (v nalogi bomo uporabljali nezaščiteno slovensko ime piknogenol) (82). V Sloveniji je na voljo v tabletah jakosti 20 miligramov (Pycnogenol®), 50 mg (Pycnogenol Strong®) in 100 mg (Pycnogenol Forte®). Priporočeni dnevni odmerek je 1 mg na kilogram telesne teže, slatkornim in srčno-žilnim bolnikom pa se prve tri mesece uživanja priporoča dnevni odmerek 100 mg ne glede na njihovo težo. Pri uživanju pripravka Pycnogenol Forte® zaužijemo najvišji priporočeni dnevni odmerek z eno tableto, torej je 100 mg tudi najvišji priporočeni enkratni odmerek. V spletni lekarni slovenskega podjetja ArsPharmae piknogenol posebej priporočajo ljudem, ki že jemljejo druga zdravila, nič pa ne izvemo o morebitnih interakcijah (83). Med 65 in 75 odstotkov ekstrakta predstavljajo proantociandini (oligomeri flavan-3-olov katehina in epikatehina). V piknogenolu najdemo oligomere katehina in epikatehina iz 2 do 12 monomernih enot, najpogostejsa sta dimera B1 in B3. V preostalih 25–35 odstotkih izvlečka najdemo monomerna flavan-3-ola katehin in epikatehin, flavanonol taksifolin (dihidrokvercetin z enojno vezjo na mestu 2-3), derivate benzojske in cimetove kisline, njihove glikozide in druge polifenolne spojine (82). Sestavine naj bi se sinergistično dopolnjevale, zato naj bi imel piknogenol močnejše antioksidativno delovanje kot izolirane posamezne komponente (84). To PD sicer oglašujejo kot odlično zaščito pred vsemi vrstami degenerativnih obolenj (83).

Biološka uporabnost proantocianidinskih oligomerov je nizka, zato so njihove plazemske koncentracije, dosežene po peroralni aplikaciji, veliko nižje od terapevtskih. Kljub temu lahko v prebavilih dosežejo zelo visoke lokalne koncentracije, ki zavirajo delovanje črevesnih encimov (npr. črevesne glukozidaze) (85). Človeški prebavni encimi ne morejo razgraditi proantocianidinov, zato večinoma nespremenjeni dosežejo debelo črevo, zelo majhen del proantocianidinskih dimerov pa se v tankem črevesu v nespremenjeni obliki absorbira v sistemski obtok. Ob uživanju na tešče, ko je pH želodčnega soka dovolj nizek, se lahko proantocianidini kislinsko razgradijo do antocianidinov, ki pa se prav tako absorbirajo v zelo majhnem obsegu (66). V debelem črevesu encimi bakterijske flore razgradijo tako proantocianidine kot monomerne flavan-3-ole, pri čemer nastanejo nizkomolekularni metaboliti, ki se lahko metabolizirajo. Pri razgradnji proantocianidinov nastanejo aromatske kisline (benzojska kislina, *m*-hidroksifenilpentanojska kislina, fenilacetna kislina, fenilpropanojska kislina ter *m*- in *p*-hidroksilirani derivati fenilacetne in fenilpropanojske kisline), pri razgradnji monomernih flavan-3-olov pa nastanejo hidroksilirani derivati 5-fenilvalerolaktona, ki jih v plazmi najdemo pretežno v konjugirani obliki (66). Proizvodi razgradnje v debelem črevesu najverjetneje pomembno prispevajo k celotnemu antioksidativnemu delovanju proantocianidinov in monomernih flavan-3-olov (66, 86).

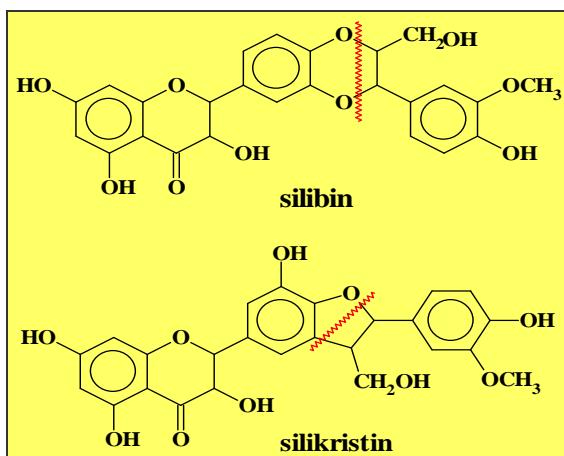
Monomerni flavan-3-oli se absorbirajo bolje, čeprav je tudi njihova biološka uporabnost nizka. Absorpcija flavan-3-olov poteka tudi s pomočjo prenašalnih proteinov, zato obstaja možnost interakcij z drugimi substrati teh prenašalcev (24). Zaradi boljše absorpcije monomernih flavan-3-olov je zaželena njihova čim višja vsebnost v izvlečku, zato raziskovalci iščejo vrste iglavcev, ki dajejo izvlečke z višjo vsebnostjo monomernih flavan-3-olov kot v izvlečku obmorskega bora. Poleg znanstvenih obstajajo tudi ekonomski razlogi za takšne raziskave, saj se izvleček pridobiva iz delov drevesa, ki jih lesna industrija ne more uporabiti, zato bi šli v odpad, če jih ne bi uporabili kot surovino za pridobivanje PD (87).

Na Katedri za farmacevtsko biologijo Fakultete za farmacijo (FFA) potekajo raziskave izvlečka lubja bele jelke (*Abies alba*) z zaščitenim imenom Abigenol®. Njegova sestava je podobna kot pri piknogenolu, saj gre za zmes monomernih flavan-3-olov in proantocianidinov. Frakcija slednjih je zelo heterogena in v njej najdemo več različnih

oligomerov kot v piknogenolu (88). Izvleček pridobivajo iz lubja bele jelke, nabranega spomladi, ki ga zdrobijo z mlinčkom do velikosti delcev, manjših od 3 milimetre. Rastlinsko drogo prelijejo z vročo prečiščeno vodo in kuhajo 15 minut, nato vodni ekstrakt pod znižanim tlakom filtrirajo preko vate. Sledi ekstrakcija vodne faze z etilacetatom, ki jo trikrat ponovijo. Etilacetatni frakciji dodajo sušilno sredstvo in jo mešajo na magnetnem mešalu čez noč. Naslednji dan raztopino filtrirajo in odparevajo topilo pod znižanim tlakom, dokler ne pride do zamotnitve. Nato dodajo trikratni volumen pentana (glede na ocenjeni volumen raztopine, ki je ostala po odparevanju topila), ki povzroči obarjanje proantocianidinov, ostale spojine pa ostanejo raztopljene. S filtracijo pod znižanim tlakom ločijo oborino od raztopine, jo sperejo z manjšo količino pentana in posušijo do suhega (88).

1.10. Izvleček plodov pegastega badlja

Flavonoidi se lahko kemijsko povezujejo z drugimi polifenolnimi spojinami rastlinskega izvora. Če se povežejo z lignani, dobimo flavolignane, med katere sodijo silibin (silibinin), izosilibin, silikristin in silidianin, ki so poglavitne sestavine zmesi, imenovane silimarin. Slednja predstavlja med 70 in 80 odstotkov izvlečka iz plodov pegastega badlja (*Silybum marianum*) (89, 90). Silibin naj bi bil nosilec farmakološkega delovanja izvlečka, ki naj bi preprečeval vstop toksinov v jetra in tako ščitil ta vitalni organ pred degeneracijo (89, 91). Zato ga uživajo predvsem ljudje z življenjskim slogom, ki je škodljiv za jetra (prekomerno uživanje alkohola, uživanje anabolnih steroidov).



Slika 12: Silibin in silikristin sta predstavnika flavolignanov. Na levi strani je flavonoidni del molekule, na desni lignanski (vir 61)

Najvišji dnevni odmerek silimarina ni uradno določen, zato imajo na tržišču dostopni pripravki z izvlečkom pegastega badlja različne priporočene odmerke in navodila za uživanje. Med pripravki, dostopnimi v Sloveniji, imajo najvišji dnevni odmerek tablete Liverin Forte®, ki vsebujejo 135 mg ekstrakta pegastega badlja, standardiziranega na silimarino (vsebnost silimarina 80 %). Priporočeni dnevni odmerek je 405 mg izvlečka pegastega badlja (3 tablete), ki naj bi ga zaužili na tešče s kozarcem vode (92). V Sloveniji se prodajajo tudi kapsule Silimarin Plus®, ki vsebujejo 175 mg izvlečka pegastega badlja, vendar je priporočeni dnevni odmerek manjši kot pri Liverinu, saj se jemlje samo ena kapsula na dan. V nasprotju z Liverinom naj bi se kapsule Silimarin Plus® zaužile po jedi (93). Med PD z izvlečkom pegastega badlja, ki se prodajajo na svetovnem spletu, ima najvišji priporočeni enkratni odmerek pripravek Organika Milk Thistle®, pri katerem je v vsaki kapsuli 250 mg standardiziranega izvlečka pegastega badlja (z 80 % vsebnosti silimarina). Priporočeni dnevni odmerek pri Organiki je nižji kot pri Liverinu, in sicer ena kapsula na dan, ki naj se zaužije s hrano (94).



Slika 13: Liverin forte® ima najvišji dnevni odmerek med pripravki z izvlečkom pegastega badlja na slovenskem trgu (vir 92)

Sestavine silimarina delujejo hepatoprotektivno zaradi inhibicije prenašalnih proteinov na membrani hepatocitov. Zavirajo tudi prenašalce OATP 1B1 in 1B3, ki so odgovorni za privzem LT v jetrne celice (91), zato obstaja možnost interakcije pri sočasnem uživanju LT in pegastega badlja. Biološko uporabnost silibina (sestavina silimarina) lahko povečamo z njegovo vgradnjo v komplekse s fosfatidilholinom ali ciklodekstrini (89). Za učinkovanje na jetra je namreč potrebna absorpcija skozi enterocite v portalni obtok. Zaradi nizkega obsega intestinalne absorpcije silimarina obstaja pri izvlečku pegastega badlja velik razkorak med izsledki *in vitro* poskusov in kliničnih raziskav. Pri prvih so opazili močno delovanje tega PD na hepatocite, medtem je bil pri kliničnih raziskavah vpliv na delovanje jeter precej manj izrazit (95).

1.11. Mehanizmi interakcij med flavonoidi in levotiroksinom

Največ klinično pomembnih interakcij med flavonoidi in eksogenim LT pričakujemo pri vplivu flavonoidov na intestinalno absorpcijo LT, saj za delovanje na ta farmakokinetični proces absorpcija flavonoidov ni nujno potrebna, ampak zadostuje že njihova visoka intraluminalna koncentracija, ki jo lahko dosežemo že z zaužitjem najvišjih enkratnih odmerkov PD, ki vsebujejo flavonoide (31).

V kliničnih raziskavah je s flavonoidi bogat grenivkin sok znižal biološko uporabnost LT. Najverjetnejši mehanizem interakcij med LT in grenivkinim sokom je inhibicija črevesnih absorptivnih prenašalcev OATP. Podoben učinek na biološko uporabnost LT kot grenivkin sok je imela tudi izolirana flavonoidna frakcija grenivkinega soka, kar dokazuje vpletenost flavonoidov v procese, ki zmanjšujejo biološko uporabnost LT. Posamezni flavonoidi grenivkinega soka (hesperidin, neohesperidin, naringein) so prav tako zmanjšali biološko uporabnost LT, vendar šibkeje kot zmes grenivkinih flavonoidov, kar kaže na sinergizem med vplivi posameznih flavonoidov na intestinalno absorpcijo LT (25). Delovanje flavonoidov na absorpcijske prenašalce za LT je najverjetneje kompetitivne narave in reverzibilno, saj se je eno uro po zaužitju grenivkinega soka učinek na biološko uporabnost LT že bistveno zmanjšal, po dveh urah pa je povsem izzvenel (25). Interakcije med LT in flavonoidi so torej najverjetnejše v primeru sočasnega zaužitja pripravka z LT in PD, ki vsebuje flavonoide.

Absorbirani flavonoidi se v enterocitih konjugirajo z glukuronsko kislino. Med konjugati flavonoidov in LT lahko pride do tekmovanja za vezavna mesta na črevesnih prenašalcih MRP 2, saj so tako konjugati kot LT substrati za te prenašalce (13, 36). Posledica je kompetitivna inhibicija izločanja LT iz enterocitov.

Flavonoidi so strukturno podobni T4, T3 in LT, kar je eden od vzrokov za opažene interakcije med flavonoidi ter eksogenimi in endogenimi ščitničnimi hormoni (7). Flavonoidi vplivajo na vse tri poglavite skupine jetrnih encimov, ki metabolizirajo LT, saj zavirajo jetrne dejodaze in sulfotransferaze, jetrne UGT pa lahko bodisi inducirajo ali inhibirajo. Učinek flavonoidov na UGT je substratno specifičen, saj kvercetin na primer zavira glukuronidacijo estradiola, stimulira pa glukuronidacijo 4-metilumbeliferona (7, 90, 96).

Za delovanje flavonoidov na metabolizem LT in endogenih ščitničnih hormonov je potrebna absorpcija flavonoidov, pri čemer se lahko del absorbiranih flavonoidov presnovi do aktivnih presnovkov, ki prav tako vplivajo na farmakokinetiko LT. Obseg absorpcije flavonoidov je nizek, velik del absorbiranih flavonoidov pa se veže na plazemske proteine ali metabolizira do neaktivnih presnovkov. Posledično je verjetnost metabolnih interakcij med flavonoidi in LT v *in vivo* pogojih veliko nižja kot pri *in vitro* poskusih. Že pri *in vitro* poskusih na celičnih kulturah je bil vpliv flavonoidov na presnovne encime precej manjši kot pri *in vitro* poskusih na mikrosomih (90). Zaradi v splošnem zaviralnega učinka flavonoidov na metabolizem LT bi ob njihovi aplikaciji pričakovali povišanje plazemske koncentracije LT, vendar je pri kliničnih raziskavah zaužitje LT z grenivkinim sokom, bogatim s flavonoidi, znižalo biološko uporabnost LT (25, 97).

Flavonoidi izpodrivajo LT in endogene ščitnične hormone z vezavnega proteina TTR, medtem ko je izpodrivanje z albuminov in TBG zelo majhno. Zaradi izpodrivanja se poveča koncentracija prostega T4 (ozioroma njegovega sintetičnega analoga LT), ki se lahko aktivira s pretvorbo v T3 ali presnovi do neaktivnih metabolitov. Več prostega LT/T4 sproži povratno zanko, ki zmanjša izločanje TSH iz hipofize. Izpodrivanje T4 s plazemskih proteinov zaradi flavonoidov so opazili v *in vivo* poskusih na podganah, pri katerih ima TBG manjšo afiniteto do T4 kot pri ljudeh, zato je pomembnejša vloga TTR. Če pri ljudeh flavonoidi izpodrinejo LT/T4 s TTR, se sproščeni LT/T4 v veliki meri takoj veže na TBG, na katerega flavonoidi skoraj ne učinkujejo. Zato je klinični pomen izpodrivanja s plazemskih proteinov pri ljudeh manjši kot pri glodalcih (7, 98).

V ščitnici flavonoidi inhibirajo prenascalc NIS, jodidno peroksidazo in ščitnične dejodaze, ki so nujno potrebni za normalni potek biosinteze endogenih ščitničnih hormonov. Posledica tiroksinskičnega delovanja flavonoidov je znižana plazemska koncentracija T4, ki lahko povzroči hipertrofijo ščitničnega tkiva zaradi povečanega izločanja TSH (7). Zaradi nizke biološke uporabnosti peroralno apliciranih flavonoidov je njihova *in vivo* tiroksinskičnost nizka, zato peroralno aplicirani flavonoidi najverjetneje ne morejo občutno zavreti sinteze endogenih ščitničnih hormonov in s tem povzročiti golšavost ali hipotirozo.

2. Namen dela

V diplomskem delu bomo ovrednotili vplive petih PD, ki vsebujejo flavonoide (kvercetin, piknogenol, izvleček lubja bele jelke, izvleček plodov pegastega badlja in izvleček listov zelenega čaja) na permeabilnost LT skozi monosloj celic Caco-2, ki predstavljajo model za človeške enterocite. Na osnovi rezultatov poskusov s celicami Caco-2 bomo ocenili, ali bi lahko omenjeni pripravki vplivali na absorpcijo LT iz prebavil ob sočasnem zaužitju prehranskega dopolnila, ki vsebuje flavonoide, in pripravka z LT.

Poskuse bomo izvedli z rakastimi celicami človeškega adenokarcinoma (celice Caco-2). Za interpretacijo rezultatov je pomembna izraženost sekretornih in absorptivnih prenašalcev v celicah Caco-2 (38), ki jo bomo preverili s spremeljanjem permeabilnostnega markerja estron-3-sulfata (E3S), ki prehaja skozi celice skoraj izključno s pomočjo sekretornih (MRP 2) in absorptivnih prenašalcev (OATP) (99). V primeru večje izraženosti sekretornih prenašalcev bomo zaznali večjo sekretorno (BL → AP; BL = bazolateralna stran, AP = apikalna stran) permeabilnost E3S, ob prevladi absorptivnih prenašalcev pa večjo absorptivno (AP → BL) permeabilnost E3S.

Za dodatno potrditev rezultatov, pridobljenih s poskusi z E3S, bomo izraženost sekretornih in absorptivnih prenašalcev v uporabljenih celicah Caco-2 preverili tudi z ugotavljanjem vpliva nespecifičnega inhibitorja absorptivnih in sekretornih prenašalcev 4,4'-diizotiociano-2,2'-stilbendisulfonske kisline (DIDS) na absorptivno (AP → BL) permeabilnost E3S (100). Ob dodatku DIDS v primeru večje izraženosti sekretornih prenašalcev pričakujemo zvišanje absorptivne permeabilnosti E3S (prevladujoči učinek DIDS bo inhibicija sekretornih prenašalcev), ob prevladi absorptivnih prenašalcev pa znižanje absorptivne permeabilnosti E3S (prevladujoči učinek DIDS bo inhibicija absorptivnih prenašalcev).

Permeabilnost LT (brez in z dodatkom PD) skozi monosloj celic Caco-2 bomo ovrednotili s pomočjo navideznega permeabilnostnega koeficiente (P_{app}), ki je odvisen od obsega pasivne difuzije (transcelularna difuzija skozi celično membrano in paracelularna difuzija skozi tesne stike med celicami) in aktivnosti celičnih prenašalcev (absorptivnih in sekretornih). Permeabilnost LT brez dodatkov PD bomo ovrednotili pri dveh različnih pH vrednostih na apikalni strani celic Caco-2. Uporabili bomo apikalni pH 6,5, ki

posnema *in vivo* pogoje v lumnu človeškega jejunuma, in apikalni pH 7,4, pri katerem bomo ocenili prispevek absorptivnih in sekretornih prenašalcev k celotni permeabilnosti LT v skladu s priporočili mednarodnih smernic (101). V obeh primerih bo pH na bazolateralni (BL) strani znašal 7,4.

Permeabilnost LT ob dodatkih posameznih PD bomo ovrednotili s poskusi, pri katerih bo pH na apikalni strani celic Caco-2 znašal 6,5, na bazolateralni pa 7,4. Izjemi bosta poskusa s kvercetinom in izvlečkom lubja bele jelke, kjer bomo zaradi majhnih razpoložljivih količin teh dveh PD pripravili le donorsko raztopino s pH 6,5, zato bomo imeli pri teh dveh PD tako na apikalni kot na bazolateralni strani celic Caco-2 pH 6,5. Pri piknogenolu zaradi omejenega števila razpoložljivih monoslojev celic Caco-2 ne bomo izvedli poskusa, pri katerem apliciramo donorsko raztopino LT in PD na bazolateralno stran celic Caco-2 in spremljamo transport LT v smeri BL → AP.

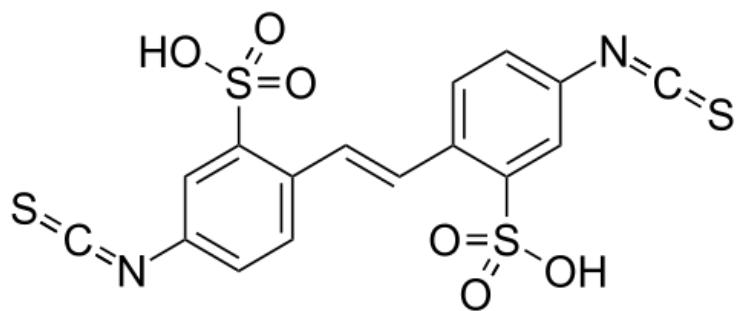
Ob bazolateralni aplikaciji donorskih raztopin PD in LT bomo spremljali vpliv PD na sekretorno (BL → AP) permeabilnost LT, ob apikalni aplikaciji pa vpliv PD na absorptivno (AP → BL) permeabilnost LT. Določili bomo P_{app} za LT v obeh smereh (razen ob dodatku piknogenola, kjer bomo določili samo P_{app} za LT v absorptivni smeri) ob dodatku posameznega PD in ju primerjali s kontrolnima vrednostima (absorptivni in sekretorni P_{app} za LT brez dodatkov PD pri apikalnem pH 6,5 in bazolateralnem pH 7,4). Na osnovi te primerjave bomo ugotavliali, ali flavonoidi iz PD vplivajo na P_{app} za LT in kakšni so mehanizmi morebitnih interakcij.

Za poskuse s celicami Caco-2 bomo pripravili donorske raztopine PD v koncentracijah, ki jih dobimo z raztplavljanjem najvišjega priporočenega enkratnega odmerka posameznega PD v 0,25 L črevesnega soka, pri čemer bomo kot model črevesnega soka uporabili Ringerjev pufer. Če se bo pri pripravi raztopine PD pojavila oborina, jo bomo odstranili s filtriranjem in za poskuse uporabili filtrat. Koncentracij posameznih flavonoidov v filtratih ne bomo ugotavliali, saj nimamo na voljo standardov teh flavonoidov, ki bi jih potrebovali za pripravo umeritvenih premic.

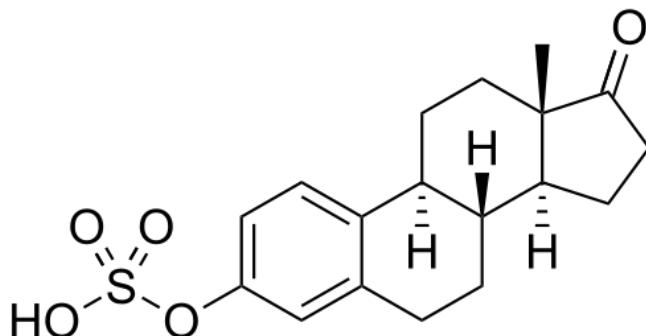
Pri kvercetinu, piknogenolu in izvlečku lubja bele jelke bomo zaradi majhnih razpoložljivih količin teh PD pripravili le donorsko raztopino s pH 6,5. V primeru kvercetina in izvlečka lubja bele jelke bomo donorsko raztopino s pH 6,5 aplicirali tako na apikalno kot na bazolateralno stran celic Caco-2, pri piknogenolu pa zaradi omejenega

števila razpoložljivih monoslojev celic Caco-2 ne bomo izvedli poskusa v BL → AP smeri. Pri ostalih dveh PD (izvleček listov zelenega čaja in izvleček plodov pegastega badlja) bomo pripravili po dve donorski raztopini, eno s pH 6,5 (za aplikacijo na apikalno stran celic Caco-2 – poskusi AP → BL), drugo pa s pH 7,4 (za aplikacijo na bazolateralno stran celic Caco-2 – poskusi BL → AP).

Pred poskusi in po njih bomo celicam Caco-2 izmerili transepiteljsko električno upornost (TEER). Z meritvami TEER bomo ocenjevali vitalnost celic Caco-2, toksičnost PD za celice ter *in vitro* vpliv PD na elektrogene prenašalce (ionske kanale) in integriteto tesnih stikov (101).



Slika 13: Struktorna formula DIDS



Slika 14: Struktorna formula E3S

3. Materiali

Biološki material:

- Celice Caco-2 (ACC 169, lot 12, pasaža 25), Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen.

Učinkovine:

- 4,4'-diizotiociano-2,2'-stilbendisulfonska kislina (DIDS), Sigma Aldrich, 498,5 g/mol;
- estron-3-sulfat (E3S), Sigma Aldrich, 372,4 g/mol;
- natrijev levotiroksinat heptahidrat (LT), Sigma Aldrich, 888,95 g/mol.

Prehranska dopolnila:

- izvleček listov zelenega čaja Estratto secco the verde, lot L*20080218, Polichimica. Izvleček je standardiziran na flavan-3-ole (vsebnost flavan-3-olov 70 %);
- izvleček lubja bele jelke (Abigenol®), Katedra za farmacevtsko biologijo FFA. Proizvod je v razvojni fazi, zato izvleček še ni standardiziran;
- izvleček lubja primorskega bora F0400/Pycnogenol®, referenčna številka BP8663, lot G/1480, Biolandes. Izvleček je standardiziran na proantocianidine (vsebnost proantocianidinov 75 %);
- izvleček plodov pegastega badlja Estratto secco cardo mariano, lot 91002031, Polichimica. Izvleček je standardiziran na silimarín (vsebnost silimarína 70 %);
- kvercetin, Kemika Zagreb, 338,27 g/mol.

Raztopine:

- *10 mmol/L glukoza/manitol v Ringerjevem pufru, pH = 7,4:* 1,6 mL 625 mmol/L raztopine glukoze ozziroma manitola redčimo v 100 mL bučki z Ringerjevim pufrom. Raztopini smo uporabili za pripravo donorskih in akceptorskih raztopin.
 - *625 mmol/L glukoza:* 2,815 g glukoze raztopimo v 25 mL Ringerjevega pufra.

- *625 mmol/L manitol:* 2,850 g manitola raztopimo v 25 mL Ringerjevega pufra.
- *3 mol/L raztopina KCl:* 55,9 g KCl raztopimo v 250 mL bidestilirane vode. Raztopino KCl smo uporabili za pripravo in shranjevanje elektrod.
- *3–4 % raztopina agarja v 3 mol/L KCl:* V čaši segrejemo 100 mL KCl in med mešanjem dodamo 3,5 g agarja. Mešamo toliko časa, da nastane gel, ki ne sme vsebovati zračnih mehurčkov. Gel smo uporabili za pripravo elektrolitskega ključa.
- *Gojišče za celice Caco-2:* Gojišče je sestavljeno iz posode za gojenje in hranilnega medija, ki ga pripravimo tako, da v 500 mL že pripravljenega minimalnega esencialnega medija dodamo po 5,75 mL L-glutamina (GlutaMAX®), neesencialnih aminokislin in raztopine penicilina/streptomicina ter 57,5 mL fetalnega govejega seruma.
- *Ringerjev puf:* 2-litrsko bučko napolnimo z ohlajeno bidestilirano vodo do 80 % volumna in postavimo na magnetno mešalo. Nato po predpisanem zaporedju dodajamo navedene soli tako, da dodamo naslednjo šele po popolni raztopitvi predhodne soli. Zatehtamo 4,2 g NaHCO₃, 0,11 g NaH₂PO₄*H₂O, 13,082 g NaCl, 0,746 g KCl, 0,352 g CaCl₂*2H₂O, 0,488 g MgCl₂*6H₂O in 0,569 g Na₂HPO₄*2H₂O. Po dodatku zadnje soli dopolnimo bučo do oznake z bidestilirano vodo in uravnamo pH pripravljenega pufra na 7,4 oziora 6,5 z dodatkom natrijevega hidroksida. Pufra s pH 6,5 in 7,4 smo uporabili za pripravo donorskih in akceptorskih raztopin.
- *Organska mobilna faza za analizo s tekočinsko kromatografijo visoke ločljivosti, sklopljeno z detekcijo z masno spektrometrijo (High Performance Liquid Chromatography / Mass Spectrometry – HPLC/MS/MS):* 0,1 % mravljične kisline (Suprapur®, Merck) v 98 % acetonitrilu (acetonitril za masno spektrometrijo, J. T. Baker).
- *Vodna mobilna faza za HPLC/MS/MS analizo:* 0,1 % mravljične kisline (Suprapur®, Merck) v bidestilirani vodi Milli-Q.

Substance za gojenje celic Caco-2:

- dimetilsulfoksid (DMSO), Kemika Zagreb, gostota 1,10 kg/L;

- Doulbeccov fosfatni pufer brez magnezijevih in kalcijevih ionov (10x), Invitrogen;
- etanol 70 %, p.a., Merck.
- fetalni goveji serum, Invitrogen;
- GlutaMAX® 1(100x), Invitrogen;
- karbogen (5 % O₂, 95 % CO₂), Messer;
- minimalni esencialni medij z Earlovimi solmi, Invitrogen;
- neesencialne aminokisline (100x), Sigma Aldrich, koncentracija 200 mmol/L;
- penicilin/streptomicin (100x), Invitrogen;
- tekoči dušik, Messer;
- tripansko modrilo (0,4 %), Sigma Aldrich;
- TrypLE® Express (brez fenol rdečega, 1 mM EDTA), Invitrogen.

Substance za izvedbo poskusov s celicami Caco-2 in analizo:

- acetonitril za masno spektrometrijo (*MS-grade*), J. T. Baker;
- agar-agar v granulah, p.a., Merck;
- bidestilirana voda (pridobljena s sistemom Milli-Q®);
- človeški albumini Albunorm®, koncentracija 200 g/L, Octapharma;
- dinatrijev hidrogenfosfat dihidrat, p.a., Merck, 177,99 g/mol;
- DMSO, Kemika Zagreb, gostota 1,10 kg/L;
- etanol 96 %, p.a., Merck, gostota 0,790 – 0,793 kg/L;
- fosforjeva (V) kislina, p.a., Merck, gostota 1,71 kg/L;
- glukoza, p.a., Kemika Zagreb, 180,16 g/mol;
- kalcijev klorid dihidrat, p.a., Merck, 147,02 g/mol;
- kalijev klorid, p.a., Merck, 74,55 g/mol;
- karbogen, Messer;
- magnezijev klorid heksahidrat, p.a., Merck, 203,30 g/mol;
- manitol, p.a., Fluka, 182,18 g/mol;
- metanol, p.a., Sigma Aldrich;
- mravljična kislina Suprapur®, p. a., Merck;
- natrijev dihidrogenfosfat monohidrat, p.a., Merck, 137,99 g/mol;

- natrijev hidrogenkarbonat, p.a., Merck, 84,01 g/mol;
- natrijev klorid, p.a., Merck, 58,44 g/mol;
- titrisol, 1 HCl mol/L, p.a., Merck.

3.1. Aparature in druga oprema

- centrifuga Centric 322A®, Tehnica;
- digitalni termometer DT02®, Dalmacija;
- filtri za filtriranje donorskih raztopin;
- filtri za nasaditev celic Caco-2 Transwell® (površina 0,3 cm²), Costar
- grelno-hladilna plošča Chilling/Heating Block®, Cole-Parmer;
- hladilnik (temperatura 4 °C), LTH;
- HPLC/MS/MS sistem:
 - tekočinski kromatograf ultra visoke zmogljivosti (HPLC): 1290 Infinity®, Agilent;
 - predkolona: Security Guard®, velikost C18 (dolžina predkolone 4 mm, premer predkolone 2,0 mm), Phenomenex;
 - kolona: Kinetex®, premer delcev 2,6 µm, velikost C18 (dolžina kolone 50 mm, premer kolone 2,10 mm), Phenomenex;
 - ionski izvor: ESI JetStream® (pozitivni način ionizacije pri analizi LT, negativni pri analizi E3S);
 - masni spektrometer (MS) tipa trojni kvadrupol: 6460 MSD Triple quadrupole®, Agilent;
- inkubator za ogljikov dioksid CB 210®, WTBBINDER;
- komora z laminarnim pretokom zraka PIO (M-12)®, Iskra;
- merilec pH MA 5750®, Iskra;
- merilec upornosti Millicell-ERS®, Millipore;
- mikroskop TMS®, Nikon;
- mikrotitrskne plošče (96 / 300 µL), Agilent;
- mikrotitrski čitalec GENios® s pripadajočima filtroma, Tecan;
- nastavki za pipete Combitips Plus® (0,1; 1,0; 5 mL), Eppendorf;
- pipete (2–20 µL, 20–200 µL, 100–1000 µL, 1–10 mL), Eppendorf;

- plastične epruvete 2 mL, Eppendorf;
- rokavice iz lateksa;
- sistem za pridobivanje bidestilirane vode Milli-Q Advantage A 10 Ultrapure Water Purification System®, Millipore
- spatule;
- steklovina (bučke, čaše, epruvete, liji, merilni valji, palčke, tehtiči, viale), Boral;
- tehnicka H54AR®, Mettler Toledo;
- tehnicka AB54-S®, Mettler Toledo;
- termični stresalnik Vortemp 56EVC®, Tehnica;
- ultrazvočna kadička Sonis.4®; Iskra;
- vibracijsko mešalo Lab Dancer®, IKA;
- vodna kopel s termostatom M3®, LAUDA;
- vstavki (*wells*) s filtri, na katere so pritrjeni monosloji celic Caco-2, Transwell;
- zamrzovalnik (temperatura –20 °C), Gorenje.

4. Metode

4.1. Gojenje celic Caco-2

Celice Caco-2 smo hranili v inkubatorju z optimalnimi pogoji za njihovo rast (karbogenska atmosfera 95 % CO₂, 5 % O₂, temperatura 37 °C). Pri delu s celicami smo uporabljali zaščitne rokavice, predhodno razkužene s 70 % etanolom. Odpadne snovi, ki so prišle v stik s celicami, smo hranili v zabojsnikih za posebne odpadke in jih pred odstranitvijo sterilizirali v avtoklavu. Za preprečitev okužbe celic smo vse postopke pri gojenju (razen centrifugiranja) izvajali v komori z laminarnim pretokom zraka (*Laminar Air Flow chamber*, LAF komora). Pri delu z rakastimi celičnimi kulturami v LAF komori lahko pride do nastanka aerosola, v katerem so dispergirane celice. Vdihovanje takšnega aerosola je zelo nevarno za zdravje, saj lahko inhalirane celice v pljučih ustvarijo rakaste zasevke. Zato moramo pri delu s celicami Caco-2 obvezno uporabljati zaščitno masko.

Priprava gojišča: Globoko zamrznjene celice (−70 °C) smo hitro odtalili in pipetirali v posodo za gojenje. Celicam smo dodali 5–10 mL hranilnega medija in jih pustili v inkubatorju. Prve 3–4 dni po nasaditvi smo jim dnevno zamenjali hranilni medij.

Presaditev v novo posodo za gojenje (tripsinizacija): Po odstranitvi medija smo posodo za gojenje sprali s 5 mL Doulbeccovega fosfatnega pufra. Z izpiranjem smo preprečili, da bi sestavine medija inhibirale tripsin. Dodali smo 4–5 mL tripsina in med opazovanjem pod mikroskopom stresali celice, dokler se jih večina ni odlepila. Zaradi možnosti poškodb celice ne smejo biti v stiku s tripsinom več kot 5 minut. Po približno 5 minutah smo dodali 5 mL medija, ki inhibira tripsin, in sprali celice z dna. Suspenzijo smo prenesli v centrifugirko in jo 8 minut centrifugirali pri hitrosti 800 vrtljajev v minuti. Po odstranitvi supernatanta smo dodali 5 mL svežega medija, v katerem smo celice ponovno suspendirali in jih nato prenesli v novo posodo za gojenje.

Štetje celic: Postopek pri štetju celic je enak postopku pri presaditvi celic v novo posodo za gojenje do vključno centrifugiranja. Po centrifugiranju smo suspendirali usedlino v 3 mL medija. V plastično epruveto smo odpipetirali 40 µL tripanskega modrila in 10 µL celične suspenzije ter dobro premešali. 10 µL zmesi tripanskega modrila in celične suspenzije smo prenesli iz plastične epruvete na objektno stekelce za

štetje in prešteli celice v vseh štirih kvadratkih. Štetje smo izvedli v dveh paralelkah in iz povprečja obeh paralelk izračunali število celic v suspenziji po enačbi 1:

$$\delta = N \times R \times V^{-1}$$

Enačba 1

δ = gostota celic v suspenziji [ml^{-1}];

N = povprečno število celic v merilni mrežici na dnu komore objektnega stekla;

R = faktor redčenja suspenzije pred štetjem (v našem primeru $R = 5$);

V = volumen merilne komore na objektnem steklu (v našem primeru 100 nL oziroma 10^{-4} mL).

Nasaditev na filter: Celice smo nasadili na filter z gostoto 10^5 celic/ cm^2 . Pripravili smo 3,5 mL celične suspenzije v hranilnem mediju z gostoto 2×10^5 celic/mL (število celic v tem volumnu suspenzije je znašalo 700.000). Na zgornji del filtra smo dodali 0,5 mL pripravljene celične suspenzije, na spodnji pa 4,5 mL hranilnega medija brez celic. V obdobju 21 dni pred izvedbo poskusov smo celicam vsak drugi dan zamenjali hranilni medij.

Zamrzovanje celic: Celice, ki jih nismo presadili na filtre za uporabo v prvi seriji poskusov, smo zamrznili v 10 % DMSO in 90 % hranilnega medija, saj bi ob zamrzovanju v vodni raztopini kristali ledu lahko poškodovali celične membrane. Po dodatku 100 μL DMSO in 900 μL celične suspenzije v navadnem gojišču smo plastično epruveto zamrznili v tekočem dušiku za dosego večje stabilnosti celic.

Meritev TEER z Millicell-ERS®: Štirinajsti dan gojenja celic Caco-2 smo preverili integritetu celičnega monosloja z meritvijo TEER, ki je potekala po naslednjem postopku:

1. Kadar elektroda ni v uporabi, jo shranujemo namočeno v nerazredčen Doulbeccov pufer. Če elektrode ne namočimo in se zato v času neuporabe popolnoma posuši, mora biti pred ponovno uporabo vsaj 24 ur namočena v nerazredčenem Doulbeccovem pufru.
2. Pred uporabo elektrodo razkužimo v 70 % etanolu za 15 minut, da se izognemo okužbi celic Caco-2. Nato jo posušimo na zraku v LAF komori in potopimo v sterilni elektrolit za 15 minut.
3. Pritisnemo tipko *MODE→R* (*MODE→R* je oznaka na tipki), pritisnemo *POWER:ON* in nato s tipko *TEST* preizkusimo aparat. Te tipke nikoli ne pritiskamo med merjenjem upornosti. Če je stikalo v območju nad 2000Ω , se na zaslonu izpiše $1000 \Omega \pm 1 \Omega$.

4. Pritisnemo tipko $MODE \rightarrow V$ ($MODE \rightarrow V$ je oznaka na tipki) in z izvijačem obrnemo potenciometer Ω , da se na aparaturi izpiše 000. Nato pritisnemo tipko $MODE \rightarrow R$ in z izvijačem obrnemo potenciometer Ω , da se izpiše 000. S tem umerimo elektrode.
5. Pritisnemo tipko $MODE \rightarrow R$ in potopimo elektrodo v predel podpornega filtra s celicami. Nato z gumbom $MEASURE$ izmerimo upornost pri slepih filtrih (filtrih brez pritrjenih monoslojev celic Caco-2) in filtrih z monosloji celic Caco-2.
6. Izračunamo **TEER** monosloja celic Caco-2 po enačbi 2:

$$TEER_{\text{Caco-2 monosloja}} = TEER_{\text{izmerjena}} - TEER_{\text{slepa}} \quad \text{Eqačba 2}$$

(Enota za TEER je Ω/cm^2 . $TEER_{\text{Caco-2 monosloja}}$ je izračunana vrednost, ki predstavlja upornost monosloja celic Caco-2. $TEER_{\text{izmerjena}}$ je rezultat meritve upornosti filtra s pritrjenim monoslojem celic Caco-2 in predstavlja vsoto upornosti celic in filtra, na katerega so celice pritrjene. $TEER_{\text{slepa}}$ je rezultat meritve upornosti filtra brez celic Caco-2 in predstavlja upornost filtra.)

Po podobnem postopku smo merili TEER ob izvedbi poskusov na celicah Caco-2, vendar v tem primeru meritev nismo izvajali v LAF komori, zato nismo potrebovali sterilnega elektrolita.

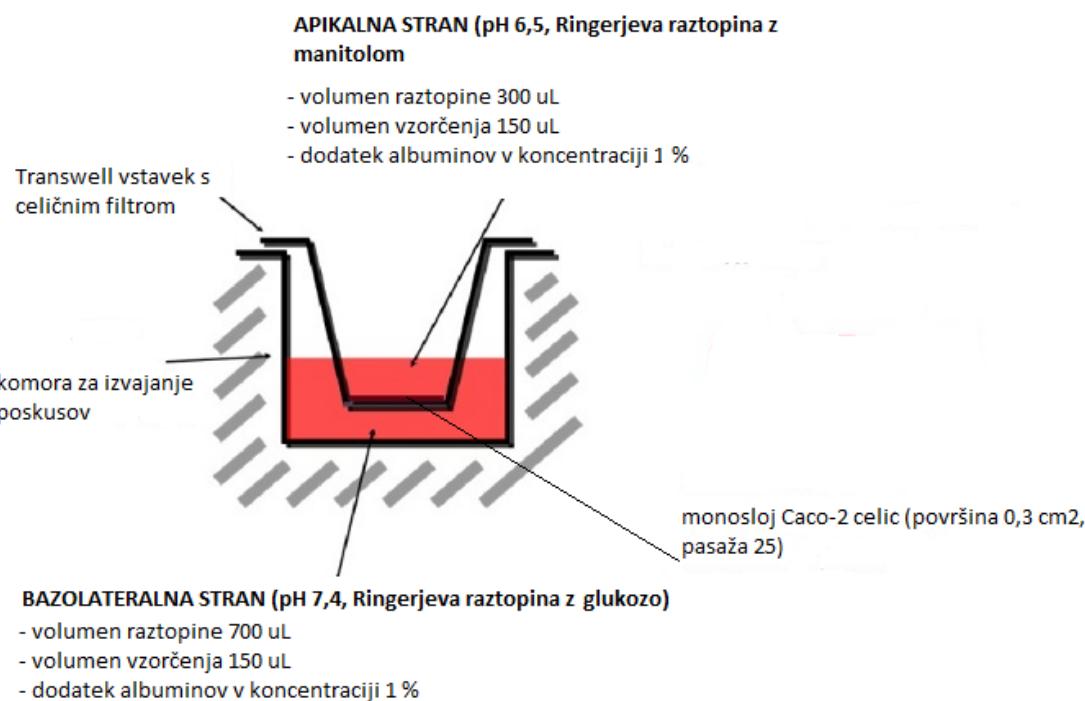
4.2. Določanje navideznega permeabilnostnega koeficiente

Priprava donorskih in akceptorskih raztopin: Pred poskusi s celicami Caco-2 smo pripravili donorske raztopine PD v Ringerjevi raztopini, ki je ponazarjala črevesni sok. Pri večini PD smo uporabili takšno zatehto, da smo po raztopljanju v 10- ali 25-mililitrski bučki dobili enako koncentracijo kot v 0,25 L črevesnega soka po zaužitju najvišjega priporočenega enkratnega odmerka PD na tešče. Volumen bučke smo izbrali glede na količino razpoložljivega prehranskega dopolnila. Pri kvercetinu, izvlečku lubja bele jelke in piknogenolu smo imeli na voljo malo substance, zato smo uporabili 10 mL bučko, pri izvlečkih zelenega čaja in pegastega badlja, kjer je bilo na razpolago veliko substance, pa smo uporabili 25 mL bučko. Podatki o zatehtah in volumnih pri pripravi donorskih raztopin PD so navedeni v preglednici I.

Podatke o odmerkih PD smo poiskali na spletnih straneh proizvajalcev in prodajalcev PD. Izvlečka lubja bele jelke v času izvedbe poskusov še ni bil na tržišču in ni imel najvišjega priporočenega odmerka, zato smo pri tem PD uporabili enak odmerek kot pri sorodnem PD piknogenolu (100 mg). Pri kvercetinu znaša najvišji enkratni odmerek 900

mg, vendar bi pri tako visokem odmerku za pripravo donorske raztopine porabili preveč substance, zato je koncentracija kvercetina v donorski raztopini posnemala intraluminalno koncentracijo po zaužitju 500 mg tega PD. Iz podobnega razloga smo pripravili donorsko raztopino izvlečka listov zelenega čaja v koncentraciji, ki ustreza intraluminalni koncentraciji po zaužitju 400-miligramskega odmerka tega PD, čeprav znaša najvišji enkratni odmerek 600 mg.

Izračunano količino posameznega PD smo zatehtali na analitski tehnicci, prenesli v bučko ustreznega volumna (glej preglednico I) in razredčili do oznake z Ringerjevim pufrom. Pri donorskih raztopinah za poskuse AP → BL (ki smo jih aplicirali na apikalno stran monosloja celic Caco-2) smo uporabili Ringerjev pufer z manitolom s pH 6,5, kar ustreza pH na AP strani enterocitov, pri donorskih raztopinah za poskuse BL → AP (ki smo jih aplicirali na bazolateralno stran monosloja celic Caco-2) pa smo uporabili pufer z glukozo s pH 7,4, kar ustreza pH na BL strani enterocitov. Zaradi majhnih količin PD, ki smo jih imeli na voljo za poskuse, smo pri izvlečku jelkinega lubja, kvercetinu in piknogenolu pripravili samo donorske raztopine s pH 6,5. Pri izvlečku jelkinega lubja in kvercetinu smo donorski raztopini s tem pH uporabili tudi za poskusa BL → AP in jih aplicirali na bazolateralno stran monosloja celic Caco-2, zato je bil pri teh dveh poskusih na BL strani pH 6,5 namesto 7,4. Pri piknogenolu poskusa BL → AP nismo izvedli.



Slika 15: Shema komore za izvajanje poskusov na celicah Caco-2 (pri poskusih s kvercetinom in izvlečkom lubja bele jelke je bila tudi na bazolateralni strani Ringerjeva raztopina z manitolom in pH 6,5).

Flavonoidi so v Ringerjevem pufru težko topni. Zato se je v večini pripravljenih donorskih raztopin za poskuse na celicah Caco-2 pojavila oborina, ki smo jo pred izvedbo poskusov odstranili s filtriranjem in izvedli poskuse na filtratih. Izjemi sta bili raztopini piknogenola in izvlečka lubja bele jelke, kjer sta se zatehti PD popolnoma raztopili, zato filtracija ni bila potrebna. Koncentracij posameznih flavonoidov v filtratih nismo ugotavljali, ker nismo imeli na voljo standardov teh flavonoidov.

V filtrate donorskih raztopin smo dodali ustrezne volumne koncentrirane raztopine (*stock solution*) natrijevega levotiroksinata v DMSO, ki smo jo pripravili z razapljanjem ustrezne mase natrijevega levotiroksinata v 2 mL DMSO in shranjevali v zamrzovalniku pri -20 °C (glej preglednico I). Na podoben način smo pripravili tudi koncentrirani raztopini E3S in DIDS (glej preglednico II). Dodatek DMSO, ki smo ga uporabili za doseg popolne raztopitve LT v donorskih raztopinah, ni vplival na permeabilnost in vitalnost celic Caco-2, saj je bila končna koncentracija DMSO v donorskih raztopinah nižja od 1 %. Pri pripravi donorskih raztopin brez dodatkov PD (glej preglednico II) smo koncentrirane raztopine LT, E3S in DIDS pipetirali v 10 mmol/L raztopino manitola v

Ringerjevem pufru (pri donorskih raztopinah za poskuse AP → BL) oziroma v 10 mmol/L raztopino glukoze v Ringerjevem pufru (pri donorskih raztopinah za poskuse BL → AP).

Za akceptorske raztopine, ki smo jih aplicirali na AP stran monosloja celic Caco-2 (pri poskusih BL → AP), smo uporabili 10 mmol/L raztopino manitola v Ringerjevem pufru (brez dodatkov LT ali PD), medtem ko smo za akceptorske raztopine, ki smo jih aplicirali na BL stran (pri poskusih AP → BL), uporabili 10 mmol/L raztopino glukoze v Ringerjevem pufru (brez dodatkov).

Za preprečitev adsorpcije LT na plastično opremo, uporabljeno pri poskusih s celicami Caco-2, smo v vse donorske in akceptorske raztopine dodali človeške albumine v koncentraciji 1 %. Pri poskusih smo uporabljali albumine na obeh straneh celic Caco-2 (AP in BL), čeprav jih v fizioloških razmerah ne najdemo na AP strani enterocitov, se pa v prebavnih cevi nahajajo drugi proteini, ki lahko vežejo LT in ostale uporabljeni spojine. Za dosega enakih pogojev pri vseh raztopinah smo albumine dodali tudi v raztopine brez LT. Zaradi dodatka albuminov se koncentracija proste frakcije LT ne znižuje zaradi adsorpcije na plastiko, ampak ostaja konstantna. Na albumine vezane frakcije LT, E3S in flavonoidov ne morejo difundirati skozi celice Caco-2 ali vstopati v interakcije s celičnimi prenašalci (21).

Pri poskusih smo uporabili donorske raztopine s celotno koncentracijo LT približno 20 $\mu\text{mol/L}$, vendar se je več kot 95 % LT v raztopini vezalo na dodane albumine (17). Pri odstranjevanju albuminov (glej podpoglavlje Odstranitev albuminov) smo odstranili tudi na albumine vezano frakcijo LT, v raztopini za HPLC/MS analizo pa je ostala samo prosta frakcija, zato je pri donorskih raztopinah prišlo do razlike med izračunano (ki predstavlja vezano in nevezano frakcijo LT skupaj) in izmerjeno koncentracijo LT (ki predstavlja le prosto frakcijo LT). Izračunano koncentracijo dobimo tako, da množino LT, ki smo ga pri pripravi raztopine dodali s pipetiranjem, delimo z volumnom donorske raztopine (izračunana koncentracija LT znaša približno 20 $\mu\text{mol/L}$ v vseh donorskih raztopinah – glej preglednici I in II), izmerjena koncentracija LT pa predstavlja rezultat HPLC/MS analize vzorcev donorskih raztopin po odstranitvi albuminov (vzorce donorskih raztopin smo vzorčili po koncu poskusov s celicami Caco-2).

Izmerjeno koncentracijo LT v donorskih raztopinah, ki predstavlja koncentracijo proste frakcije LT, smo uporabili kot C_d v formuli za izračun P_{app} (glej podpoglavlje 4.3.), saj je le prosta frakcija LT razpoložljiva za transport skozi monosloj celic Caco-2 in morebitne interakcije s prenašalcji. Koncentracija prostega LT v donorskih raztopinah (približno 0,2 $\mu\text{mol/L}$, če upoštevamo 99 % vezavo LT na albumine) je bila v podobnem velikostnem razredu kot intraluminalna koncentracija LT (0,9 $\mu\text{mol/L}$) po zaužitju najvišjega enkratnega odmerka natrijevega levotiroksinata za paciente s hipotirozo (200 μg) (glej podpoglavlje 1.2.).

Pri izračunu P_{app} za E3S smo prav tako uporabili koncentracije E3S v donorskih raztopinah (C_d), ki smo jih izmerili s HPLC/MS analizo, in ne izračunanih koncentracij E3S. Izračunana koncentracija (množina učinkovine/volumen raztopine) E3S v donorskih raztopinah je sicer znašala približno 200 $\mu\text{mol/L}$, izračunana koncentracija DIDS pa približno 100 $\mu\text{mol/L}$ (glej preglednico II).

Preglednica I: Priprava donorskih raztopin z levotiroksinom in prehranskimi dopolnilji

PD	najvišji enkratni odmerek [mg]	konz. v črevesnem soku* [mg/L]	serija poskusov	zatehta PD za pripravo donorske raztopine [mg]	volumen donorske raztopine [mL]	konz. PD v donorski raztopini ** [mg/L]	zatehta natrijevega levotiroksinata *** [mg]	volumen dodatka konc. raztopine LT [µL]	izračunana konc. LT v donorski raztopini [µmol/L]	filtriranje
izvleček listov zelenega čaja	600	2400	1 (AP → BL)	16,04 (pH 6,5)	10	1604	4,64	77	20,2	DA
			2 (BL → AP)	40,01 (pH 7,4)	25	1600	4,55	200	20,5	
izvleček lubja bele jelke	100	400	2 (obe smeri)	4,08 (pH 6,5)	10	408	4,55	80	20,5	NE (popolna raztopitev)
izvleček plodov pegastega badlja	250	1000	2 (AP → BL)	25,03 (pH 6,5)	25	1001	4,55	200	20,5	DA
			2 (BL → AP)	25,07 (pH 7,4)	25	1003	4,55	200	20,5	
kvercetin	900	3600	2 (obe smeri)	19,96 (pH 6,5)	10	1996	4,55	80	20,5	DA
piknogenol	100	400	1 (AP → BL)	4,30 (pH 6,5)	10	430	4,64	77	20,2	NE (popolna raztopitev)

* Koncentracija, ki jo dobimo pri raztopljanju najvišjega enkratnega odmerka PD v 0,25 L črevesnega soka

** Koncentracija v primeru popolne raztopitve PD v Ringerjevi raztopini. Izvleček listov zelenega čaja, izvleček plodov pegastega badlja in kvercetin se niso v celoti raztoplili (oborino smo pred poskusi filtrirali), zato je bila pri teh PD realna koncentracija v donorskih raztopinah nižja od navedene v preglednici.

*** Zatehta natrijevega levotiroksinata za pripravo koncentrirane raztopine z raztpljanjem v 2 mL DMSO.

Preglednica II: Priprava donorskih raztopin, pri katerih nismo uporabili prehranskih dopolnil (raztopine z LT brez dodatkov; LT z dodatkom E3S; E3S; E3S z dodatkom DIDS)

donorska raztopina	zatehta** [mg]		serija poskusov***	volumen dodatka koncentrirane raztopine [μL]		volumen donorske raztopine [mL]	izračunana koncentracija v donorski raztopini [$\mu\text{mol/L}$]	
LT (pH 6,5 in 7,4)*	4,64		1	77		10	20,2	
LT + E3S (pH 6,5)	4,64 (LT)	10,17 (E3S)	1	77 (LT)	146 (E3S)	10	20,2 (LT)	199,9 (E3S)
E3S (pH 6,5 in 7,4)*	10,17		1	146		10	199,9	
E3S + DIDS (pH 6,5)	10,17 (E3S)	4,05 (DIDS)	1	146 (E3S)	246 (DIDS)	10	20,2 (LT)	100 (DIDS)

* Pripravili smo dve donorski raztopini, eno s pH 6,5 in drugo s pH 7,4. Podatki veljajo za obe raztopini.

** Zatehta za pripravo koncentrirane raztopine z raztopljanjem v 2 mL DMSO.

*** Vse poskuse z E3S, DIDS in LT brez dodatkov smo izvedli v prvi seriji poskusov

Izvedba poskusov s celicami Caco-2: Poskuse smo izvajali v karbogenski atmosferi pri temperaturi 36–37 °C na celicah Caco-2 pasaže 25, gojenih na Transwell® filtrih s površino 0,3 cm². Na zgornji strani filtra s celičnim monoslojem je bila celična AP stran, na spodnji pa BL stran. Poskuse smo izvedli v dveh serijah (glej preglednici 1 in 2), pri čemer smo v prvi seriji izvedli 10 poskusov in v drugi 7, vsak poskus pa smo izvedli v 4 paralelkah (na 4 celičnih monoslojih). V prvi seriji poskusov neuporabljene celice smo zamrznili v tekočem dušiku (po postopku, opisanem v podpoglavlju 4.1.) in jih kasneje uporabili v drugi seriji (v preglednicah I in II je navedeno, katere poskuse smo opravljali v prvi in katere v drugi seriji). Tako smo v obeh serijah uporabili celice iste pasaže (pasaža 25). Za LT smo v drugi seriji poskusov določili novo umeritveno premico (glej sliko 18).

Vstavke s celičnimi monosloji smo sprali z Ringerjevim pufrom (pH 7,4) in jih napolnili z ustreznimi raztopinami, pri čemer smo za zmanjšanje hidrostatskih tlakov najprej napolnili komore na zgornjih (apikalnih) straneh celičnih monoslojev. Za preprečitev poškodb celic zaradi temperturnega stresa smo vse dodane raztopine predhodno segreli na 37 °C. Pri monoslojih celic Caco-2, kjer smo izvajali poskuse v AP → BL smeri, smo dodali po 0,3 mL donorskih raztopin (priprava in sestava donorskih

raztopin sta opisani v preglednicah I in II) na apikalno stran monoslojev, na bazolateralno stran pa smo dodali po 0,7 mL akceptorske raztopine (10 mmol/L raztopina glukoze v Ringerjevem pufru). Pri monoslojih, kjer smo izvajali poskuse v BL → AP smeri, pa smo dodali po 0,7 mL donorskih raztopin (za pripravo donorskih raztopin glej preglednici I in II) na bazolateralno stran monoslojev, medtem ko smo na apikalno stran dodali po 0,3 mL akceptorske raztopine (10 mmol/L raztopina manitola). V vse uporabljene raztopine smo predhodno dodali albumine v koncentraciji 1 %. Pri odvzemanju in dodajanju raztopin smo ravnali previdno, saj lahko ob hitrem pipetiranju v raztopinah nastanejo visoki hidrostatski tlaki, ki poškodujejo celične monosloje (37). Celice se lahko poškodujejo tudi ob dotiku monosloja s konico pipete.

Vzorčili smo na akceptorskih straneh v časih 20 min, 40 min, 60 min, 80 min, 100 min in 120 min od začetka poskusa. Pri BL → AP poskusih smo vzorčili 150 µL na AP strani (vzorčili smo polovico volumna akceptorske raztopine, ki je znašal 300 µL), pri AP → BL poskusih pa smo vzorčili 150 µL na BL strani (celotni volumen na BL strani je znašal 700 µL). Na akceptorske apikalne strani monoslojev celic Caco-2 smo po vsakem vzorčenju dodali po 150 µL 10 mmol/L raztopine manitola v Ringerjevem pufru in s tem vrnili med vzorčenjem odvzeti volumen. Podobno smo na akceptorske BL strani po vzorčenjih dodali po 150 µL 10 mmol/L raztopine glukoze v Ringerjevem pufru. Po zadnjih vzorčenjih na akceptorskih straneh smo pri vseh monoslojih odvzeli po 150 µL z donorskih strani (za meritve koncentracij LT in E3S v donorskih raztopinah (C_d), ki smo jih potrebovali pri izračunih P_{app} .

Pred začetkom in po koncu poskusov smo vsakemu celičnemu monosloju izmerili TEER, ki predstavlja upornost paracelularne difuzije skozi tesne stike med celicami. S pomočjo TEER smo ocenjevali obseg paracelularne difuzije in vitalnost celic Caco-2. Če je TEER celic nižja od mejne vrednosti $200 \Omega/cm^2$, rezultati poskusov na njih niso uporabni (37, 99). V našem primeru smo pred poskusi in po njih pri vseh celičnih monoslojih izmerili TEER, višjo od mejne vrednosti, vendar so se nekateri monosloji tej vrednosti približali.

Odstranitev albuminov: Pri vzorčenjih smo vzorce pipetirali v plastične epruvete s po 450 µL hladnega metanola, ki je oboril albumine. Po enodnevni inkubaciji v metanolu smo vzorce centrifugirali 15 minut pri hitrosti 10000 vrtlajev v minuti in s tem ločili

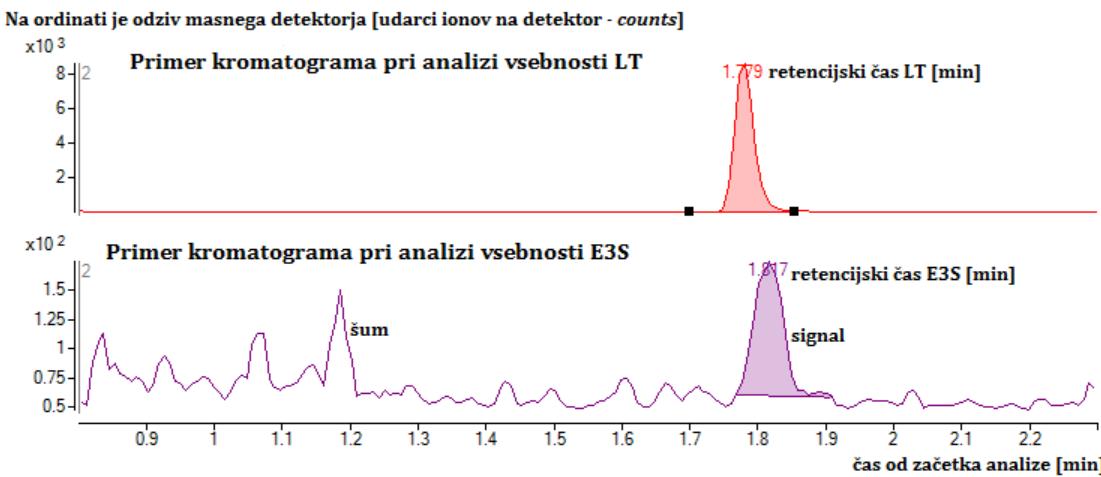
oborino od supernatanta. Po centrifugiraju smo pri vsakem vzorcu odvzeli po $120 \mu\text{L}$ supernatanta in te volumne prenesli v vdolbine na mikrotitrski plošči, ki smo jo nato prekrili in do analize shranili v zamrzovalniku pri temperaturi -20°C . Pri analizi smo zaznali samo proste frakcije LT in E3S, saj so vezane frakcije ostale na oborini albuminov v plastičnih epruvetah. Izmerjene koncentracije proste frakcije LT v donorskih raztopinah smo upoštevali kot C_d v formuli za izračun P_{app} (glej podpoglavlje 4.3.).

Analitika: Koncentracije LT in E3S v vzorcih smo merili s tekočinskim kromatografom (ultra) visoke zmogljivosti (HPLC), sklopljenim z masnim spektrometrom (MS) kot detektorjem (sistem HPLC/MS/MS 1290 Infinity®, Agilent). Sestavna dela HPLC kromatografa sta bila predkolona (Security Guard®) in kolona (Kinetex®). Podatki o velikosti delcev stacionarne faze ter dimenzijah predkolone in kolone se nahajajo v preglednici III. Vodna mobilna faza je vsebovala 0,1 % mravljične kisline (Suprapur®, Merck) v bidestilirani vodi Milli-Q, organska mobilna faza pa 0,1 % mravljične kisline (Suprapur®, Merck) v 98 % acetonitrilu (acetonitril MS-grade, J. T. Baker). Med analizo smo vzdrževali temperaturo kolone 50°C . V preglednici III so predstavljeni podatki o pretoku mobilne faze skozi kolono in sestavi mobilne faze (deleži organske mobilne faze) v izbranih časovnih točkah med analizo (uporabljali smo linearni gradient, zato so se omenjeni parametri med analizo zvezno spremajali). Podatki o volumnih injiciranja, časih analize in retencijskih časih za LT in E3S se prav tako nahajajo v preglednici III.

Masni detektor je bil tipa trojni kvadrupol (6460 MSD Triple quadrupole®, Agilent) z ionskim izvorom ESI JetStream®. Pri analizi LT je masni detektor deloval v pozitivnem načinu multirezidualne analize, spremljali pa smo masni prehod (spremembo m/z pri fragmentaciji iona) $m/z 777,7 \rightarrow m/z 351,0$ (m/z je razmerje med maso in nabojem iona), medtem ko je pri analizi E3S detektor deloval v negativnem načinu multirezidualne analize, spremljali pa smo masni prehod $m/z 349,1 \rightarrow m/z 269,0$. Pri fragmentaciji LT in E3S smo uporabili kolizijski energiji, pri katerih dosežemo optimalni signal teh dveh analitov (glej preglednico III).

Preglednica III: HPLC/MS/MS analiza LT in E3S

podatki o HPLC	LT	E3S			
HPLC kromatograf	1290 Infinity®, Agilent				
predkolona	Security Guard®, Phenomenex				
dolžina predkolone [mm]	4				
premer predkolone [mm]	2,0				
kolona	Kinetex®, Phenomenex				
dolžina kolone [mm]	50				
premer kolone [mm]	2,10				
premer delcev stacionarne faze [μm]	2,6				
temperatura kolone med analizo [$^{\circ}\text{C}$]	50				
volumen injiciranja [μL]	0,1	1,0			
retencijski čas [min]	1,779	1,817			
podatki o MS	LT	E3S			
ionski izvor	ESI JetStream®				
masni spektrometer	6460 MSD Triple quadrupole®, Agilent				
čas MS analize [min]	0,8–2,0	0,9–2,1			
masni prehod pri fragmentaciji [$\text{m/z} =$ razmerje mase in naboja]	777,7 → 351,0	349,1 → 269,0			
kolizijska energija [eV]	50	28			
način multirezidualne analize	pozitiven	negativen			
čas od začetka injiciranja [min]	delež organske mobilne faze (%)	pretok [mL/min]	čas od začetka injiciranja [min]	delež organske mobilne faze (%)	pretok [mL/min]
0,25	25	0,80	0	10	0,50
0,50	45	0,65	1,60	90	0,50
1,00	90	0,65	2,00	98	0,50
1,50	90	0,65	2,05	10	0,60
1,60	25	0,65			
1,75	25	0,70			



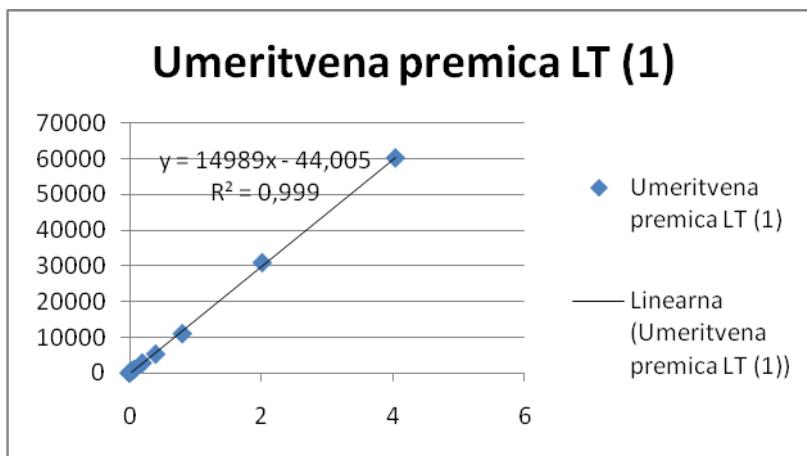
Oba kromatograma se nanašata na analizo donorske raztopine z LT in dodatkom izvlečka zelenega čaja, ki smo jo uporabili pri poskusu v absorptivni (AP - BL) smeri. Omenjena donorska raztopina ni vsebovala E3S, zato pri kromatogramu za E3S signal pri retencijskem času E3S (1,817 min) ni značilno večji od šuma.

Slika 16: Primera kromatogramov za LT in E3S

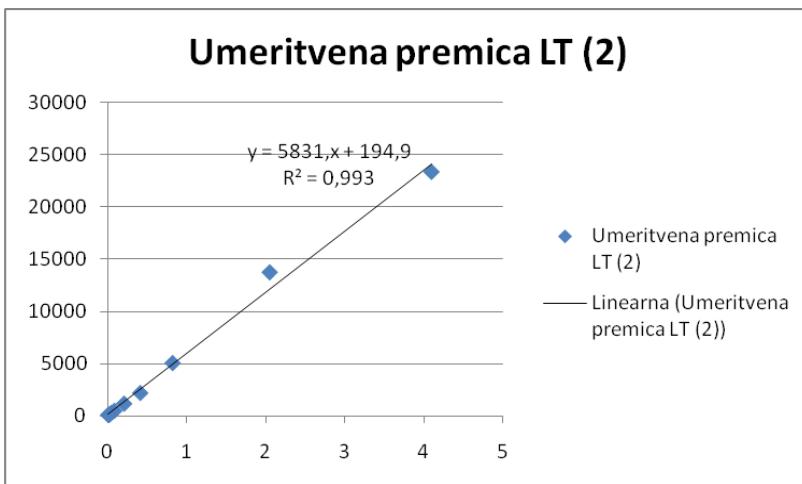
S pomočjo umeritvenih premic, določenih z linearno regresijo, smo pretvorili odzive analizatorja v koncentracije LT oziroma E3S (glej preglednico IV in slike 17–19). Za pripravo umeritvenih premic smo pred poskusi pripravili po 10 redčitev donorskih raztopin LT in E3S. Iz koncentracij analitov smo izračunali kumulativne množine in pri vsakem celičnem monosloju z linearno regresijo izračunali hitrost naraščanja kumulativne množine s časom (dn / dt), ki smo jo uporabili v formuli za izračun P_{app} (glej podpoglavlje 4.3.).

Preglednica IV: Določitev umeritvenih premic

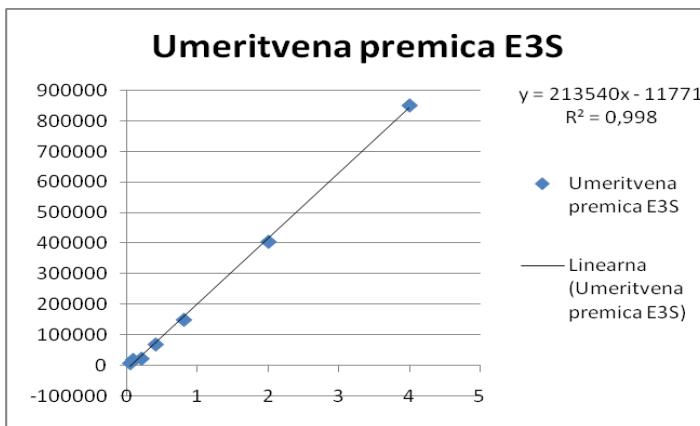
	LT, serija 1	LT, serija 2	E3S
naklon umeritvene premice (k)	14989	5831	213540
odsek na ordinati umeritvene premice (n)	-44,005	194,9	-11771
kvadrat Pearsonovega koeficiente (R^2)	0,999	0,993	0,998
redčitve donorske raztopine	koncentracija [$\mu\text{mol/L}$]	koncentracija [$\mu\text{mol/L}$]	koncentracija [$\mu\text{mol/L}$]
nerazredčena donorska raztopina	20,2	20,5	199,9
5-kratna redčitev	4,04	4,10	39,98
10x	2,02	2,05	19,99
25x	0,808	0,820	7,996
50x	0,404	0,410	3,998
100x	0,202	0,205	1,999
250x	0,0808	0,0820	0,7996
500x	0,0404	0,0410	0,3998
1000x	0,0202	0,0205	0,1999
2500x	0,00808	0,00820	0,07996
5000x	0,00404	0,00410	0,03998



Slika 17: Graf umeritvene premice za LT (serija 1). Na abscisi je koncentracija [$\mu\text{mol/L}$], na ordinati odziv analizatorja.



Slika 18: Graf umeritvene premice za LT (serija 2). Na abscisi je koncentracija [$\mu\text{mol/L}$], na ordinati odziv analizatorja.



Slika 19: Graf umeritvene premice za E3S. Na abscisi je koncentracija [$\mu\text{mol/L}$], na ordinati odziv analizatorja.

4.3. Izračun in analiza rezultatov

Izračun navideznega permeabilnostnega koeficienta:

Pri določanju P_{app} za določeno spojino moramo najprej izračunati njen pretok (\mathbf{J}). V primeru pasivne difuzije skozi celice je \mathbf{J} neodvisen od koncentracije spojine na donorski strani, kar pa ne velja za prenos s pomočjo prenašalcev (102). Ker pri transportu LT in E3S sodelujejo absorptivni in sekretorni prenašalci, bomo pri izračunu P_{app} upoštevali njune koncentracije v donorskih raztopinah (C_d), ki jih bomo izračunali iz odziva HPLC/MS analizatorja s pomočjo umeritvenih premic (glej slike 17–19). Zaradi vezave LT in E3S na albumine se koncentracija teh spojin v donorski raztopini, izmerjena s HPLC/MS analizatorjem, razlikuje od izračunane koncentracije, ki jo dobimo, če

množino v donorsko raztopino dodanega LT ali E3S delimo z volumnom te raztopine (glej podpoglavlje Priprava donorskih in akceptorskih raztopin). Koncentracija, izmerjena s HPLC/MS analizatorjem, predstavlja le koncentracijo prostih frakcij LT ali E3S, medtem ko izračunana koncentracija predstavlja skupno koncentracijo proste in na albumine vezane frakcije teh dveh spojin. Ker lahko le prosti frakciji LT in E3S prehajata skozi monosloj celic Caco-2 in vstopata v interakcije s prenašalci, je koncentracija prostih frakcij teh dveh spojin bolj relevantna za izračun P_{app} kot njuna celotna koncentracija.

Pretok \mathbf{J} [$\text{mol}/(\text{cm}^2 \times \text{s})$] je definiran kot množina snovi \mathbf{dn} , ki v času \mathbf{dt} difundira skozi površino \mathbf{A} . Pri celičnih kulturah običajno predpostavimo 0. red kinetike transporta učinkovine skozi celice, kar pomeni konstantno hitrost difuzije ($\mathbf{dn} / \mathbf{dt}$) učinkovine skozi celice. Ob upoštevanju predpostavke o kinetiki 0. reda in konstantni hitrosti difuzije izračunamo (104) pretok \mathbf{J} po enačbi 3:

$$\mathbf{J} = \frac{\frac{\mathbf{dn}}{\mathbf{dt}}}{\mathbf{A}} \quad \text{Enačba 3}$$

($\mathbf{dn} / \mathbf{dt}$ = konstantna hitrost difuzije [mol/s]; \mathbf{A} = površina [cm^2], razpoložljiva za transport učinkovine. V našem primeru je \mathbf{A} površina monosloja celic Caco-2.)

Navidezni permeabilnostni koeficient \mathbf{P}_{app} za določeno spojino izračunamo (99) po enačbi 4:

$$\mathbf{P}_{app} = \frac{\mathbf{J}}{\mathbf{C}_d} = \frac{\frac{\mathbf{dn}}{\mathbf{dt}}}{\mathbf{A} \times \mathbf{C}_d} \quad \text{Enačba 4}$$

Enote: \mathbf{P}_{app} [cm/s]; \mathbf{J} [$\text{mol}/(\text{cm}^2 \times \text{s})$]; \mathbf{C}_d [$\text{mol}/\text{L} = \text{mol}/\text{dm}^3 = \text{mol}/1000 \text{ cm}^3$]; $\mathbf{dn} / \mathbf{dt}$ [mol/s]; \mathbf{A} [cm^2].

Če želimo izračunati $\mathbf{dn} / \mathbf{dt}$, moramo poznati kumulativno množino snovi \mathbf{n} , ki se je v času \mathbf{t} transportirala skozi monosloj celic Caco-2. Pri vsakem vzorčenju smo določeno množino spojine odstranili iz akceptorske raztopine in je nismo vrnili nazaj. Če želimo izračunati kumulativno množino snovi, ki se je med začetkom poskusa in časom vzorčenja prenesla skozi monosloj celic Caco-2, moramo k množini spojine, ki se v času vzorčenja \mathbf{t} nahaja v akceptorski raztopini prištetи vsoto množin spojine, ki smo jih odvzeli pri predhodnih vzorčenjih (102).

Množino snovi \mathbf{n} [mol] LT ali E3S, ki se v času n -tega vzorčenja (\mathbf{t}) nahaja v akceptorski raztopini, izračunamo po enačbi 5:

$$\mathbf{n} = \mathbf{C}_n \times \mathbf{V}_a \quad \text{Enačba 5}$$

(\mathbf{C}_n = koncentracija spojine v akceptorski raztopini [mol/L] v času n -tega vzorčenja. Izračunamo jo iz odziva analizatorja s pomočjo umeritvenih premic – glej slike 17–19; \mathbf{V}_a = volumen akceptorske raztopine [L])

Množino snovi n_k [mol], ki smo jo odvzeli iz akceptorske raztopine pri k-tem vzorčenju, izračunamo po enačbi 6:

$$n_k = C_k \times V_v \quad \text{Enačba 6}$$

(C_k = koncentracija spojine v akceptorski raztopini [mol/L] v času k-tega vzorčenja; V_v = volumen odvzetega vzorca [L])

Če smo pri vsakem vzorčenju odvzeli enak volumen, izračunamo kumulativno množino po n vzorčenjih n (n) [mol] po enačbi 7:

$$n(n) = (C_1 + C_2 + \dots + C_{n-1}) \times V_v + C_n \times V_a \quad \text{Enačba 7}$$

(C_1, C_2, \dots, C_{n-1} = koncentracije spojine v akceptorski raztopini [mol/L] v času prvega, drugega, ... predzadnjega vzorčenja; V_v = volumen odvzetega vzorca pri posamičnem vzorčenju [L]; C_n = koncentracija spojine v akceptorski raztopini [mol/L] v času zadnjega vzorčenja; V_a = volumen akceptorske raztopine [L])

Za vsakega od šestih vzorčenj iste spojine ($n = 1, 2, \dots, 6$) smo izračunali $n(n)$. Prvo vzorčenje je bilo 20 minut po začetku poskusa, nato smo vzorčili vsakih 20 minut do zadnjega (šestega) vzorčenja 120 minut po začetku poskusa. Ustvarili smo graf časovne odvisnosti kumulativne množine LT ali E3S ($n(n) = f(t)$) in s pomočjo linearne regresije začrtali premico. Njen naklon je predstavljal hitrost difuzije dn / dt , ki smo jo vstavili v enačbo za izračun P_{app} (102). Moč linearne regresije pri začrtanju premice smo ocenili s kvadratom Pearsonovega koeficienta korelacije (R^2). Čim bližje je R^2 vrednosti 1, tem bolje premica linearne regresije ponazarja odvisnost med spremenljivkama.

Statistična analiza: Pri vsakem poskusu smo izračunali povprečje in standardni odklon za začetno TEER, končno TEER in P_{app} . Povprečne vrednosti smo statistično primerjali s programom Microsoft Excel 2007®. Pri primerjavi povprečnih začetnih in končnih TEER smo uporabili t-test za parni preizkus, povprečne P_{app} pa smo primerjali s t-testom za neodvisna vzorca. Predhodno smo izvedli F-test za enakost varianc, saj obstajata dve obliki t-testa za neodvisna vzorca: ena za primer enakih varianc, druga pa za primer neenakih.

Rezultat statističnih testov je vrednost p , ki predstavlja stopnjo tveganja pri zavračanju ničelne hipoteze. Ničelna hipoteza je trditev, da med populacijama, iz katerih izhajata testirana vzorca, ni značilnih razlik pri aritmetični sredini določenega parametra. Če je vrednost p nižja od mejne stopnje tveganja α , lahko zavrnemo ničelno hipotezo in sprejmemmo alternativno (populaciji se značilno razlikujeta po aritmetični sredini analiziranega parametra). Če pa je $p > \alpha$, ničelne hipoteze ne moremo zavrniti. Mejno

stopnjo tveganja α določimo sami in predstavlja verjetnost neupravičene zavrnitve ničelne hipoteze, pri čemer višja α pomeni večjo verjetnost. V našem primeru predstavljajo populacijo celice Caco-2, vzorec so pri poskusih uporabljeni monosloji celic Caco-2, parametra pa sta P_{app} in TEER. Pri vseh statističnih testih smo uporabili obojestransko tveganje s stopnjo $\alpha = 0,05$ in prepostavili normalno populacijsko porazdelitev vrednosti analiziranega parametra (porazdelitev po Gaussovi krivulji) (103).

F-test: Varianca s^2 in njen kvadratni koren s , ki se imenuje standardna deviacija (SD), sta merilo variabilnosti določenega parametra med enotami v vzorcu.

Vzorčno varianco določenega parametra (v našem primeru P_{app} in TEER) s^2 izračunamo po enačbi 8:

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

(x_i = vrednost posamezne enote v vzorcu; \bar{x} = vzorčno povprečje; n = število enot v vzorcu)

Vzorčno povprečje \bar{x} izračunamo po enačbi 9:

$$\bar{x} = \frac{\sum_{i=1}^n x_i}{n} \quad \text{Enačba 9}$$

(\bar{x} = vzorčno povprečje; x_i = vrednost posamezne enote v vzorcu; n = število enot v vzorcu)

S pomočjo vzorčnih varianc izračunamo eksperimentalno vrednost F_{exp} , iz katere sklepamo o populacijskih variankah. Postavimo ničelno (populacijski varianci sta enaki) in alternativno hipotezo (populacijski varianci se značilno razlikujeta)

Vrednost F_{exp} izračunamo po enačbi 10:

$$F_{exp} = \frac{s_x^2}{s_y^2} \quad \text{Enačba 10}$$

Ničelna hipoteza H_0 :

$$H_0: s_x^2 = s_y^2 \quad \text{Enačba 11}$$

Alternativna hipoteza H_1 :

$$H_1: s_x^2 \neq s_y^2 \quad \text{Enačba 12}$$

(s_x^2 = varianca prvega vzorca; s_y^2 = varianca drugega vzorca)

Če ugotovimo, da je vrednost F_{exp} nižja od mejne (tabelarične) vrednosti F (F_{tab}) za določeno stopnjo tveganja α oziroma da je $p > \alpha$, ničelne hipoteze ne moremo zavrniti. V tem primeru privzamemo, da sta populacijski varianci enaki, in za primerjavo populacijskih aritmetičnih sredin uporabimo t-test za enaki varianci. Če pa je $F_{exp} > F_{tab}$

($p < \alpha$), lahko zavrnemo ničelno hipotezo in sprejmemo alternativno, da populacijski varianci nista enaki. V tem primeru za primerjavo populacijskih aritmetičnih sredin uporabimo t-test za neenaki varianci (104).

T-test za enaki varianci: Uporabimo ga v primeru dveh neodvisnih vzorcev, pri katerih je vrednost **p** F-testa večja od stopnje tveganja **α** . Rezultat testa je vrednost **t_{exp}** , ki jo primerjamo s tabelično vrednostjo **t_{tab}** pri **$\alpha = 0,05$** in prostostni stopnji **f**, ki je za 2 manjša od skupnega števila enot v prvem in drugem vzorcu. Če je **$t_{exp} > t_{tab}$ ($p < \alpha$)**, zavrnemo ničelno hipotezo o enakosti populacijskih aritmetičnih sredin in sprejmemo alternativno hipotezo, da se populacijski aritmetični sredini značilno razlikujeta. Če je **$t_{exp} < t_{tab}$ ($p > \alpha$)**, ničelne hipoteze ne moremo zavrniti (104).

Izračun prostostne stopnje **f**:

$$f = n + m - 2$$

Enačba 13

(**n** = število enot ozziroma meritev pri prvem vzorcu; **m** = število meritev pri drugem vzorcu)

Ničelna hipoteza **H_0** :

$$H_0: \mu_1 = \mu_2$$

Enačba 14

Alternativna hipoteza **H_1** :

$$H_1: \mu_1 \neq \mu_2$$

Enačba 15

(**μ_1** = aritmetična sredina populacije, iz katere izhaja prvi vzorec; **μ_2** = aritmetična sredina populacije, iz katere izhaja drugi vzorec)

Vrednost **t_{exp}** izračunamo po enačbi 16:

$$t_{exp} = \frac{\bar{x}_1 - \bar{x}_2}{s} \times \sqrt{\frac{mn}{m+n}}$$

Enačba 16

(**\bar{x}_1** = povprečje prvega vzorca; **\bar{x}_2** = povprečje drugega vzorca; **s** = skupna standardna deviacija)

Skupno standardno deviacijo **s** iz zgornje enačbe izračunamo po enačbi 17:

$$s = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (x_{i1} - \bar{x}_1)^2 + \sum_{i=1}^m (x_{i2} - \bar{x}_2)^2}{(n-1) + (m-1)}}$$

Enačba 17

(**x_{i1}** = posamezna meritev pri prvem vzorcu; **x_{i2}** = posamezna meritev pri drugem vzorcu)

Program Excel®, ki ga uporabljam za statistično analizo, nam prikaže rezultate t- in F-testov kot vrednost **p**, zato nam ni potrebno uporabljati preglednic z vrednostmi **t_{tab}** in **F_{tab}** za različne stopnje tveganja **α** in prostostne stopnje **f**.

T-test za neenaki varianci: Uporabimo ga v primeru dveh neodvisnih vzorcev, pri katerih je **p**-vrednost F-testa nižja od stopnje tveganja **α** . V tem primeru zavrnemo ničelno hipotezo F-testa o enakosti populacijskih varianc določenega parametra in

sprejmemmo hipotezo, da sta populacijski varianci različni. Rezultat t-testa je vrednost t_{exp} , ki jo interpretiramo na enak način kot pri t-testu za primer enakih varianc (102).

Vrednost t_{exp} izračunamo po enačbi 18:

$$t_{\text{exp}} = \frac{\bar{x}_1 - \bar{x}_2}{\sqrt{\frac{s_1^2}{m} + \frac{s_2^2}{n}}} \quad \text{Enačba 18}$$

(s_1^2 = varianca prvega vzorca; s_2^2 = varianca drugega vzorca)

T-test za parni preizkus: Uporabimo ga za primerjavo parov meritev, izvedenih na istem vzorcu v različnih okoliščinah (v našem primeru smo t-test za parni preizkus uporabili za primerjavo meritev TEER istega monosloja celic Caco-2 pred poskusom in po njem). Rezultat je vrednost t_{exp} , ki jo interpretiramo podobno kot pri t-testu za primer enakih varianc, le da število prostostnih stopenj f pri t-testu za parni preizkus znaša $n - 1$ (n = število enot v vzorcu).

Pri t-testu za parni preizkus moramo pri vseh parih meritev izračunati razliko med vrednostima, ki predstavlja par meritev (v našem primeru TEER istega monosloja pred poskusom in po njem). Nato po formulah za izračun vzorčnega povprečja in variance (glej podpoglavlje F-test) izračunamo povprečje \bar{x}_d in standardno deviacijo s_d razlik med pari meritev (102).

Vrednost t_{exp} izračunamo po enačbi 19:

$$t_{\text{exp}} = \frac{\bar{x}_d \sqrt{n}}{s_d} \quad \text{Enačba 19}$$

(n = število enot v vzorcu; \bar{x}_d = povprečje razlik med pari meritev; s_d = standardna deviacija razlik med pari meritev)

5. Rezultati

Najprej predstavljamo podatke za vsak posamezni poskus (meritve TEER in izračun P_{app}), na koncu pa preglednice z združenimi podatki, v kateri so pri posameznem poskusu prikazane samo povprečne vrednosti P_{app} in TEER. V teh preglednicah so tudi rezultati statistične analize (F- in t-test). Rezultati iz preglednic so nato prikazani v grafih.

Zaradi večje preglednosti in nizkih vrednosti so vsi P_{app} podani v **nm/s**. **1 nm/s = 10^{-7} cm/s** (cm/s je običajna enota za P_{app}).

5.1. Permeabilnost estron-3-sulfata

Preglednica V: Prehod E3S z AP (pH 6,5) na BL stran (pH 7,4)

monosloj	1	2	3	4
TEER pred poskusom [Ω/cm^2]	609	574	604	612
TEER po poskusu [Ω/cm^2]	530	520	505	555
TEER po / TEER pred (%)*	87	91	84	91
P_{app} [nm/s]	50	47	51	41
povprečni P_{app} $\pm SD$ [nm/s]	$47,1 \pm 4,56$			

*Razmerje $TEER_{po poskusu} / TEER_{pred poskusom}$, izraženo v %.

Preglednica VI: Prehod E3S z BL (pH 7,4) na AP stran (pH 6,5)

monosloj	1	2	3	4
TEER pred poskusom [Ω/cm^2]	580	553	577	592
TEER po poskusu [Ω/cm^2]	550	530	580	580
TEER po / TEER pred (%)	95	96	101	98
P_{app} [nm/s]	3572	2975	2880	3037
povprečni P_{app} $\pm SD$ [nm/s]	$3115,8 \pm 310,7$			

Preglednica VII: Prehod E3S z AP (pH 6,5) na BL stran (pH 7,4), dodatek LT

monosloj	1	2	3	4
P _{app} [nm/s]	39	47	37	40
povprečni P _{app} ± SD [nm/s]	40,7 ± 4,53			

Podatki za TEER so v preglednici XII.

Preglednica VIII: Prehod E3S z AP (pH 6,5) na BL stran (pH 7,4), dodatek DIDS

monosloj	1	2	3	4
TEER pred poskusom [Ω/cm ²]	576	588	531	555
TEER po poskusu [Ω/cm ²]	560	565	540	580
TEER po / TEER pred (%)	97	96	102	105
P _{app} [nm/s]	91	72	61	72
povprečni P _{app} ± SD [nm/s]	74,3 ± 12,5			

Preglednica IX: Rezultati poskusov z E3S

poskus z E3S	AP 6,5 → BL 7,4 (kontrola)	BL 7,4 → AP 6,5	AP 6,5 → BL 7,4, dodatek LT	AP 6,5 → BL 7,4, dodatek DIDS
povprečni P_{app} [nm/s]	47,1	3115,8	40,7	74,3
SD P_{app} [nm/s]	4,56	310,7	4,53	12,5
KV P_{app} (%)	9,7	10,0	11,1	16,8
relativna spremembra P_{app} (%)	0	+6511	-14	+56
p (F-test P_{app})	K	0,0000108 (S)	0,992 (NS)	0,133 (NS)
p (t-test P_{app})	K	0,000283 (S)	0,0912 (NS)	0,00650 (S)
povprečna TEER pred [Ω/cm^2]	599,8	575,5	580,0	562,5
SD TEER pred [Ω/cm^2]	17,5	16,3	13,3	25,0
KV TEER pred (%)	2,9	2,8	2,3	4,4
povprečna TEER po [Ω/cm^2]	527,5	560,0	507,3	561,3
SD TEER po [Ω/cm^2]	21,0	24,5	20,7	16,5
KV TEER po (%)	4,0	4,4	4,1	2,9
spremembra TEER (%)	-12,0	-2,7	-12,5	-0,2
p (t-test TEER)	0,00631 (S)	0,120 (NS)	0,000707 (S)	0,384 (NS)

Pomen izrazov iz preglednic IX, XVIII in XXVI:

- **SD** = standardna deviacija:

$$SD = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2}{n - 1}} \quad \text{Enačba 20}$$

(x_i = vrednost posamezne enote v vzorcu; \bar{x} = vzorčno povprečje; n = število enot v vzorcu);

- **KV** = koeficient variabilnosti:

$$KV = \frac{SD}{\bar{x}} \times 100\% \quad \text{Enačba 21}$$

- **relativna spremembra P_{app}**

$$P_{app} = \frac{P_{app}(\text{pri določenem poskusu}) - P_{app}(\text{pri kontrolnem poskusu})}{P_{app}(\text{pri kontrolnem poskusu})} \times 100\% \quad \text{Enačba 22}$$

(razmerje je izraženo v % P_{app} pri kontrolnem poskusu);

- **p (F-test P_{app})** = p-vrednost F-testa primerjave varianc pri določenem poskusu in kontrolnem poskusu (**LT/E3S brez dodatkov, AP 6,5 → BL 7,4**);
- **p (t-test P_{app})** = p-vrednost t-testa primerjave povprečnega P_{app} pri določenem poskusu in kontrolnem poskusu (**LT/E3S brez dodatkov, AP 6,5 → BL 7,4**);
- **K** (kontrolni poskus) = pri F- in t-testu primerjamo parameter pri določenem poskusu z ustreznim parametrom pri kontrolnem poskusu, ki je v preglednici označen s K;

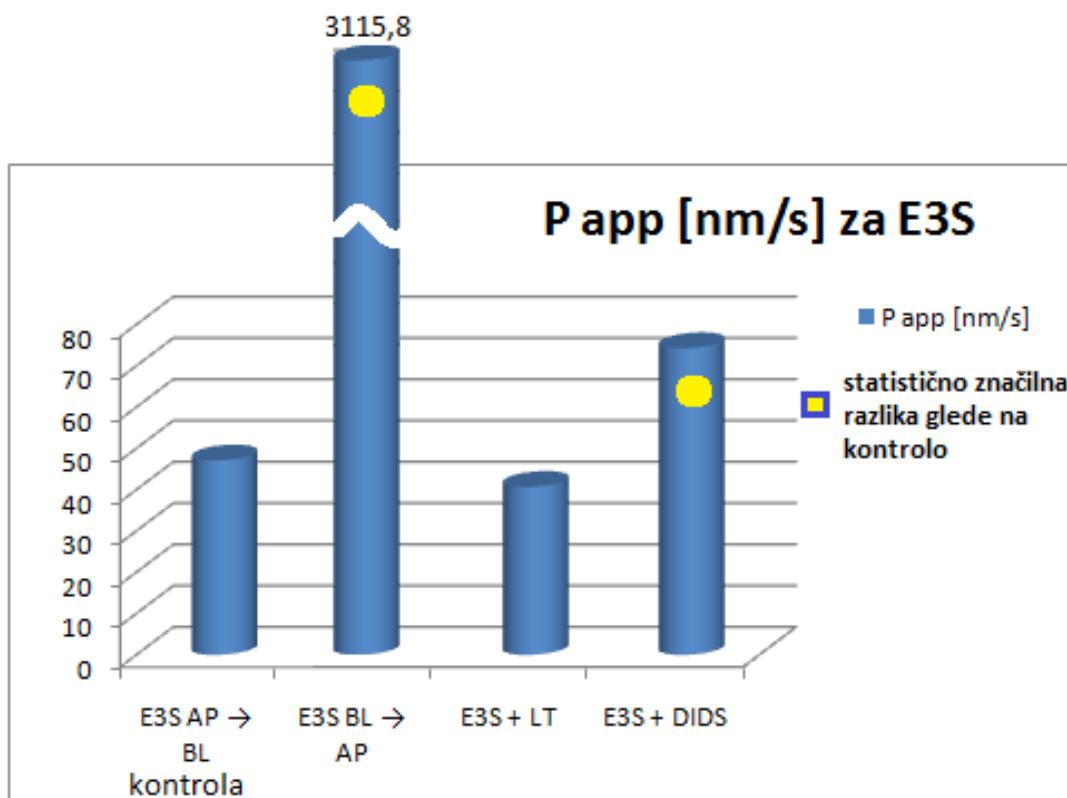
- **NS** (ni signifikantno) = razlika med vrednostima določenega parametra (varianca pri F-testu, P_{app} in TEER pri t-testih) pri določenem poskusu in kontrolnem poskusu ni statistično značilna;
- **S** (signifikantno) = razlika med vrednostima parametra pri določenem poskusu in kontrolnem poskusu je statistično značilna;
- **Krepko izpisana p-vrednost t-testa je rezultat t-testa za enake variance, ležecje izpisana p-vrednost t-testa pa predstavlja rezultat t-testa za neenake variance;**
- **TEER pred** = TEER pred poskusom;
- **TEER po** = TEER po poskusu;
- **sprememba TEER**

$$\Delta TEER = \frac{\overline{TEER}_{po poskusu} - \overline{TEER}_{pred poskusom}}{\overline{TEER}_{po poskusu}} \times 100\%$$

Enačba 23

(sprememba je izražena v % začetne TEER);

- **p (t-test TEER)** = p-vrednost t-testa primerjave povprečnih TEER pred poskusom in po njem (t-test za parni preizkus). (**S**) pomeni statistično značilno razliko, (**NS**) pa pomeni, da razlika ni značilno različna.
T-test pri TEER se nanaša na primerjavo začetne TEER (pred poskusom) in končne TEER (po poskusu) pri posameznem poskusu in ne na primerjavo posameznega poskusa s kontrolo.



Slika 20: P_{app} pri poskusih z E3S [nm/s]

5.2. Permeabilnost levotiroksina v AP → BL smeri

Preglednica X: Prehod LT z AP (pH 6,5) na BL stran (pH 7,4)

monosloj	1	2	3	4
TEER pred poskusom [Ω/cm^2]	630	582	609	612
TEER po poskusu [Ω/cm^2]	500	500	420	520
TEER po / TEER pred (%)	79	86	69	85
P_{app} [nm/s]	181	125	112	123
povprečni P_{app} \pm SD [nm/s]	$135,2 \pm 31,3$			

Preglednica XI: Prehod LT z AP (pH 7,4) na BL stran (pH 7,4)

monosloj	1	2	3	4
TEER pred poskusom [Ω/cm^2]	530	550	570	520
TEER po poskusu [Ω/cm^2]	480	470	450	482
TEER po / TEER pred (%)	91	85	79	93
P_{app} [nm/s]	34	29	32	300*
povprečni P_{app} \pm SD (monosloji 1 – 3) [nm/s]	$31,8 \pm 2,65$			

* P_{app} monosloja 4 preveč izstopa in ga nismo uporabili pri izračunih povprečja in SD.

Preglednica XII: Prehod LT z AP (pH 6,5) na BL stran (pH 7,4), dodatek E3S

monosloj	1	2	3	4
TEER pred poskusom [Ω/cm^2]	595	566	587	572
TEER po poskusu [Ω/cm^2]	530	480	512	507
TEER po / TEER pred (%)	89	85	87	89
P_{app} [nm/s]	172	170	181	193
povprečni P_{app} \pm SD [nm/s]	179,1 \pm 10,3			

Preglednica XIII: Prehod LT z AP (pH 6,5) na BL stran (pH 7,4), dodatek piknogenola

monosloj	1	2	3	4
TEER pred poskusom [Ω/cm^2]	586	443	550	591
TEER po poskusu [Ω/cm^2]	730	500	670	650
TEER po / TEER pred (%)	125	113	122	110
P_{app} [nm/s]	215	281	221	132
povprečni P_{app} \pm SD [nm/s]	212,4 \pm 61,3			

Preglednica XIV: Prehod LT z AP (pH 6,5) na BL stran (pH 7,4), dodatek izvlečka lubja bele jelke

monosloj	1	2	3	4
TEER pred poskusom [Ω/cm^2]	460	421	550	530
TEER po poskusu [Ω/cm^2]	500	517	588	543
TEER po / TEER pred (%)	109	123	107	102
P_{app} [nm/s]	87,5	91,8	90,4	84,7
povprečni P_{app} \pm SD [nm/s]	$88,6 \pm 3,2$			

Preglednica XV: Prehod LT z AP (pH 6,5) na BL stran (pH 7,4), dodatek kvercetina

monosloj	1	2	3	4
TEER pred poskusom [Ω/cm^2]	230	506	490	555
TEER po poskusu [Ω/cm^2]	290	288	417	405
TEER po / TEER pred (%)	126	57	85	73
P_{app} [nm/s]	271*	94,1	67,0	30,4
povprečni P_{app} \pm SD (monosloji 2 – 4) [nm/s]	$63,8 \pm 32,0$			

* P_{app} monosloja 1 preveč odstopa, zato ga nismo uporabili pri izračunih povprečja in SD. Vzrok je lahko nizka vitalnost celic, saj je že pred poskusom TEER znašala $230 \Omega/\text{cm}^2$, kar je tik nad spodnjo mejo vitalnosti $200 \Omega/\text{cm}^2$.

Preglednica XVI: Prehod LT z AP (pH 6,5) na BL stran (pH 7,4), dodatek izvlečka plodov pegastega badlja

monosloj	1	2	3	4
TEER pred poskusom [Ω/cm^2]	549	550	560	550
TEER po poskusu [Ω/cm^2]	275	590	305	519
TEER po / TEER pred (%)	50	107	54	94
P_{app} [nm/s]	87,5	75,6	93,5	81,2
povprečni P_{app} \pm SD [nm/s]	$84,5 \pm 7,8$			

Preglednica XVII: Prehod LT z AP (pH 6,5) na BL stran (pH 7,4), dodatek izvlečka listov zelenega čaja

monosloj	1	2	3	4
TEER pred poskusom [Ω/cm^2]	540	615	636	610
TEER po poskusu [Ω/cm^2]	910	980	990	970
TEER po / TEER pred (%)	169	159	156	159
P_{app} [nm/s]	351	302	277	284
povprečni P_{app} \pm SD [nm/s]	$303,6 \pm 33,5$			

Preglednica XVIII: Rezultati poskusov z LT v AP → BL smeri

poskus z LT	vpliv pH		vpliv E3S	vpliv PD s flavan-3-oli			vpliv ostalih PD	
	AP 6,5 → BL 7,4 (kontrola)	AP 7,4 → BL 7,4	AP 6,5 → BL 7,4 (dodatek E3S)	AP 6,5 → BL 7,4 (dodatek piknogenola)	AP 6,5 → BL 7,4 (dodatek izvlečka bele jelke)	AP 6,5 → BL 7,4 (dodatek izvlečka zelenega čaja)	AP 6,5 → BL 7,4 (dodatek izvlečka pegasteg a badlja)	AP 6,5 → BL 7,4 (dodatek kvercetina)
povprečni P _{app} [nm/s]	135,2	31,8	179,1	212,4	88,6	303,6	79,2	63,8
SD P _{app} [nm/s]	31,3	2,65	10,3	61,3	3,2	33,5	14,7	32,0
KV P _{app} (%)	23,2	8,3	5,8	28,9	3,6	11,0	18,6	50,2
relativna sprememba P _{app} (%)	0	-76	+32	+57	-34	+125	-41	-53
p (F-test P _{app})	K	0,0143 (S)	0,102 (NS)	0,298 (NS)	0,00344 (S)	0,916 (NS)	0,246 (NS)	0,906 (NS)
p (t-test P _{app})	K	0,00675 (S)	0,0374 (S)	0,0660 (NS)	0,0580 (NS)	0,000323 (S)	0,0177 (S)	0,0316 (S)
povprečna TEER pred [Ω/cm ²]	608,3	542,5	580,0	542,5	490,3	600,3	552,3	445,3
SD TEER pred [Ω/cm ²]	19,8	22,2	13,3	68,8	60,1	41,7	5,2	146,1
KV TEER pred (%)	3,3	4,1	2,3	12,7	12,3	6,9	0,9	32,8
povprečna TEER po [Ω/cm ²]	485,0	470,5	507,3	637,5	537,0	962,5	422,3	350,0
SD TEER po [Ω/cm ²]	44,3	14,6	20,7	97,8	38,3	35,9	155,9	70,6
KV TEER po (%)	9,1	3,1	4,1	15,3	7,1	3,7	36,9	20,2
sprememba TEER (%)	-20,3	-13,3	-12,5	+17,5	+9,5	+60,3	-23,6	-21,4
p (t-test TEER)	0,0144 (S)	0,0291 (S)	0,000707 (S)	0,0227 (S)	0,0759 (NS)	0,0000018 6 (S)	0,199 (NS)	0,208 (NS)

Za izraze v zgornji preglednici glej legendo pri preglednici IX.

5.3. Permeabilnost levotiroksina v BL → AP smeri

Preglednica XIX: Prehod LT z BL (pH 7,4) na AP stran (pH 6,5)

monosloj	1	2	3	4
TEER pred poskusom [Ω/cm^2]	586	580	610	615
TEER po poskusu [Ω/cm^2]	500	530	530	555
TEER po / TEER pred (%)	85	91	87	90
P_{app} [nm/s]	241	201	291	160
povprečni P_{app} \pm SD [nm/s]	$223,2 \pm 56,0$			

Preglednica XX: Prehod LT z BL (pH 7,4) na AP stran (pH 7,4)

monosloj	1	2	3	4
TEER pred poskusom [Ω/cm^2]	625	605	590	587
TEER po poskusu [Ω/cm^2]	520	505	500	520
TEER po / TEER pred (%)	83	83	85	89
P_{app} [nm/s]	156	183	205	205
povprečni P_{app} \pm SD [nm/s]	$187,1 \pm 23,3$			

Preglednica XXI: Prehod LT z BL (pH 6,5) na AP stran (pH 6,5), dodatek izvlečka lubja bele jelke

monosloj	1	2!*	3!	4
TEER pred poskusom [Ω/cm^2]	626	614	582	622
TEER po poskusu [Ω/cm^2]	261	214	320	340
TEER po / TEER pred (%)	42	35	55	55
P_{app} [nm/s]	275	340	200	196
povprečni P_{app} $\pm \text{SD}$ [nm/s]	$252,3 \pm 68,5$			

* Znak ! pomeni vidne spremembe celičnega monosloja med poskusom.

Preglednica XXII: Prehod LT z BL (pH 6,5) na AP stran (pH 6,5), dodatek kvercetina

monosloj	1	2	3	4
TEER pred poskusom [Ω/cm^2]	365	587	607	587
TEER po poskusu [Ω/cm^2]	317	234	350	566
TEER po / TEER pred (%)	87	40	58	96
P_{app} [nm/s]	67,6	77,5	107	77,4
povprečni P_{app} $\pm \text{SD}$ [nm/s]	$82,3 \pm 17,0$			

Preglednica XXIII: Prehod LT z BL (pH 7,4) na AP stran (pH 6,5), dodatek izvlečka plodov pegastega badlja

monosloj	1	2	3	4
TEER pred poskusom [Ω/cm^2]	612	620	607	632
TEER po poskusu [Ω/cm^2]	450	688	495	300
TEER po / TEER pred (%)	74	111	82	47
P_{app} [nm/s]	57,3	41,4	65,1	111
povprečni P_{app} \pm SD [nm/s]	$68,7 \pm 29,8$			

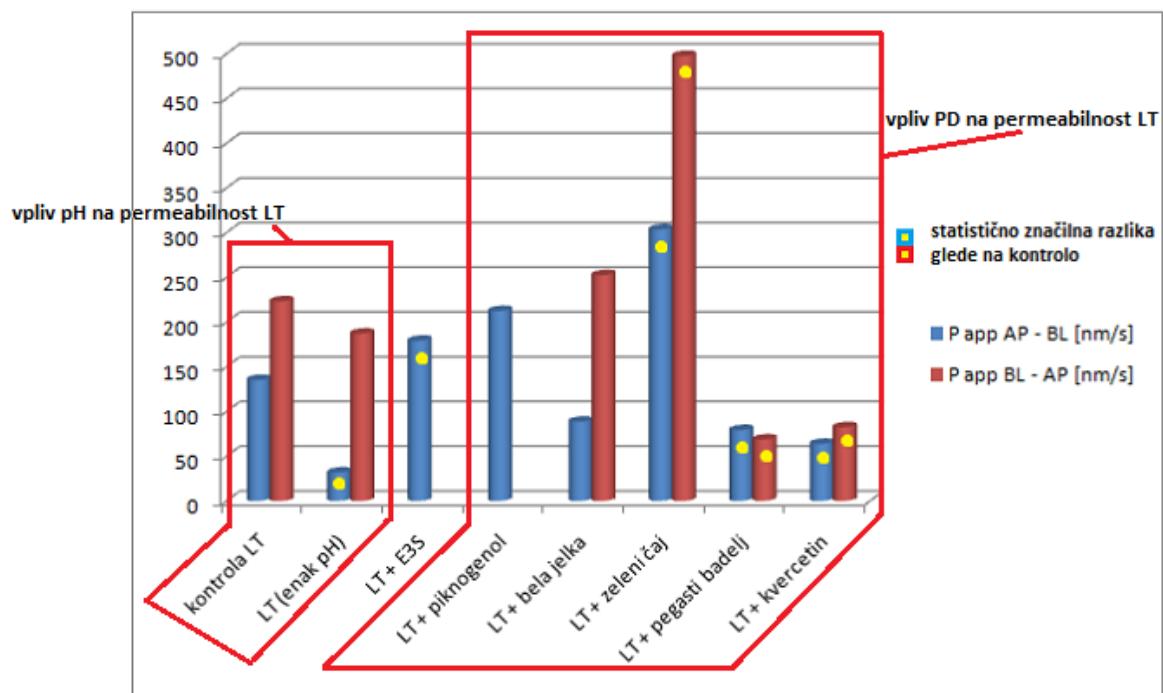
Preglednica XXIV: Prehod LT z BL (pH 7,4) na AP stran (pH 6,5), dodatek izvlečka listov zelenega čaja

monosloj	1!	2!	3	4
TEER pred poskusom [Ω/cm^2]	578	566	564	263
TEER po poskusu [Ω/cm^2]	230	240	218	228
TEER po / TEER pred (%)	40	42	39	87
P_{app} [nm/s]	480	350	749	411
povprečni P_{app} \pm SD [nm/s]	$497,5 \pm 175,7$			

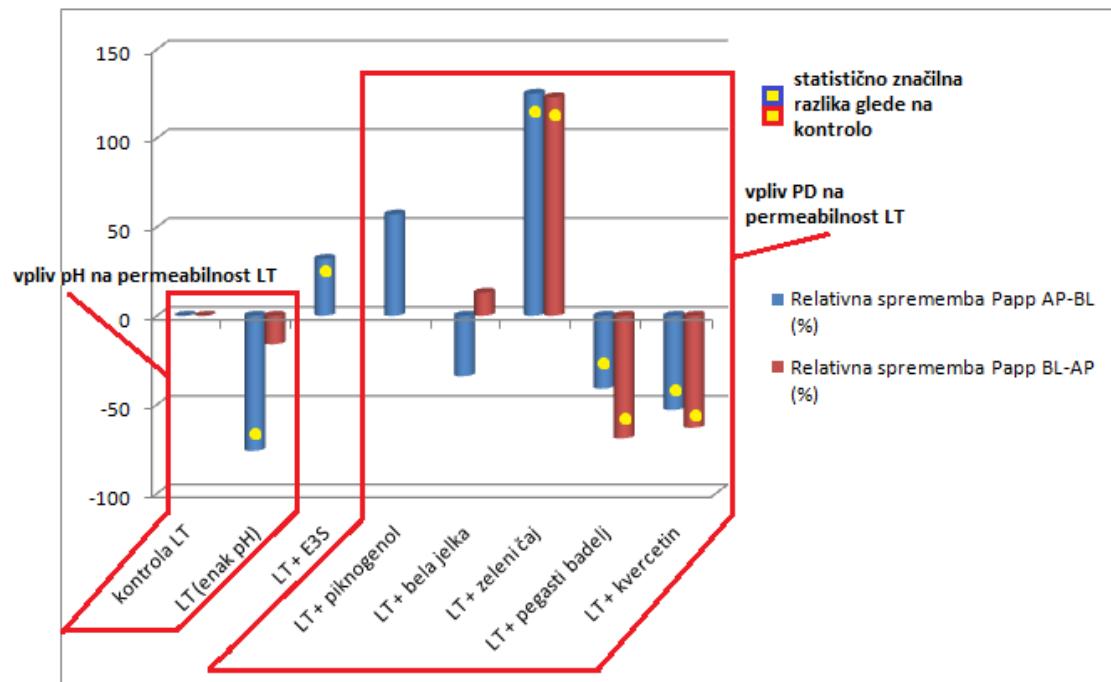
Preglednica XXV: Rezultati poskusov z LT v BL → AP smeri

poskus z LT	vpliv pH		vpliv PD s flavan- 3-oli		vpliv ostalih PD	
	BL 7,4 → AP 6,5 (kontrola)	BL 7,4 → AP 7,4	BL 6,5 → AP 6,5 (dodatek izvlečka bele jelke)	BL 7,4 → AP 6,5 (dodatek izvlečka zelenega čaja)	BL 7,4 → AP 6,5 (dodatek izvlečka pegastega badlja)	BL 6,5 → AP 6,5 (dodatek kvercetina)
povprečni P_{app} [nm/s]	223,2	187,1	252,3	497,5	68,7	82,3
SD P_{app} [nm/s]	56,0	23,3	68,5	175,7	29,8	17,0
KV P_{app} (%)	25,1	12,5	27,2	35,3	43,4	20,7
relativna sprememba P_{app} (%)	0	-16	+13	+123	-69	-63
p (F-test P_{app})	K	0,184 (NS)	0,747 (NS)	0,0921 (NS)	0,328 (NS)	0,0807 (NS)
p (t-test P_{app})	K	0,278 (NS)	0,534 (NS)	0,0248 (S)	0,00278 (S)	0,00294 (S)
povprečna TEER pred [Ω/cm^2]	597,8	601,8	611,0	492,8	617,8	536,5
SD TEER pred [Ω/cm^2]	17,3	17,4	20,0	153,3	10,9	114,7
KV TEER pred (%)	2,9	2,9	3,3	31,1	1,8	21,4
povprečna TEER po [Ω/cm^2]	528,8	511,3	283,8	229,0	483,3	366,8
SD TEER po [Ω/cm^2]	22,5	10,3	57,3	9,02	159,9	141,5
KV TEER po (%)	4,3	2,0	20,2	3,9	33,1	38,6
sprememba TEER (%)	-11,5	-15,0	-53,6	-53,5	-21,8	-31,6
p (t-test TEER)	0,00381 (S)	0,00173 (S)	0,00217 (S)	0,0409 (S)	0,201 (NS)	0,126 (NS)

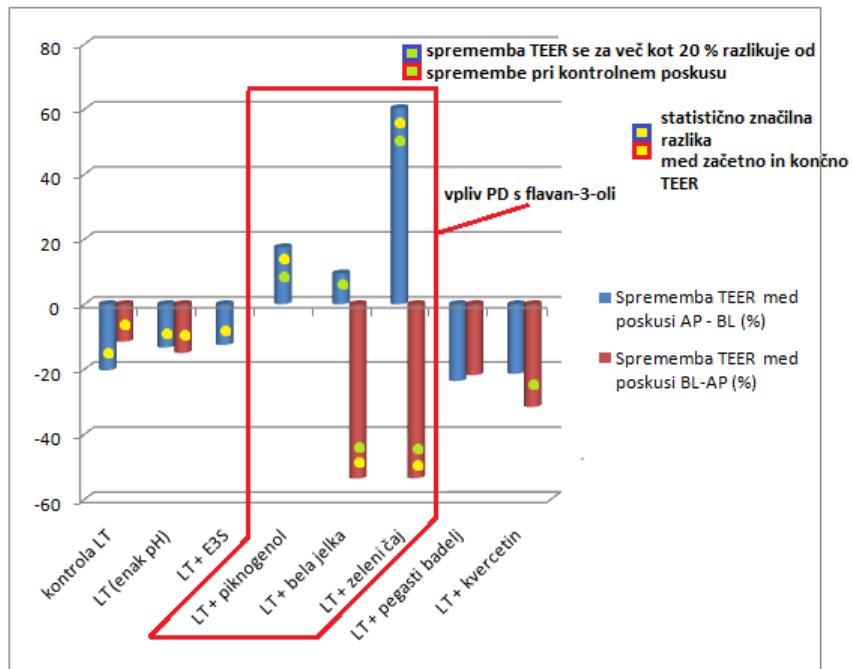
Za izraze v zgornji preglednici glej legendo pri preglednici IX.



Slika 21: P_{app} [nm/s] pri poskusih z LT v obeh smereh



Slika 22: Relativna sprememba P_{app} (v % glede na kontrolo) pri poskusih z LT v obeh smereh



Slika 23: Sprememba TEER (izražena v % TEER pred poskusom) med poskusi z LT v obeh smerih

6. Razprava

6.1. Izraženost sekretornih in absorptivnih prenašalcev

Povprečni sekretorni ($BL \rightarrow AP$) P_{app} za E3S je znašal $3,12 \times 10^{-4}$ cm/s, kar je 66-krat višja vrednost od povprečnega absorptivnega ($AP \rightarrow BL$) P_{app} za E3S, ki je znašal $4,71 \times 10^{-6}$ cm/s (pH pogoji so opisani v preglednicah V in VI). Razlika med obema P_{app} za E3S je signifikantna (S), saj je $p < \alpha$ ($\alpha = 0,05$). Veliko višja sekretorna kot absorptivna permeabilnost E3S je najverjetneje posledica večje izraženosti sekretornih kot absorptivnih prenašalcev v uporabljenih celicah Caco-2. Rezultati poskusov s celicami Caco-2 v sekretorni ($BL \rightarrow AP$) smeri so torej primerni predvsem za vrednotenje interakcij s sekretornimi prenašalci. K višji sekretorni kot absorptivni permeabilnosti E3S je najverjetneje pripomogla tudi visoka afiniteta E3S do sekretornih prenašalcev, saj so sulfati in drugi konjugati tipični substrati za sekretorne prenašalce MRP 2 (13).

Domnevo o visoki izraženosti sekretornih in nizki izraženosti absorptivnih prenašalcev v uporabljenih celicah Caco-2 smo dodatno potrdili s poskusom, kjer smo ugotavljali vpliv DIDS (nespecifični inhibitor absorptivnih in sekretornih prenašalcev) na absorptivno permeabilnost E3S (100). S poskusom z DIDS smo zgolj potrjevali ugotovitve o izraženosti prenašalcev, do katerih smo prišli na osnovi rezultatov poskusov z E3S, zato smo poskus z DIDS izvedli le v absorptivni smeri.

Povprečni absorptivni P_{app} za E3S je ob dodatku DIDS (glej preglednico VIII) znašal $7,43 \times 10^{-6}$ cm/s, brez dodatka DIDS pa je znašal $4,71 \times 10^{-6}$ cm/s. Dodatek DIDS je torej signifikantno (56 % zvišanje, $p < 0,05 \rightarrow S$) povišal absorptivno permeabilnost E3S. Povišanje absorptivne permeabilnosti E3S smo najverjetneje zaznali, ker je inhibitorno delovanje DIDS na višje izražene sekretorne prenašalce prevladalo nad inhibitornim delovanjem te spojine na nižje izražene absorptivne prenašalce. Višja izraženost sekretornih kot absorptivnih prenašalcev v uporabljenih celicah Caco-2 potruje izsledke raziskave Hilgendorfa in sodelavcev (38), v kateri so za celice Caco-2 ugotovili višjo stopnjo izraženosti sekretornih prenašalcev MRP 2 v primerjavi z absorptivnimi prenašalci OATP.

Povprečni sekretorni P_{app} za LT brez dodatkov (ob apikalnem pH 6,5 in bazolateralnem pH 7,4 – glej preglednico XIX) je znašal $2,23 \times 10^{-5}$ cm/s, povprečni absorptivni P_{app} za LT brez dodatkov (preglednica X) pa je znašal $1,35 \times 10^{-5}$ cm/s

(razlika med obema P_{app} je bila signifikantna, $p < 0,05 \rightarrow S$). Te vrednosti P_{app} za LT bomo uporabili kot kontrolne vrednosti, s katerimi bomo primerjali vrednosti P_{app} za LT ob dodatkih prehranskih dopolnil (glej preglednici XVIII in XXV).

Pri poskusu z LT brez dodatkov smo določili nižjo sekretorno in višjo absorptivno permeabilnost kot pri poskusu z E3S v primerljivih pH pogojih, zato je bilo razmerje med sekretornim in absorptivnim P_{app} pri LT ($1,65 : 1$) veliko nižje kot pri E3S ($66,1 : 1$). Nižja sekretorna permeabilnost LT kot E3S je najverjetnejše posledica nižje afinitete LT kot E3S do sekretornih prenašalcev, višja absorptivna permeabilnost LT kot E3S pa je bila najverjetnejše posledica razlik v prispevku pasivne transcelularne difuzije k celotni absorptivni permeabilnosti. Ta prispevek je bil pri LT višji kot pri E3S, saj E3S zaradi svoje polarnosti (sulfatna skupina) težko difundira skozi celične membrane (22, 99).

6.2. Vpliv pH na permeabilnost levotiroksina

Pri apikalni aplikaciji LT (glej preglednici X in XI) je povprečni absorptivni P_{app} za LT ob gradientu pH med apikalno (pH 6,5) in bazolateralno (pH 7,4) stranjo znašal $1,35 \times 10^{-5}$ cm/s, medtem ko je v primeru obojestranskega pH 7,4 znašal $3,18 \times 10^{-6}$ cm/s, kar predstavlja znižanje za 76 % ($p < 0,05 \rightarrow S$). Pri bazolateralni aplikaciji LT (glej preglednici XIX in XX) nismo zaznali značilnega vpliva gradiента pH med bazolateralno in apikalno stranjo na sekretorno permeabilnost LT, saj je povprečni sekretorni P_{app} za LT ob apikalnem pH 6,5 in bazolateralnem pH 7,4 znašal $2,23 \times 10^{-5}$ cm/s, v primeru obojestranskega pH 7,4 pa je znašal $1,87 \times 10^{-5}$ cm/s (16 % znižanje, $p > 0,05 \rightarrow NS =$ nesignifikantno).

Višja absorptivna permeabilnost LT v kislem apikalnem pH je bila najverjetnejše posledica razlik v stopnji ionizacije LT, saj se v molekuli LT nahaja karboksilna skupina s pKa 6,7 (14). Po porazdelitveni teoriji o vplivu pH na permeabilnost (105) se pri nižjih apikalnih pH vrednostih večji odstotek molekul šibkih kislin nahaja v neionizirani obliki, ki se lažje absorbira s pasivno transcelularno difuzijo skozi celično AP membrano. Kisli apikalni pH 6,5 je nižji od pKa vrednosti za karboksilno skupino LT (pKa = 6,7), zato se pri tem pH večina molekul LT nahaja v neionizirani obliki, kar olajšuje njihovo transcelularno difuzijo. Po drugi strani je apikalni pH 7,4 višji od pKa za karboksilno skupino LT, zato se pri tem pH večina molekul LT nahaja v ionizirani obliki, ki težko

difundira skozi celične membrane. V molekuli LT najdemo tudi bazični center (amino skupina) s pKa 2,2 in drugi kisli center (fenolna hidroksilna skupina) s pKa 10,1 (14), vendar sta pKa vrednosti teh dveh skupin daleč od pH vrednosti, pri katerih smo izvajali poskuse (pH 6,5 in 7,4), zato sta se pri omenjenih pH obe skupini praktično v celoti nahajali v neionizirani obliki in nista vplivali na permeabilnost LT.

K povišanju absorptivne permeabilnosti LT ob apikalnem pH 6,5 bi lahko pripomogla tudi višja aktivnost absorptivnih prenašalcev ob nižjem apikalnem pH, kljub nizki izraženosti teh prenašalcev v uporabljenih celicah Caco-2. Po literaturnih podatkih nižji apikalni pH stimulira delovanje absorptivnih prenašalcev OATP, medtem ko je delovanje sekretornih prenašalcev MRP 2 neodvisno od pH (27, 34, 35).

V bazolateralnem pH 7,4 je bila večina molekul LT ioniziranih, kar je v primeru bazolateralne aplikacije LT najverjetneje oviralo transcelularno difuzijo te spojine v sekretorni smeri. Kljub temu smo zaznali veliko višjo sekretorno ($1,87 \times 10^{-5}$ cm/s) kot absorptivno ($3,18 \times 10^{-6}$ cm/s) permeabilnost LT ob obojestranskem pH 7,4. Razmerje med sekretorno in absorptivno permeabilnostjo je znašalo približno 6 : 1, kar najverjetneje kaže na visok prispevek sekretornih prenašalcev k celotni sekretorni permeabilnosti LT, saj je po priporočilih smernic za izvajanje poskusov na celicah Caco-2 več kot dvakrat višja sekretorna kot absorptivna permeabilnost neke spojine indikator za aktivno sekrecijo te spojine s sekretornimi prenašalci (101). Čeprav smo ugotovili, da se je ob pH gradientu med apikalno (pH 6,5) in bazolateralno (pH 7,4) stranjo povišala absorptivna permeabilnost LT (najverjetneje zaradi višje transcellularne difuzije v smeri absorpcije), je bila sekretorna permeabilnost LT ($2,23 \times 10^{-5}$ cm/s) v teh pH pogojih še vedno za približno 65 % višja od absorptivne ($1,35 \times 10^{-5}$ cm/s). To potrjuje ugotovitev o pomembni vlogi sekretornih prenašalcev pri transportu LT v smeri sekrecije.

Zaradi majhnih količin razpoložljive substance smo pri kvercetinu in izvlečku bele jelke pripravili le donorski raztopini s pH 6,5 (glej podoglavlje 4.2.), zato je bil pri BL → AP poskusih s tema dvema PD (preglednici XXI in XXII) tako na bazolateralni kot na apikalni strani pH 6,5 (namesto bazolateralnega pH 7,4 in apikalnega pH 6,5). V tem podoglavlju opisani poskusi z LT brez dodatkov kažejo, da pH gradient med BL in AP stranjo ni značilno vplival na sekretorno permeabilnost LT, prispevek sekretornih prenašalcev (predvsem prenašalcev MRP 2, katerih delovanje je neodvisno od pH) k

celotni sekretorni permeabilnosti LT pa je bil najverjetneje bistveno večji od prispevka pasivne transcelularne difuzije LT, ki je odvisna od pH (zaradi vpliva pH na ionizacijo LT). Odsotnost pH gradienta med bazolateralno in apikalno stranjo pri BL → AP poskusih s kvercetinom in izvlečkom bele jelke torej najverjetneje ni vplivala na sekretorno permeabilnost LT, določeno pri teh poskusih. Zato smo pri F- in t-testu (preglednica XXV) rezultate teh poskusov (ki smo jih izvedli ob obojestranskem pH 6,5) lahko primerjali z rezultati kontrolnega poskusa (LT brez dodatkov, BL pH 7,4 → AP pH 6,5), pri katerem smo imeli pH gradient med bazolateralno in apikalno stranjo.

6.3. Vpliv kvercetina in izvlečka plodov pegastega badlja na permeabilnost levotiroksina

Izvleček plodov pegastega badlja in kvercetin sta v obeh smereh značilno znižala permeabilnost LT. Povprečni absorptivni P_{app} za LT (preglednici XV in XVI) je ob dodatku izvlečka pegastega badlja znašal $7,92 \times 10^{-6}$ cm/s (41 % znižanje glede na kontrolno vrednost $1,35 \times 10^{-5}$ cm/s, $p < 0,05 \rightarrow S$), ob dodatku kvercetina pa je znašal $6,38 \times 10^{-6}$ cm/s (53 % znižanje, $p < 0,05 \rightarrow S$). Znižanje povprečnega absorptivnega P_{app} za LT pri poskusu s kvercetinom (53 % glede na kontrolo) predstavlja največje znižanje absorptivne permeabilnosti LT pri poskusih s PD, vendar visok koeficient variabilnosti P_{app} (50,2 %) zmanjšuje pomen tega znižanja (ob dodatku kvercetina so bili P_{app} pri posameznih celičnih monoslojih v razponu od $3,04 \times 10^{-6}$ cm/s do $9,41 \times 10^{-6}$ cm/s).

Povprečni sekretorni P_{app} za LT (preglednici XXII in XXIII) je ob dodatku izvlečka pegastega badlja znašal $6,87 \times 10^{-6}$ cm/s (69 % znižanje glede na kontrolno vrednost $2,23 \times 10^{-5}$ cm/s, $p < 0,05 \rightarrow S$), ob dodatku kvercetina pa je znašal $8,23 \times 10^{-6}$ cm/s (63 % znižanje, $p < 0,05 \rightarrow S$). Znižanje povprečnega sekretornega P_{app} za LT pri poskusu z izvlečkom pegastega badlja predstavlja največje znižanje sekretorne permeabilnosti LT pri poskusih s PD, vendar smo tudi v tem primeru zaznali visok koeficient variabilnosti P_{app} (43,4 %; vrednosti P_{app} pri posameznih celičnih monoslojih so se gibale med $5,73 \times 10^{-6}$ cm/s in $1,11 \times 10^{-5}$ cm/s).

Kvercetin in poglavitna sestavina izvlečka pegastega badlja silimarin sta najverjetneje inhibirala sekretorne in absorptivne prenašalce za LT. Njuno inhibitorno delovanje na sekretorne prenašalce smo zaznali predvsem v primeru bazolateralne aplikacije (poskusi BL → AP). Ob apikalni aplikaciji (poskusi AP → BL) molekule flavonoidov zaradi svoje

velikosti in polarnosti najverjetneje niso potovale skozi apikalno membrano v notranjost celic Caco-2 v obsegu, ki bi lahko občutno moduliral (inhibiral ali stimuliral) delovanje sekretornih prenašalcev za LT (ki imajo vezavna mesta na citoplazemski strani apikalne membrane), ob BL aplikaciji pa so najverjetneje lažje potovale v celično notranjost (zaradi večje prepustnosti bazolateralne membrane v primerjavi z apikalno) in tam modulirale delovanje sekretornih prenašalcev (24, 64, 66, 72, 106). Nižja prepustnost apikalne kot bazolateralne membrane celic Caco-2 je bila najverjetneje posledica razlik v fluidnosti in vsebnosti lipidov med posameznimi področji apikalne membrane. Luminalna stran apikalne membrane vsebuje večji delež sfingomielina in glikosfingolipidov kot citoplazemska stran, zato je fluidnost na luminalni strani nižja kot na citoplazemski, neenakomerna membranska fluidnost pa znižuje transmembransko permeabilnost flavonoidov in drugih topljencev (107). Visoka koeficiente variabilnosti P_{app} pri AP → BL poskusu s kvercetinom in BL → AP poskusu z izvlečkom pegastega badlja sta bila najverjetneje posledica variabilnega privzema flavonoidov v notranjost celic Caco-2.

Kvercetin in silimarín bi lahko ob AP aplikaciji inhibirala absorptivne prenašalce za LT, ki imajo svoja vezavna mesta na apikalni strani celic Caco-2 (26), zato za kompetitivno inhibicijo teh prenašalcev ni potreben privzem flavonoidov v celično notranjost. Ker smo pri poskusih z E3S ugotovili nizko izraženost absorptivnih prenašalcev v uporabljenih celicah Caco-2 (glej podpoglavlje 6.1.), inhibicija absorptivnih prenašalcev najverjetneje ni bila poglaviti vzrok za znižanje absorptivne permeabilnosti.

Najverjetnejši vzrok za znižanje absorptivne permeabilnosti LT ob dodatkih kvercetina in silimaria je bilo znižanje pasivne transcelularne difuzije neioniziranih molekul LT zaradi vplivov kvercetina in silimaria na fluidnost apikalne membrane celic Caco-2. Pasivna transcelularna difuzija omogoča permeabilnost topljencev v absorptivni in sekretorni smeri tudi ob odsotnosti prenašalcev in ionskih kanalov (107). Prispevek pasivne transcelularne difuzije k celotni permeabilnosti LT je bil najverjetneje višji v absorptivni kot sekretorni smeri zaradi nižje izraženosti absorptivnih kot sekretornih prenašalcev za LT (glej podpoglavlje 6.1.) in višje ionizacije molekul LT pri bazolateralnem pH 7,4, ki ovira transcelularno difuzijo te spojine v sekretorni smeri (glej podpoglavlje 6.2.). Razlike v ionizaciji LT niso vplivale na transcelularno difuzijo pri BL

→ AP poskusih s kvercetinom in izvlečkom bele jelke, saj smo imeli pri teh poskusih obojestranski pH 6,5 (glej preglednici XXI in XXII).

Molekule flavonoidov se lahko vgradijo v apikalno membrano celic Caco-2 in tam vstopajo v interakcije s holesterolom, kar povzroči spremembo membranske fluidnosti (108). Zaradi fluidnosti v fosfolipidnem dvosloju prehodno nastajajo majhne z vodo napolnjene odprtine, ki omogočajo pasivno difuzijo neioniziranih topljencev skozi fosfolipidni dvosloj. Takšne odprtine najtežje nastajajo v področjih fosfolipidnega dvosloja, kjer se hidrofobne verige ogljikovodikov stikajo s hidrofilnimi fosfatnimi skupinami, zato je na teh področjih fluidnost najnižja. Področja z nizko fluidnostjo predstavljajo največjo bariero za pasivno transmembransko difuzijo, zato je fluidnost teh področij omejitveni dejavnik za difuzijsko hitrost. Ob zmanjšanju fluidnosti celotnega fosfolipidnega dvosloja je na področjih dvosloja z nizko fluidnostjo (področja ob stiku hidrofobnih verig s hidrofilnimi fosfatnimi skupinami) dodatno otežena tvorba vodnih odprtin, zato pride do znižanja pasivne difuzije neioniziranih topljencev skozi membrano. Ob povečanju fluidnosti celotnega fosfolipidnega dvosloja pa se tudi na kritičnih področjih z nizko fluidnostjo poveča tvorba odprtin, ki omogočajo difuzijo skozi membrano, zato pride do zvišanja pasivne difuzije neioniziranih topljencev (107).

Kvercetin lahko vstopa v interakcije s holesterolom, ki se nahaja v hidrofobnem jedru fosfolipidnega dvosloja. Posledica je znižanje fluidnosti v celotnem dvosloju, najbolj pa v njegovem hidrofobnem jedru, zato je ovirana transmembranska difuzija LT. Otežena je tudi transmembranska difuzija prostih radikalov, med katero radikali oksidirajo membranske lipide, zato ima znižanje membranske fluidnosti tudi antioksidativne učinke (108). S podobnim mehanizmom lahko pojasnimo tudi delovanje silimarina, saj je ob aplikaciji silimarina zmanjšano delovanje substanc (kot je npr. fenilhidrazin), ki povečujejo membransko fluidnost in s tem omogočajo lipidno peroksidacijo (109).

6.4. Vpliv izvlečka listov zelenega čaja na permeabilnost levotiroksina

Izvleček listov zelenega čaja je v obeh smereh signifikantno zvišal permeabilnost LT (glej preglednici XVII in XXIV). Povprečni absorptivni P_{app} za LT je znašal $3,04 \times 10^{-5}$ cm/s (125 % povišanje glede na kontrolno vrednost $1,35 \times 10^{-5}$ cm/s, $p < 0,05 \rightarrow S$),

povprečni sekretorni P_{app} pa je znašal $4,98 \times 10^{-5}$ cm/s (123 % povišanje glede na kontrolno vrednost $2,23 \times 10^{-5}$ cm/s, $p < 0,05 \rightarrow S$).

Monomerni flavan-3-oli, ki so poglavite sestavine izvlečka zelenega čaja (74), so v primeru bazolateralne aplikacije PD najverjetnejše stimulirali sekretorne prenašalce za LT (privzem bazolateralno apliciranih flavonoidov v celično notranjost, kjer so vezavna mesta sekretornih prenašalcev, je najverjetnejše višji kot privzem apikalno apliciranih – glej podpoglavlje 6.3.). Najverjetnejši mehanizem delovanja flavan-3-olov na sekretorne prenašalce je bila alosterična stimulacija. Na posameznem sekretornem prenašalcu obstaja več vezavnih mest za njegove substrate (npr. pri prenašalcih MRP 2 poznamo vezavni mesti D in G). Vezava enega od substratov (flavonoidi) lahko alosterično modificira strukturo sekretornega prenašalca in tako povzroči povečano sekrecijo drugega substrata (LT) preko vezave na drugo vezavno mesto. V primeru takšne alosterične modifikacije sekretornih prenašalcev sekrecija LT narašča ob zviševanju koncentracije flavonoidnih substratov, vendar le do določene mejne koncentracije. Ko je mejna koncentracija presežena, pričnejo presežne molekule flavonoidov nespecifično izpodravati LT z drugih vezavnih mest na istem prenašalcu, kar povzroči kompetitivno inhibicijo sekrecije LT, ki jo zaznamo kot znižanje sekretorne permeabilnosti LT (110).

Znižanje sekretorne permeabilnosti LT ob dodatkih kvercetina in izvlečka pegastega badlja je najverjetnejše bila posledica inhibicije sekretornih prenašalcev za LT zaradi preseženih mejnih koncentracij kvercetina in silimarina (glej podpoglavlje 6.3.), ob dodatku izvlečka zelenega čaja pa koncentracija monomernih flavan-3-olov najverjetnejše ni dosegla mejne vrednosti, zato so flavonoidi stimulirali sekretorne prenašalce za LT, kar smo zaznali kot povišanje BL → AP permeabilnosti LT.

Monomerni flavan-3-oli bi lahko ob apikalni aplikaciji stimulirali absorptivne prenašalce OATP. V literaturi (24) je opisano stimulatorno delovanje EGCG (monomerni flavan-3-ol) na privzem E3S preko prenašalcev OATP 1B3, ki so skupaj s prenašalci OATP 1B1 sicer specifični za hepatocite, vendar se po podatkih raziskave Hilgendorfa in sodelavcev (38) v manjši meri izražajo tudi v celicah Caco-2. Delovanje flavonoidov na absorptivne prenašalce OATP je substratno specifično (24), torej je inhibicija ali stimulacija teh prenašalcev odvisna od kombinacije dodanih substratov (LT in flavonoidi). S substratno specifičnostjo delovanja flavonoidov na prenašalce OATP bi

lahko pojasnili po eni strani znižanje absorptivne permeabilnosti LT ob dodatkih kvercetina in silimarina (glej podpoglavlje 6.3.), po drugi strani pa zvišanje absorptivne permeabilnosti LT ob dodatku monomernih flavan-3-olov. Kljub temu delovanje flavan-3-olov na absorptivne prenašalce najverjetneje ni bilo poglavitni vzrok za spremembe absorptivne permeabilnosti LT ob dodatku izvlečka zelenega čaja, saj so bili v uporabljenih celicah Caco-2 absorptivni prenašalci nizko izraženi (glej podpoglavlje 6.1.).

Najverjetnejši vzrok za povišanje absorptivne permeabilnosti LT je bila spremenjena membranska fluidnost zaradi delovanja monomernih flavan-3-olov na apikalno membrano celic Caco-2. Monomerni flavan-3-oli (predvsem EGCG) najverjetneje zvišujejo membransko fluidnost, saj so v raziskavah značilno zavrli delovanje ultravijoličnih žarkov B in natrijevega oksalata, ki povzročajo izgubo membranske fluidnosti (111, 112). Posledica višje membranske fluidnosti je bilo obojesmerno zvišanje pasivne transcelularne difuzije LT. Zaradi visoke izraženosti sekretornih prenašalcev in nizke izraženosti absorptivnih prenašalcev v uporabljenih celicah Caco-2 (glej podpoglavlje 6.1.) so imele spremembe pasivne transcelularne difuzije najverjetneje večji vpliv na celotno absorptivno kot na celotno sekretorno permeabilnost LT.

6.5. Vpliv piknogenola in izvlečka lubja bele jelke na permeabilnost levotiroksina

Ostali dve PD s flavan-3-oli, piknogenol in izvleček lubja bele jelke, nista značilno vplivali na permeabilnost LT (glej preglednice XIII, XIV in XVI). Povprečni absorptivni P_{app} za LT ob dodatku izvlečka bele jelke je znašal $8,86 \times 10^{-6}$ cm/s (34 % znižanje glede na kontrolno vrednost $1,35 \times 10^{-5}$ cm/s, $p > 0,05 \rightarrow \text{NS}$), ob dodatku piknogenola pa je znašal $2,12 \times 10^{-5}$ cm/s (57 % zvišanje, vendar $p > 0,05 \rightarrow \text{NS}$). Povprečni sekretorni P_{app} za LT ob dodatku izvlečka bele jelke je znašal $2,52 \times 10^{-5}$ cm/s (13 % zvišanje, $p > 0,05 \rightarrow \text{NS}$). Pri piknogenolu nismo določili sekretornega P_{app} zaradi omejenega števila monoslojev celic Caco-2, ki smo jih imeli na voljo za poskuse.

Sestavi piknogenola in izvlečka bele jelke sta bolj heterogeni kot pri izvlečku zelenega čaja. Poglavitno sestavino piknogenola in izvlečka bele jelke predstavljajo oligomerni proantocianidini, manjši delež pa predstavljajo monomerni flavan-3-oli, ki so sicer poglavitna sestavina izvlečka zelenega čaja (74, 82, 88). Za razliko od monomernih flavan-3-olov, ki najverjetneje zvišujejo membransko fluidnost in posledično zvišujejo

permeabilnost LT (111, 112), oligomerni proantocianidini najverjetneje znižujejo membransko fluidnost, kar povzroča znižanje permeabilnosti LT (113). Ker so sestavine piknogenola in izvlečka bele jelke najverjetneje imele nasprotujoči učinek na permeabilnost LT, signifikantnega vpliva teh dveh PD na P_{app} za LT nismo zaznali.

Monomerni flavan-3-oli in oligomerni proantocianidini so se najverjetneje razlikovali tudi po svojem delovanju na sekretorne prenašalce za LT. V primerjavi z monomernimi flavan-3-oli imajo proantocianidini višjo molekulsko maso, zato je njihova permeabilnost nižja kot pri monomernih flavan-3-olih (66, 72). Nižja permeabilnost pomeni nižji privzem v celično notranjost, kjer so vezavna mesta sekretornih prenašalcev, ki zaradi svoje visoke izraženosti predstavljajo poglavito pot sekrecije LT pri uporabljenih celicah Caco-2 (glej podpoglavlji 6.1. in 6.3.). Posledično je bil vpliv proantocianidinov na sekretorno permeabilnost LT najverjetneje manjši od vpliva monomernih flavan-3-olov.

6.6. Vpliv prehranskih dopolnil na transepiteljsko električno upornost

Pri poskusih z LT brez dodatkov se je med poskusom v absorptivni smeri povprečna TEER monoslojev celic Caco-2 znižala za 20 % ($p < 0,05 \rightarrow S$), med poskusom v sekretorni smeri pa se je znižala za 11,5 % ($p < 0,05 \rightarrow S$). Med poskusi s kvercetinom in izvlečkom pegastega badlja smo izmerili podobne spremembe TEER kot pri poskusih z LT brez dodatka. Pri kvercetinu se je med poskusom v absorptivni smeri povprečna TEER znižala za 21,4 % ($p > 0,05 \rightarrow NS$), med poskusom v sekretorni smeri pa se je znižala za 31,6 % ($p > 0,05 \rightarrow NS$). Pri izvlečku pegastega badlja se je med poskusi v absorptivni smeri povprečna TEER znižala za 23,6 % ($p > 0,05 \rightarrow NS$), med poskusi v sekretorni smeri pa se je znižala za 21,8 % ($p > 0,05 \rightarrow NS$). Znižanje TEER pri poskusu s kvercetinom v sekretorni smeri (-31,6 %) je bilo sicer više od tistega pri poskusu z LT brez dodatkov v sekretorni smeri (-11,5 %), vendar ni bilo tako izrazito kot pri poskusih z izvlečkoma zelenega čaja in bele jelke (-53,5 % oziroma -53,6 %). Do znižanja TEER med poskusi s kvercetinom in izvlečkom pegastega badlja je torej najverjetneje prišlo zaradi vpliva LT in ne zaradi flavonoidov.

Pri izvlečku zelenega čaja se je med poskusom v absorptivni smeri povprečna TEER zvišala za 60,3 % ($p < 0,05 \rightarrow S$), med poskusom v sekretorni smeri pa se je znižala za

53,5 % ($p < 0,05 \rightarrow S$). Pri izvlečku bele jelke se je med poskusom v absorptivni smeri povprečna TEER zvišala za 9,5 % ($p > 0,05 \rightarrow NS$), med poskusom v sekretorni smeri pa se je znižala za 53,6 % ($p < 0,05 \rightarrow S$). Pri poskusih v sekretorni smeri z zelenim čajem in izvlečkom bele jelke (glej preglednici XXI in XXIV), kjer smo zaznali izrazito znižanje TEER med poskusom, smo pri nekaterih monoslojih opazili spremembe, ki bi lahko bile znak celičnih poškodb, vendar se je TEER znižala tudi pri ostalih monoslojih, zato celične poškodbe najverjetneje niso bile vzrok za znižanje TEER. Pri piknogenolu (kjer smo izvedli samo poskus v absorptivni smeri) se je med poskusom v absorptivni smeri povprečna TEER zvišala za 17,5 % ($p < 0,05 \rightarrow S$).

Poškodbe celic Caco-2 med gojenjem, shranjevanjem in izvajanjem poskusov lahko porušijo integriteto tesnih stikov med celicami, kar olajša paracelularno difuzijo učinkovin. Poškodovane celice imajo praviloma nižjo TEER, ki predstavlja upornost paracelularne difuzije ter jo uporabljamo kot kazalec vitalnosti celic Caco-2 in integritete tesnih stikov med njimi (37, 99). Celične poškodbe niso edini dejavnik, ki lahko vpliva na TEER. Znižanje ali zvišanje TEER je lahko tudi posledica delovanja spojin, ki z vezavo na ustrezne receptorje vplivajo na elektrogene ionske kanale v membranah celic Caco-2 ali povečajo oziroma zmanjšajo prepustnost tesnih stikov med celicami Caco-2 celicami (114). Pri povečanju prepustnosti tesnih stikov se TEER zniža, pri zmanjšanju prepustnosti pa zviša.

Bazolateralno aplicirana PD s flavan-3-oli (izvleček zelenega čaja in izvleček bele jelke; pri piknogenolu nismo izvedli poskusa v sekretorni smeri) so med poskusi v sekretorni smeri močno znižala TEER, apikalno aplicirana PD s flavan-3-oli (izvleček zelenega čaja, izvleček bele jelke in piknogenol) pa med poskusi v absorptivni smeri niso imela takšnega učinka na TEER (pri zelenem čaju smo med poskusom v absorptivni smeri celo zaznali izrazito povišanje TEER). Močno znižanje TEER med poskusi v sekretorni smeri je bilo najverjetneje posledica delovanja bazolateralno apliciranih flavan-3-olov na tesne stike ali ionske kanale. Odsotnost znižanja TEER ob apikalni aplikaciji flavan-3-olov je bila najverjetneje posledica v splošnem manjše prepustnosti tesnih stikov v absorptivni kot sekretorni smeri ali oteženega dostopa flavan-3-olov do tesnih stikov z apikalne strani. V ozadju bi lahko bil tudi obrambni odziv rakavih celic Caco-2, saj flavan-3-oli sodijo med polifenolne spojine, ki zavirajo nekontrolirane celične

delitve (108). Rakavo spremenjene črevesne celice običajno prihajajo v stik s takšnimi spojinami na svoji AP strani, zato bi se lahko ob AP aplikaciji PD aktivirali mehanizmi, ki zmanjšajo prepustnost tesnih stikov in omejijo možnost paracelularne difuzije teh spojin v celice (114).

Odprtje tesnih stikov med celicami Caco-2 zaradi delovanja flavan-3-olov bi moralo povzročiti zvišanje P_{app} za LT zaradi povečanega obsega paracelularne difuzije LT skozi odprte tesne stike. Po drugi strani bi zmanjšanje prepustnosti tesnih stikov moralo znižati P_{app} za LT, saj bi bila paracelularna difuzija LT skozi tesne stike otežena. Kljub temu pri naših poskusih nismo opazili povezave med spremembami permeabilnosti LT in spremembami TEER ob dodatkih PD s flavan-3-oli. V sekretorni smeri sta izvlečka zelenega čaja in bele jelke značilno znižala TEER, značilno povečano permeabilnost LT pa smo zaznali le pri zelenem čaju, v absorptivni smeri pa sta piknogenol in izvleček zelenega čaja značilno zvišala TEER, vendar nista signifikantno znižala P_{app} za LT (izvleček zelenega čaja je celo signifikantno povišal absorptivni P_{app} za LT).

Odsotnost enoznačnih povezav med spremembami TEER celic Caco-2 in spremembami P_{app} za LT ob dodatkih PD s flavan-3-oli lahko pojasnimo na dva načina. Po prvi razlogi flavan-3-oli niso vplivali na integriteto tesnih stikov med celicami Caco-2, ampak so spremembe TEER bile posledica delovanja flavan-3-olov na elektrogene ionske kanale v membranah celic Caco-2. V tem primeru bi integriteta tesnih stikov med celicami ostala nespremenjena, zato sprememba TEER ne bi vplivala na obseg paracelularne difuzije in posledično na P_{app} za LT. Po drugi razlogi je bil prispevek paracelularne difuzije LT skozi tesne stike k celotni absorptivni in sekretorni permeabilnosti LT tako nizek, da spremembe paracelularne difuzije zaradi delovanja flavan-3-olov na tesne stike niso imele signifikantnega vpliva na celotno permeabilnost LT.

6.7. Pomen vpliva prehranskih dopolnil na permeabilnost levotiroksina

Signifikantna sprememba intestinalne permeabilnosti LT ne povzroči vedno signifikantne spremembe biološke uporabnosti LT, saj slednja ni odvisna le od permeabilnosti, ampak tudi od drugih farmakokinetičnih procesov (sproščanje iz farmacevtske oblike, topnost v črevesnem soku, metabolizem, distribucija, hitrost

eliminacije). Flavonoidi ne vplivajo le na črevesno absorpcijo LT, ampak tudi na njegovo distribucijo (z izrivanjem LT s plazemskih proteinov), metabolizem (z zaviranjem dejodaz, sulfotransferaz in glukuroniltransferaz, ki presnavljajo LT) in eliminacijo (z moduliranjem delovanja črevesnih sekretornih prenašalcev in encimov, ki presnavljajo LT) (7, 13, 90, 96, 98). Zato je vpliv flavonoidov na farmakokinetiko LT vsota vplivov na posamezne farmakokinetične procese, ki se lahko medsebojno dopolnjujejo (npr. zaviranje sekretornih prenašalcev je v sinergiji z zaviranjem metabolnih encimov, saj oboje povečuje biološko uporabnost) ali izničujejo (npr. zaviranje absorptivnih prenašalcev zmanjšuje biološko uporabnost, zaviranje metabolnih encimov pa jo povečuje).

Kljub nizki biološki uporabnosti flavonoidov se majhen delež teh spojin po peroralni aplikaciji absorbira in se nato presnovi do metabolitov, ki jih lahko zaznamo v plazmi (66, 72). Metaboliti flavonoidov so običajno neaktivni in ne vplivajo na farmakokinetiko LT, vendar lahko pri presnovi flavonoidov nastanejo aktivni metaboliti s podobnim delovanjem kot nemetabolizirani flavonoidi (72). Kljub temu je zaradi izgub med absorpcijo skupna plazemska koncentracija intaktnih flavonoidov in njihovih aktivnih presnovkov najverjetneje veliko nižja od lokalne koncentracije v črevesnem soku, ki jo dosežemo z zaužitjem enkratnega priporočenega odmerka PD, ki vsebuje flavonoide (31, 66, 72). Zato je vpliv flavonoidov na intestinalno absorpcijo LT najverjetneje močnejši kot na druge farmakokinetične procese.

Zaradi svoje nizke permeabilnosti (66, 72) bi flavonoidi (v intaktni obliki ali kot aktivni presnovki) v fizioloških razmerah na BL strani enterocitov težko dosegli tako visoke koncentracije kot v donorskih raztopinah za BL → AP poskuse s celicami Caco-2. Prav tako je izraženost sekretornih prenašalcev v normalnih človeških enterocitih verjetno nižja kot v uporabljenih celicah Caco-2 (38), torej je nižji tudi prispevek teh prenašalcev k celotni sekretorni permeabilnosti LT. Zato je malo verjetno, da bi flavonoidi iz peroralno apliciranih PD (predvsem tisti, ki vplivajo na sekretorne prenašalce) v *in vivo* pogojih podobno vplivali na permeabilnost LT kot pri BL → AP poskusih s celicami Caco-2.

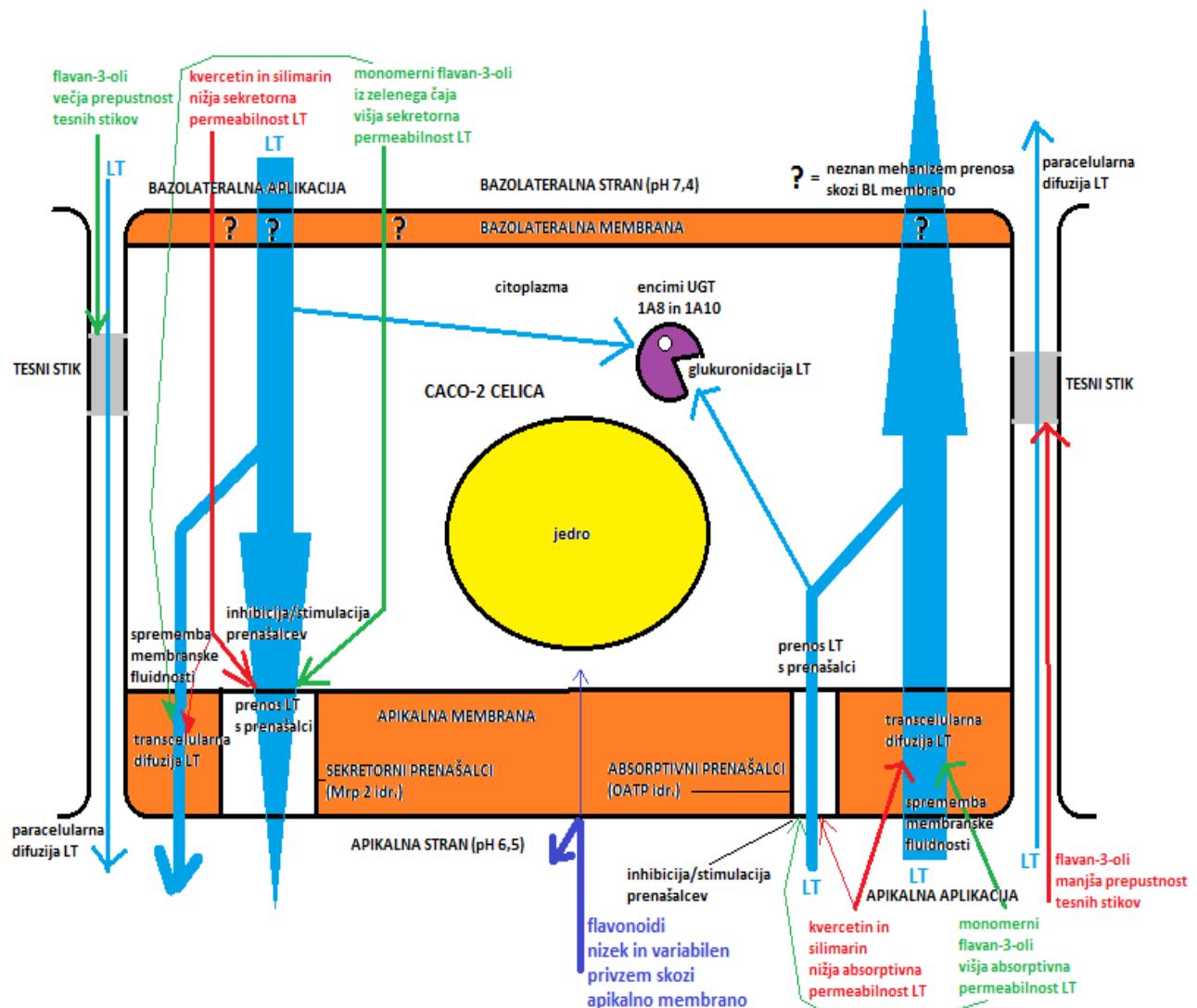
Večji klinični pomen imajo torej poskusi v AP → BL smeri, ki ponazarja fiziološko pot absorpcije zaužitih hranil in zdravil. V primeru sočasnega zaužitja pripravka z LT in

PD, ki vsebuje flavonoide, bi lahko flavonoidi dosegli visoke intraluminalne koncentracije, ki bi vplivale na intestinalno permeabilnost LT (31). V *in vivo* pogojih bi lahko flavonoidi vplivali na pasivno transcelularno difuzijo LT skozi enterocite, paracelularno difuzijo LT skozi tesne stike med enterociti in prenos LT z intestinalnimi absorptivnimi prenašalci. Ker je LT spojina z nizkimi terapevtskimi koncentracijami in ozkim terapevtskim oknom (5, 18), bi lahko bile klinično pomembne tudi spremembe permeabilnosti LT v obsegu, kot smo ga zaznali pri AP → BL poskusih s celicami Caco-2. Pri pacientih bi takšne spremembe lahko povzročile stanji hipotiroze (v primeru znižane absorptivne permeabilnosti LT) ali hipertiroze (v primeru zvišane absorptivne permeabilnosti LT), zato ne priporočamo sočasnega uživanja LT in PD, ki vsebujejo flavonoide.

6.8. Nadaljnje raziskave

Pri preučevanju vpliva PD na farmakokinetiko LT bi morali izvesti poskuse še na drugih *in vitro* modelih (npr. na izoliranem podganjem jejunumu ali drugih vrstah celičnih kultur) in primerjati rezultate pri teh modelih z rezultati poskusov s celicami Caco-2. Kot model za poskuse bi lahko uporabili transformirane celične linije, ki izražajo samo določen tip ali podtip človeških prenašalnih proteinov, npr. OATP 1A2 ali MRP 2. Iz rezultatov teh poskusov bi dobili jasnejšo sliko, kako so posamezni tipi in podtipi prenašalcev udeleženi pri transportu LT in kakšen je vpliv flavonoidov na ta transport. Končni sklep o kliničnem pomenu vpliva flavonoidov na farmakokinetiko LT bi lahko naredili šele po opravljenih *in vivo* raziskavah.

Iz PD bi morali izolirati posamezne flavonoide in preučiti njihove vplive na pasivno transcelularno difuzijo LT ter na posamezne tipe intestinalnih absorptivnih in sekretornih prenašalcev, ki prenašajo LT. Preveriti bi morali hipotezo, da nizke koncentracije flavonoidov alosterično stimulirajo prenašalce MRP 2 in druge sekretorne prenašalce, visoke koncentracije pa jih kompetitivno inhibirajo. Prav tako bi morali preveriti hipotezi, da flavan-3-oli vplivajo na prepustnost tesnih stikov med celicami Caco-2 ter da posamezne sestavine piknogenola in izvlečka bele jelke nasprotujejoče učinkujejo na permeabilnost LT.



Slika 24: Shematski prikaz razlage rezultatov poskusov s celicami Caco-2. Svetlo modre puščice ponazarjajo transport LT. Rdeče puščice ponazarjajo inhibicijo, zelene pa stimulacijo transporta LT. Debelina puščic je v sorazmerju s pomembnostjo procesov.

7. Sklep

V diplomski nalogi smo ovrednotili vpliv petih PD, ki vsebujejo flavonoide, na permeabilnost LT. Pknogenol in izvleček bele jelke nista v nobeni smeri spremenila permeabilnosti LT. Ob bazolateralni aplikaciji PD so kvercetin in flavonoidi iz izvlečka pegastega badlja (silimarín) značilno znižali sekretorno permeabilnost LT, najverjetneje zaradi kompetitivne inhibicije sekretornih prenašalcev v celicah Caco-2 (predvsem prenašalcev MRP 2), flavonoidi iz izvlečka zelenega čaja (flavan-3-oli) pa so značilno zvišali sekretorno permeabilnost LT, najverjetneje zaradi alosterične stimulacije sekretornih prenašalcev. Apikalno aplicirana prehranska dopolnila so manj vplivala na sekretorne prenašalce kot bazolateralno aplicirana, najverjetneje zaradi nižje prepustnosti apikalne kot bazolateralne membrane za flavonoide iz PD. Večja prepustnost bazolateralne membrane omogoča lažji privzem bazolateralno apliciranih flavonoidov v notranjost celic Caco-2, kjer se nahajajo vezavna mesta sekretornih prenašalcev.

V primeru apikalne aplikacije PD sta kvercetin in izvleček pegastega badlja značilno znižala absorptivno permeabilnost LT, izvleček zelenega čaja pa jo je značilno povišal. Flavonoidi iz teh PD so najverjetneje spremenili absorptivno permeabilnost LT zaradi svojega delovanja na fluidnost apikalne membrane celic Caco-2, ki vpliva na transcelularno pasivno difuzijo LT. Zaradi visoke izraženosti sekretornih prenašalcev in nizke izraženosti absorptivnih prenašalcev v uporabljenih celicah Caco-2 so imele spremembe pasivne transcelularne difuzije najverjetneje večji vpliv na celotno absorptivno kot na celotno sekretorno permeabilnost LT.

Ob zaužitju najvišjih enkratnih odmerkov prehranskih dopolnil, ki vsebujejo flavonoide, lahko flavonoidi dosežejo visoke intraluminalne koncentracije. V primeru sočasnega zaužitja takšnega prehranskega dopolnila in pripravka z LT bi lahko prišlo do sprememb absorpcije LT iz prebavil zaradi vpliva flavonoidov na intestinalno permeabilnost te spojine.

8. Seznam virov

1. Trontelj J. Interakcije zdravil za bolezni ščitnice z drugimi zdravili. Farmacevtski vestnik 2007; 58(3): 106–12.
2. Živin M, Ribarič S (ur.) Temelji patološke fiziologije. Medicinska fakulteta Univerze v Ljubljani, Ljubljana, 2009: 253–61.
3. Pirnat E. Zdravljenje z radiojodom. Farmacevtski vestnik 2007; 58(3): 100–2.
4. Gaberšček S, Zaletel K. Kako prepoznati ščitnično bolezen? Farmacevtski vestnik 2007; 58(3): 97–9.
5. Sočan A, Gmeiner Stopar T, Hojker S. Farmakoterapija bolezni ščitnice. Farmacevtski vestnik 2007; 58(3): 103–5.
6. Rang HP, Dale MM, Ritter JM, Flower RJ: Rang and Dale's Pharmacology, sixth edition. Elsevier, London, 2007: 437–44.
7. Hamann I, Seidlova-Wuttke D, Wuttke W, Köhrle J. Effects of isoflavonoids and other plant-derived compounds on the hypothalamus–pituitary–thyroid hormone axis. Maturitas – The European Menopause Journal. 2006; 55S: S14–S25.
8. Köhrle J. Local activation and inactivation of thyroid hormones: the deiodinase family. Molecular and Cellular Endocrinology. 1999; 151: 103–19.
9. Tong Z, Li HS, Goljer I, McConnell O, Chandrasekaran A. In vitro Glucuronidation of Thyroxine and Triiodothyronine by Liver Microsomes and Recombinant Human UDP-Glucuronosyl Transferases. Drug Metabolism and Disposition. 2007; 35(12): 2203–10.
10. Yamanaka H, Nakajima M, Katoh M, Yokoi T. Glucuronidation of thyroxine in human liver, jejunum, and kidney microsomes. Drug Metabolism and Disposition. 2007; 35(9): 1642–8.
11. Lindsey J, Wang LL, Li Y, Zhou SF. Structure, Function and Polymorphism of Human Cytosolic Sulfotransferases. Current Drug Metabolism. 2008; 9: 99–105.
12. Visser TJ, Kaptein E, Glatt H, Bartsch I, Hagen M, Coughtrie MWH. Characterization of thyroid hormone sulfotransferases. Chemico-Biological Interactions. 1998; 109(1-3): 279–91.
13. Lecureux L, Dieter MZ, Nelson DM, Watson L, Wong H, Gemzik B, Klaasen CD, Lehman-McKeeman LD. Hepatobiliary Disposition of Thyroid Hormone in Mrp2-Deficient TR- rats: Reduced Biliary Excretion of Thyroxine-Glucuronide does not Prevent Xenobiotic-Induced Hypothyroidism. Toxicological Sciences. 2009; 108(2): 482–91.
14. Pierres C, Gangain-Hamidi A. Concentrated Liquid Thyroid Hormone Composition. United States Patent, številka patenta 2009/0270507 A1, datum patenta 29. 10. 2009.
15. Kasim NA, Whitehouse M, Ramachandran C, Bermejo M, Lennernäs H, Hussain AS, Junginger HE, Stavchansky SA, Midha KK, Shah VP, Amidon GL. Molecular Properties of WHO Essential Drugs and Provisional Biopharmaceutical Classification. Molecular Pharmaceutics. 2004; 1(1): 85–96.
16. Povzetek glavnih značilnosti zdravila - Eltroxin 50 mcg tablete. ASPEN EUROPE GmbH, Bad Oldesloe, 2010.
17. Povzetek glavnih značilnosti zdravila - Euthyrox tablete 25 mcg, 50 mcg, 100 mg, 150 mcg. Merck, d.o.o., Ljubljana, 2009.

18. Henderson JD, Esham RH. Generic Substitution: Issues for Problematic Drugs. *Current Concepts*. 2001; 94(1): 16–21.
19. Campbell NRC, Hasinoff BB, Stalts H, Rao B, Wong NCW. Ferrous Sulfate Reduces Thyroxine Efficacy in Patients with Hypothyroidism. *Annals of Internal Medicine*. 1992; 117(12): 1010–13.
20. Elevit Pronatal - Povzetek glavnih značilnosti zdravila. http://www.bayer.si/html/images/upload/smpe/SmPC_Elevit_Pronata.pdf, dostopano 22. 9. 2011.
21. Kennedy JA, Besses GS. Comparison of Adsorption of Iodine-131-Thyroxine to Glass and Plastic Containers. *Journal of Nuclear Medicine*. 1967; 8: 226–8.
22. Van der Deure WM, Peeters RP, Visser TJ. Molecular aspects of thyroid hormone transporters, including MCT8, MCT10, and OATPs, and the effects of genetic variation in these transporters. *Journal of Molecular Endocrinology*. 2010; 44: 1–11.
23. Lehninger AL, Nelson DL, Cox MM. *Lehninger principles of biochemistry*. W. H. Freeman, New York, 2005.
24. Roth M, Timmermann BN, Hagenbuch B. Interactions of green tea catechins with organic anion transport polypeptides. *Drug Metabolism and Disposition*. 2011; 39(5): 920–6.
25. Bailey DG. Fruit juice inhibition of uptake transport: a new type of food-drug interactions. *British Journal of Clinical Pharmacology*. 2010; 70(5): 645–55.
26. Niemi M. Role of OATP transporters in the disposition of drugs. *Pharmacogenomics*. 2007; 8(7): 787–802.
27. Leuthold S, Hagenbuch B, Mohebbi N, Wagner CA, Meier PJ, Stieger B. Mechanisms of pH-gradient driven transport mediated by organic anion polypeptide transporters. *American Journal of Physiology – Cell Physiology*. 2009; 296: 570–82.
28. Hagenbuch B, Meier PJ. Organic anion transporting polypeptides of the OATP/SLC21 family: phylogenetic classification as OATP/SLCO superfamily, new nomenclature and molecular/functional properties. *European Journal of Physiology*. 2004; 447: 653–65.
29. Van der Deure WM, Skov Hansen P, Peeters RP, Ohm Kyvik K, Friesema ECH, Hegedüs L, Visser TJ. Thyroid Hormone Transport and Metabolism by Organic Anion Transporter 1C1 and Consequences of Genetic Variation. *Endocrinology*. 2008; 149(10): 5307–14.
30. Kallikoski A, Niemi M. Impact of OATP transporters on pharmacokinetics. *British Journal of Pharmacology*. 2009; 158: 693–705.
31. Mandery K, Bujok K, Schmidt I, Keiser M, Siegmund W, Balk B, König J, Fromm MF, Glaeser H. Influence of the flavonoids apigenin, kaempferol, and quercetin on the function of organic anion transporting polypeptides 1A2 and 2B1. *Biochemical Pharmacology*. 2010; 80: 1746–53.
32. Yanase H, Takebe K, Nio-Kobayashi J, Takahashi-Iwanaga H, Iwanaga T. Cellular expression of a sodium-dependent monocarboxylate transporter (Slc5a8) and the MCT family in the mouse kidney. *Histochemistry and Cellular Biology*. 2008; 130: 957–66.
33. Suzuki H, Sugiyama Y. Mini Review: Role of metabolic enzymes and efflux transporters in the absorption of drugs from the small intestine. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*. 2000; 12: 3–12.

34. Taipalensuu J, Törnblom H, Lindberg G, Einarsson C, Sjöqvist F, Melhus H, Garberg P, Sjöström B, Lundgren B, Artursson P. Correlation of Gene Expression of Ten Drug Efflux Proteins of the ATP-Binding Cassette Transporter Family in Normal Human Jejunum and in Human Intestinal Epithelial Caco-2 Cell Monolayers. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*. 2001; 299(1): 164–70.
35. Makhey VD, Guo A, Norris DA, Hu P, Yan JS, Sinko PJ. Characterization of the Regional Intestinal Kinetics of Drug Efflux in Rat and Human Intestine and in Caco-2 Cells. *Pharmaceutical Research*. 1998; 15(8): 1160–7.
36. Liu Y, Hu M. Absorption and metabolism of flavonoids in the Caco-2 cell culture model and a perused rat intestinal model. *Drug Metabolism and Disposition*. 2002; 30(4): 370–7.
37. Berginc K, Zvonar A, Gašperlin M, Kristl A. The industrial and academic rationale of Caco-2 cell models today. In: *Caco-2 Cells and their Uses* (ur. Megan A. Schulz). Nova Publishers, 2011.
38. Hilgendorf C, Ahlin G, Seithel A, Artursson P, Ungell AL, Karlsson J. Expression of Thirty-six Drug Transporter Genes in Human Intestine, Liver, Kidney, and Organotypic Cell Lines. *Drug Metabolism and Disposition*. 2007; 35(8): 1333–40.
39. Sambuy Y, De Angelis I, Ranaldi G, Scarino ML, Stammati A, Zucco F. The Caco-2 cell line as a model of the intestinal barrier: influence of cell and culture-related factors on Caco-2 cell functional characteristics. *Cell Biology and Toxicology*. 2005; 21(1): 1–26.
40. Yamashita S, Furubayashi T, Kataoka M, Sakane T, Sezaki H, Tokuda H. Optimized conditions for prediction of intestinal drug permeability using Caco-2 cells. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*. 2000; 10(3): 195–204.
41. Hunter J, Jepson MA, Tsuruo T, Simmons NL, Hirst BH. Functional Expression of P-glycoprotein in Apical Membranes of Human Intestinal Caco-2 Cells: Kinetics of Vinblastine Secretion and Interaction with Modulators. *The Journal of Biological Chemistry*. 1993; 268(20): 14991–7.
42. Annaert P, Kinget R, Naesens L, De Clercq E, Augustijns P. Transport, Uptake, and Metabolism of the Bis(pivaloyloxymethyl)-Ester Prodrug of 9-(2-Phosphonylmethoxyethyl)Adenine in an In Vitro Cell Culture System of the Intestinal Mucosa (Caco-2). *Pharmaceutical Research*. 1997; 14(4): 492–6.
43. Pabla D., Akhlaghi F., Zia H. Intestinal permeability enhancement of levothyroxine sodium by straight chain fatty acids studied in MDCK epithelial cell line. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*. 2010; 40(5): 466–72.
44. Katsura T, Inui K. Intestinal Absorption of Drugs Mediated by Drug Transporters: Mechanisms and Regulation. *Drug Metabolism and Pharmacokinetics*. 2003; 18(1): 1–15.
45. Monolayer Assay: Monolayer Assay Systems.
<http://www.solvobiotech.com/images/uploads/1.jpg>, dostopano 23. 12. 2011.
46. Pravilnik o prehranskih dopolnilih (neuradno prečiščeno besedilo).
http://www.mz.gov.si/fileadmin/mz.gov.si/pageuploads/mz_dokumenti/zakonodaja/varnost_hrane/precis.preh.dopolnila.pdf, dostopano 12. 4. 2012.
47. Direktiva Evropskega parlamenta in Sveta Evropske unije. 2002; Uradni list Evropske skupnosti L 183, 2002/46/ES: 0051–0057.

48. Pravilnik o razvrstitvi zdravilnih rastlin. 2008; Uradni list Republike Slovenije, 103/2008: 13637.
49. Pravilnik o razvrstitvi vitaminskih in mineralnih izdelkov za peroralno uporabo, ki so v farmacevtskih oblikah, med zdravila. 2008; Uradni list Republike Slovenije, 86/2008: 11988.
50. Priloga II: Najnižja in najvišja dnevna količina ter priporočeni dnevni vnosi (PDV/RDA) vitaminov in mineralov za odrasle. 2010; Uradni list Republike Slovenije, 104/2010: 16212.
51. Colalto C. Herbal interactions on absorptions of drugs: Mechanisms of action and clinical risk assessment. *Pharmacological Research.* 2010; 62: 207–27.
52. Chavez ML, Jordan MA, Chavez PI. Evidence-based drug-herbal interactions. *Life Sciences.* 2006; 78: 2146–57.
53. Venkataraman R, Komoroski B, Strom S. In vivo and in vitro assessment of herb drug interactions. *Life Sciences.* 2005; 78: 2105–15.
54. Bean P. The use of alternative medicine in the treatment of hepatitis C. *American Clinical Laboratory.* 2002; 21(4): 19–21.
55. Tamler R, Mechanick JI. Dietary Supplements and Nutriceuticals in the Management of Andrologic Disorders. *Endocrinology and Metabolism Clinics of North America.* 2007; 36(2): 533–52.
56. Skårberg K, Nyberg F, Ekström I. The development of multiple drug use among anabolic-androgenic steroid users: six subjective case reports. *Substance Abuse Treatment, Prevention, and Policy.* 2008; 3: 24.
57. Michels Blanck H, Kettell Khan L, Serdula MK. Use of Nonprescription Weight Loss Products: Results From a Multistate Survey. *The Journal of the American Medical Association.* 2001; 286(8): 930–5.
58. Perls TT. Anti-Aging Medicine: The Legal Issues: Anti-Aging Quackery: Human Growth Hormone and Tricks of the Trade - More Dangerous Than Ever. *The Journals of Gerontology Series A: Biological Sciences and Medical Sciences.* 2004; 59(7): B682–B691.
59. Kelly JP, Kaufman DW, Kelley K, Rosenberg L, Anderson TE, Mitchell AA. Recent Trends in Use of Herbal and Other Natural Products. *Archives of Internal Medicine.* 2005; 165(3): 281–6.
60. Marinac JS, Buchinger CL, Godfrey LA, Wooten JM, Sun C, Willsie SK. Herbal Products and Dietary Supplements: A Survey of Use, Attitudes, and Knowledge Among Older Adults. *The Journal of the American Osteopathic Association.* 2007; 107(1): 13–23.
61. Umek A. Farmakognozija. 2008; <http://farma-drustvo.si/studentska-scena/studijsko-gradivo-2/>, dostopano 12. 9. 2011.
62. Friedli GL. Flavonoids. <http://www.friedli.com/herbs/phytochem/flavonoids.html#intro>, dostopano 12. 9. 2011.
63. Wolffram S, Blöck M, Ader P. Quercetin-3-Glucoside Is Transported by the Glucose Carrier SGLT 1 across the Brush Border Membrane of Rat Small Intestine. *The Journal of Nutrition.* 2002; 132(4): 630–5.
64. Walgren RA, Karnaky KJ, Lindenmayer GE, Walle T. Efflux of Dietary Flavonoid Quercetin 4'-beta-Glucoside across Human Intestinal Caco-2 Cell Monolayers by Apical

Multidrug Resistance-Associated Protein-2. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics.* 2000; 294(3): 830–6.

65. Murota K, Terao J. Antioxidative flavonoid quercetin: implication of its intestinal absorption and metabolism. *Archives of Biochemistry and Biophysics.* 2003; 417(1): 12–17.

66. Manach C, Williamson G, Morand C, Scalbert A, Rémésy C. Bioavailability and bioefficacy of polyphenols in humans. I. Review of 97 bioavailability studies. *The American Journal of Clinical Nutrition.* 2005; 81(suppl): 230S–242S.

67. Harwood M, Danielewska-Nikiel B, Borzelecca JF, Flamm GW, Williams GM, Lines TC. A critical review of the data related to the safety of quercetin and lack of evidence of in vivo toxicity, including lack of genotoxic/carcinogenic properties. *Food and Chemical Toxicology.* 2007; 45: 2179–205.

68. Bevko Vitamins: Supplements for Health, Vitality, & Wellness. <http://bevkovitamins.com/>, dostopano 12. 9. 2011.

69. University of Maryland, Medical Center: Quercetin. <http://www.umm.edu/altmed/articles/quercetin-000322.htm>, dostopano 13. 9. 2011.

70. Azuma K, Ippoushi K, Ito H, Higashio H, Terao J. Combination of Lipids and Emulsifiers Enhances the Absorption of Orally Administered Quercetin in Rats. *Journal of Agricultural and Food Chemistry.* 2002; 50(6): 1706–12.

71. Shimoji K, Yoshizumi K, Kido T, Usui Y, Yumoto T. Absorption and Urinary Excretion of Quercetin, Rutin, and αG-Rutin, a Water Soluble Flavonoid, in Rats. *Journal of Agricultural and Food Chemistry.* 2003; 51(9): 2785–9.

72. Williamson G, Manach C. Bioavailability and bioefficacy of polyphenols in humans. II. Review of 93 intervention studies. *The American Journal of Clinical Nutrition.* 2005; 81(suppl): 243S–255S.

73. Hollman PCH, Arts ICV. Review: Flavonols, flavones and flavanols - nature, occurrence and dietary burden. *Journal of the Science of Food and Agriculture.* 2000; 80: 1081–93.

74. Chandra AK, De N. Goitrogenic/antithyroidal potential of green tea extract in relation to catechin in rats. *Food and Chemical Toxicology.* 2010; 48(8-9): 2304–11.

75. Vo2 Sport - Reflex Green Tea 100 kap. <http://www.vo2sport.com/reflex-green-tea-100kap-p-188.html>, dostopano 13. 9. 2011.

76. Green Tea Extract 400 mg - 100 Caps. <http://www.nowfoods.com/Products/M003173.htm>, dostopano 13. 9. 2011.

77. What is Polyphenon. 2005; <http://www.polyphenon.jp/en/about/index.html>, dostopano 13. 9. 2011.

78. Polyphenon Pharma Receives Orphan Drug Designation For Its Botanical Drug, Polyphenon E, For The Treatment Of CLL. *Medical News Today.* 2008; <http://www.medicalnewstoday.com/releases/116391.php>, dostopano 13. 9. 2011.

79. Donovan JL, Crespy V, Manach C, Morand C, Besson C, Scalbert A, Rémésy C. Catechin Is Metabolized by Both the Small Intestine and Liver of Rats. *The Journal of Nutrition.* 2001; 131(6): 1753–7.

80. Sherry Crow HH, Hakim IA, Vining DR, Crowell JA, Ranger-Moore J, Chew WM, Celaya CA, Rodney SR, Hara Y, Alberts DS. Effects of Dosing Condition on the Oral Bioavailability of Green Tea Catechins after Single-Dose Administration of Polyphenon E in Healthy Individuals. *Clinical Cancer Research.* 2005; 11(12): 4627–33.

81. Vaidyanathan JB, Walle T. Cellular Uptake and Efflux of the Tea Flavonoid (-)-Epicatechin-3-gallate in the Human Intestinal Cell Line Caco-2. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*. 2003; 307(2): 745–52.
82. Oliff H. Scientific and Clinical Monograph for Pycnogenol®. American Botanical Council, 2007; http://www.pycnogenol.com/pdf/Pycnog_FullMono120809_LOW.pdf, dostopano 13. 9. 2011.
83. ArsPharmae - Pycnogenol. <http://www.arspharmae.com/articles.php?lng=si&pg=167>, dostopano 13. 9. 2011.
84. Grimm T, Skrabala R, Chovanová Z, Muchová J, Sumegová K, Liptáková A, Ďuračková Z, Högger P. Single and multiple dose pharmacokinetics of maritime pine bark extract (Pycnogenol) after oral administration to healthy volunteers. *BMC Clinical Pharmacology*. 2006; 6: 4.
85. Schäfer A, Högger P. Oligomeric procyanidins of French maritime pine bark extract (Pycnogenol1) effectively inhibit α-glucosidase. *Diabetes Research and Clinical Practice*. 2007; 77(1): 41–6.
86. Stoupi S, Williamson G, Viton F, Barron D, King LJ, Brown JE, Clifford MN. In Vivo Bioavailability, Absorption, Excretion, and Pharmacokinetics of [14C]Procyanidin B2 in Male Rats. *Drug Metabolism and Disposition*. 2010; 38(2): 287–91.
87. Yesil-Celiktas O, Otto F, Parlar H. A comparative study of flavonoid contents and antioxidant activities of supercritical CO₂ extracted pine barks grown in different regions of Turkey and Germany. *European Food Research and Technology*. 2009; 229(4): 671–7.
88. Ćajić A, Kreft S, Janeš D. Karakterizacija in poskus identifikacije komponent antioksidativnega ekstrakta lubja navadne jelke (*Abies alba*). Fakulteta za farmacijo Univerze v Ljubljani, Ljubljana, 2011: 35–57.
89. Dixit N, Baboota S, Kohli K, Ahmad S, Ali J. Silymarin: A review of pharmacological aspects and bioavailability enhancement approaches. *Indian Journal of Pharmacology*. 2007; 39(4): 172–9.
90. Moon YJ, Wang XD, Morris ME. Dietary flavonoids: Effects on xenobiotic and carcinogen metabolism. *Toxicology in Vitro*. 2006; 20: 187–210.
91. Letschert K, Faulstich H, Keller D, Keppler D. Molecular Characterization and Inhibition of Amanitin Uptake into Human Hepatocytes. *Toxicological Sciences*. 2006; 91(1): 140–9.
92. Lekarnar - spletna lekarna: Liverin forte, tablete. <http://www.lekarnar.com/izdelki/liverin-forte-tablete>, dostopano 14. 9. 2011.
93. Difar - zeleno je modro: Silimarín Plus. <http://www.difar.si/artikel/1080018018/2/znamke/silimarin-plus>, dostopano 14. 9. 2011.
94. NationalNutrition.ca: Milk Thistle 250 mg - 90 caps (2 for deal). <http://www.nationalnutrition.ca/detail.aspx?ID=2109>, dostopano 14. 9. 2011.
95. Parés A, Planas R, Torres M, Caballería J, Viver JM, Acero D, Panés J, Rigau J, Santos J, Rodés J. Effects of silymarin in alcoholic patients with cirrhosis of the liver: results of a controlled, double-blind, randomized and multicenter trial. *Journal of Hepatology*. 1998; 28(4): 615–21.
96. Wang LQ, James MO. Inhibition of Sulfotransferases by Xenobiotics. *Current Drug Metabolism*. 2006; 7: 83–104.
97. Lilja JJ, Laitinen K, Neuvonen PJ. Effects of grapefruit juice on the absorption of levothyroxine. *British Journal of Clinical Pharmacology*. 2005; 60(3): 337–41.

98. Van der Heide D, Kastelijn J, Schröder-van der Elst JP. Mini Review: Flavonoids and thyroid disease. *BioFactors*. 2003; 19: 113–19.
99. Gram LK, Rist GM, Lennernäs H, Steffansen B. Impact of carriers in oral absorption: Permeation across Caco-2 cells for the organic anions estrone-3-sulfate and glipizide. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*. 2009; 37(3–4): 378–86.
100. Wehner F, Rosin-Steiner S, Beetz G, Sauer H. The anion transport inhibitor DIDS increases rat hepatocyte K^+ conductance via uptake through the bilirubin pathway. *The Journal of Physiology*. 1993; 471: 617–35.
101. Caco-2 permeability assay. <http://www.cyprotex.com/cloescreen/in-vitro-permeability/caco-2-permeability/>, dostopano 25. 3. 2012.
102. Pehan S, Kristl A, Šturm K. Primerjava proučevanja prehoda nekaterih učinkovin skozi monosloj Caco-2 celic in podganji jejunum *in vitro*. Fakulteta za farmacijo, Ljubljana, 2006: 35–7.
103. Ferligoj A. Osnove statistike na prosojnicah. Ljubljana, 1995: 2, 143.
104. Grabnar I. Testiranje hipotez o razlikih med dvema vzorcema. 2009; <http://wwwffa.uni-lj.si/si/o-fakulteti/katedre/katedra-za-socialno-farmacij/pedagoska-dejavnost/farmacevtska-informatika-emsf/predavanja.html>, dostopano 25. 3. 2012.
105. Legen I, Kristl A. pH and energy dependent transport of ketoprofen across rat jejunum *in vitro*. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*. 2003; 56(1): 87–94.
106. Gao S, Hu M. Bioavailability Challenges Associated with Development of Anti-Cancer Phenolics. *Mini-Reviews in Medicinal Chemistry*. 2010; 10(6): 550–67.
107. Lande MB, Donovan JM, Zeidel ML. The Relationship between Membrane Fluidity and Permeabilities to Water, Solutes, Ammonia, and Protons. *The Journal of General Physiology*. 1995; 106(1): 67–84.
108. López-Revuelta A, Sánchez-Gallego JI, Hernández-Hernández A, Sánchez-Yagüe J, Llanillo M. Membrane cholesterol contents influence the protective effects of quercetin and rutin in erythrocytes damaged by oxidative stress. *Chemico-Biological Interactions*. 2006; 161(1): 79–91.
109. Valenzuela A, Barría T, Guerra R, Garrido A. Inhibitory effect of the flavonoid silymarin on the erythrocyte hemolysis induced by phenylhydrazine. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 1985; 126(2): 712–18.
110. Berginc K, Trontelj J, Kristl A. The Influence of Aged Garlic Extract on the Uptake of Saquinavir and Darunavir into HEPG2 Cells and Rat Liver Slices. *Drug Metabolism and Pharmacokinetics*. 2010; 25(3): 307–13.
111. Vayalil PK, Elmets CA, Katiyar SK. Treatment of green tea polyphenols in hydrophilic cream prevents UVB-induced oxidation of lipids and proteins, depletion of antioxidant enzymes and phosphorylation of MAPK proteins in SKH-1 hairless mouse skin. *Carcinogenesis*. 2003; 24(5): 927–36.
112. Ojo OO, Ladeji O, Nadro MS. Studies of the Antioxidative Effects of Green and Black Tea (*Camellia sinensis*) Extracts in Rats. *Journal of Medicinal Food*. 2007; 10(2): 345–9.
113. Verstraeten SV, Hammerstone JF, Keen CL, Fraga CG, Oteiza PI. Antioxidant and Membrane Effects of Procyanidin Dimers and Trimers Isolated from Peanut and Cocoa. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2005; 53(12): 5041–8.

114. Murota K, Shimizu S, Miyamoto S, Izumi T, Obata A, Kikuchi M, Terao J. Unique Uptake and Transport of Isoflavone Aglycones by Human Intestinal Caco-2 Cells: Comparison of Isoflavonoids and Flavonoids. *The Journal of Nutrition*. 2002; 132(7): 1956–61.