

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO

MARJETA BENEDIK

**DOLOČITEV PERMEABILNOSTNIH LASTNOSTI NOVIH
ZAVIRALCEV HOLINESTERAZ NA ILEUMU PODGANE**

IN VITRO

**DETERMINATION OF PERMEABILITY PROPERTIES OF
NOVEL CHOLINESTERASE INHIBITORS ON RAT ILEUM**

IN VITRO

DIPLOMSKA NALOGA

Ljubljana, 2013

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

Zahvaljujem se mentorju doc. dr. Simonu Žaklju za strokovno pomoč, usmerjanje in nasvete med delom v laboratoriju in pri izdelavi diplomske naloge. Zahvalila bi se tudi ostalim zaposlenim na Katedri za biofarmacijo in farmakokinetiko, še posebej Nevenki Lilik za pomoč pri delu.

Zahvalila bi se tudi svoji družini, ki mi je stala ob strani skozi celotno šolanje, Mihu za vso podporo, pomoč in potrpljenje ter prijateljem za vse lepe, vesele in nepozabne trenutke, ki so razbremenili in popestrili študentska leta.

Izjava

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

Ljubljana, december 2013

Predsednik diplomske komisije: prof. dr. Stanislav Gobec

Član diplomske komisije: doc. dr. Tomaž Bratkovič

VSEBINA

1	UVOD.....	1
1.1	Alzheimerjeva bolezen in inhibitorji holinesteraze	1
1.1.1	Definicija	1
1.1.2	Holinergični sistem.....	1
1.1.3	Zdravljenje.....	2
1.2	Topnost	5
1.3	Tekočinska kromatografija visoke ločljivosti.....	5
1.4	Gastrointestinalni trakt.....	7
1.4.1	Lastnosti tankega črevesa	7
1.4.2	Primerjava tankega črevesa pri podgani in človeku	7
1.4.3	Ileum.....	8
1.5	Transport snovi skozi membrano.....	8
1.6	Absorpcija.....	10
1.7	Biofarmacevtski sistem klasifikacije	10
2	NAMEN DELA.....	12
3	MATERIALI IN METODE	13
3.1	Reagenti	13
3.2	Raztopine	13
3.2.1	Osnovne raztopine preiskovanih spojin.....	13
3.2.2	Raztopine za razvoj analizne metode	14
3.2.3	Raztopine za merjenje permeabilnosti.....	14
3.3	Aparature	15
3.4	Fizikalno-kemijske lastnosti spojin	15
3.5	Razvoj analizne metode	15
3.6	Permeabilnost.....	16

3.6.1	Topnost v Ringerjevem pufru	16
3.6.2	Merjenje permeabilnosti na podganjem črevesju <i>in vitro</i>	16
3.6.3	Statistična obdelava	20
4	REZULTATI IN RAZPRAVA	23
4.1	Fizikalno-kemijske lastnosti	23
4.2	Analizna metoda	23
4.2.1	GUK-662	25
4.2.2	GBB-47	30
4.2.3	GBB-49	34
4.2.4	GBB-79	38
4.2.5	CB-14948874	41
4.3	Topnost v Ringerjevem pufru	46
4.4	Permeabilnost	47
4.4.1	Elektrofiziološki parametri	48
4.4.2	Vrednosti permeabilnostnih koeficientov in njihova statistična obdelava	49
4.4.3	Interpretacija rezultatov permeabilnosti	52
5	SKLEP	57
6	LITERATURA	59

POVZETEK

Alzheimerjeva bolezen je nevrodegenerativno obolenje, ki postaja vse večji zdravstveni problem v razvitem svetu. Kljub naraščanju števila obolelih je v terapiji relativno malo zdravil, ki zmanjšujejo simptome bolezni. Zdravila prvega izbora za zdravljenje bolezni predstavljajo zaviralcí holinesteraz.

V okviru diplomskega dela smo opredelili permeabilnostne lastnosti nekaterim novim zaviralcem holinesteraz: GUK-662, CB-14948874, GBB-47, GBB-49 in GBB-79. Pred začetkom poskusa permeabilnosti smo vsaki spojni morali razviti analizno metodo s tekočinsko kromatografijo visoke ločljivosti. S številnimi poskusi smo določili optimalne kromatografske pogoje. Končno analitsko metodo smo nato uporabili pri analiziranju vzorcev, ki smo jih pridobili pri poskusu permeabilnosti.

Permeabilnost smo pod enakimi pogoji merili v absorptivni in eliminatorni smeri na ileumu podgane *in vitro* z metodo dvostranskih Sweetana-Grass difuzijskih celic.

Izbranim spojinam smo preverili topnost v Ringerjevem pufru in ugotovili, da so se CB-14948874, GBB-47, GBB-49 in GBB-79 obarjale. Na podlagi rezultatov smo določili optimalno donorsko koncentracijo za vsako učinkovino posebej in šele nato lahko določili pravilne vrednosti navideznih permeabilnostnih koeficientov.

Vse preiskovane spojine so prehajale s pasivnim transportom, zato smo jih lahko opredelili v smislu biofarmacevtske klasifikacije. Visoko permeabilna je bila spojina CB-14948874, spojinam GUK-662, GBB-49 in GBB-79 pa smo izmerili nizke vrednosti navideznih permeabilnostnih koeficientov. Strukturna značilnost, ki je bila najverjetneje odgovorna za nizko permeabilnost teh treh spojin, je bila velikost molekule, ki se je odražala tudi v njihovi visoki molekulski masi.

Najbolj zaželena farmakokinetična lastnost za spojine, ki naj bi prehajale skozi hematoencefalno bariero, je visoka permeabilnost, vsaj taka, kot smo jo dobili pri spojini CB-14948874.

GUK-662, GBB-49 in GBB-79 niso bili substrati prenosalcev, ki delujejo v eliminatorni smeri, kamor uvrščamo tudi P-glikoprotein. Kljub njihovi nizki permeabilnosti v *in vitro* pogojih zato še vedno obstaja verjetnost, da bi spojine prehajale preko hematoencefalne bariere.

Med izvajanjem poskusa smo ugotovili, da spojine delujejo toksično na ileum podgane. To pomeni, da bi peroralno aplicirane spojine lahko povzročile večjo pogostnost gastrointestinalnih neželenih učinkov, če bi bila njihova koncentracija v prebavnem traktu podobna ali višja kot v naših poskusih.

ABSTRACT

Alzheimer's disease is a neurodegenerative disease which is becoming an increasing problem in the developed world. Despite the growing number of the diseased there are relatively few drugs that reduce the symptoms. The first-line medicines for treating the illness are cholinesterase inhibitors.

In this work we have defined the permeability properties of some new cholinesterase inhibitors: GUK-662, CB-14948874, GBB-47, GBB-49 and GBB-79. Prior to the permeability measurements we had to develop an analytical method with high-performance liquid chromatography.

With numerous tests we have defined the optimal chromatographic conditions. We have then used the analytical method in the analysis of the samples, obtained during the permeability test. We measured the permeability under the same conditions in the absorptive and eliminatory direction on rat ileum *in vitro* using a two-sided Sweetana-Grass diffusion chambers method.

We tested the solubility of the chosen compounds in the Ringer buffer where CB-14948874, GBB-47, GBB-49 and GBB-79 have precipitated. On the basis of these results we have defined the donor concentration for each tested compound and only then we could calculate the correct values of apparent permeability coefficients.

All of the tested compounds permeated primarily by passive transport. We were also able to classify them according to the biopharmaceutical classification system. CB-14948874 was highly permeable, while the permeability coefficients in GUK-662, GBB-49 and GBB-79 were low. The most likely structural characteristic responsible for the low permeability of these three compounds is their size which is reflected in their high molecular mass. The most desirable pharmacokinetic property for compounds which should pass through the blood-brain barrier in order to be effective would be high permeability at least like that of CB-14948874.

Since GUK-662, GBB-49 and GBB-79 are not substrates of the main efflux transporters like P-glycoprotein they also have some chances for distribution through the blood-brain barrier in spite of their low permeability *in vitro*.

During our test we have found out that the compounds are toxic for the rat ileum. This means that orally applied compounds could cause a high occurrence of gastrointestinal

adverse effects if their concentration in the gastrointestinal tract is similar or higher than in our tests.

SEZNAM OKRAJŠAV

AB	Alzheimerjeva bolezen
ABC	ang.: <i>ATP-Binding Cassete</i>
AChE	acetilholinesteraza
ACh	acetilholin
ADMET	absorpcija, distribucija, metabolizem, eliminacija, toksičnost
ATP	adenozin trifosfat
BuChE	butirilholinesteraza
BCRP	ang.: <i>Breast Cancer Resistance Protein</i> = protein odgovoren za odpornost rakavih celic proti citostatikom
BCS	ang.: <i>Biopharmaceutical Classification System</i> = biofarmacevtski klasifikacijski sistem
BU	biološka uporabnost
CoA	koencim A
CŽS	centralni živčni sistem
DMSO	dimetilsulfoksid
EMA	ang.: <i>European Medicines Agency</i> = Evropska agencija za zdravila
ER	efluksno razmerje
GIT	gastrointestinalni trakt
HE	hematoencefalen
HPLC	ang.: <i>High-Performance Liquid Cromatography</i> = tekočinska kromatografija visoke ločljivosti
IVIVC	ang.: <i>In Vitro-In Vivo Correlation</i> = korelacija <i>in vitro-in vivo</i>
log P	porazdelitveni koeficient
log D	koeficient distribucije
MCT1	ang.: <i>Monocarboxilic Transporter 1</i> = prenšalec monokarboksilnih kislin 1
MM	molekulska masa
MRP2	ang.: <i>Multidrug Resistance associated Protein 2</i>
M-S	iz mukozne na serozno stran
NMDA	N-metil-D-aspartat
P _{app}	navidezni permeabilnostni koeficient
PEPT1	ang.: <i>oligopeptide transporter 1</i> = oligopeptidni prenšalec 1

pKa	negativni desetiški logaritem konstante disociacije
P-gp	P-glikoprotein
PSA	polarna površina molekule
RS	Republika Slovenija
SLC	ang.: <i>Solute Carrier</i> = prenašalec topljencev
S-M	iz serozne na mukozno stran
TEER	ang.: <i>TransEpithelial Electrical Resistance</i> = transepiteljski električni upor

1 UVOD

1.1 Alzheimerjeva bolezen in inhibitorji holinesteraze

1.1.1 Definicija

Alzheimerjeva bolezen (AB) je progresivna, ireverzibilna in neozdravljiva nevrološka bolezen, za katero je značilen progresivni upad kognitivnih funkcij, ki se navzven kaže s progresivno izgubo spomina, ki ji sledi popolna demenca. Pogostost obolenja za AB narašča s starostjo, še zlasti v razvitem svetu, kjer se življenska doba prebivalstva daljša (1, 2).

Pri bolnikih z AB so ugotovili atrofijo možganskih vijug in zvečanje stranskih ventriklov. V možganih nastanejo amiloidne lehe in nevrfibrilarne pentlje. Slednje se pri bolnikih z AB pojavijo v nevronih pomembnih nevrotansmitorskih sistemov. Patološki procesi zajamejo holinergični, noradrenergični in serotoninergični sistem. Ko živčni končiči zgoraj omenjenih nevrotansmitorskih sistemov propadejo, se v področjih, ki jih oživčujejo, zmanjša holinergični, noradrenergični in serotoninergični prenos. Nevrodegenerativne spremembe in znižanje holinergičnega prenosa v hipokampusu vodijo v motnje prehajanja kratkotrajnega v dolgotrajni spomin. Posledica so motena pozornost, učenje, spomin in drugi kognitivni procesi (1).

1.1.2 Holinergični sistem

Acetiholin (ACh) se sintetizira v presinaptičnem nevronu iz holina in acetil-CoA s pomočjo encima holin-acetiltransferaze. Nastali ACh prehaja v sinaptične mešičke. Dražljaj povzroči odpiranje Ca^{2+} kanalčkov in povečano koncentracijo Ca^{2+} v celici. Sledi zlivanje sinaptičnih mešičkov s presinaptično membrano in sprostitev ACh v sinaptično režo. Na postsinaptični strani se ACh veže na holinergične receptorje (3).

Acetylholinesteraza (AChE) je encim, ki na postsinaptični membrani razgradi ACh in s tem prekine prenos živčnega signala med celicama (4). Poleg AChE je v organizmu prisotna tudi butirilholinesteraza (BuChE), katere fiziološka vloga je še vedno nejasna (5).

Pri zdravem človeku se v možganih nahaja 99 % AChE in 1 % BuChE. Študije so pokazale, da je pri bolnikih z Alzheimerjevo boleznijo aktivnost AChE zmanjšana (65 %), medtem ko je aktivnost BuChE povečana (35 %). V poznejših fazah bolezni BuChE lahko nadomesti AChE in hidrolizira ACh v možganih (6).

AChE se lahko nahaja v holinergičnih sinapsah na periferiji in v CŽS. Učinkovine za zdravljenje AB delujejo na AChE v CŽS, zato morajo prehajati hematoencefalno (HE) bariero. Za ta prehod niso primerne spojine, ki imajo v svoji strukturi kvartarni dušikov atom (3).

Inhibitorje AChE delimo na reverzibilne (donepezil, galantamin), psevdoreverzibilne (rivastigmin) in ireverzibilne. Inhibitorje v zadnjih dveh skupinah imenujemo tudi acilirajoči, ker acilirajo encim in delujejo enako kot ACh. Razlika je predvsem kvantitativna, ker je deacilacija pri psevdoreverzibilnih inhibitorjih počasna, pri ireverzibilnih pa sploh ne poteče. Encim ostane v tem primeru zelo dolgo aciliran in ne more hidrolizirati ACh. Reverzibilni inhibitorji z encimom tvorijo le aditivni kompleks. Vezava reverzibilnega inhibitorja na katalitično mesto encima upočasni hitrost hidrolize ACh (2, 4, 5).

1.1.3 Zdravljenje

1.1.3.1 Registrirana zdravila

Zdravljenje Alzheimerjeve bolezni je simptomatsko. Trenutna farmakoterapija je usmerjena v zdravljenje kliničnih znakov demence, predvsem v izboljšanje kognitivnih funkcij. To dosežejo z zvečanjem holinergične aktivnosti (2). V ta namen uporabljamo inhibitorje holinesteraz, ki zavrejo delovanje AChE. Zdravila vzdržujejo koncentracijo ACh in kompenzirajo zgoraj omenjene klinične zname. V registru zdravil RS so navedene tri učinkovine: donepezil, galantamin in rivastigmin (glej Preglednico I) (7). Spadajo med zdravila prvega izbora za zdravljenje AB (2). Učinkovine, ki zavirajo AChE, pripomorejo le k izboljšanju spomina pri blagi oziroma zmerno hudi demenci, ne zaustavijo pa procesa nevrodegeneracije. Prav tako je učinkovitost inhibitorjev AChE odvisna od integritete presinaptičnih nevronov, kar pomeni, da bo zmanjšana pri zelo razviti bolezni (1, 3, 6).

Zdravljenje z zaviralcem AChE upočasni razvoj bolezni, vendar je učinkovito le v začetni fazi bolezni. Povečane koncentracije acetilholina po daljšem času povzročijo zmanjšano sproščanje acetilholina in posledično zmanjšano aktivnost holinergičnega sistema (3, 8).

Neželeni stranski učinki inhibitorjev AChE so posledica prevelike stimulacije holinergičnega sistema. Uporaba teh zdravilnih učinkovin je zaradi njih omejena. Stranski učinki so predvsem gastrointestinalni. Kažejo se kot slabost, bruhanje, diareja, anoreksija, izguba telesne teže in bolečine v trebuhi. pride lahko tudi do utrujenosti, oslabelosti, vrtoglavice in zbganosti (3, 6, 8).

Preglednica I: Inhibitorji holinesteraz, ki jih uporabljamo v terapiji (7, 9, 10, 11).

SPOJINA	MOLEKULSKA MASA [g/mol]	STRUKTURA
Rivastigmin	250,34	
Donepezil	379,49	
Galantamin	287,35	

Poleg inhibitorjev holinesteraze je za zdravljenje AB registriran memantin, ki spada med delne antagoniste receptorjev NMDA. Prihaja tudi do novih odkritij o vzrokih nastanka te bolezni in posledično novih terapij, ki so usmerjene v sam vzrok nastanka bolezni (inhibitorji β - in γ -sekretaz, učinkovine za zniževanje holesterola, kelatorji kovinskih ionov, protivnetne učinkovine ...) (2, 4).

1.1.3.2 Novi zaviralci holinesteraz

Spojine, za določanje katerih smo razvili analizno metodo in jim ocenili permeabilnostne lastnosti, so predstavljene v Preglednici II.

Preglednica II: Novi zaviralci holinesteraz (vir spojin: Fakulteta za farmacijo).

SPOJINA	MOLEKULSKA MASA [g/mol]	STRUKTURA
GUK-662	442,59	
GBB-47	384,51	
GBB-49	420,57	
GBB-79	478,65	
CB- 14948874	339,45	

1.2 Topnost

Dобра topnost je pomembna pri peroralno apliciranih zdravilih, saj določa količino prosto razpoložljive učinkovine, ki lahko preide skozi gastrointestinalno membrano ozira oziroma sluznico v sistemski krvni obtok (12).

Odvisna je od fizikalno-kemijskih lastnosti molekule, topila, temperature, tlaka ... Če je spojina slabo topna, se slabo absorbira in ima majhno biološko razpoložljivost. Slabo topne so bolj lipofilne spojine. Bolj hidrofilne so slabše permeabilne in se tako slabše absorbirajo. Bistven podatek, ki ga potrebujemo za oceno topnosti iz biofarmacevtskega vidika, je odmerek, saj je to tista količina učinkovine, ki se mora raztopiti v prebavnem traktu (13, 14).

Pri topnosti igra pomembno vlogo ionizacijsko stanje molekule. Razlog za to so funkcionalne skupine, ki ionizirajo in katerih topnostna energija narašča od kristalne do vodne raztopine. Zwitterion vsebuje tako kisle kot tudi alkalne funkcionalne skupine. Če je molekula majhna, kot so to zdravilne učinkovine, je najmanj topna v obliki, ko sta ionizirani obe skupini in je zato celokupni naboj molekule nevtralen. Dobro je topna izven pH območja, v katerem ionizirata obe skupini. Pri kislinah in bazah je večja verjetnost, da bodo pri pH 7,4 ionizirale karboksilne kisline z vrednostmi pKa pod 6 kot šibke baze z dokaj nizkimi vrednostmi pKa (12).

1.3 Tekočinska kromatografija visoke ločljivosti

Tekočinska kromatografija visoke ločljivosti (HPLC) je kolonska kromatografija, pri kateri tekoča mobilna faza pod visokim pritiskom teče skozi kolono, v kateri je stacionarna faza. Za HPLC je značilna hitra in dobra ločljivost. Postopek kromatografske analize poteka tako, da najprej ločimo posamezne komponente vzorca in jih nato zaznamo z ustrezno detekcijo, s ciljem kvantitativne in kvalitativne določitve. V praksi skušamo doseči čim boljšo separacijo v čim krajšem času z optimizacijo vseh parametrov in komponent kromatografskega sistema. Meja optimalnosti je določena z zmogljivostjo opreme in pritiska v koloni. Posamezne komponente preiskovanega vzorca se ločijo med seboj na podlagi njihovih različnih fizikalnih in kemijskih interakcij z mobilno in stacionarno fazo (15).

Pri analizi zdravilnih učinkovin najpogosteje uporabljam kromatografija z reverzno fazo. Ima nepolarno stacionarno fazo in polarno mobilno fazo. Stacionarno fazo sestavlja porozni delci silikagela, na katerega so vezane hidrofobne funkcionalne skupine (oktadecilna, oktilna, fenilheksilna, butilna, cianopropilna ...). Mobilno fazo sestavlja pufer v kombinaciji z različnimi organskimi topili. S spremjanjem pH in količine organskega modifikatorja (acetonitril, metanol) pride do želene ločbe vrhov. Večji delež organskega modifikatorja v mobilni fazi povzroči hitrejšo elucijo hidrofobnih analitov (15, 16).

HPLC-sistem mora imeti naslednje komponente: rezervoar z mobilno fazo, črpalko, injektor, kromatografsko kolono, detektor in instrument za zapis signala (15).

Naloga injektorja je vnesti točno določen volumen vzorca v tok mobilne faze pri visokem delovnem pritisku. Proses injiciranja vzorca je praviloma avtomatski. V tem primeru je injektor povezan z avtomatskim vzorčevalnikom, ki samodejno injicira predhodno pripravljene vzorce. Vzorec v mobilni fazi potuje do kolone (16).

Črpalka mora zagotavljati enakomeren pretok mobilne faze skozi kolono (15). Sestava mobilne faze med analizo je lahko stalna ali pa se spreminja. Izokratska elucija imenujemo postopek, pri katerem uporabimo za kromatografsko ločitev mobilno fazo enake sestave med celotno analizo. Pri gradientni eluciji se mobilna faza spreminja tekom analize. Uporabljamo jo predvsem za ločitev komponent z zelo različnimi afinitetami do stacionarne faze (15, 16).

Kolona je bistveni del HPLC-sistema. V njej se dogajajo najpomembnejši procesi separacije – ločevanje in porazdelitev molekul med polarno in nepolarno fazo. V odvisnosti od porazdelitvenega koeficiente ($\log P$) in konstante ionizacije (pK_a) raztopljenih molekul potujejo molekule med obema fazama in se v njih različno dolgo zadržujejo. Molekule z različnimi lastnostmi prihajajo iz kolone ob različnih časih. Daljša kot je kolona, večji je padec pritiska v HPLC sistemu, sposobnost ločevanja v izokratskem načinu delovanja pa je večja (15, 16). Kontaminacijo analitske kolone zmanjšamo z uporabo predkolon. S tem preprečimo zmanjšanje učinkovitosti kolone in povečanje pritiska v njej (15).

Detektor zazna analit in njegov odziv pretvori v električni signal. Zelo pomembna lastnost detektorja je, da z njim lahko določamo koncentracijo preiskovane spojine. Najbolj uporabljeni detektorji so UV absorpcijski detektorji, in sicer zaradi svoje univerzalnosti,

enostavnosti, selektivnosti in občutljivosti. Njihovo delovanje temelji na absorpciji svetlobe pri določeni valovni dolžini zaradi prisotnosti eluiranih molekul v mobilni fazi. Izberemo valovno dolžino, pri kateri imajo eluirane molekule absorpcijski maksimum (15, 16).

1.4 Gastrointestinalni trakt

GIT je sestavljen iz zgornjega dela, v katerega spadajo ustna votlina, žrelo, požiralnik in želodec, ter iz spodnjega dela, ki ga sestavljajo tanko in debelo črevo ter zadnjik. Naloge GIT so prebavljanje hrane, absorpcija hranil, potiskanje vsebine vzdolž prebavil in vzdrževanje imunske homeostaze (17, 18). V nadaljevanju se bomo osredotočili na tanko črevo in na njegov terminalni del, ileum.

1.4.1 Lastnosti tankega črevesa

Tanko črevo je glavno mesto, kjer poteka absorpcija hranil, vode in elektrolitov. Razdeljeno je na tri različno dolge segmente: duodenum, jejunum in ileum (17, 19, 20). Stena tankega črevesa je sestavljena iz sluznice (tunica mucosa), podsluznice (tela submucosa), mišične plasti (tunica muscularis) in zunanje plasti (tunica serosa) (21). Črevesno steno obrobljajo epitelijske celice, ki jih imenujemo enterociti (22). Sluznica je sestavljena iz krožnih gub, črevesnih resic, ki izraščajo iz stene v lumen prebavil ter mikrovilov, ki se nahajajo na enterocitih in tvorijo ščetkasto površino. Površino sluznice, kjer poteka absorpcija, se zaradi zgoraj omenjenih anatomskeih lastnosti poveča za 600-krat (17, 20, 22). Črevesne resice so številčnejše v jejunumu. V ileumu postajajo redkejše in kraje (21, 22). S sluznico je tesno povezana podsluznica. V njej se nahajajo žile, živčni pletež in limfatično tkivo (21).

1.4.2 Primerjava tankega črevesa pri podgani in človeku

Dolžina prebavnega trakta pri človeku je samo 5,5-krat večja kot pri podgani, kljub temu da je človek (70 kg) v primerjavi s podgano (0,25 kg) veliko večji. Površina, kjer poteka absorpcija snovi, je pri človeku zaradi morfoloških sprememb 200-krat večja kot pri podgani. Posledično je absorpcija snovi hitrejša (17).

1.4.3 Ileum

Zadnjih 15 cm tankega črevesa podgane ustreza segmentu ileuma z vidika aktivnega transporta (23). Vrednost pH v ileumu je 7, v distalnem delu se lahko zaradi sekrecije bikarbonata dvigne do 8. Močne kisline in baze so pri nevtralnem pH ionizirane, zato bo njihova absorpcija omejena. Najbolj učinkovito se bodo v tem delu tankega črevesja absorbirale ustrezeno topne spojine, ki niso ionizirane pri pH 7–8. Žolč pomaga raztopiti maščobe in druge hidrofobne snovi (22).

1.5 Transport snovi skozi membrano

Peroralno aplicirana zdravila morajo prečkati črevesno steno sluznice, preden dosežejo kapilare in sistemski krvni obtok. Prehajanje lahko poteka s pasivnim ali aktivnim transportom (24).

Pasivni transport poteka od višje proti nižji koncentraciji. Pri procesu se energija ne porablja. Predstavlja glavni absorpcijski proces za večino učinkovin. Na stopnjo pasivne difuzije vplivata topnost učinkovin v lipidih, ki je najbolje predstavljena s porazdelitvenim koeficientom, ter površina, skozi katero prehaja učinkovina. Pomemben vpliv ima tudi ioniziranost učinkovine (22).

Pasivno lahko prehajajo spojine paracelularno ali transcelularno. Pri paracelularnem transportu molekule difundirajo v tesne stike ali v prostore med črevesne epitelijske celice (22). Na ta način lahko prehajajo ionizirane hidrofilne spojine, ki imajo MM manjšo od 200 Da. Po tem mehanizmu prehaja malo učinkovin, saj površina, ki je namenjena paracelularnemu transportu, predstavlja približno 0,01 % celotne površine tankega črevesja (14, 25). Prosto gibanje molekul omejujejo tudi tesni stiki med epitelijskimi celicami (26). Pasivna transcelularna difuzija predstavlja glavni mehanizem absorpcije učinkovin. Obsega prehajanje snovi skozi apikalno membrano, citosol in bazolateralno membrano v kri (22). Temu transportu so podvržene bolj lipofilne spojine (14, 25, 26). Podatki iz različnih študij kažejo, da so učinkovine visoko permeabilne v jejunumu, če imajo $\log P > 0$ in $PSA < 100$. Učinkovine, ki prehajajo s transcelularnim transportom, so podvržene intracelularnemu metabolizmu (14).

Snovi lahko prehajajo transcelularno tudi z **aktivnim transportom**, ki lahko poteka tudi v smeri od nižje proti višji koncentraciji. Prehajanje vedno poteka s pomočjo prenašalcev, ki nadzorujejo privzem in izločanje sladkorjev, aminokislin, nukleotidov, anorganskih ionov in prav tako zdravil. Specifični membranski prenašalci so izraženi na apikalni in bazolateralni membrani enterocitov, hepatocitov, epitelnih celic ledvičnih tubulov in na drugih barierah tkiv, vključno s HE-bariero. Količina učinkovine, ki prehaja v sistemski krvni obtok po peroralni aplikaciji, je odvisna od izraženih prenašalcev. Njihovo število je omejeno, zato se nasičijo, če je koncentracija učinkovine zelo visoka (14, 22, 24).

V organizmu sta najpomembnejši dve naddružini, v kateri spada več kot 400 prenašalcev. To sta ABC (*ATP-binding cassette*) in SLC (*solute carrier*) (22). Kljub veliki raznolikosti prenašalcev, ki so izraženi na enterocitih, jih je le nekaj izmed njih klinično pomembnih pri gastrointestinalni absorpciji učinkovin (24).

Pri procesu aktivnega transporta se energija porablja. Prenašalci iz skupine ABC dobijo energijo s hidrolizo ATP. Skupina SLC energijo dobi posredno, saj transport poteka v obliki intra- in ekstracelularnega kotransporta ionov (24).

Prenašalci lahko delujejo v absorptivni ali eliminatorni smeri (22). Najbolj raziskani prenašalci, ki večinoma prenašajo substrate v eliminatorni smeri in se nahajajo na apikalni membrani enterocitov, so prenašalci iz skupine ABC. Predstavniki iz te skupine so P-glikoprotein (P-gp), MRP2 (*Multidrug Resistance associated Protein 2*) in BCRP (*Breast Cancer Resistance Protein*) (24). Najbolj so ti prenašalci izraženi v ileumu, saj je zanj značilno višje efluksno razmerje kot v ostalih delih tankega črevesja (27). Omejujejo absorpcijo toksičnih snovi in ksenobiotikov, kamor spadajo tudi zdravila. S tem povzročijo zmanjšanje biološke uporabnosti (24).

Prenašalci, ki delujejo v absorptivni smeri, prenašajo snovi v kri in višajo njihovo koncentracijo v plazmi (22). Na ta način se absorbirajo aminokisline, peptidi, sladkorji, žolčne kisline, nevrotransmitorji in ksenobiotiki. Med prenašalce za privzem spadajo nekateri predstavniki iz naddružine SLC. Predstavnika te skupine sta peptidni prenašalec PEPT1 (*oligopeptide transporter*) in organski kationski prenašalec MCT1 (*monocarboxilic transporter I*) (24).

1.6 Absorpcija

Peroralna aplikacija je najpogosteji način aplikacije zdravil, saj je jemanje preprosto in neinvazivno (22,26). Pri zasnovi zdravil moramo upoštevati ekstremne vrednosti pH, prisotnost ali odsotnost hrane, razgradne encime, različno permeabilnost v posameznih delih GIT in gibljivost GIT (22).

Biološka uporabnost (BU) je definirana kot merilo za obseg in hitrost absorpcije učinkovine od mesta aplikacije v centralni krvni obtok po peroralni aplikaciji. Obseg absorpcije predstavlja delež aplicirane učinkovine, ki v nespremenjeni obliki doseže centralni krvni obtok. Časovni potek plazemske koncentracije učinkovine je odvisen tudi od kinetike procesa absorpcije.

Na stopnjo in obseg absorpcije vplivajo mnogi dejavniki:

- fizikalno-kemijski: pKa, topnost, stabilnost, lipofilnost, velikost delcev;
- fiziološki: pH v GIT, pretok krvi v GIT, praznjenje želodca, čas prehajanja skozi različne segmente GIT, mehanizmi absorpcije;
- dejavniki, povezani s farmacevtsko obliko (npr. tablete, kapsule, raztopine ...) (14, 26).

1.7 Biofarmacevtski sistem klasifikacije

Biofarmacevtski sistem klasifikacije (BCS) je orodje pri razvoju zdravil, ki nam pomaga oceniti parametre, ki so pomembni za absorpcijo. Njegov glavni namen je razdeliti učinkovine v 4 razrede glede na topnost in permeabilnost učinkovin skozi membrano stene GIT (glej Preglednico III). Eden izmed ciljev BCS je postavljanje korelacije med informacijami o sproščanju učinkovine *in vitro* ter profilom učinkovine *in vivo* (IVIVC).

Klasifikacija definira učinkovino kot visoko topno, če se v 250 mL pufra popolnoma raztopi najvišji odmerek zdravila v območju pH med 1 in 6,8 pri 37 ± 1 °C. Spojina je visoko permeabilna, če se po peroralni aplikaciji absorbira več kot 85 % odmerka (definicija po EMA) (28).

Preglednica III: Biofarmacevtski sistem klasifikacije.

BCS RAZRED	TOPNOST	PERMEABILNOST
I	Visoka	Visoka
II	Nizka	Visoka
III	Visoka	Nizka
IV	Nizka	Nizka

Spojine iz razreda I se načeloma dobro absorbirajo. Hitrost absorpcije kontrolira praznjenje želodca. V razred II spadajo spojine, za katere je značilno, da je absorpcija odvisna od raztapljanja. Ponavadi je počasnejša kot pri zdravilnih učinkovinah iz I. razreda, traja pa dalj časa. Absorpcijo pri učinkovinah iz razreda III nadzoruje permeabilnost. Spojine iz razreda IV so zaradi svojih lastnosti problematične za peroralno aplikacijo.

Dobro korelacijo IVIVC lahko pričakujemo pri spojinah, ki spadajo v I. in II. razred BCS. IVIVC skrajša obdobje razvoja zdravilnih učinkovin, prispeva k zmanjšanju stroškov in vodi k izboljšanju kvalitete produkta (14, 22, 29).

BCS predstavlja orodje pri iskanju novih učinkovin, pri predkliničnem in kliničnem razvoju zdravil, pri načrtovanju in razvoju različnih generičnih zdravil, zasnovana pa je bila predvsem za zmanjšanje števila bioekvivalentnih študij (14, 22).

2 NAMEN DELA

Namen diplomske naloge je razvoj analiznih metod HPLC in opredelitev permeabilnostnih lastnosti nekaterim izbranim novim zavircem holinesteraz: GUK-662, CB-14948874, GBB-47, GBB-49 in GBB-79.

Najprej bomo za spojine razvili analizne metode z visoko zmogljivo tekočinsko kromatografijo, pri čemer bomo spremenjali kromatografske pogoje do optimalne metode. Izbrati bomo morali ustrezno stacionarno in mobilno fazo, volumen injiciranja, temperaturo in valovno dolžino na detektorju.

Pred meritvijo permeabilnosti bomo preverili, ali so spojine primerno topne za izvedbo poskusa. Na podlagi ustreznih meritev bomo določili optimalno donorsko koncentracijo za vsako učinkovino posebej.

Sledilo bo merjenje permeabilnosti na ileumu podgane *in vitro*. Pri poskusu bomo uporabili dvostranske Sweetana-Grass difuzijske celice. Prehajanje učinkovin bomo merili v absorptivni (M-S) in eliminatorni smeri (S-M). Vzorce, ki jih bomo odvzeli med poskusom, bomo analizirali z analizno metodo, ki jo bomo predhodno razvili. Izračunali bomo navidezni permeabilnostni koeficient (P_{app}) in spojine uvrstili med visoko ali nizko permeabilne. S poskusi bomo poskusili ugotoviti, ali so spojine GUK-662, CB-14948874, GBB-47, GBB-49 in GBB-79 substrati katerega od prenašalcev, ki bi povzročil izrazito večjo permeabilnost v eliminatorni smeri. Permeabilnost bomo opredelili v smislu biofarmacevtske klasifikacije, izmerili pa bomo tudi morebitni aktivni transport teh spojin. Iz dobljenih rezultatov permeabilnosti bomo ugotavliali, ali se bodo testirane spojine v zadostni meri absorbirale iz prebavnega trakta. Vemo namreč, da dobro permeabilne spojine dobro prehajajo tudi HE-bariero, medtem ko je za ostale verjetno pomemben aktivni transport (30, 31). Iz teh podatkov bomo poskusili napovedovati, ali bodo prehajale HE-bariero.

Pri interpretiranju rezultatov permeabilnosti si bomo pomagali z nekaterimi fizikalno-kemijskimi lastnostmi spojin. V literaturi bomo poiskali podatke o lastnostih učinkovin, ki spadajo v isto terapevtsko skupino zdravil in jih že uporabljajo v terapiji Alzheimerjeve bolezni.

3 MATERIALI IN METODE

3.1 Reagenti

- natrijev hidrogenkarbonat: stopnja čistosti: p.a.; MerckKGaA, Nemčija
- natrijev dihidrogenfosfat monohidrat: stopnja čistosti: p.a.; MerckKGaA, Nemčija
- natrijev klorid: stopnja čistosti: p.a.; MerckKGaA, Nemčija
- kalijev klorid: stopnja čistosti: p.a.; MerckKGaA, Nemčija
- kalcijev klorid dihidrat: stopnja čistosti: p.a.; MerckKGaA, Nemčija
- magnezijev klorid heksahidrat: stopnja čistosti: p.a.; Riedel-de HaenSeelze, Nemčija
- dinatrijev hidrogenfosfat dihidrat: stopnja čistosti: p.a.; MerckKGaA, Nemčija
- D-glukoza: stopnja čistosti: p.a.; Sigma Aldrich, St. Louis, ZDA
- manitol: stopnja čistosti: p.a.; Sigma Aldrich, Nemčija
- acetonitril: stopnja čistosti: HPLC gradient grade; Sigma Aldrich, St. Louis, ZDA
- ortofosforjeva kislina: stopnja čistosti: p.a.; MerckKGaA, Nemčija
- kalijev dihidrogenfosfat: stopnja čistosti: p.a.; MerckKGaA, Nemčija
- DMSO: stopnja čistosti: p.a.; Sigma Aldrich, Nemčija
- amoniak: stopnja čistosti: p.a.; PomreacQuimica S.A.U., Castellar del Valles, Španija

3.2 Raztopine

3.2.1 Osnovne raztopine preiskovanih spojin

- Osnovna 10 mM raztopina GUK-662:
3,76 mg GUK-662 raztopimo v 850,0 µl DMSO.
- Osnovna 10 mM raztopina GBB-79:
2,40 mg GBB-79 raztopimo v 501,0 µl DMSO.
- Osnovna 10 mM raztopina GBB-47:
1,32 mg GBB-47 raztopimo v 343,3 µl DMSO.
- Osnovna 10 mM raztopina GBB-49:
3,52 mg GBB-49 raztopimo v 837,0 µl DMSO.
- Osnovna 10 mM raztopina CB-14948874:
2,80 mg CB-14948874 raztopimo v 824,7 µl DMSO.

3.2.2 Raztopine za razvoj analizne metode

- Fosfatni pufer s pH 3,5:
Steklenico smo napolnili z 1 l bidestilirane vode. Opremili smo jo z magnetom in jo postavili na električno mešalo. Natehtali smo 6,8 g KH_2PO_4 in ga raztopili v bidestilirani vodi. Z ortofosforno kislino smo raztopino nakisali do pH 3,5.
- Razredčena fosforna kislina s pH 2,5:
Steklenico smo napolnili z 1 l bidestilirane vode. Opremili smo jo z magnetnim mešalom in jo postavili na električno mešalo. Po kapljicah smo dodajali ortofosforno kislino do pH 2,5.

3.2.3 Raztopine za merjenje permeabilnosti

- Ringerjev pufer; pH 7,4:
Sestava: 4,2 g NaHCO_3 , 0,11 g $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{xH}_2\text{O}$, 13,082 g NaCl , 0,746 g KCl , 0,352 g $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 0,488 g $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 0,569 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$
Priprava: Dvolitrsko bučko smo napolnili z bidestilirano vodo do treh četrtin. Opremili smo jo z magnetnim mešalom, jo postavili na električno mešalo. Nastavili smo primerno hitrost mešanja in začeli dodajati navedene snovi po predpisanim zaporedju. Paziti smo morali, da smo dodali naslednjo sol šele takrat, ko se je predhodna popolnoma raztopila. Na koncu smo z bidestilirano vodo bučko dopolnili do oznake.
- 10 mM glukoza za prenos tkiva:
Natehtali smo 0,904 g glukoze in jo raztopili v 500 mL Ringerjeve raztopine.
- 625 mM raztopina glukoze:
2,815 g glukoze smo raztopili v 25 mL bidestilirane vode.
- 625 mM raztopina manitola:
2,850 g manitola smo raztopili v 25 mL bidestilirane vode.
- 10 mM raztopina glukoze:
1,6 mL 625 mM raztopine glukoze smo dali v 100 mL bučko in dopolnili do oznake z Ringerjevim pufrom.
- 10 mM raztopina manitola:
1,6 mL 625 mM raztopine manitola smo dali v 100 mL bučko in dopolnili do oznake z Ringerjevim pufrom.
- 3 M raztopina KCl: 55,9 g KCl raztopimo v 250 mL demineralizirane vode

- 3–4 % raztopina agarja v 3 M KCl: 100 mL 3 M KCl smo segrevali na vodni kopeli, dodali 3,5 g agarja in počasi mešali.

3.3 Aparature

- HPLC: Agilent 1100 Series z razplinjevalcem, binarno črpalko, hlajenim avtomatskim vzorčevalnikom za mikrotitrsko ploščo, termostatom za kolono in detektorjem z nizom diod.
- Digitalni termometer: Testo 926.
- pH meter: WTW Ph 330i.
- Analitska tehnika: Mettler Toledo.
- Tehnika: Tehnika EXACTA 300EB.
- Električni mešali: Tehnika ROTAMIX 550MMH in Tehnika MM-551.
- Centrifuga: Tehnika centric 322A.
- Ultrazvočna kadička: Iskra PIO d.o.o., Sonis 4.
- Difuzijske celice EasyMount z elektrodami in naprava za merjenje električnih parametrov (VCC MC8 in VCC MC6), Physiologic Instruments Inc., ZDA.
- Termostatirana vodna kopel: M3 Lauda.

3.4 Fizikalno-kemijske lastnosti spojin

S pomočjo programa ChemAxon smo izračunali nekatere fizikalno-kemijske lastnosti spojin. Iz strukturne formule posamezne molekule smo določili molekulsko maso (MM), porazdelitveni koeficient ($\log P$), koeficient distribucije ($\log D$), konstanto ionizacije (pK_a) in polarno površino molekule (PSA).

3.5 Razvoj analizne metode

Analizno metodo smo razvijali s tekočinsko kromatografijo visoke ločljivosti. Izbrati smo morali ustrezeno stacionarno in mobilno fazo, volumen injiciranja, temperaturo in valovno dolžino na detektorju. Pri določanju ustreznih pogojev smo si pomagali z gradientno elucijo, kjer se je med analizo delež acetonitrila spremjal. Razpon deleža je bil odvisen od uporabljenega pufra. Fosfatni pufer ni bil primeren za merjenje pri višjih deležih acetonitrila, ker bi se oboril (16). Valovno dolžino na detektorju smo nastavili na 274 nm.

Z gradientno elucijo smo pod enakimi pogoji kot preiskovano spojino morali posneti tudi kromatogram uporabljenih topil. Uporabili smo 1 % DMSO v bidestilirani vodi. Primerjali smo kromatograme topil in vzorcev. Iz kromatogramov spojin smo izločili kromatografske vrhe, ki so pripadali topilu. Ostal nam je kromatografski vrh, ki je pripadal preiskovani spojni. Določili smo retencijski čas in valovno dolžino vrha.

Nadaljevali smo z izokratsko elucijo. Mobilna faza je bila enake sestave med celotno analizo. Na detektorju smo nastavili ustrezeno valovno dolžino. Iz kromatograma gradientne elucije smo lahko izračunali primeren delež acetonitrila tako, da analizna metoda ni trajala predolgo. Želen retencijski čas je bil približno dveh minut oziroma najmanj dvakrat daljši od časa topila (mrtvega časa).

Posneli smo kromatogram in poiskali kromatografski vrh spojine. Določili smo mu retencijski čas, površino in višino ter šum bazne linije.

3.6 Permeabilnost

3.6.1 Topnost v Ringerjevem pufru

Pred začetkom merjenja permeabilnosti smo preverili tudi topnost spojin v Ringerjevem pufru s pH 7,4. Poskus smo izvedli tako, da smo v čaši pripravili donorsko raztopino s koncentracijo 196 µM. Pokrili smo jo s parafilmom in jo pustili stati 2 uri. V tem času se je nekaj učinkovine oborilo, določen delež spojine pa se je raztopil v Ringerjevem pufru. Vzorce smo nato centrifugirali 10 minut pri 2000 vrtljajih/min na sobni temperaturi. Supernatant, v katerem je bila raztopljena spojina, smo dali analizirati na HPLC. Z metodo umeritvene premice smo ugotovili mejno koncentracijo preiskovane spojine, pri kateri še ni prišlo doobarjanja.

3.6.2 Merjenje permeabilnosti na podganjem črevesju *in vitro*

Permeabilnost na izoliranem črevesju podgane smo merili s pomočjo dvoprostornih difuzijskih celic tipa Sweetana Grass; Easy mount. Volumen posameznega prostora v difuzijski celici je znašal 2,5 mL, površina tkiva pa 1 cm^2 . Vsaka difuzijska celica je bila opremljena z dvema tokovnima in dvema napetostnima elektrodama.

Permeabilnost smo merili skozi tkivo tankega črevesa podgane, natančneje ileuma. Permeabilnostni koeficient (P_{app}) smo pri vseh preiskovanih spojinah določali iz mukozne na serozno stran (M-S) in iz serozne na mukozno stran (S-M).

3.6.2.1 Priprava tkiva in vzorcev

Poskusi so bili izvedeni v skladu s predpisi za zaščito živali Republike Slovenije in so bili registrirani na Veterinarski upravi Republike Slovenije (23). Pred eksperimentom so podgane postili 18 ur. Po evtanaziji in laparotomiji je bilo črevesje za prevoz shranjeno v ledeno hladni 10 mM raztopini glukoze v Ringerjevem pufru, ki je bila prepihana z karbogenom.

Podganje črevo smo sprali z ledeno hladno 10 mM raztopino glukoze v Ringerjevem pufru. Prerezali smo ga vzdolž mezenterične linije in ga razrezali na 3 cm dolge dele. Izpustili smo Peyerjeve ploščice. Posamezne segmente smo vpeli v nastavke tako, da je bila mukozna stran obrnjena navzdol, proti iglicam. Med poskusom je bila serozna stran obrnjena na desno, mukozna stran pa na levo. Nastavek Easy mount smo vpeli med dve akrilni ploščici Sweetana-Grass difuzijske celice. Takoj smo dodali ustrezno inkubacijsko raztopino: na mukozno stran 10 mM manitol in na serozno stran 10 mM glukozo v Ringerjevem pufru. Temperaturo inkubacijske raztopine smo vzdrževali med 36 in 37 °C s pomočjo termostatirane vodne kopeli. Stalno prepihanje s karbogenom je omogočalo oksigenacijo tkiva in ustrezno mešanje raztopin. Med poskusom smo morali biti pozorni na morebitno puščanje celic na akceptorski strani difuzijskih celic. Celic, ki so puščale, pri izračunu P_{app} nismo mogli uporabiti.

Pred dodatkom vzorca smo difuzijske celice z inkubacijsko raztopino in vpetim tkivom pustili čakati približno 20 minut. Po tem času smo dodali vzorec preiskovane spojine s koncentracijo 10 mM. Takoj smo odvzeli 50 µL začetne donorske raztopine. Vsakih 25 minut smo iz akceptorske strani difuzijske celice vzeli 250 µL vzorca. Volumen smo nadomestili z ustrezno inkubacijsko raztopino. Postopek smo izvajali 175 minut. Na koncu smo za analizo vzeli še 50 µL končne donorske raztopine.

3.6.2.2 Elektrofiziološki parametri

Elektrofiziološke parametre smo merili s pomočjo šestkanalnega (VCC MC6) in osemkanalnega (VCC MC8) napetostnega tokovnega izvira (ang. *Voltage-current clamp*). Difuzijske celice so bile opremljene z dvema paroma Ag/AgCl elektrod. Dve elektrodi sta merili napetost, drugi dve pa sta prevajali tok, ki je moral steći skozi tkivo, da je transepitelijski potencial padel na nič.

Meriti smo jih lahko začeli, ko sta bili asimetrija elektrod in upornost raztopine kompenzirani ter ko je bilo v celice vstavljeno tkivo. Vsakih 25 min smo tekom poskusa

izmerili vrednosti transepiteljskega električnega potenciala (Pd v mV) in kratkostičnega toka (I_{SC} v μA). S pomočjo Ohmovega zakona (Enačba 1) smo izračunali transepiteljski električni upor (TEER).

$$TEER[\Omega cm^2] = \frac{Pd[mV] \cdot 1000}{I_{SC}[\mu A]} \quad \text{Enačba 1}$$

S pridobljenimi in izračunanimi elektrofiziološkimi parametri smo ovrednotili vitalnost in integriteto tkiva.

V primeru, da je bilo tkivo poškodovano, odmrlo ali je imelo slabšo vitalnost, smo dobili nižjo absolutno vrednost električnega potenciala (Pd), kratkostičnega toka (I_{SC}) in posledično nižjo transepiteljsko upornost tkiva. Tkivo, ki je odmrlo že v začetku poskusa, smo zamenjali z novim. Kadar smo opazili odmiranje tkiva med poskusom, smo za izračun permeabilnostnega koeficiente uporabili vrednosti, pridobljene, dokler je bilo tkivo še vitalno, ali pa smo meritve na takem segmentu tkiva izpustili iz obdelave podatkov.

Na koncu poizkusa smo ocenili vitalnost tkiva tako, da smo dodali 100 μl 625 mM glukoze na mukozno stran difuzijske celice. Dvig absolutne vrednosti električnega potenciala je bil dokaz, da je tkivo sposobno za kotransport glukoze z natrijevimi ioni. S tem smo potrdili, da vitalnost tkiva na koncu poskusa ni bila zmanjšana do te mere, da bi lahko vplivala na izmerjeno permeabilnost testirane substance (23). Asimetrijo elektrod smo izmerili potem, ko smo jih odstranili iz difuzijskih celic in njihove konice pomočili v Ringerjev pufer ali 3M KCl za shranjevanje elektrod.

3.6.2.3 Analiza preiskovanih spojin

Vzorce smo analizirali s HPLC. Pri vsaki spojni smo nastavili pogoje, ki smo jih predhodno določili z analizno metodo. Začetne in končne donorske raztopine smo 5-krat redčili z Ringerjevim pufrom, da so bile primernih koncentracij za analizo s HPLC.

3.6.2.4 Izračun permeabilnostnega koeficiente (P_{app})

Permeabilnostni koeficient smo izračunali s pomočjo rezultatov, ki smo jih dobili tekom poskusa merjenja permeabilnosti in med analizo vzorcev s HPLC.

Množino učinkovine, ki preide skozi tkivo v določenem času (Q_t), smo izračunali s pomočjo Enačbe 2:

$$Q_t = \left(\sum_{i=1}^{N-1} V_s \cdot C_i \right) + C_t \cdot V_A \quad Enačba\ 2$$

Q_t ...množina učinkovine, ki je prešla skozi tkivo v času t [mol]

V_s ...volumen vzorca [L]

C_i ...koncentracije učinkovine na akceptorski strani izmerjene v prejšnjih vzorcih [mol/L]

C_t ... koncentracije učinkovine na akceptorski strani v posameznih časovnih točkah [mol/L]

V_A ...volumen akceptorske raztopine [L]

Hitrost difuzije $\frac{dQ}{dt}$ [mol/h] smo izrazili kot:

$$\frac{dQ}{dt} = k \cdot (C_d - C_a) \quad Enačba\ 3$$

k ...konstanta difuzije [L/h]

C_d ...koncentracija preiskovane spojine na donorski strani [mol/L]

C_a ...koncentracija preiskovane spojine na akceptorski strani [mol/L]

Med poskusom je veljalo, da je $C_d \gg C_a$. Enačbo smo lahko poenostavili, saj se je vrednost člena ($C_d \gg C_a$) spremenjala minimalno.

$$\frac{dQ}{dt} = k \cdot C_d = k_d \quad Enačba\ 4$$

k_d ...nova konstanta difuzije [mol/h]

Integrirali smo Enačbo 4 in dobili:

$$\int_0^{Q(t)} dQ = k_d \cdot \int_0^t dt \quad Enačba\ 5$$

Q_t smo izračunali s pomočjo Enačbe 6:

$$Q_t = k_d \cdot t + n \quad Enačba\ 6$$

Konstanto difuzije (k_d) smo dobili s pomočjo linearne regresije. Začetnega nelinearnega dela krivulje $Q(t)$ nismo upoštevali.

S pomočjo konstante difuzije (k_d) smo izračunali pretok [$\frac{nmol}{h \cdot cm^2}$]:

$$J = \frac{k_d}{A} \quad Enačba\ 7$$

A ...površina tkiva, skozi katero snov difundira [cm^2]

Na podlagi pretoka (J) smo izračunali permeabilnostni koeficient [cm/s]:

$$P_{app} = \frac{J}{C_d} \quad Enačba\ 8$$

Za koncentracijo donorske raztopine (C_d) smo vzeli povprečje donorskih koncentracij, ki so bile izmerjene v tem poskusu.

3.6.3 Statistična obdelava

Za statistično obdelavo podatkov smo uporabili program Microsoft Excel 2007.

Morebitno statistično značilnost razlik med prehajanjem iz S-M in M-S smeri smo določali z izračunom efluksnega razmerja, F-testom in Studentovim t-testom. Pri obdelavi podatkov smo uporabili dvostransko tveganje. Izbrali smo dovoljeno napako $\alpha = 0,05$.

Najprej smo izračunali aritmetično sredino (AS) permeabilnostnih koeficientov, standardno deviacijo (SD), standardno napako aritmetične sredine (SEM) in relativno standardno deviacijo (RSD) ter določili število meritev (n).

Efluksno razmerje je razmerje povprečij permeabilnosrnh koeficientov iz serozne na mukozno stran in iz mukozne na serozno stran. Izračunali smo ga s pomočjo Enačbe 9:

$$ER = \frac{P_{app}(S - M)}{P_{app}(M - S)} \quad Enačba\ 9$$

ER...efluksno razmerje

S F-testom smo najprej morali ugotoviti, ali sta varianci med dvema skupinama vzorcev enaki ali različni.

Izračun variance:

$$s^2 = \frac{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2}{n-1} \quad Enačba\ 10$$

s^2 ...varianca vzorca

x_i ...posamezna meritev P_{app} v vzorcu

n ... število meritev

\bar{x}, \bar{y} ...povprečna vrednost permeabilnostnih koeficientov

Postavili smo dve hipotezi:

$$H_0 : s_x^2 = s_y^2$$

$$H_1 : s_x^2 \neq s_y^2$$

Ničelna hipoteza pravi, da se varianci dveh skupin vzorcev ne razlikujeta, alternativna hipoteza pa, da se varianci razlikujeta.

S pomočjo F-testa smo morali ugotoviti, ali sta varianci dveh skupin vzorcev enaki ali ne. Pri izračunu smo uporabili Enačbo 11:

$$F = \frac{s_x^2}{s_y^2} \quad \text{Enačba 11}$$

F_{eks} ... eksperimentalna vrednost F

F_{tab} ... tabelarična vrednost F

Če je bil F_{eks} manjši od F_{tab} in je bila izračunana verjetnost $p > \alpha$, ničelne hipoteze nismo zavrnili. Privzeli smo, da sta varianci enaki. V tem primeru smo za ugotavljanje enakosti aritmetičnih sredin uporabili Studentov t-test za enake variance. Pri izračunu smo uporabili Enačbo 12:

$$t = \frac{\bar{x} - \bar{y}}{s} \cdot \sqrt{\frac{m \cdot n}{m + n}} \quad \text{Enačba 12}$$

Če je bil F_{eks} večji od F_{tab} in je bila izračunana verjetnost $p < \alpha$, smo ničelno hipotezo zavrnili ter privzeli, da sta varianci različni. V tem primeru smo uporabili Studentov t-test za različne variance. Uporabili smo Enačbo 13:

$$t = \frac{\bar{x} - \bar{y}}{\sqrt{\frac{s_x^2}{m} + \frac{s_y^2}{n}}} \quad \text{Enačba 13}$$

t_{eks} ... eksperimentalna vrednost t

t_{tab} ... tabelarična vrednost t

Če je bil t_{eks} manjši od t_{tab} in je bila $p > \alpha$, smo ničelno hipotezo o enakosti aritmetičnih sredin sprejeli. S tem smo ugotovili, da se povprečji permeabilnostnih koeficientov v smeri S-M in smeri M-S ne razlikujeta signifikantno. Če pa je bil t_{eks} večji od t_{tab} in $p < \alpha$, smo razlike med permeabilnostnimi koeficienti lahko potrdili, saj je bila razlika signifikantna.

4 REZULTATI IN RAZPRAVA

4.1 Fizikalno-kemijske lastnosti

Pri delu z novimi inhibitorji holinesteraz smo si lahko pomagali le z njihovimi strukturnimi formulami. Iz njih smo lahko izračunali posamezne vrednosti fizikalno-kemijskih parametrov, ki imajo pomemben vpliv na farmakokinetiko v organizmu. Pri interpretaciji rezultatov smo si pomagali z molekulsko maso (MM), porazdelitvenim koeficientom ($\log P$), koeficientom distribucije ($\log D$), konstanto ionizacije (pK_a) in polarno površino molekule (PSA). Vrednosti so navedene v Preglednici IV. Razumevanje teh lastnosti lahko s pomočjo meritev in z ustreznim predvidevanjem pomembno vpliva na razvoj učinkovine.

Preglednica IV: Fizikalno-kemijski parametri zaviralcev holinesteraz.

Spojina	MM [g/mol]	Log P	Log D (pH 7,4)	PSA	pKa (T=25 °C)
GUK-662	442,59	4,86	2,80	32,78	9,47
GBB-47	384,51	4,68	2,56	32,34	9,53
GBB-49	420,57	4,43	3,06	49,41	8,74 10,10
GBB-79	478,65	4,61	3,22	49,85	8,77
CB-14948874	339,45	2,97	1,59	46,68	8,76
Rivastigmin	250,34	2,41	0,91	32,78	8,89
Donepezil	379,49	4,21	2,96	38,77	8,62
Galantamin	287,35	1,16	-0,36	41,93	8,91

4.2 Analizna metoda

Za spojine GUK-662, CB-14948874, GBB-47, GBB-49 in GBB-79 smo pred začetkom merjenja permeabilnosti na podganjem črevesju *in vitro* morali razviti analizno metodo s pomočjo sistema HPLC. Z analizno metodo smo analizirali vzorce, ki smo jih odvzeli v različnih časovnih točkah med poskusom permeabilnosti. Iz posnetih kromatogramov smo lahko izračunali množino spojine in določili P_{app} spojin.

Razvoj analizne metode smo začeli z gradientno elucijo. Posneti kromatogram gradientne elucije smo primerjali s kromatogramom topila (1 % DMSO v bidestilirani vodi), ki smo ga posneli pod enakimi kromatografskimi pogoji. Tako smo izločili vrhove, ki so pripadali topilu oziroma njegovim nečistotam, in iz preostalih kromatografskih vrhov poskušali določiti kromatografski vrh spojine. Sledila je izokratska elucija, s katero smo spojinam natančneje določili kromatografske pogoje.

Pri vseh preiskovanih spojinah smo kromatografsko analizo izvedli pri temperaturi 55 °C. Zaradi analize velikega števila vzorcev smo čas analizne metode poskusili približati 2 minutama. Med iskanjem ustreznih kromatografskih pogojev smo morali paziti tudi, da v koloni ni bilo previsokega tlaka. Med razvijanjem analizne metode smo pri vseh spojinah injicirali 10 µL standarda. Pri analiziranju vzorcev, odvzetih med poskusom permeabilnosti, smo volumen injiciranja iz 10 µL povišali na 100 µL, da smo spojino lahko zaznali že pri nižjih koncentracijah.

Umeritvena premica

Umeritvena premica je nujno potrebna za kvantitativno določanje, v postopku razvoja HPLC analizne metode pa je tudi pomembno orodje, s katerim lahko opazimo morebitno vezavo preiskovane spojine na laboratorijsko plastiko in steklovino ali pa obarjanje preiskovane spojine iz prenasičenih raztopin zaradi prenizke topnosti.

Iz 100 µM osnovne raztopine smo pripravili 10 raztopin preiskovane spojine. Redčili smo jih z Ringerjevim pufrom po standardni shemi redčitev, ki zajema zelo veliko območje koncentracij preko treh velikostnih razredov. Njihove koncentracije so bile od 0,02 do 20 µM. V diagram (x-os je koncentracija, y-os je površina pod krivuljo) smo nanašali ustrezne vrednosti in jim priredili premico pridobljeno z linearno regresijo.

Na narisane diagrame smo vnesli manj točk, kot je bilo pripravljenih raztopin. Razlog za to je, da s HPLC analizo praviloma ne moremo posneti kromatografskih vrhov pri raztopinah z najnižjimi koncentracijami.

V nekaterih primerih točke niso ležale na premici. Razlog za to je bil obarjanje spojin v raztopinah z visokimi koncentracijami. V teh primerih smo linearnost dosegli tako, da smo za umeritveno premico uporabili 7 raztopin s koncentracijami od 0,02 do 2 µM. 10 mM osnovno raztopino smo redčili z DMSO do 10 µM. Redčenje do nižjih koncentracij smo nadaljevali z Ringerjevim pufrom. Tudi v tem primeru smo narisali graf odvisnosti

površine vrha od koncentracije analita. Z nižjimi koncentracijami in redčenjem z DMSO smo preprečili obarjanje ter dobili ustreznoumeritveno premico.

Vse preiskovane spojine so se vezale na plastiko. Raztopine, s katerimi smo delali umeritveno premico, smo zato morali redčili v steklenih vialah.

Podatke smo obdelali s pomočjo linearne regresije in določili enačbo premice. Dodaten kriterij za sprejemljivost enačbe je bil determinacijski koeficient (r^2).

4.2.1 GUK-662

Razvijanje analizne metode

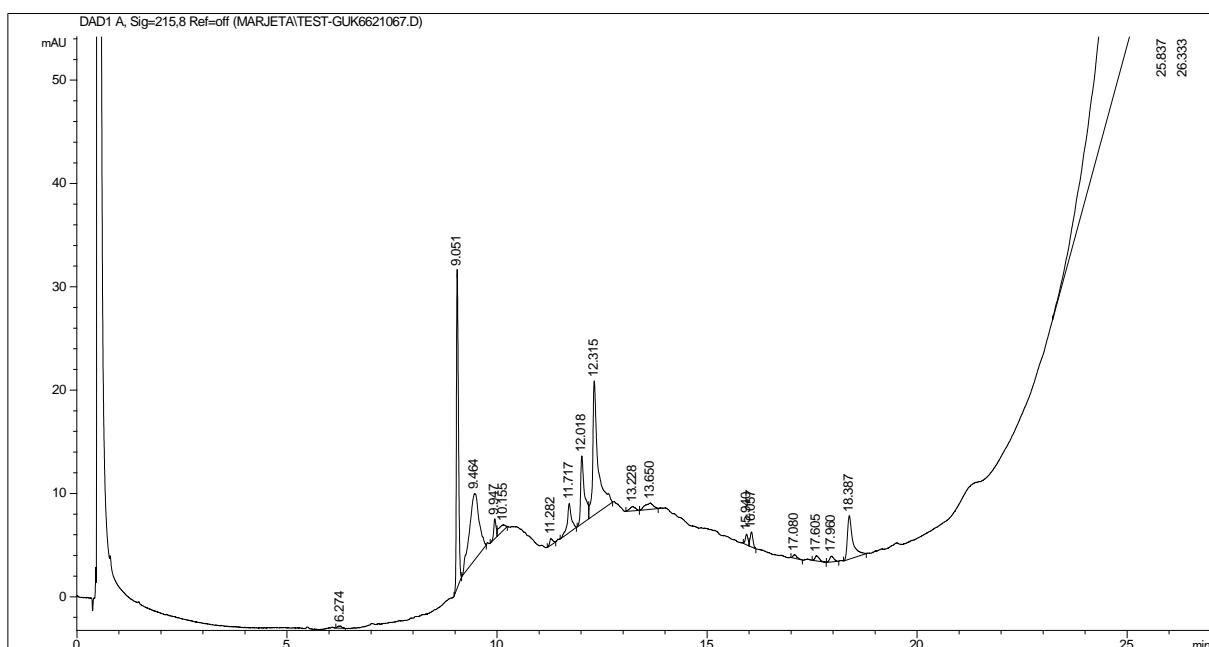
Analizirali smo $15 \mu\text{M}$ raztopino GUK-662 v 1 % DMSO. V Preglednici V so prikazane različne preizkušene metode, s katerimi smo poskusili analizirati spojino. Pri razvijanju analizne metode smo uporabili različne kolone in mobilne faze. Spreminjali smo tudi pretok mobilne faze in temperaturo. Dvig temperature iz 30°C na 55°C je bil posledica prehoda iz monolitne kolone na kolono z delci.

Preglednica V: Pogoji različnih preizkušenih metod pri spojni GUK-662.

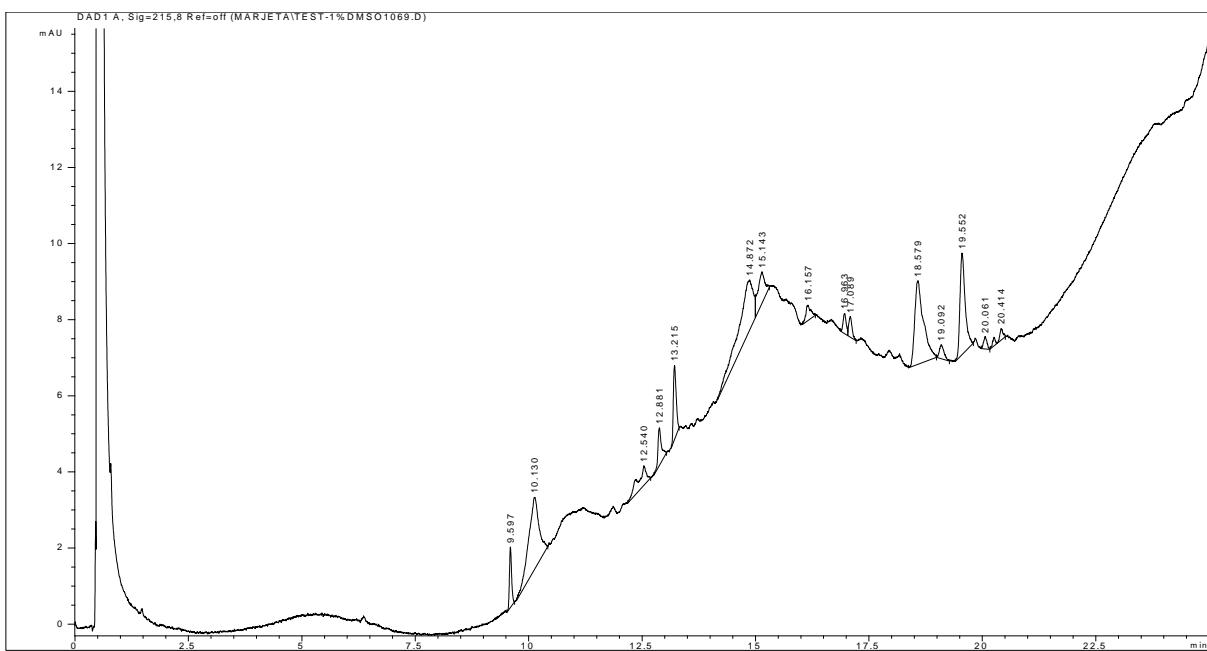
Kolona	Mobilna faza	Deleži acetonitrila oz. metanola [%]	Pretok [mL/min]	Temperatura [$^\circ\text{C}$]
Onyx monolithic C18 (50 x 2,0 mm)	50 mM amonijev acetat in acetonitril	80, 60, 40, 25	1,25	30
	fosfatni pufer s pH 3,5 in acetonitril	20→40, 15, 40→60	1,25	30
	fosfatni pufer s pH 3,5 in acetonitril	55, 45, 35	2,5	30
Gemini 3u C6-Phenyl 110A (50 x 4,60 mm, 3 micron)	Bidestilirana voda in metanol	1→100	2,5	55
Synergi 4u Polar-RP (80A, 250 x 4,6 mm, 4 micron)	Bidestilirana voda in metanol	1→30	1	55
Zorbax Eclipse XDB-C18 (4,6 x 75 mm, 3,5 μm)	Razredčena fosforna kislina s pH 2,5 in acetonitril	1→100, 28, 34	2	55

Analizno metodo smo uspešno razvili s kolono Zorbax Eclipse XDB-C18 (4,6 x 75 mm, 3,5 µm). Mobilna faza je bila sestavljena iz razredčene fosforne kisline s pH 2,5 in acetonitrila. Z gradientno elucijo smo spremajali delež acetonitrila od 1 do 100 % in tako na kromatogramu iskali vrh preiskovane spojine. Valovno dolžino na detektorju smo nastavili na 274 nm. Pretok mobilne faze je bil 2 mL/min. Temperaturo smo nastavili na 55 °C. Injicirali smo 10 µL vzorca.

Po primerjavi kromatogramov spojine (Slika 1) in topila 1 % DMSO v bidestilirani vodi (Slika 2) smo kromatografski vrh spojine GUK-662 identificirali pri retencijskem času 9,051 min. Na UV-VIS spektru smo našli absorpcijski maksimum spojine pri valovni dolžini 224 nm (Slika 4). Površina vrha je bila 101,5 mAU×s, višina pa 30,8 mAU.



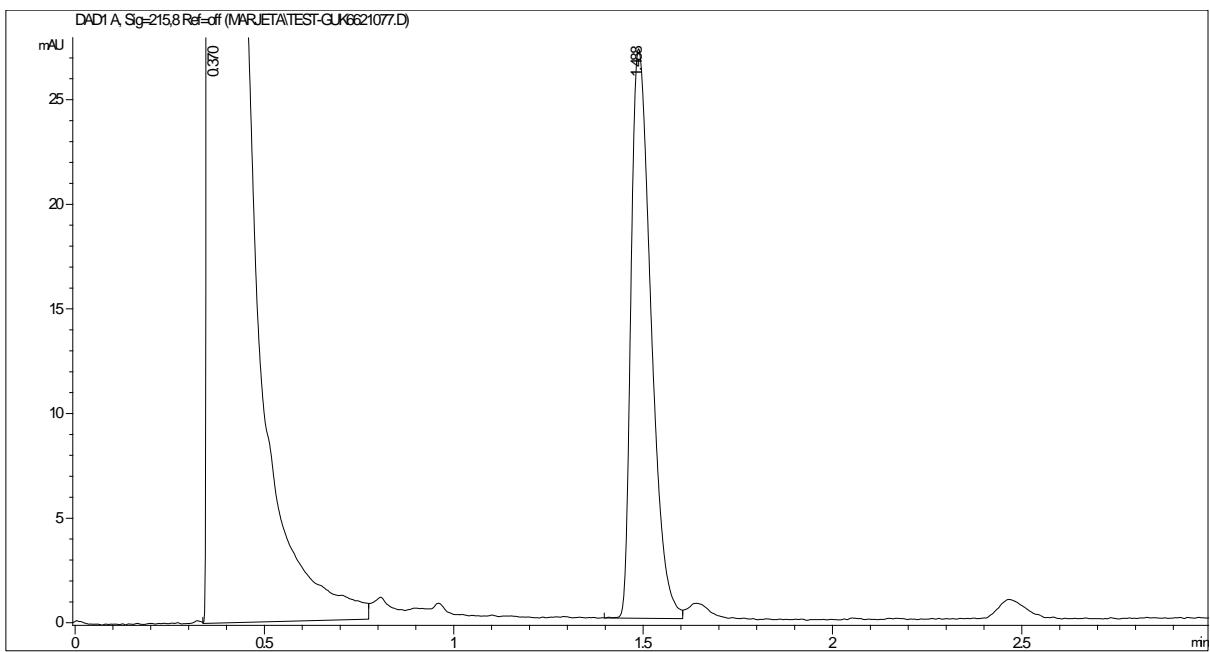
Slika 1: Gradientna elucija GUK-662.



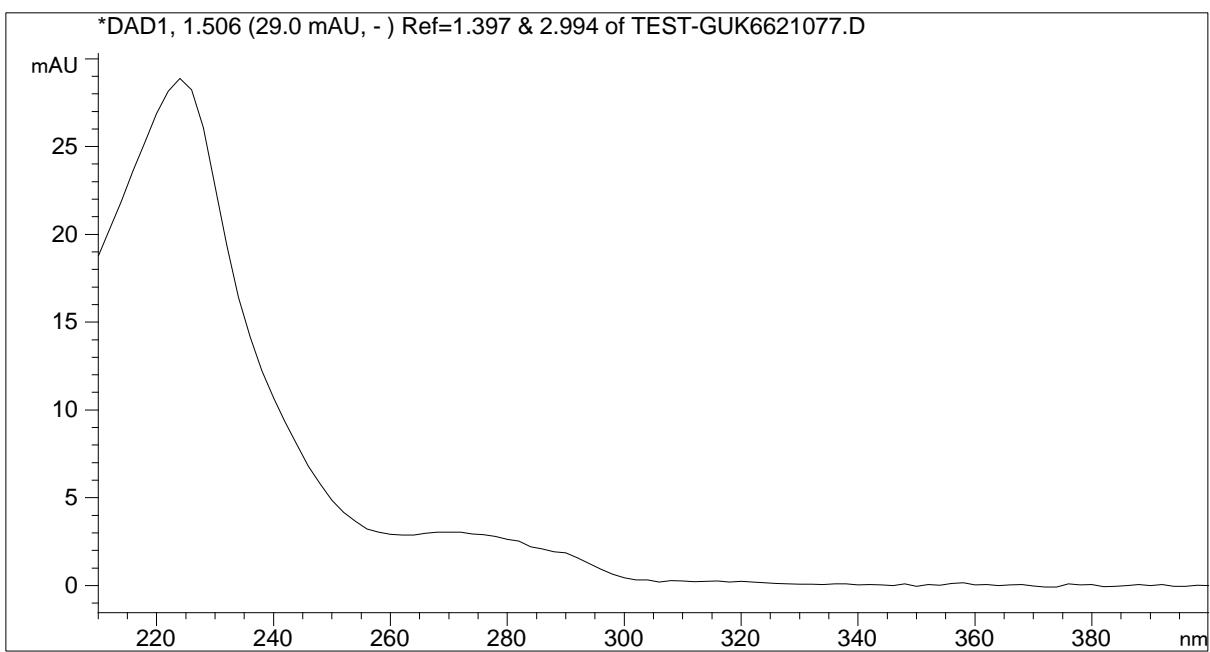
Slika 2: Gradientna elucija topila (1 % DMSO v bidestilirani vodi).

Razvijanje analizne metode smo nadaljevali z izokratsko elucijo. Mobilna faza je bila sestavljena iz 34 % acetonitrila v razredčeni fosforni kislini s pH 2,5. Valovno dolžino na detektorju smo nastavili na 224 nm. Temperatura, pretok in volumen injiciranja so ostali enaki kot pri gradientni eluciji.

Kromatografski vrh spojine GUK-662 smo dobili pri retencijskem času 1,488 min (glej Sliko 3). Površina vrha je bila 99,9 mAU×s, višina vrha spojine pa 27,2 mAU. Retencijski čas topila je znašal 0,370 min. Šum na bazni liniji je bil 0,07 mAU. Čas analize smo nastavili na 2 min.



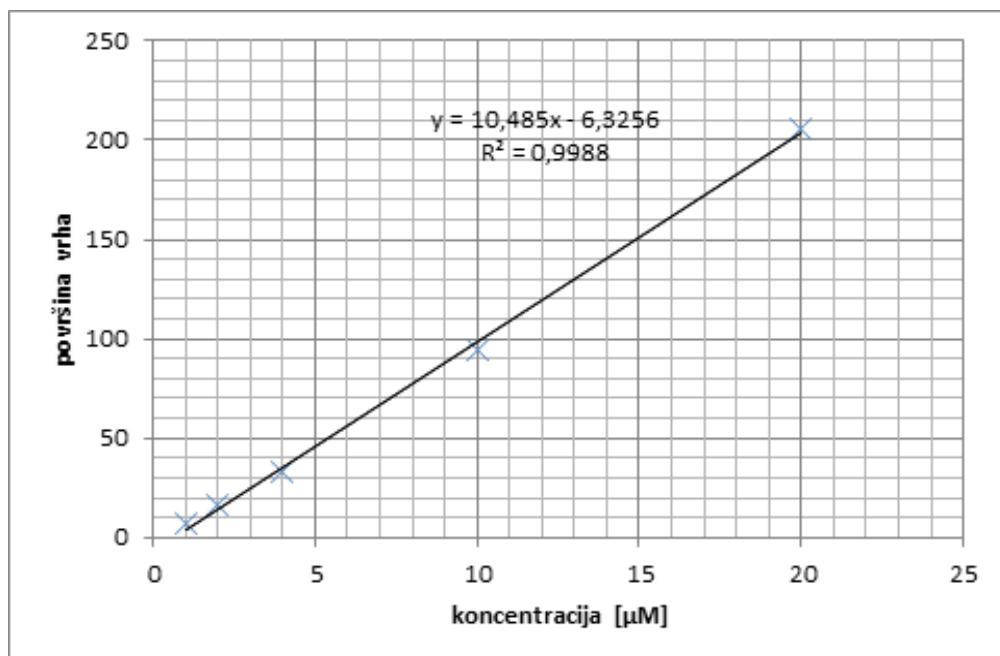
Slika 3: Izokratska elucija GUK-662.



Slika 4: UV-VIS spekter GUK-662.

Umeritvena premica

Spojini GUK-662 smo naredili umeritveno premico, ki je predstavljena na Sliki 5.



Slika 5: Umeritvena premica za GUK-662.

Končna analizna metoda

Uspešno razvita analizna metoda pri spojini GUK-662 in njeni končni parametri so predstavljeni v Preglednici VI.

Preglednica VI: Analizna metoda za določevanje GUK-662.

GUK-662	Kolona	Zorbax Eclipse XDB-C18 (4,6 x 75 mm, 3,5 μm)
	Pufer	66 % razredčena fosforna kislina pH 2,5
		34 % acetonitril
	Pretok	2 mL/min
	Temperatura	55 °C
	Volumen injiciranja	100 μL
	Valovna dolžina	224 nm
	Čas analize	2 min

4.2.2 GBB-47

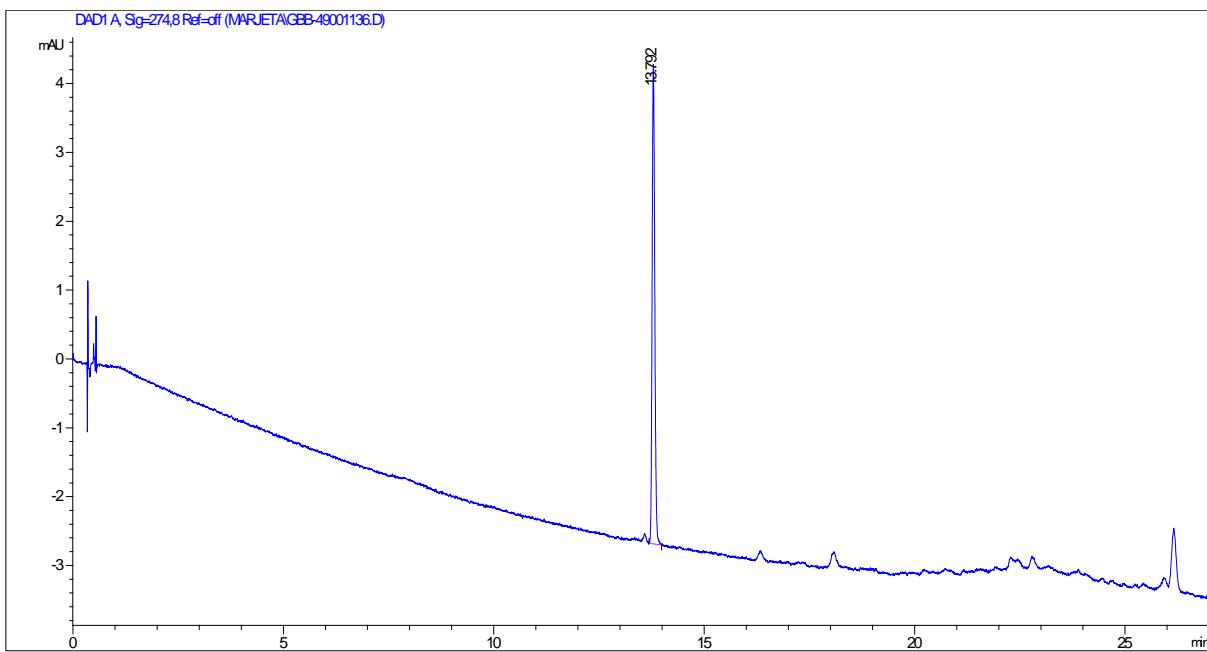
Razvijanje analizne metode

Pri razvoju analizne metode smo uporabili 10 µM raztopino GBB-47 v 1 % DMSO. V Preglednici VII smo predstavili stopnje razvoja analizne metode in vse parametre, ki smo jih spremenjali.

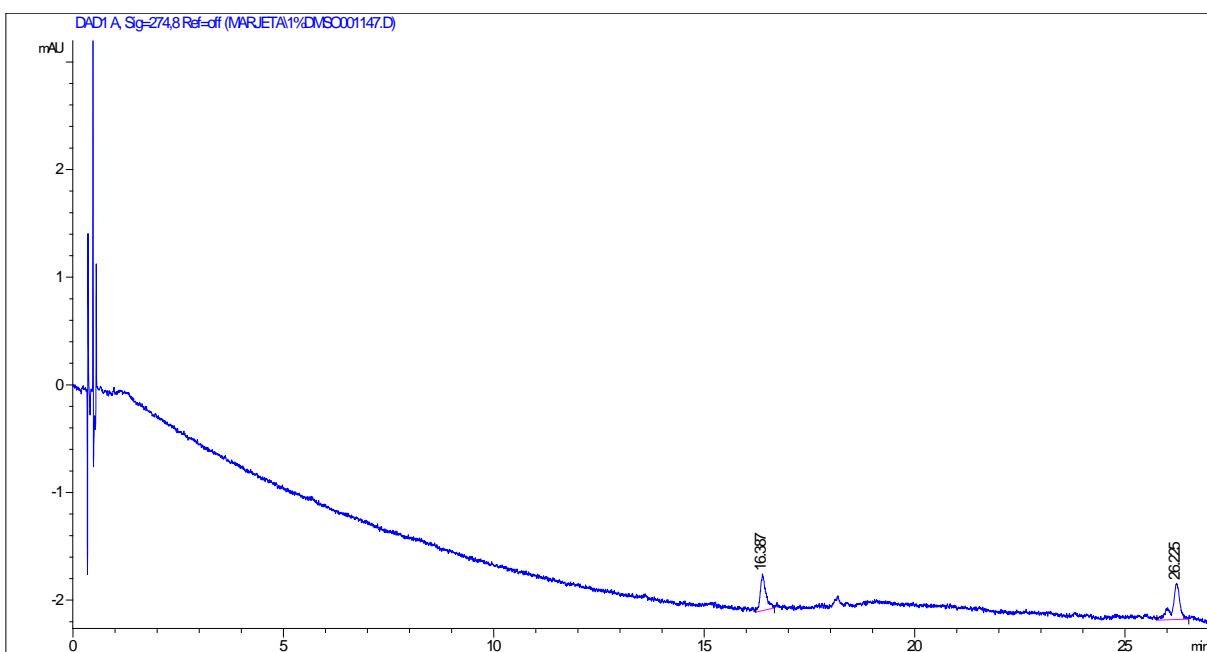
Preglednica VII: Pogoji različnih preizkušenih metod pri spojni GBB-47.

Kolona	Mobilna faza	Delež acetonitrila [%]	Pretok [mL/min]	Temperatura [°C]
Zorbax Eclipse XDB-C18 (4,6 x 75 mm, 3,5 µm)	Fosfatni pufer s pH 3,5 in acetonitril	1→55, 30, 33	2	55

Prava kolona je bila Zorbax Eclipse XDB-C18 (4,6 x 75 mm, 3,5 µm). Mobilno fazo pri gradientni eluciji sta sestavlja fosfatni pufer s pH 3,5 in acetonitril. Delež acetonitrila se je tokom analize spremenjal od 1 do 55 %. Pretok smo nastavili na 2 mL/min. Temperatura, pri kateri je potekala analiza, je bila 55 °C. Volumen injiciranega vzorca je bil 10 µL. Valovno dolžino na detektorju smo nastavili na 274 nm. Na Sliki 6 je prikazan kromatogram, posnet pod temi pogoji. Pri primerjavi kromatograma GBB-47 in topila (Slika 7) smo na kromatogramu spojine našli kromatografski vrh, ki je pripadal spojni GBB-47 pri retencijskem času 13,792 min in valovni dolžini 234 nm (glej UV-VIS spekter na Sliki 9). Površina vrha je bila 30,3 mAU×s, višina pa 7,0 mAU.



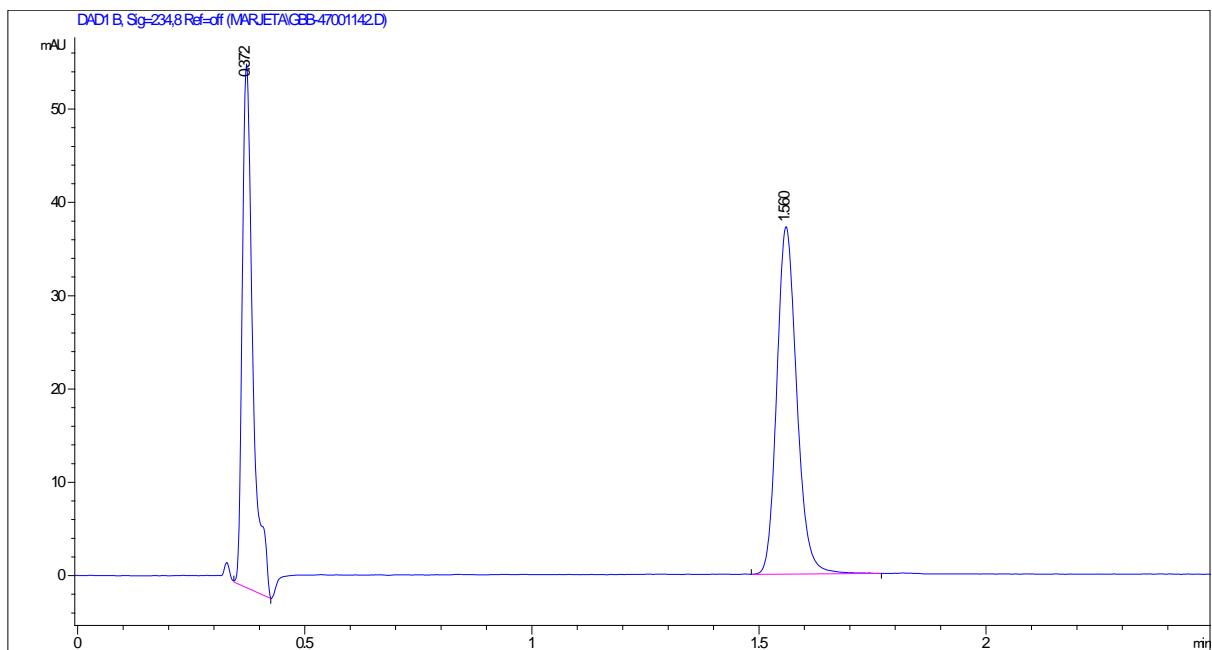
Slika 6: Gradientna elucija GBB-47.



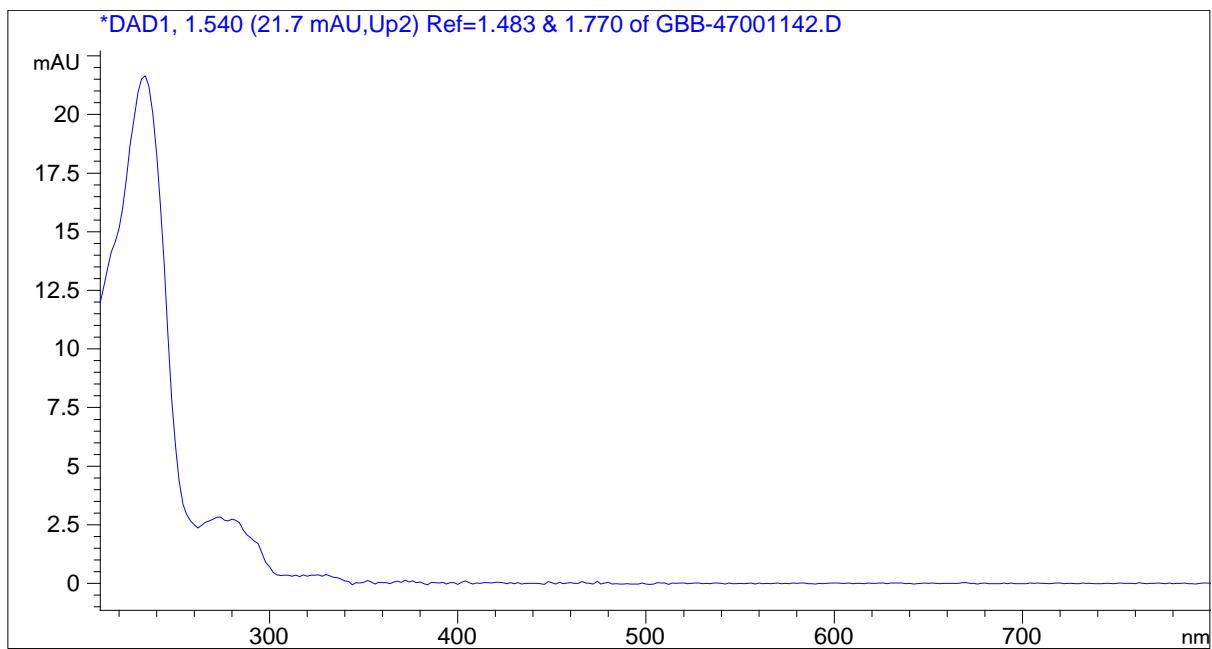
Slika 7: Gradientna elucija topila (1 % DMSO v bidestilirani vodi).

Nadaljevali smo z izokratsko elucijo. Kot mobilno fazo smo uporabili 33 % acetonitril v fosfatnem pufru s pH 3,5. Absorpcijski maksimum spojine smo detektirali pri valovni dolžini 234 nm. Temperatura je bila nastavljena na 55 °C, pretok mobilne faze je bil 2 mL/min, volumen injiciranja pa 10 µL.

Retencijski čas, pri katerem smo dobili kromatografski vrh spojine GBB-47, je bil 1,56 min (Slika 8). Površina vrha je bila 113,7 mAU×s, višina pa 37,3 mAU. Retencijski čas topila je bil 0,372 min. Šum na bazni liniji je znašal 0,05 mAU. Analiza na HPLC je potekala 2 min.



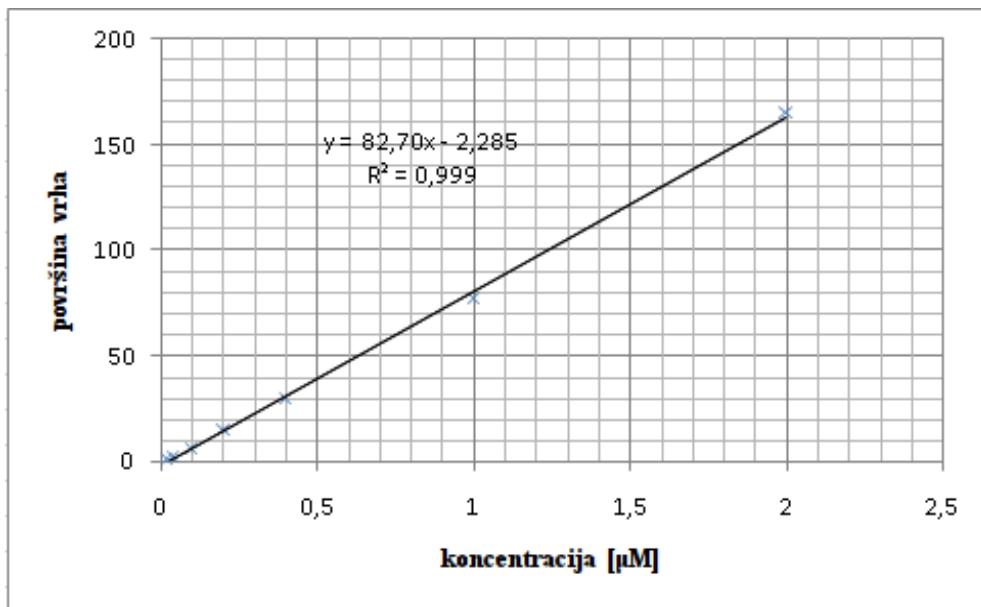
Slika 8: Izokratska elucija GBB-47.



Slika 9: UV-VIS spekter GBB-47.

Umeritvena premica

Na Sliki 10 je umeritvena premica za spojino GBB-47.



Slika 10: Umeritvena premica za GBB-47.

Končna analizna metoda

Končni parametri uspešno razvite analizne metode za spojino GBB-47 so predstavljeni v Preglednici VIII.

Preglednica VIII: Analizna metoda za določanje GBB-47.

GBB-47	Kolona	Zorbax Eclipse XDB-C18 (4,6 x 75 mm, 3,5 μm)
	Pufer	67 % fosfatni pufer pH 3,5 33 % acetonitril
	Pretok	2 mL/min
	Temperatura	55 °C
	Volumen injiciranja	100 μL
	Valovna dolžina	234 nm
	Čas analize	2 min

4.2.3 GBB-49

Razvijanje analizne metode

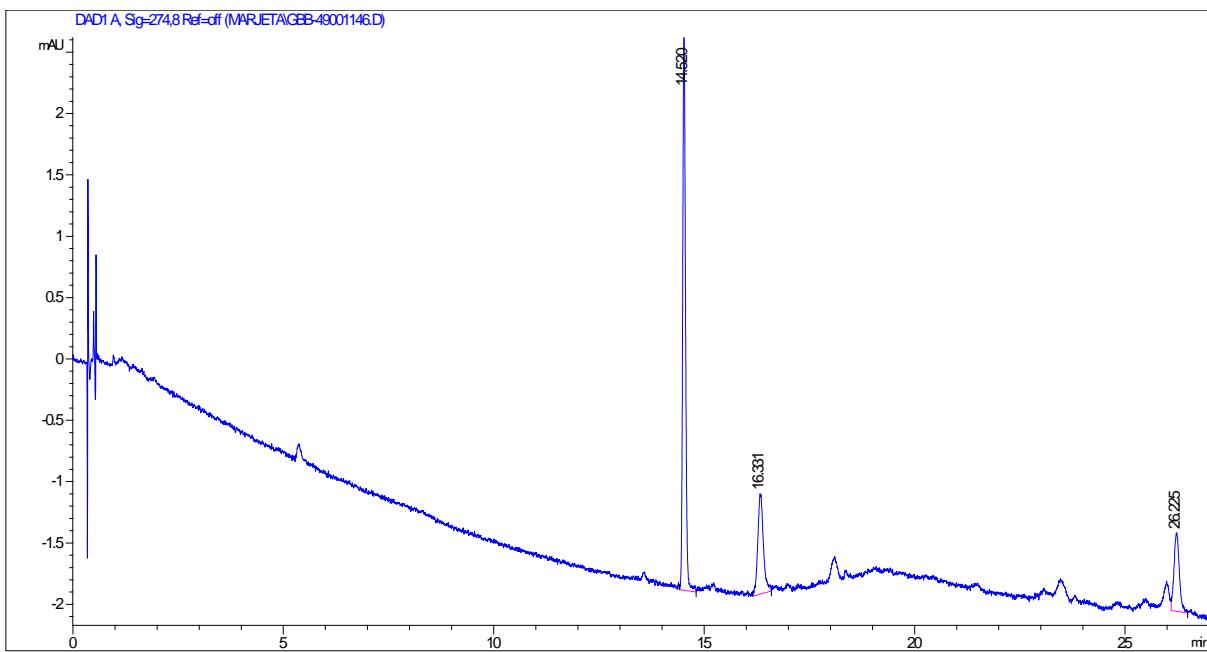
Za razvoj analizne metode smo uporabili 10 µM raztopino GBB-49 v 1 % DMSO. Stopnje razvoja metode z vsemi spremembami parametrov smo predstavili v Preglednici IX.

Preglednica IX: Pogoji različnih preizkušenih metod pri spojini GBB-49.

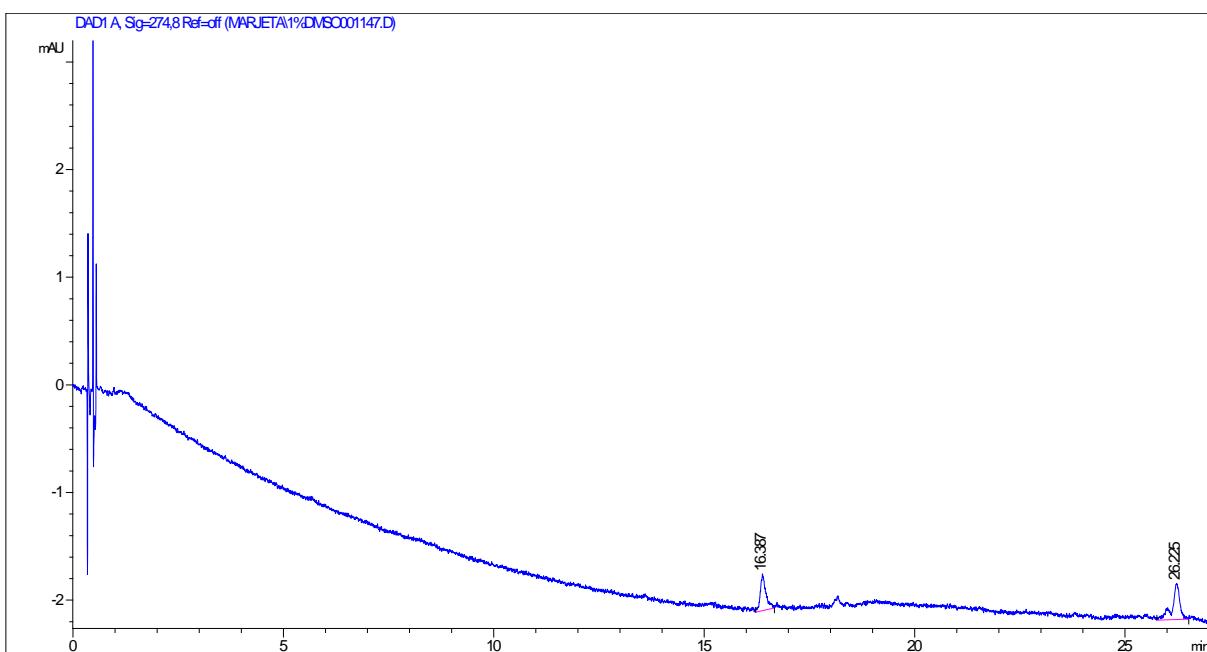
Kolona	Mobilna faza	Delež acetonitrila [%]	Pretok [mL/min]	Temperatura [°C]
Zorbax Eclipse XDB-C18 (4,6 x 75 mm, 3,5 µm)	fosfatni pufer s pH 3,5 in acetonitril	1→55, 31, 35	2	55

Analizno metodo nam je uspelo razviti s kolono Zorbax Eclipse XDB-C18 (4,6 x 75 mm, 3,5 µM). Metodo smo začeli razvijati z uporabo gradientne elucije. Za mobilno fazo smo uporabili acetonitril in fosfatni pufer s pH 3,5. Delež acetonitrila se je spremenjal od 1 do 55 %. Pretok smo nastavili na 2 mL/min. Injicirali smo 10 µL vzorca. Temperatura, pri kateri smo merili, je bila 55 °C. Nastavili smo standardno valovno dolžino 274 nm. Kromatogram je predstavljen na Sliki 11.

Po primerjavi kromatograma spojine in topila, ki smo ga posneli pod enakimi pogoji (Slika 12), smo našli kromatografski vrh spojine. Nahajal se je pri retencijskem času 14,52 min. Površina vrha je bila 21,3 mAU×s, višina pa 4,6 mAU. Absorpcijski maksimum spojine je bil pri valovni dolžini 230 nm (Slika 14).



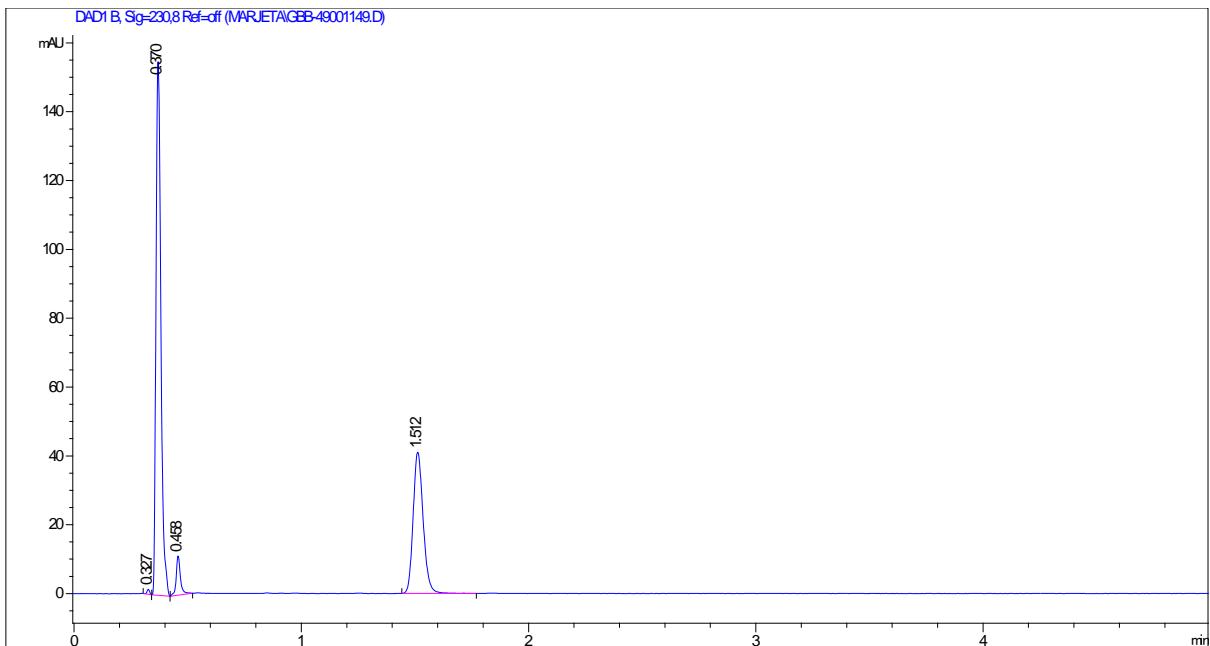
Slika 11: Gradientna elucija GBB-49.



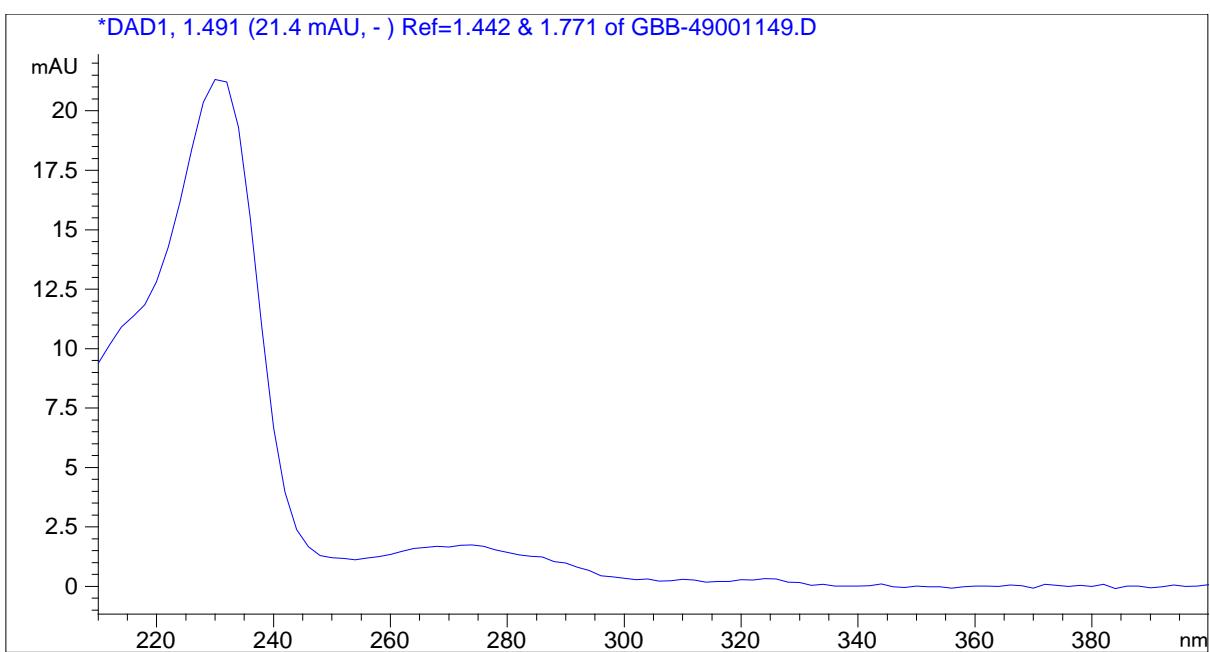
Slika 12: Gradientna elucija topila (1 % DMSO v bidestilirani vodi).

Končna sestava mobilne faze pri izokratski eluciji je bila 35 % acetonitrila v fosfatnem pufru s pH 3,5. Pretok je bil 2 mL/min, volumen injiciranja pa 10 μM . Analiza je potekala pri temperaturi 55 °C. Na detektorju smo nastavili valovno dolžino na 230 nm.

Na posnetem kromatogramu (Slika 13) je imela spojina retencijski čas pri 1,512 min. Površina vrha je bila 126 mAU×s, višina pa 41,1 mAU. Topilo je imelo vrh pri 0,37 min. Šum na kromatogramu je bil 0,08 mAU. Čas analize je znašal 2 min.



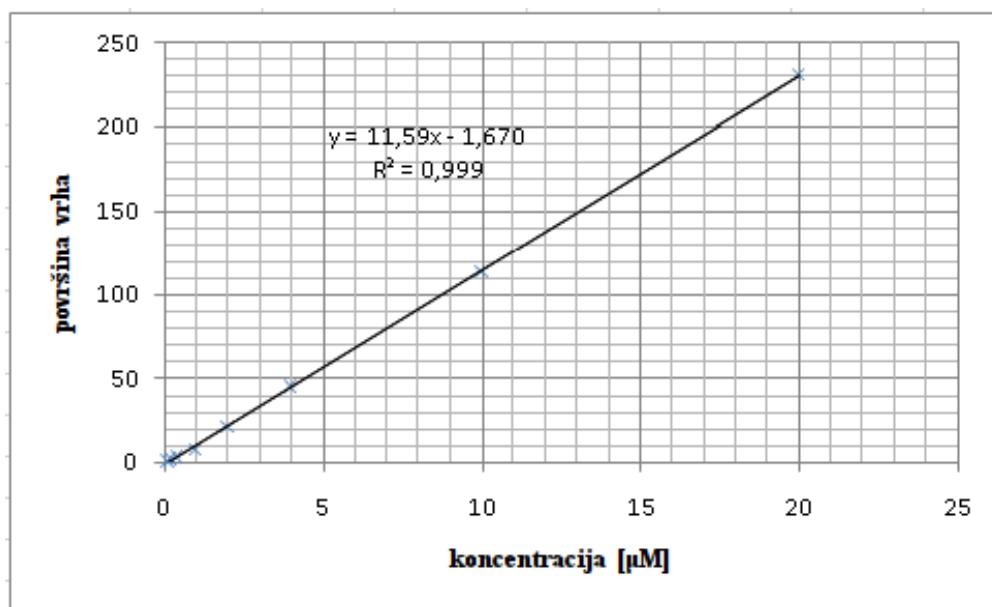
Slika 13: Izokratska elucija GBB-49.



Slika 14: UV-VIS spekter GBB-49.

Umeritvena premica

Umeritvena premica za spojino GBB-49 je predstavljena na Sliki 15.



Slika 15: Umeritvena premica za GBB-49.

Končna analizna metoda

Analizno metodo za spojino GBB-49 smo s HPLC uspešno razvili. Končni parametri so predstavljeni v Preglednici X.

Preglednica X: Analizna metoda za določanje GBB-49.

GBB-49	Kolona	Zorbax Eclipse XDB-C18 (4,6 x 75 mm, 3,5 μm)
	Pufer	65 % fosfatni pufer pH 3,5
		35 % acetonitril
	Pretok	2 mL/min
	Temperatura	55 °C
	Volumen injiciranja	100 μL
	Valovna dolžina	230 nm
	Čas analize	2 min

4.2.4 GBB-79

Razvijanje analizne metode

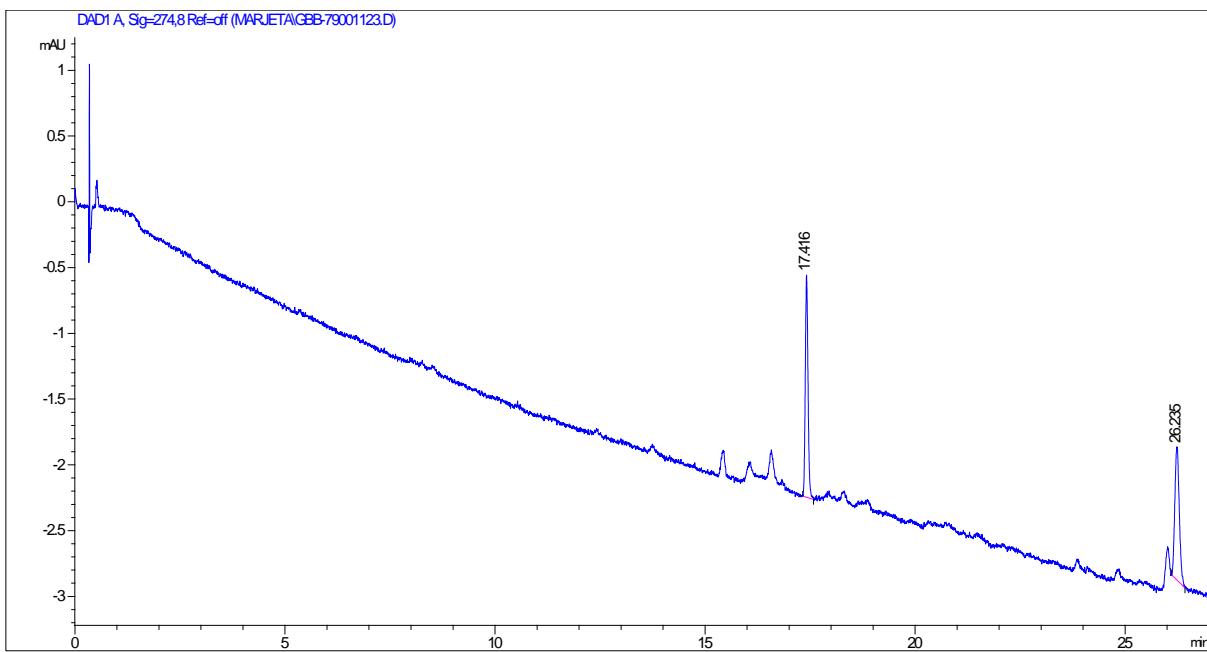
Analizno metodo smo začeli razvijati z 10 µM raztopino GBB-79 v 1 % DMSO. Stopnje razvoja analizne metode in vse spremembe parametrov smo predstavili v Preglednici XI.

Preglednica XI: Pogoji različnih preizkušenih metod pri spojini GBB-79.

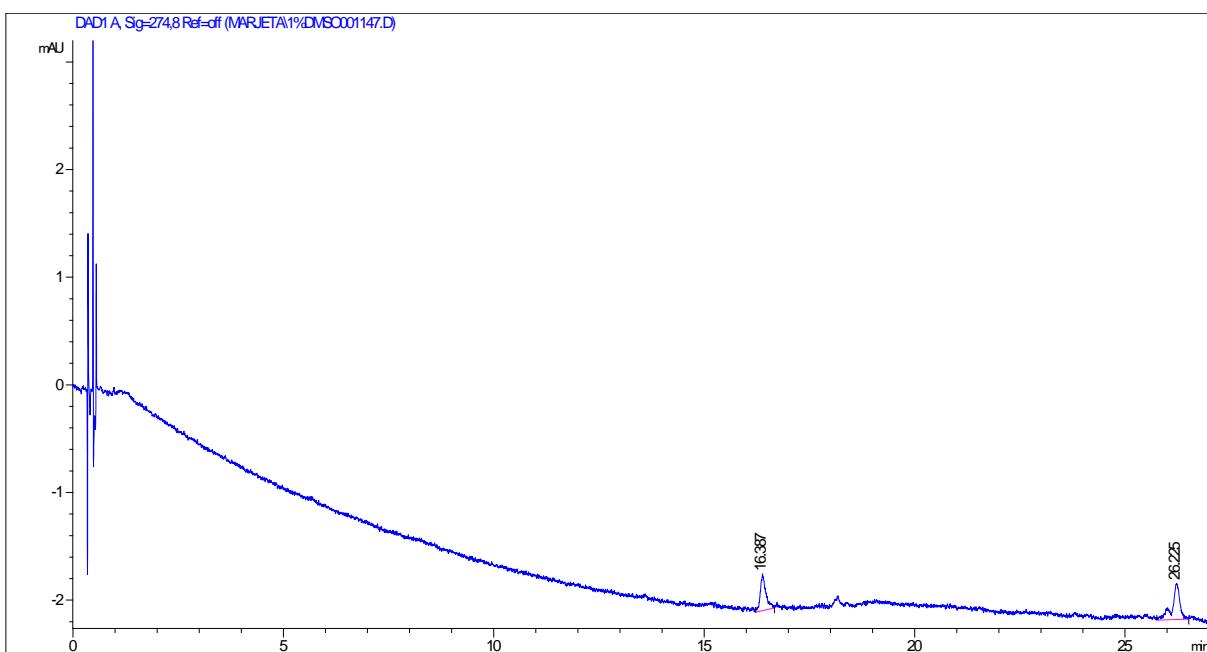
Kolona	Mobilna faza	Delež acetonitrila [%]	Pretok [mL/min]	Temperatura [°C]
Zorbax Eclipse XDB-C18 (4,6 x 75 mm, 3,5 µm)	Fosfatni pufer s pH 3,5 in acetonitril	1→55, 38, 41	2	55

Uporabili smo kolono Zorbax Eclipse XDB-C18 (4,6 x 75 mm, 3,5 µm). Najprej smo posneli kromatogram z gradientno elucijo (Slika 16). Kot mobilno fazo smo uporabili acetonitril v fosfatnem pufru s pH 3,5. Delež acetonitrila smo spremenjali od 1 do 55 %. Pretok mobilne faze smo nastavili na 2 mL/min. Temperatura analizne metode je bila 55 °C. Injicirali smo 10 µL vzorca. Merili smo pri valovni dolžini 274 nm.

Po primerjavi kromatograma spojine in topila (Slika 17) je na kromatogramu spojine ostal en vrh, ki je pripadal spojini GBB-79. Retencijski čas vrha je bil 17,416 min. Na UV-VIS spektru se je absorpcijski maksimum spojine nahajal pri valovni dolžini 230 nm (Slika 19). Površina kromatografskega vrha je bila 7,5 mAU×s, višina pa 1,7 mAU.



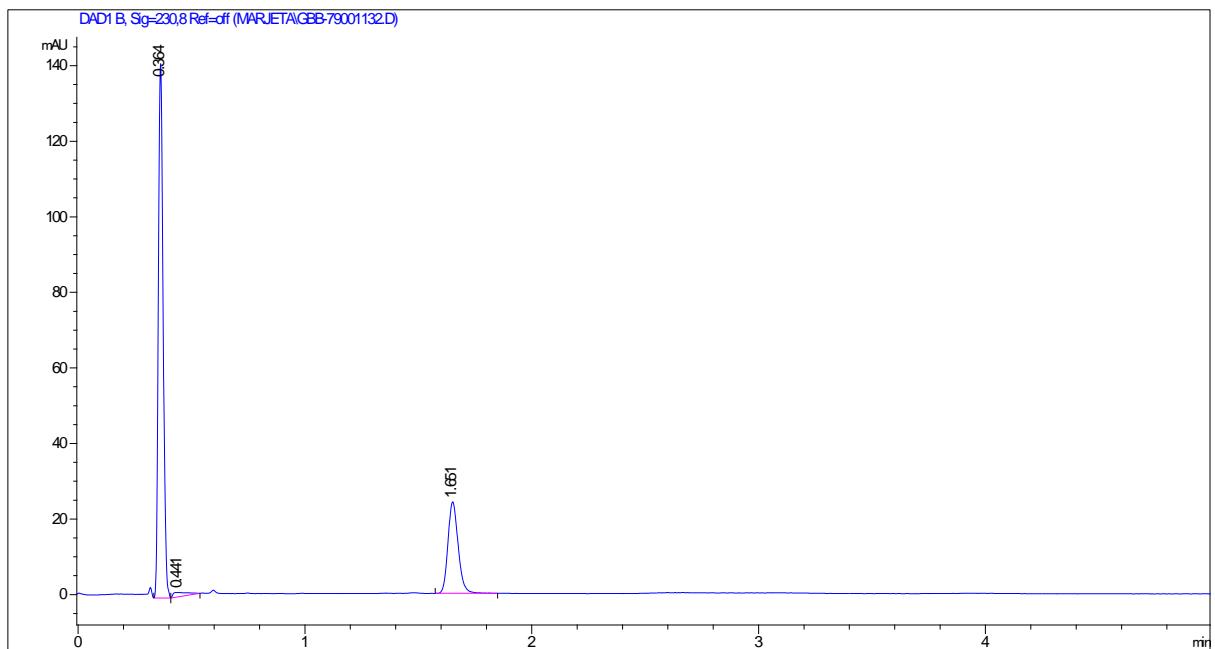
Slika 16: Gradientna elucija GBB-79.



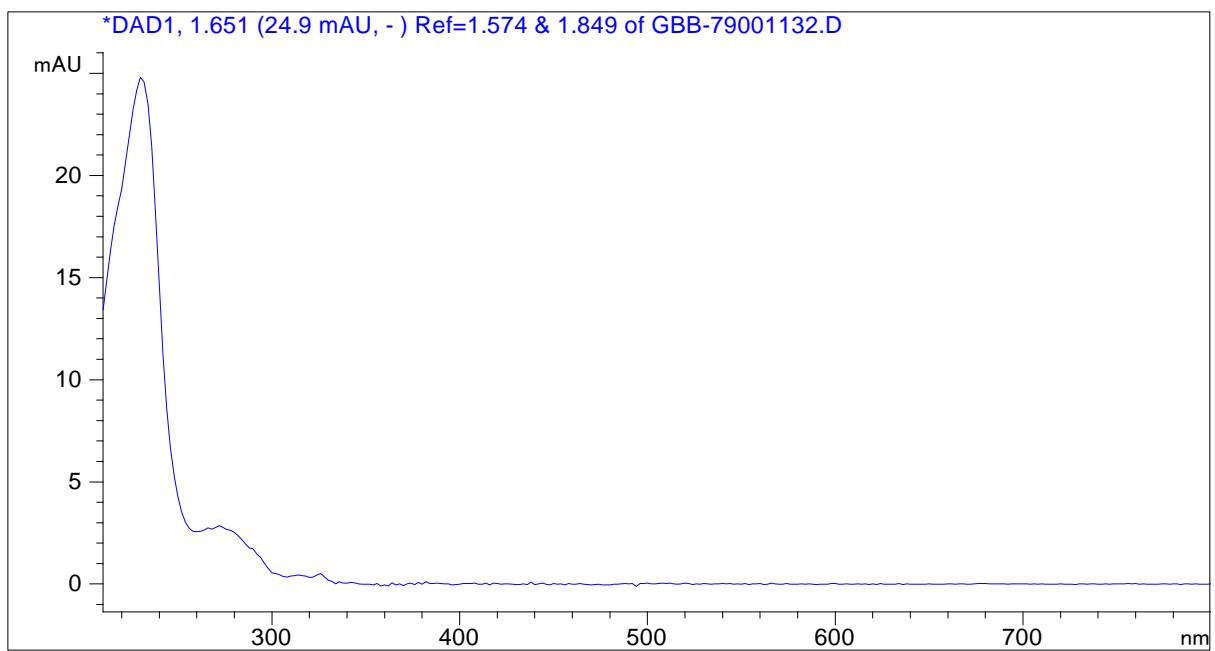
Slika 17: Gradientna elucija topila (1 % DMSO v bidestilirani vodi).

Sledila je izokratska elucija. Kot mobilno fazo smo uporabili 41 % acetonitril v fosfatnem pufru s pH 3,5. Valovno dolžino smo nastavili na 230 nm. Pretoka mobilne faze, temperature in volumna injiciranja nismo spremajali. Posneli smo kromatogram (Slika 18) s kromatografskim vrhom pri retencijskem času 1,651 min. Površina vrha je bila 76,2

mAU×s, višina pa 24,3 mAU. Retencijski čas topila je znašal 0,364 min, njegova površina pa 208,8 mAU×s. Šum na bazni liniji je bil 0,08 mAU. Vzorec smo analizirali 2,5 min.



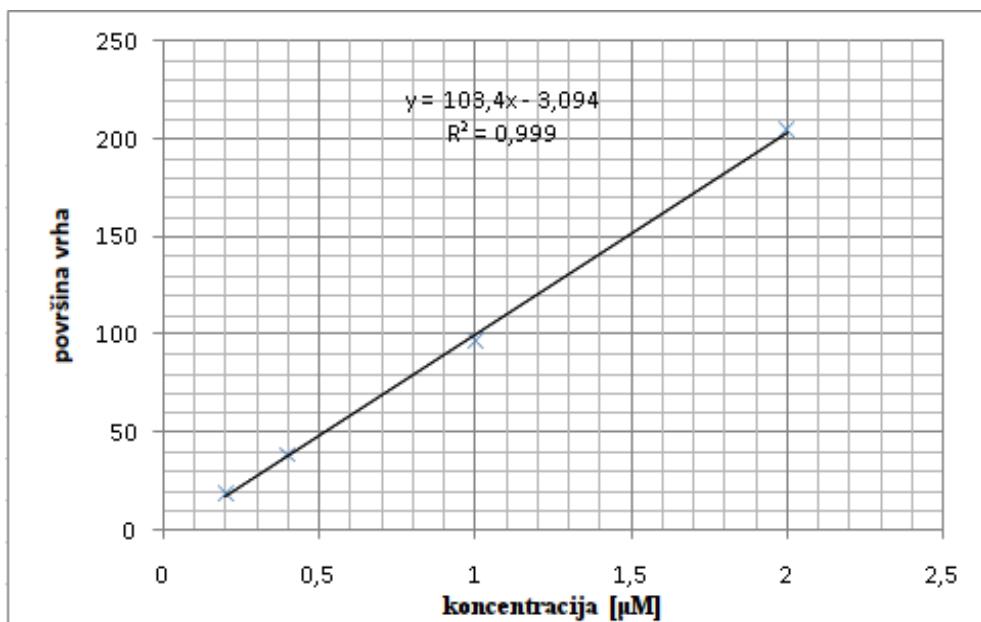
Slika 18: Izokratska elucija GBB-79.



Slika 19: UV-VIS spekter GBB-79.

Umeritvena premica

Na Sliki 20 je predstavljena umeritvena premica za spojino GBB-79.



Slika 20: Umeritvena premica za GBB-79.

Končna analizna metoda:

Končni parametri analizne metode za spojino GBB-79 so predstavljeni v Preglednici XII.

Preglednica XII: Analizna metoda za določanje GBB-79.

GBB-79	Kolona	Zorbax Eclipse XDB-C18 (4,6 x 75 mm, 3,5 μm)
	Pufer	59 % fosfatni pufer pH 3,5 41 % acetonitril
	Pretok	2 mL/min
	Temperatura	55 °C
	Volumen injiciranja	100 μL
	Valovna dolžina	230 nm
	Čas analize	2,5 min

4.2.5 CB-14948874**Razvijanje analizne metode**

Razvoj analizne metode smo začeli z 10 μM raztopino CB-14948874 v 1 % DMSO. V Preglednici XIII so predstavljene stopnje razvoja metode z vsemi spremembami parametrov.

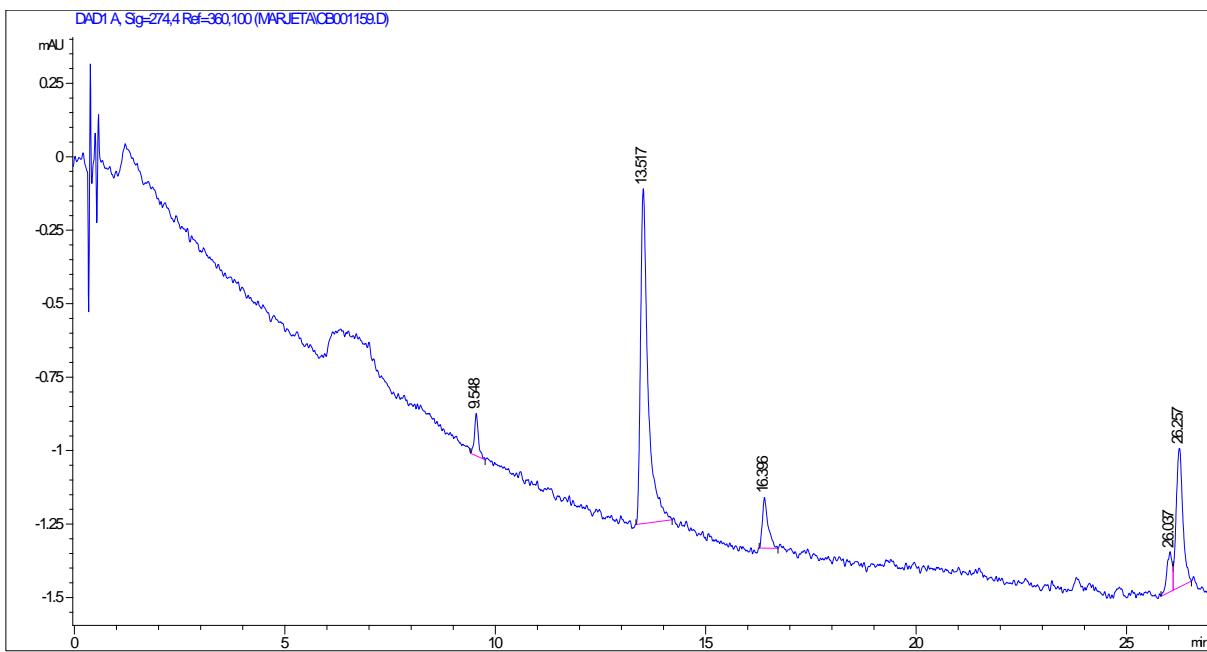
Na kromatogramu, ki smo ga posneli z mobilno fazo, sestavljeno iz acetonitrila in fosfatnega pufra s pH 3,5, smo našli zelo majhen kromatografski vrh. Želeli smo boljšo odzivnost, zato smo zamenjali mobilno fazo. Namesto fosfatnega pufra s pH 3,5 smo uporabili razredčeno fosforno kislino s pH 2,5 in amonijev fosfat s pH 7,0. Razredčeno fosforno kislino s pH 2,5 smo uporabili, da smo lahko povečali delež acetonitrila v mobilni fazi. Nikjer ni bilo primerrega kromatografskega vrha, zato smo kot končni vrh spojine uporabili kromatogram, posnet v fosfatnem pufru s pH 3,5.

Preglednica XIII: Pogoji različnih preizkušenih metod pri spojini CB-14948874.

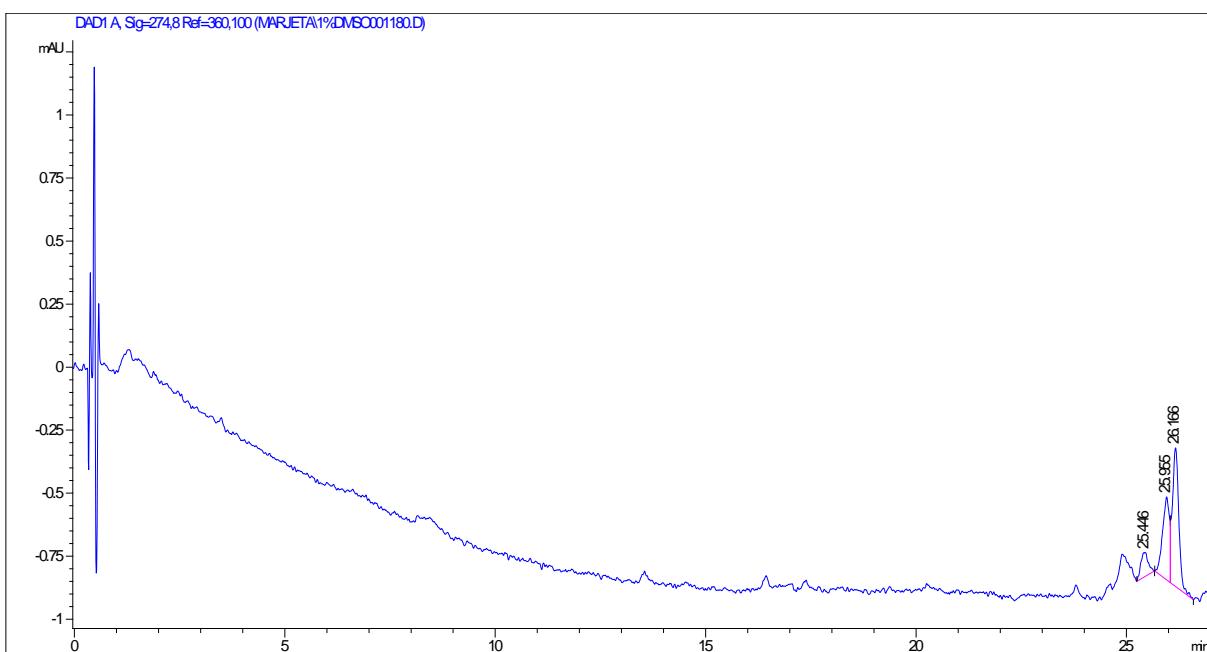
Kolona	Mobilna faza	Delež acetonitrila [%]	Pretok [mL/min]	Temperatura [°C]
Zorbax Eclipse XDB-C18 (4,6 x 75 mm, 3,5 µm)	Fosfatni pufer s pH 3,5 in acetonitril	1→55, 21, 28, 30	2	55
	Razredčena fosforna kislina s pH 2,5 in acetonitril	1→100, 24, 36, 50, 64, 76	2	55
	Amonijev fosfat pH 7,0 in acetonitril	1→65, 32	2	55

Analizno metodo nam je uspelo razviti s kolono Zorbax Eclipse XDB-C18 (4,6 x 75 mm, 3,5 µm). Mobilna faza je bila sestavljena iz fosfatnega pufra s pH 3,5 in acetonitrila. Metodo smo začeli razvijati z gradientno elucijo, kjer smo spremajali delež acetonitrila od 1 do 55 %. Pretok mobilne faze je bil 2 mL/min. Injicirali smo 10 µl vzorca. Temperatura analize je bila 55 °C. Valovno dolžino na detektorju smo nastavili na 274 nm.

Po primerjavi kromatograma spojine (Slika 21) s kromatogramom topila (Slika 22) smo našli dva vrhova, ki bi lahko pripadala CB-14948874. Večji kromatografski vrh je imel retencijski čas pri 13,517 min, manjši vrh pa pri 9,548 min. Preverili smo UV-VIS spektra obeh vrhov. Na spektru večjega vrha ni bilo ustreznega absorpcijskega maksimuma. Našli pa smo ga na spektru manjšega vrha pri valovni dolžini 210 nm. Kromatografski vrh spojine je prestavljal vrh pri retencijskem času 9,548. Površina vrha spojine je bila 0,93 mAU×s, višina pa 0,14 mAU.



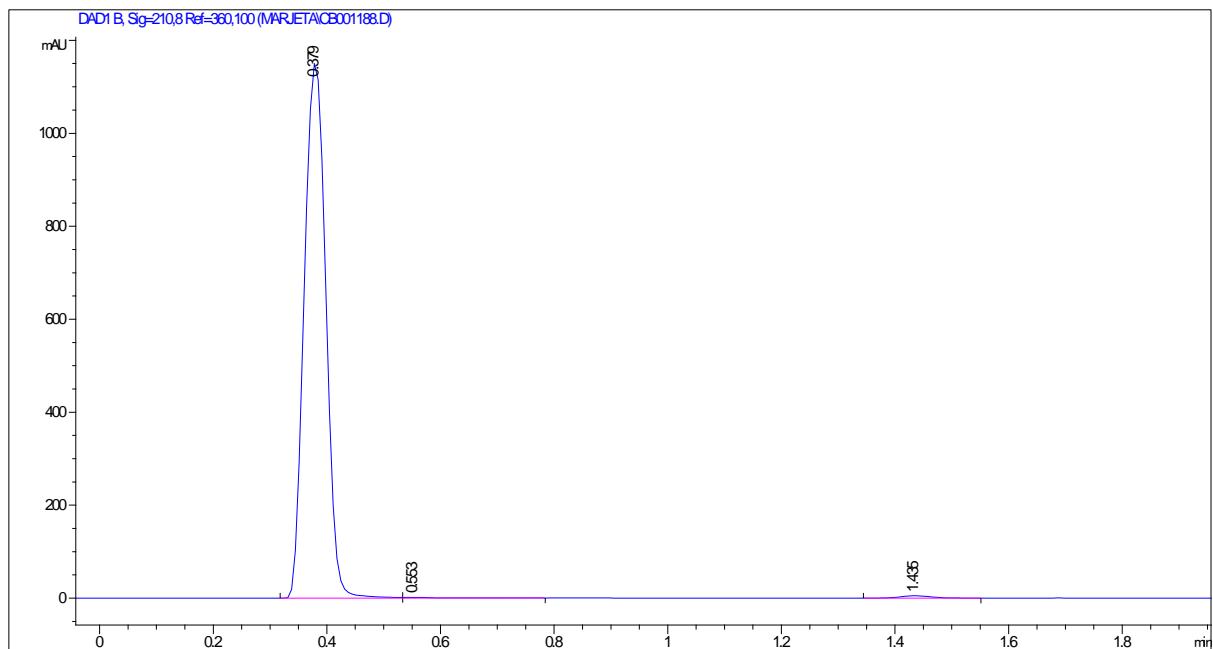
Slika 21: Gradientna elucija CB-14948874.



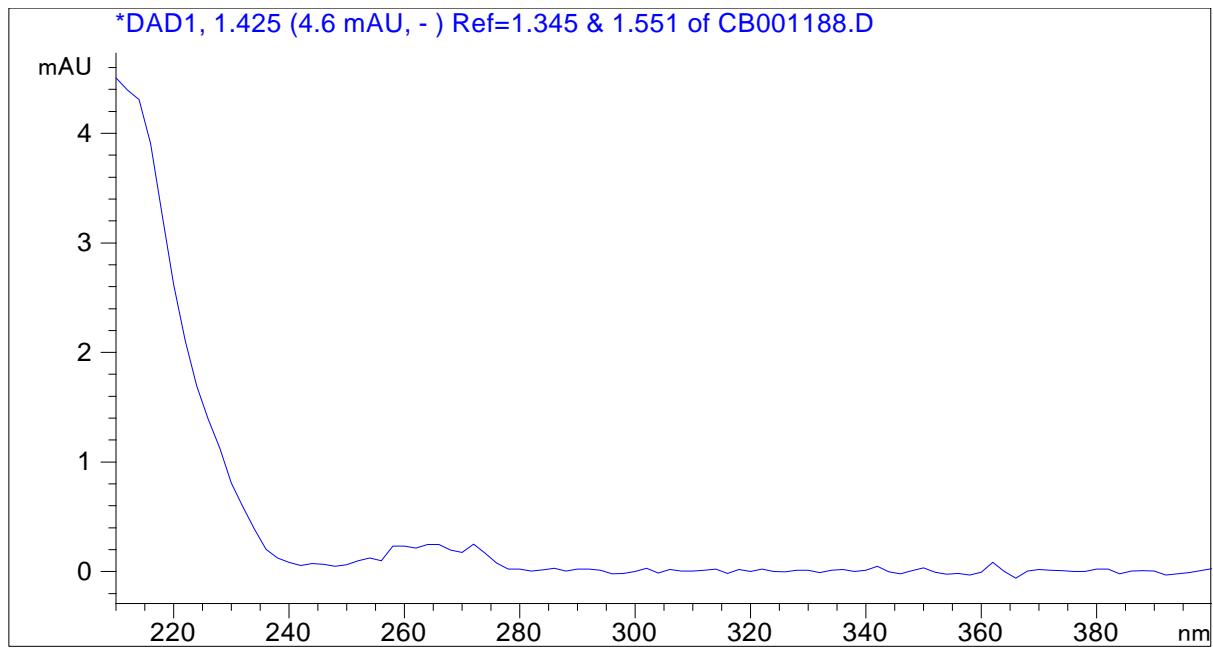
Slika 22: Gradientna elucija topila (1 % DMSO v bidestilirani vodi).

Nadaljevali smo z izokratsko elucijo. Iz kromatograma gradientne elucije smo določili delež acetonitrila v fosfatnem pufru. Končna sestava mobilne faze je bila 24 % acetonitrila v fosfatnem pufru s pH 3,5. Na detektorju smo nastavili valovno dolžino 210 nm (glej UV-

VIS spekter na Sliki 24). Pretok mobilne faze, temperaturo analize in volumen injiciranja smo ohranili.



Slika 23: Izokratska elucija CB-14948874.

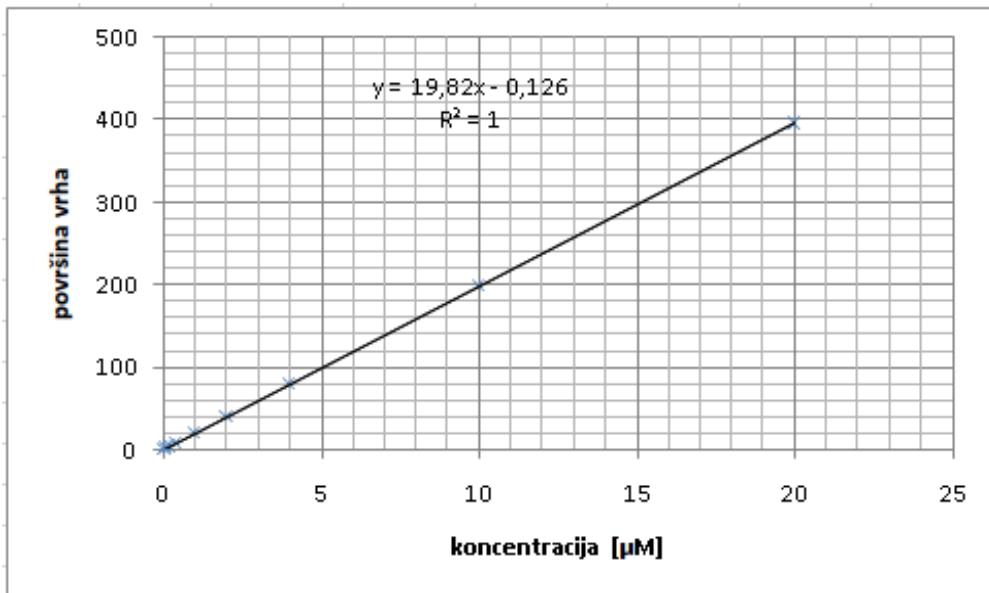


Slika 24: UV-VIS spekter CB-14948874.

Na posnetem kromatogramu (Slika 23) smo našli vrh spojine pri retencijskem času 1,435 min. Površina pod vrhom je bila 17,7 mAU×s. Višina je znašala 4,9 mAU. Topilo je imelo retencijski čas pri 0,379 min. Šum na bazni liniji je bil 0,08 mAU. Čas analize vzorca je bil 2 min.

Umeritvena premica

Umeritvena premica za spojino CB-14948874 je predstavljena na Sliki 25.



Slika 25: Umeritvena premica za CB-14948874.

Končna analizna metoda

Analizno metodo za spojino CB-14948874 smo s HPLC-sistemom uspešno razvili. Končni parametri so predstavljeni v Preglednici XIV.

Preglednica XIV: Analizna metoda za določanje CB-14948874.

CB-14948874	Kolona	Zorbax Eclipse XDB-C18 (4,6 x 75 mm, 3,5 µm)
	Pufer	76 % fosfatni pufer pH 3,5 24 % acetonitril
	Pretok	2 mL/min
	Temperatura	55 °C
	Volumen injiciranja	100 µL
	Valovna dolžina	210 nm
	Čas analize	2 min

4.3 Topnost v Ringerjevem pufru

Pomembno vlogo pri eksperimentalnem delu je imela topnost preiskovanih spojin v bidestilirani vodi in Ringerjevem pufru s pH 7,4. Med razvijanjem analizne metode smo morali biti pazljivi, da v HPLC-sistem nismo aplicirali vzorca z oborjenimi delci. Pri poskusu permeabilnosti se je spojina najprej morala raztopiti v pufru, da je lahko prehajala skozi črevo podgane.

Na začetku eksperimentalnega dela smo morali pripraviti ustrezne osnovne raztopine. Preiskovane spojine se v bidestilirani vodi niso raztapljale. Pri pripravi 10 mM raztopin smo kot topilo uporabili DMSO. Za vsa nadaljnja redčenja smo uporabili bidestilirano vodo ali Ringerjev pufer. Koncentracija DMSO v končnih raztopinah ni presegala 1 % in tem ni vplivala na permeabilnost in vitalnost tkiva.

Preglednica XV: Topnost v Ringerjevem pufru s pH 7,4.

SPOJINA	OBARJANJE	KONCENTRACIJA SPOJIN, UPORABLJENA PRI RAČUNANJU P_{app}	
		NE	DA
GUK-662	NE	196,08 µM	
CB-14948874	DA	149,72 µM	
GBB-79	DA	14,48 µM	
GBB-47	DA	6,74 µM	
GBB-49	DA	49,75 µM	

Spojine CB-14948874, GBB-47, GBB-49 in GBB-79 so se obarjale v Ringerjevem pufru s pH 7,4 (glej Preglednico XV). Najbolj problematična je bila topnost pri GBB-47 in GBB-79. V pripravljenih 100 μM raztopinah smo lahko s prostim očesom zaznali lebdeče delce spojine. Nekoliko boljšo topnost je imela spojina GBB-49, še vedno pa je bila opazna motnost raztopine pri koncentraciji 100 μM . Razmeroma dobro topna je bila CB-14948874, saj se je začela obarjati šele pri 150 μM . Edina spojina, ki se pri redčenju z Ringerjevim pufrom ni obarjala, je bila GUK-662.

Izmerjene koncentracije smo morali upoštevati pri izračunu P_{app} , saj bi v nasprotnem primeru dobili občutno nižje, napačne vrednosti P_{app} . Pri spojini GUK-662, ki se ni obarjala, smo pri izračunu uporabili začetno donorsko koncentracijo 196 μM .

Slaba topnost spojin je povezana z njeno lipofilnostjo. Lipofilnost najlažje izrazimo s porazdelitvenim koeficientom v sistemu oktanol/voda ($\log P$). Večja kot je vrednost $\log P$, manjša je topnost (13). Topnost preiskovanih spojin se sklada s to trditvijo. Visoko vrednost $\log P$ imajo spojine GBB-47, GBB-49 in GBB-79. Vse tri so zelo slabo topne v Ringerjevem pufru. Log P CB-14948874 je od ostalih spojin nižji skoraj za 2 enoti, kar se odraža tudi v topnosti. Kljub zgornjim trditvam še vedno obstajajo nekatere spojine, ki so dobro topne, čeprav tega ne bi pričakovali (12). Mednje sodi tudi GUK-662, ki ima med vsemi preiskovanimi spojinami najvišjo vrednost $\log P$ in zelo visoko molekulsko maso.

Na topnost, lipofilnost in absorcijo spojine vpliva konstanta ionizacije ($p\text{Ka}$), ki predstavlja merilo kislosti oziroma bazičnosti spojin. Odvisna je od temperature, zato moramo vedno navesti temperaturo, pri kateri je bila določena (32). Vrednosti $p\text{Ka}$ GUK-662, CB-14948874, GBB-47, GBB-49 in GBB-79 se gibljejo v intervalu od 8,62 do 9,53.

4.4 Permeabilnost

Navidezne permeabilnostne koeficiente (P_{app}) smo določali na ileumu podganjega črevesja. Pod enakimi pogoji smo merili v absorptivni in eliminatorni smeri. Poskus permeabilnosti je trajal 175 min.

Visoke vrednosti P_{app} bi nam dale informacijo, da bi spojina zelo verjetno dobro prehajala tako skozi sluznico črevesa kot tudi skozi HE-bariero in bi jo vsekakor smatrali kot primerno za nadaljnji razvoj iz tega vidika. Pri nizkih vrednostih P_{app} pa bi bilo smiselno

razmisliti o spremembah v sami strukturi molekule. Najslabša možnost bi bila kombinacija nizkega P_{app} v absorptivni smeri in visokega efluksnega razmerja, kar bi kazalo, da je spojina tudi substrat katerega od prenašalcev, ki delujejo v eliminatorni smeri – najverjetneje P-gp.

4.4.1 Elektrofiziološki parametri

Pri poskusu permeabilnosti smo uporabili meritve, kjer je bila izračunana vrednost transepiteljskega električnega upora višja od $18 \Omega\text{cm}^2$ oziroma kjer se je napetost na koncu poskusa po dodatku glukoze dvignila za vsaj 0,2 mV. Upoštevati smo morali tudi vrednost električnega potenciala, ki je morala biti manjša od -0,7 mV. V nekaterih primerih je bil električni potencial višji, vendar so bile meritve vseeno uporabne, saj sta bila še vedno izpolnjena prva dva pogoja. Na segmentih ileuma smo skušali zagotoviti vsaj 3–4 meritve, ki so imele ustrezno vitalnost. Točke na grafu množine snovi v odvisnosti od časa, ki smo jih upoštevali za izračun permeabilnostnega koeficiente, so morale ležati linearno. Pri končni izbiri ustreznih meritev P_{app} smo morali upoštevati tudi asimetrijo elektrod. V Preglednici XVI je predstavljeno število tkiv, ki smo jih uporabili pri poskusu, in tista, ki so bila izločena.

Preglednica XVI: Število uporabljenih in izločenih tkiv pri poskusu permeabilnosti.

Spojina	GUK-662		CB-14948874		GBB-47		GBB-49		GBB-79	
Smer prehajanja	S-M	M-S	S-M	M-S	S-M	M-S	S-M	M-S	S-M	M-S
Število uporabljenih tkiv pri poskusu	8	14	7	8	2	4	5	5	7	7
Število izločenih tkiv	4	11	2	3	1	2	2	2	4	4

Ob dodatku vzorcev v difuzijske celice z vpetim tkivom smo opazili padanje vrednosti transepiteljskega električnega potenciala in upora. Iz pridobljenih elektrofizioloških parametrov smo prišli do ugotovitve, da vse spojine delujejo toksično na ileum podgane in s tem povzročijo zmanjšanje vitalnosti sluznice ileuma.

Najbolj je bila toksičnost izražena pri spojni GUK-662. Po dodatku vzorca v difuzijsko celico je vitalnost tkiva hitro začela padati. Elektrofiziološki parametri so se po 40 min merjenja v enajstih primerih tako močno znižali, da vpeto tkivo ni bilo več primerno za nadaljnjo izvedbo poskusa. Sluznica je bila bistveno bolj izpostavljena toksičnosti GUK-

662, ko smo jo dodali na mukozno stran, saj tkivo na tej strani nima serozne membrane in plasti mišic. Celoten poskus merjenja permeabilnosti spojine GUK-662 smo morali ponoviti trikrat, da smo dobili ustrezeno število rezultatov.

Spojine CB-14948874, GBB-79, GBB-49 in GBB-47 so na tkivo delovale manj toksično. Padec elektrofizioloških parametrov je bil po dodatku vzorca manjši. Pri večini vpetih tkiv sta transepiteljski električni potencial in upor počasi padala skozi celoten poskus. Poskus smo še vedno lahko izvedli, saj je bila vitalnost tkiva po dodatku glukoze na koncu poskusa še vedno ustrezena. V posameznih primerih pa so tudi te spojine na tkivo delovale tako toksično, da so bile meritve neuporabne že v začetnih točkah vzorčenja. Pri spojini CB-14948874 se je to zgodilo štirikrat, v primeru spojine GBB-79 trikrat, pri GBB-47 dvakrat in pri spojini GBB-49 enkrat. Permeabilnostne koeficiente smo določili po enem ali največ dveh izvedbah poskusa.

Posledica toksičnega delovanja je, da bi peroralno aplicirane spojine povzročale gastrointestinalne stranske učinke. V literaturi smo zasledili, da imajo tudi donepezil, rivastigmin in galantamin po peroralni aplikaciji veliko incidenco gastrointestinalnih neželenih učinkov, kot so slabost, bruhanje, diareja, anoreksija in bolečine v trebuhu (33, 34, 35). Želja raziskovalcev je odkriti druge načine aplikacije, ki bi odpravile neželene gastrointestinalne učinke na telo tako, da bi se učinkovina izognila prehodu skozi črevesje. Kot alternativo so pri rivastigminu že razvili transdermalne obliže (36).

4.4.2 Vrednosti permeabilnostnih koeficientov in njihova statistična obdelava

V Preglednicah XVII–XXV so zbrani izračunani navidezni permeabilnostni koeficienti (P_{app}), ki smo jih dobili pri poskusu merjenja permeabilnosti, in njihova statistična obdelava.

4.4.2.1 GUK-662

Preglednica XVII: Permeabilnostni koeficienti za spojino GUK-662.

Smer prehajanja	$P_{app}[\text{cm/s}]$			
S-M	$3,95 \times 10^{-6}$	$7,79 \times 10^{-6}$	$8,23 \times 10^{-6}$	$4,88 \times 10^{-6}$
M-S	$3,95 \times 10^{-6}$	$3,73 \times 10^{-6}$	$1,68 \times 10^{-6}$	

Preglednica XVIII: Statistično obdelani rezultati GUK-662.

	AS [cm/s]	SD [cm/s]	n	SEM [cm/s]	RSD [%]
smer S-M	$6,21 \times 10^{-6}$	$2,12 \times 10^{-6}$	4	$1,06 \times 10^{-6}$	34
smer M-S	$3,12 \times 10^{-6}$	$1,25 \times 10^{-6}$	3	$7,23 \times 10^{-7}$	40

Razlika med S-M in M-S	
ER	1,99
F-test	0,539
t-test	0,077
	NSig

4.4.2.2 ***GBB-47***

Preglednica XIX: Permeabilnostni koeficienti za spojino GBB-47.

Smer prehajanja	P _{app} [cm/s]
S-M	$2,04 \times 10^{-4}$
M-S	$4,01 \times 10^{-5}$ $8,10 \times 10^{-5}$

Pri spojni GBB-47 smo pri poskusu merjenja permeabilnosti dobili zelo visoke P_{app}. Vrednosti niso bile realne. Rezultate si morda lahko razlagamo s tem, da je pri poskusu permeabilnosti nastala prenasičena raztopina, ki se je dlje časa obarjala. Pri izračunu P_{app} smo uporabili donorsko koncentracijo, ki smo jo izmerili pri poskusu topnosti. Možno je, da je bila ta koncentracija prenizka, saj je spojina lahko prehajala skozi črevesno sluznico iz prenasičene raztopine. Ponovna meritev ni bila mogoča, ker nismo imeli več vzorca za analizo. Posledično nismo mogli določiti transporta skozi membrano.

Pri spojni GBB-47 smo prišli le do zaključka, da bi bilo potrebno narediti dodatne meritve, da bi prišli do ustreznih rezultatov.

4.4.2.3 GBB-49

Preglednica XX: Permeabilnostni koeficienti za spojino GBB-49.

Smer prehajanja	P _{app} [cm/s]		
S-M	1,42×10 ⁻⁶	1,16×10 ⁻⁶	1,47×10 ⁻⁶
M-S	1,11×10 ⁻⁶	1,15×10 ⁻⁶	1,01×10 ⁻⁶

Preglednica XXI: Statistično obdelani rezultati GBB-49.

	AS [cm/s]	SD [cm/s]	n	SEM [cm/s]	RSD [%]
smer S-M	1,35×10 ⁻⁶	1,66×10 ⁻⁷	3	9,61×10 ⁻⁸	12
smer M-S	1,09×10 ⁻⁶	7,21×10 ⁻⁸	3	4,16×10 ⁻⁸	7

Razlika med S-M in M-S	
ER	1,24
F-test	0,316
t-test	0,068
	NSig

4.4.2.4 GBB-79

Preglednica XXII: Permeabilnostni koeficienti za spojino GBB-79.

Smer prehajanja	P _{app} [cm/s]		
S-M	1,37×10 ⁻⁶	1,64×10 ⁻⁶	1,84×10 ⁻⁶
M-S	1,76×10 ⁻⁶	1,77×10 ⁻⁶	2,97×10 ⁻⁶

Preglednica XXIII: Statistično obdelani rezultati GBB-79.

	AS [cm/s]	SD [cm/s]	n	SEM [cm/s]	RSD [%]
smer S-M	1,62×10 ⁻⁶	2,36×10 ⁻⁷	3	1,36×10 ⁻⁷	15
smer M-S	2,17×10 ⁻⁶	6,96×10 ⁻⁷	3	4,02×10 ⁻⁷	32

Razlika med S-M in M-S	
ER	0,78
F-test	0,206
t-test	0,264
	NSig

4.4.2.5 CB-14948874

Preglednica XXIV: Permeabilnostni koeficienti za spojino CB-14948874.

Smer prehajanja	P_{app}[cm/s]				
S-M	$11,9 \times 10^{-6}$	$12,0 \times 10^{-6}$	$11,9 \times 10^{-6}$	$10,5 \times 10^{-6}$	$10,4 \times 10^{-6}$
M-S	$12,0 \times 10^{-6}$	$12,1 \times 10^{-6}$	$11,1 \times 10^{-6}$	$12,3 \times 10^{-6}$	$9,46 \times 10^{-6}$

Preglednica XXV: Statistično obdelani rezultati CB-14948874.

	AS [cm/s]	SD [cm/s]	n	SEM [cm/s]	RSD [%]
smer S-M	$11,3 \times 10^{-6}$	$8,14 \times 10^{-7}$	5	$3,64 \times 10^{-7}$	7
smer M-S	$11,4 \times 10^{-6}$	$1,17 \times 10^{-6}$	5	$5,25 \times 10^{-7}$	10

Razlika med S-M in M-S	
ER	1,00
F-test	0,496
t-test	0,937
	NSig

4.4.3 Interpretacija rezultatov permeabilnosti

Efluksno razmerje pri GUK-662 in GBB-49 kaže v prid transporta iz S-M stran, pri spojni GBB-79 pa je transport pomaknjen v M-S stran. S pomočjo statistične obdelave podatkov s F-testom in Studentovim t-testom smo pri vseh omenjenih spojinah ugotovili, da razlika ni

statistično signifikantna. Vrednost efluksnega razmerja pri CB-14948874 je 1, kar pomeni, da je spojina enako prehajala v obeh smereh.

Iz ugotovitev, da se pri vsaki posamezni spojini povprečne vrednosti izmerjenih P_{app} v S-M in M-S smeri niso statistično razlikovale, smo lahko sklepali, da GUK-662, CB-14948874, GBB-49 in GBB-79 prehajajo skozi ileum črevesa podgane s pomočjo pasivnega transporta.

Rezultate, ki smo jih dobili pri poskusu permeabilnosti, smo poskusili umestiti v biofarmacevtski klasifikacijski sistem (BCS). Za eksterne standarde smo vzeli P_{app} 14 učinkovin, ki so bili predhodno določeni v našem laboratoriju. Predstavljeni so v Preglednici XXVI.

Preglednica XXVI: Izmerjene standardne vrednosti P_{app} v laboratoriju (37).

Učinkovina	Permeabilnost klasifikacija	% absorpcije ali BU*	P_{app} [$\times 10^{-6}$ cm/s]		ER	
			M-S	S-M		
Antipirin	Visoka	100	24,7 ± 3,2	29,5 ± 4,9	1,2	
Kofein	Visoka	100	41,5 ± 1,4	41,2 ± 3,4	1,0	
Karbamazepin	Visoka	92*	15,8 ± 0,2	18,4 ± 1,5	1,2	
Fluvastatin	Visoka	90-100	4,3 ± 1,6	23,7 ± 3,0	5,4	
Ketoprofen	Visoka	100	16,9 ± 4,0	21,1 ± 7,6	1,2	
Metoprolol	Visoka	95-100	19,9 ± 5,9	26,1 ± 3,9	1,3	
Naproksen	Visoka	94-99	37,3 ± 5,2	18,8 ± 1,0	0,5	
Propranolol	Visoka	90-100	11,1 ± 2,3	21,5 ± 2,3	1,9	
Teofilin	Visoka	96	15,5 ± 0,7	28,2 ± 1,2	1,8	
Atenolol	Nizka	50	3,7 ± 1,2	6,5 ± 0,8	1,8	
Furosemid	Nizka	61	5,9 ± 3,0	27,9 ± 4,7	4,7	
Hidroklorotiazid	Nizka	65-72	4,4 ± 0,6	12,6 ± 0,6	2,9	
Metildopa	Nizka	41	2,3 ± 0,3	4,3 ± 0,7	1,9	
Ranitidin	Nizka	50-61	4,0 ± 1,1	12,9 ± 0,1	3,2	

Izmerjene P_{app} smo primerjali s tabelaričnimi in poskušali uvrstiti spojine med visoko ali nizko permeabilne. Spojine GUK-662, GBB-49 in GBB-79 so imele P_{app} nižje od nizko permeabilnih eksternih standardov, torej jih moramo po BCS klasificirati kot nizko permeabilne spojine. Vrednosti P_{app} pri spojni CB-14948874 so bile nekoliko višje od nizko permeabilnih eksternih standardov in povsem primerljive s permeabilnostnim koeficientom propranolola, zato smo jo uvrstili med visoko permeabilne spojine.

V literaturi nismo našli nobenih podatkov o permeabilnostnih koeficientih zaviralcev holinesteraz, ki jih že uporabljamo v terapiji. Primerjava P_{app} z našimi učinkovinami tako ni bila mogoča.

Smernice EMA spojine označijo kot visoko permeabilne, če je njihova frakcija absorpcije vsaj 85 % (28). V literaturi smo poiskali BU inhibitorjev holinesteraze, ki jih že uporabljamo v terapiji. Donepezil in galantamin spadata med visoko permeabilne učinkovine, saj je njuna BU 100 % in 89 % (8,34). Rivastigmin se hitro in popolnoma absorbira. Njegova BU je 36 %, kar kaže na posledice učinka prvega prehoda (35). Učinkovine, ki se v velikem deležu metabolizirajo, spadajo med visoko permeabilne učinkovine (38). Torej tudi za rivastigmin lahko rečemo, da ima visoko permeabilnost.

Permeabilnostne lastnosti spojin so močno odvisne od fizikalno-kemijskih lastnosti molekule. Na prehod skozi gastrointestinalno membrano najbolj vplivajo velikost molekule, lipofilnost in ionizacija molekule ter njena polarna površina. Navedene lastnosti opisujejo molekulska masa (MM), porazdelitveni koeficient ($\log P$), koeficient distribucije ($\log D$), konstanta ionizacije (pKa) in polarna površina molekule (PSA) (12, 14, 39). Nekatere od teh parametrov smo *in silico* spojinam določili tudi mi in jih poskušali primerjati med seboj.

$\log P$ je najboljši pokazatelj lipofilnosti (13). Povečana vrednost $\log P$ izboljša permeabilnost, hkrati pa se lahko zmanjša topnost (40). Porazdelitveni koeficient v sistemu oktanol/voda korelira s permeabilnostjo učinkovine v primeru, ko imamo pri prehodu skozi membrano prevladujoč pasivni transport (39). GUK-662, CB-14948874, GBB-49 in GBB-79 so prehajale skozi membrano pasivno, zato smo jih enostavno lahko primerjali med seboj.

Spojine GUK-662, GBB-49 in GBB-79 so imele podobne vrednosti $\log P$. Vrednosti so bile dokaj visoke, vendar še vedno v skladu s pravilom Lipinskega, ki pravi, da mora biti za dobro permeabilnost $\log P < 5$ (22). Kljub visoki vrednosti $\log P$ je bila njihova permeabilnost nizka. Omenjene spojine bi lahko primerjali z donepezilom, ki ima podobno vrednost $\log P$. Do razlik prihaja pri permeabilnosti, saj donepezil spada med visoko permeabilne spojine. Edina spojina, ki je bila visoko permeabilna, je bila CB-14948874. Njen $\log P$ je bil od ostalih preiskovanih spojin manjši za skoraj 2 enoti. CB-14948874 se je morda bolj ustrezno porazdelila med hidrofilno in lipofilno fazo, boljše prehajala skozi

membrano črevesja in bila zato visoko permeabilna. Podobno vrednost log P je imel rivastigmin, ki prav tako spada med visoko permeabilne učinkovine.

Očitno je torej, da v primeru našega nabora spojin log P kot parameter za razlago permeabilnostnih lastnosti ni primeren. Neskladje porazdelitvenega koeficiente in permeabilnosti si lahko razlagamo s tem, da na prehajanje snovi skozi membrano vplivajo tudi nekateri drugi dejavniki, kot sta velikost in rigidnost molekule. Spojino CB-14948874 smo izbrali, ker je bila manjša od drugih preiskovanih spojin, saj so te vse dokaj velike. Pri merjenju permeabilnosti smo dokazali, da bi prav velikost molekule lahko bila bistveni dejavnik pri prehajanju skozi ileum, saj je bila CB-14948874 visoko permeabilna. MM vseh ostalih spojin so bile blizu 500, kar je celo na meji »*drug like*« definicije Lipinskega, vsekakor pa so bile vrednosti previsoke za doseganje visoke pasivne permeabilnosti (14).

Koeficient distribucije je prav tako pokazatelj lipofilnosti, še zlasti pri spojinah, ki ionizirajo (13). Pri izračunu smo upoštevati fiziološki pH (22). Visoko permeabilne spojine, ki prehajajo skozi ileum s pasivnim transportom, morajo imeti vrednost log D med 0,0 in 2,5 (41). V ta interval spada log D spojine CB-14948874, ki je tudi po naših meritvah visoko permeabilna. Pri GUK-662, GBB-49 in GBB-79 je bila vrednost log D višja. S to trditvijo se ujemajo naši rezultati merjenja permeabilnosti, saj imajo vse tri spojine nizko permeabilnost.

S prehajanjem skozi HE-bariero sovpadajo nekatere fizikalno-kemijske lastnosti, kot so lipofilnost, velikost molekule in število vodikovih vezi. Napoved je mogoča, če učinkovine niso podvržene metabolizmu in prehajajo pasivno (42).

Tudi pri naših preiskovanih spojinah smo ugotavliali, ali so se v zadostni meri absorbirale iz prebavnega trakta in iz teh ugotovitev poskušali sklepati, ali prehajajo HE bariero.

Pri spojinah nismo opazili izrazitega aktivnega transporta v eliminatorni smeri. Iz tega smo lahko sklepali, da ni bilo prisotne aktivnosti P-gp, saj je P-gp najpomembnejši prenašalec, ki zmanjšuje sposobnost učinkovin za prehod HE-bariere. Manjša aktivnost P-gp omogoča večjo količino učinkovine v možganih. Raziskovalci pri razvoju novih učinkovin skušajo povišati permeabilnost skozi HE-bariero s tem, da načrtujejo spojine, ki niso substrati za P-gp (43). Mednje sodijo tudi že registrirane učinkovine rivastigmin, donepezil in galantamin (31).

Spojine, ki slabo prehajajo skozi črevesno sluznico, praviloma ne prehajajo dosti boljše skozi HE-bariero. Za naše spojine lahko trdimo, da slabo prehajajo skozi njo. Izjema je le spojina CB-14948874, ki ima visoko gastrointestinalno permeabilnost. Zanjo lahko sklepamo, da bi lahko uspešno prehajala HE-bariero. Trditev bi lahko dodatno potrdili z *in vitro* meritvami permeabilnosti na izoliranih celičnih kulturah, kot so na primer BBEC (*bovine brain endothelial cells*), HPBEC (*human primary brain endothelial cells*) in MBEC4 (*immortalized mouse brain endothelial cells*) ali pa z *in vivo* študijo na živali (30, 43).

5 SKLEP

Za vse preiskovane spojine smo uspešno razvili analizne metode. Izmed preizkušenih stacionarnih faz smo najboljše rezultate pri vseh spojinah dobili s kolono z reverzno fazo Zorbax Eclipse XDB-C18 (4,6 x 75 mm, 3,5 µm). Spojine CB-14948874, GBB-47, GBB-49 in GBB-79 so imele mobilno fazo sestavljeni iz različnega deleža acetonitrila in fosfatnega pufra s pH 3,5. Pri GUK-662 je organsko topilo ostalo enako, namesto fosfatnega pufra s pH 3,5 pa smo uporabili razredčeno fosforno kislino s pH 2,5. Temperatura, pri kateri je potekala analiza, je bila pri vseh spojinah 55 °C. Spojine, ki smo jih analizirali, so se med seboj razlikovale po valovni dolžini detekcije. Končno analitsko metodo smo nato uporabili pri analiziranju vzorcev, ki smo jih odvzeli v ustreznih časovnih intervalih pri poskusih meritev permeabilnosti.

Topnost spojin CB-14948874, GBB-47, GBB-49 in GBB-79 je bila nizka, saj so se obarjale v Ringerjevem pufru s pH 7,4. Edina spojina, ki se ni obarjala, je bila GUK-662. Obarjanje spojin predstavlja velik problem pri merjenju permeabilnostnih lastnosti, saj je raztopljena spojina na donorski strani difuzijske celice pogoj za prehajanje skozi gastrointestinalno membrano v sistemski krvni obtok.

Toksično delovanje spojin na ileum podgane je oteževalo delo pri poskusu permeabilnosti zaradi številnih neuporabnih meritev. Še pomembnejše je, da tovrstno *in vitro* delovanje lahko napoveduje večjo pogostnost gastrointestinalnih stranskih učinkov.

Osnovni namen dela je bil ugotoviti, ali spojine v zadostni meri prehajajo iz prebavnega trakta, da bi dosegli dovolj visoko koncentracijo v sistemskem krvnem obtoku in možganih, ki so tarčno mesto delovanja zaviralcev holinesteraz.

Spojine GUK-662, GBB-49 in GBB-79 so bile nizko permeabilne. Za te spojine načeloma velja, da zaradi slabega prehajanja skozi črevesno sluznico slabše prehajajo tudi skozi HE-bariero. Edina spojina, ki je imela visoko gastrointestinalno permeabilnost, je bila spojina CB-14948874. Zanjo lahko sklepamo, da bi lahko uspešno prehajala HE-bariero.

S to trditvijo sovpada tudi dejstvo, da so vse spojine skozi ileum podgane prehajale s pomočjo pasivnega transporta. Posledično ni bilo nobenega izrazitega aktivnega transporta v eliminatorni smeri.

Nizke vrednosti navideznih permeabilnostnih koeficientov niso bile dober podatek za spojine, ki imajo mesto delovanja v možganih. Pričakujemo lahko omejeno porazdeljevanje spojin v centralni živčni sistem. Še slabše bi bilo le, če bi bile te spojine tudi substrati aktivnega transporta v eliminatorni smeri, saj bi lahko v tem primeru pričakovali povsem zanemarljivo porazdeljevanje v centralni živčni sistem.

Visoke vrednosti molekulske mase, porazdelitvenega koeficiente in koeficiente distribucije pri preiskovanih spojinah so se ujemale z ugotovljeno slabšo topnostjo in permeabilnostjo. Glede permeabilnosti je kot tista lastnost molekul, ki se je ujemala z izmerjenimi permeabilnostmi, izstopala velikost oziroma molekulska masa. Večjo skupino spojin in njihove ADMET lastnosti bi lahko raziskali še s pomočjo računalniških simulacij.

6 LITERATURA

1. Ribarič S: Temelji patološke fiziologije. Univerza v Ljubljani, Medicinska fakulteta, Inštitut za patološko fiziologijo, Ljubljana, 2009; 315-320
2. Sarpini E, Schdlterns P, Feldman H: *Treatment of Alzheimer's disease: current status and new perspectives*. The Lancet Neurology, 2003; 539-547
3. Patrick GL: *An Introduction to Medicinal Chemistry*, 3. izdaja. Oxford University Press Inc., New York, 2005
4. Rang HP, Dale MM, Ritter JM, Flower RJ: *Rang and Dale's pharmacology*, 6. izdaja. Churchill Livingstone, Elsevier, Philadelphia, 2010
5. Stojan R, Stojan Ž, Stojan J: *Holin-esteraze: struktura, delovanje ter inhibicija z naravnimi in sintetičnimi strupi*. Medicinski razgledi, 2008; 47: 293-307
6. Standridge JB: *Pharmacotherapeutic approaches to the treatment of Alzheimer's disease*. Clinical Therapeutics, 2004; 615-630
7. Register zdravil RS, XII. Izdaja: http://www.ivz.si/register/RZ_ATCN.HTM
8. Saluja S, Kasha PC, Paturi J, Anderson C, Morris R, Banga AK: *A novel electronic skin patch for delivery and pharmacokinetic evaluation of donepezil following transdermal iontophoresis*. International Journal of Pharmaceutics, 2013; 453: 395-399
9. PubChem, donepezil: http://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/summary/summary.cgi?cid=3152&loc=ec_rcs, dostop: 10.10.2013
10. PubChem, galantamin: <http://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/summary/summary.cgi?cid=9651>, dostop: 10.10.2013
11. PubChem, rivastigmin: http://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/summary/summary.cgi?cid=77991&loc=ec_rcs, dostop: 10.10.2013
12. Gleeson MP. *Generation of a set of simple, interpretable ADMET rules of thumb*. Journal of Medicinal Chemistry, 2008; 51:817-34
13. Waterbeemd H van de, Gifford E: *ADMET in silico modelling: Towards prediction paradise*. Nature Reviews Drug Discovery, 2003; 2(3):192-204
14. Waterbeemd H van de, Testa B: *Drug Bioavailability: Estimation of Solubility, Permeability, Absorption and Bioavailability*, 2. izdaja. Wiley-VCH, Weinheim, 2009
15. Žorž M: *HPLC*. Samozaložba, Ljubljana, 1991

16. Hansen SH, Pedersen-Bjergaard S, Rasmussen KE: *Introduction to Pharmaceutical Chemical Analysis*. John Wilwy & Sons Inc., Chichester, 2012
17. DeSesso JM, Jacobson CF: *Anatomical and physiological parameters affecting gastrointestinal absorption in humans and rats*. Food and Chemical Toxicology, 2001; 39: 209-228
18. MacDonald T, Monteleone I, Fantini MC, Momteleone G: *Regulation of homeostasis and inflammation in the intestine*. Gastroenterology, 2011; 1768-1775
19. Masaoka Y, Tanaka Y, Kataoka M, Sakuma S, Yamashita S: *Site of drug absorption after oral administration: Assessment of membrane permeability and luminal concentration of drugs in each segment of gastrointestinal tract*. European Journal of Pharmaceutical Sciences, 2006; 29: 240-250
20. Welling PG: *Pharmacokinetics: processes, mathematics and applications*, 2. izdaja. American Chemical Society, Washington, 1997
21. Čebašek V: *Anatomija prebavne cevi*. Medicinski razgledi, 2010; 49: 347-369
22. Shargel L, Wu-Pong S, Yu A: *Applied Biopharmaceutics and Pharmacokinetics*, 6. izdaja. The McGraw-Hill Companies, Inc., 2012
23. Žakelj S, Šturm K, Kristl A: *Ciprofloxacin permeability and its active secretion through rat small intestine in vitro*. International Journal of Pharmaceutics, 2006; 313:175–180
24. Estudante M, Morais JG, Soveral G, Benet LZ: *Intestinal drug transporters: An overview*. Advanced Drug Delivery Reviews, 2012;
25. Egan WJ, Lauri G: *Prediction of intestinal permeability*. Advanced Drug Delivery Reviews, 2001; 54: 273-289
26. Chan LMS, Lowes S, Hirst BH: *The ABCs of drug transport in intestine and liver: efflux proteins limiting drug absorption and bioavailability*. European Journal of Pharmaceutical Sciences, 2004; 21: 25-51
27. You G, Morris ME: *Drug transporters: Molecular characterization and role in drug disposition*. John Wiley & Sons, Inc., 2007
28. Verbeeck RK, Musuanba FT: *The revised 2010 EMA guideline for the investigation of bioequivalence for immediate release oral formulations with systemic action*. Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences, 2012; 15: 376-388
29. Benet LZ: *The role of BCS (Biopharmaceutics Classification System) and BDDCS (Biopharmaceutics Drug Disposition Classification System) in Drug Development*. Journal of Pharmaceutical Sciences, 2013; 102(1):34-42

30. Garberg P, Ball M, Borg N, Cecchelli R, Fenart L, Hurst RD, Lindmark T, Mabondzo A, Nilsson JE, Raub TJ, Stanimirovic D, Terasaki T, Öberg JO, Österberg T: *In vitro models for the blood-brain barrier.* Toxicology in Vitro, 2005; 19: 299-334
31. Broccatelli F, Larregieu CA, Cruciani G, Oprea TI, Benet LZ: *Improving the prediction of the brain disposition for orally administered drugs using BDDCS.* Advanced Drug Delivery Reviews, 2012; 64: 95-109
32. Bogataj M, Kerec M, Grabnar I, Primožič S, Mrhar A: *Vaje iz biofarmacije s farmakokinetiko, skripta.* Fakulteta za farmacijo Univerze v Ljubljani, Katedra za biofarmacijo in farmakokinetiko, 2001
33. Centralna baza zdravil: Povzetek temeljnih značilnosti zdravila Aricept (donepezil): [http://www.cbz.si/zzzs/pao/bazazdr2.nsf/o/EB986CDCBE6FBF76C12579C2003F4A9F/\\$File/s-012346.pdf](http://www.cbz.si/zzzs/pao/bazazdr2.nsf/o/EB986CDCBE6FBF76C12579C2003F4A9F/$File/s-012346.pdf), dostop: 20.8.2013
34. Centralna baza zdravil: Povzetek temeljnih značilnosti zdravila Reminyl (galantamin): [http://www.cbz.si/zzzs/pao/bazazdr2.nsf/o/4BB0032558F18AF9C12579C2003F655D/\\$File/s-008263.pdf](http://www.cbz.si/zzzs/pao/bazazdr2.nsf/o/4BB0032558F18AF9C12579C2003F655D/$File/s-008263.pdf), dostop: 20.8.2013
35. Williams B, Nazarians A, Gill MA: *A review of rivastigmine: A reversible cholinesterase inhibitor.* Clinical Therapeutics, 2003; 1634-1653
36. Emeršič A, Pirtošek Z, Štempelj M, Štrukelj B: Zdravljenje Alzheimerjeve bolezni. Farmacevtski vestnik, 2013; 64: 202-207
37. Žakelj S, Berginc K, Roškar R, Kralj B, Kristl A: *Do the recommended standards for in vitro biopharmaceutic classification of drug permeability meet the "passive transport" criterion for biowaivers?* Current Drug Metabolism, 2013; [Epub ahead of print]
38. Benet LZ, Amidon GL, Barends DM, Lannernäs H, Polli JE, Shah VP, Stavchansky SA, Yu LX: The use od BDDCS in classifying the permeability of marketed drugs. Pharmaceutical Research, 2008; 25: 483-488
39. Benet LZ, Broccatelli F, Oprea TI: *BDDCS applied to over 900 drugs.* The AAPS Journal, 2011; 13(4):519-47
40. Agatonovic-Kustrin S, Beresford R, Pauzi A, Yusof M: *Theoretically-derived molecular descriptors important in human intestinal absorption.* Journal of Pharmaceutical and Biomedical analysis, 2001; 25: 227-237
41. Ungell AL, Nylander S, Bergstrand S, Sjöberg A, Lennernäs: *Membrane transport of drugs in different regions of the intestinal tract of the rat.* Journal of Pharmaceutical Sciences, 1998; 87: 360-6

42. Eddy EP, Maleef BE, Hart TK, Smith PL: *In vitro models to predict blood-brain barrier permeability*. Advanced Drug Delivery Reviews, 1997; 23: 185-198

43. Terasaki T, Ohtsuki S, Hori S, Takanaga H, Nakashima E, Hosoya K: *New approaches to in vitro models of blood-brain barrier drug transport*. Drug Discovery Today, 2003; 944-954