

Univerza v Ljubljani  
Fakulteta *za farmacijo*



TINA JARC

**DOLOČITEV REFERENČNIH VREDNOSTI  
PERMEABILNOSTNIH KOEFICIENTOV ZA  
BIOFARMACEVTSKO KLASIFIKACIJO UČINKOVIN S  
CELIČNIM MODELOM Caco-2**

**DETERMINATION OF REFERENCE PERMEABILITY  
COEFFICIENTS FOR THE BIOPHARMACEUTICAL  
CLASSIFICATION SYSTEM OF ACTIVE SUBSTANCES ON  
Caco-2 CELL MODEL**

Ljubljana, 2013

Diplomsko nalogo sem opravljala na Katedri za biofarmacijo in farmakokinetiko na Fakulteti za farmacijo pod mentorstvom doc. dr. Simona Žaklja in somentorstvom doc. dr. Katje Kristan. Eksperimentalni del naloge sem opravljala v Leku. Slikanje celic z elektronskim mikroskopom so izvedli na Inštitutu za biologijo celice na Medicinski fakulteti.

## **HVALA**

- \* *Mentorju doc. dr. Simonu Žaklju in somentorici doc. dr. Katji Kristan*
- \* *Izr. prof. dr. Mateji Erdani Kreft z Inštituta za biologijo celice in sodelavcem v Leku*
- \* *Janezu, Magdaleni, Blanki in staršem*

## **IZJAVA**

Izjavljam, da sem diplomsko nalogo samostojno izdelala pod mentorstvom doc. dr. Simona Žaklja in somentorstvom doc. dr. Katje Kristan.

Tina Jarc

Ljubljana, september 2013

Predsednica diplomske komisije: prof. dr. Mirjana Gašperlin, mag. farm.

Član diplomske komisije: asist. dr. Stane Pajk, mag. farm.

## VSEBINA

<b>1</b>	<b>UVOD.....</b>	<b>1</b>
<b>1.1</b>	<b>Peroralna aplikacija zdravil.....</b>	<b>1</b>
1.1.1	Dejavniki, ki vplivajo na absorpcijo zdravilnih učinkovin po peroralni aplikaciji.....	1
<b>1.2</b>	<b>Mehanizmi prehoda zdravilnih učinkovin skozi sluznico tankega črevesa .....</b>	<b>2</b>
1.2.1	Pasivni transcelularni transport.....	3
1.2.2	Transcelularni transport s pomočjo prenašalnih proteinov .....	3
1.2.3	Paracelularni transport .....	3
1.2.4	Endocitoza.....	4
1.2.5	Aktivni transport v eliminatorni smeri .....	4
<b>1.3</b>	<b>Biofarmaceutski klasifikacijski sistem .....</b>	<b>4</b>
<b>1.4</b>	<b>Opustitev <i>in vivo</i> bioekvivalentnih študij osnovana na BCS.....</b>	<b>7</b>
1.4.1	Topnost .....	7
1.4.2	Permeabilnost oz. absorpcija .....	8
1.4.3	Določanje <i>in vitro</i> sproščanja .....	9
<b>1.5</b>	<b>Celični model Caco-2 .....</b>	<b>10</b>
1.5.1	Lastnosti celičnega modela Caco-2.....	11
<b>1.6</b>	<b>Lastnosti testiranih učinkovin.....</b>	<b>12</b>
<b>2</b>	<b>NAMEN DELA.....</b>	<b>13</b>
<b>3</b>	<b>MATERIALI IN METODE.....</b>	<b>14</b>
<b>3.1</b>	<b>Spojine za pripravo donorskih raztopin .....</b>	<b>14</b>
<b>3.2</b>	<b>Raztopine .....</b>	<b>14</b>
3.2.1	Donorske raztopine .....	14
3.2.2	Donorska raztopina spojine Lucifer Yellow .....	15
3.2.3	Raztopina pufra s pH 7,4 .....	15
3.2.4	Hranilni medij za celice .....	15
3.2.5	Raztopina za odcepitev pritrjenih celic na podlago .....	15
3.2.6	Raztopine in reagenti za pripravo celic na slikanje z elektronskim mikroskopom .....	15
<b>3.3</b>	<b>Aparature in pribor.....</b>	<b>16</b>
<b>3.4</b>	<b>Caco-2 celice .....</b>	<b>17</b>
3.4.1	Postopek gojenja Caco-2 celic .....	17
3.4.2	Priprava monoslojev Caco-2 celic na poskus.....	19

<b>3.5</b>	<b>Avtomatska izvedba poskusa .....</b>	<b>19</b>
<b>3.6</b>	<b>Testiranje kompatibilnosti pufra (0,1 M HEPES v HBSS) s celičnim monoslojem Caco-2 ...</b>	<b>21</b>
<b>3.7</b>	<b>Preverjanje integritete celičnega monosloja po koncu poskusa .....</b>	<b>21</b>
<b>3.8</b>	<b>Testiranje Caco-2 celic na okužbo z Mycoplasma .....</b>	<b>21</b>
<b>3.9</b>	<b>Priprava celičnega monosloja za slikanje z elektronskim mikroskopom .....</b>	<b>22</b>
<b>3.10</b>	<b>Določevanje Lucifer Yellow in FITC-Dekstranov v vzorcih .....</b>	<b>22</b>
<b>3.11</b>	<b>Določevanje učinkovin v vzorcih.....</b>	<b>23</b>
<b>3.12</b>	<b>Izračun permeabilnostnega koeficienta (<math>P_{app}</math>) .....</b>	<b>25</b>
<b>3.13</b>	<b>Statistična obdelava podatkov .....</b>	<b>26</b>
<b>4</b>	<b><i>REZULTATI IN RAZPRAVA</i>.....</b>	<b>28</b>
<b>4.1</b>	<b>Lastnosti monosloja Caco-2 celic .....</b>	<b>28</b>
4.1.1	Razrast celic po površini membrane v monosloju in njihova diferenciacija .....	28
4.1.2	Testiranje Caco-2 celic na okužbo z Mycoplasma .....	30
4.1.3	Integriteta celičnega monosloja .....	30
4.1.4	Vitalnost monosloja po koncu poskusa.....	33
<b>4.2</b>	<b>Določitev permeabilnostnih koeficientov učinkovin s celičnim modelom Caco-2.....</b>	<b>34</b>
4.2.1	Dobro permeabilne zdravilne učinkovine .....	36
4.2.2	Slabo permeabilne zdravilne učinkovine.....	40
<b>4.3</b>	<b>Korelacija med permeabilnostnimi koeficienti (<math>P_{app}</math>), določenimi s celičnim modelom Caco-2, in absorbirano frakcijo učinkovine pri ljudeh (<math>f_a</math>).....</b>	<b>45</b>
<b>5</b>	<b><i>SKLEPI</i> .....</b>	<b>47</b>
<b>6</b>	<b><i>VIRI IN LITERATURA</i> .....</b>	<b>48</b>

## POVZETEK

Celice Caco-2 so rakave celice debelega črevesa, ki imajo podobne lastnosti kot enterociti, zato se celični model Caco-2 uporablja za študije permeabilnosti učinkovin skozi steno prebavnega trakta. Ker se rezultati, pridobljeni na Caco-2 celičnem modelu, med različnimi laboratoriji lahko razlikujejo, njihova kvantitativna primerjava ni mogoča in mora imeti vsak laboratorij postavljene svoje standarde. V okviru diplomskega dela smo v novem celičnem laboratoriju vzpostavili celični model Caco-2 za določanje permeabilnosti učinkovin.

Z gojenjem Caco-2 celic v aseptičnem okolju pod nadzorovanimi pogoji in po natančno določenem protokolu gojenja smo zagotavljali, da so celice tvorile kompakten monosloj in se v obdobju rasti ustrezno diferencirale.

Permeabilnost učinkovin skozi celični monosloj smo testirali avtomatsko s pomočjo robota Freedom EVO, Tecan. Testirali smo 6 slabo permeabilnih učinkovin, ki so uvrščene v III. oziroma IV. razred po biofarmaceutskem klasifikacijskem sistemu (BCS), in 9 dobro permeabilnih učinkovin, ki so v I. oziroma II. razredu. S celičnim modelom Caco-2 smo lahko ustrezno ločili dobro in slabo permeabilne učinkovine. Metoprolol smo določili za interni standard ( $P_{app}=1,5 \times 10^{-05}$  cm/s), ki predstavlja najnižjo vrednost med dokazano dobro permeabilnimi učinkovinami na našem celičnem modelu. Pri furosemidu, lozartanu in ranitidinu smo potrdili aktivni transport v eliminatorni smeri, pri oksacilinu pa smo opazili aktivni transport v smeri absorpcije. Z namenom, da bi ovrednotili uporabnost celičnega modela Caco-2, smo za 14 modelnih učinkovin izračunali korelacijo med dobljenimi vrednostmi navideznih permeabilnostnih koeficientov ( $P_{app}$ ) in obsegom absorpcije ( $f_a$ ) pri ljudeh. Na osnovi rezultata ( $R^2=0,80$ ) smo ocenili, da je model dober, kljub nizkemu številu testiranih učinkovin.

**KLJUČNE BESEDE:** biofarmaceutski klasifikacijski sistem, celični model Caco-2, navidezni permeabilnostni koeficient ( $P_{app}$ )

## ABSTRACT

Caco-2 is a cell line derived from human colon cancer cells with similar characteristics to enterocytes, therefore, a Caco-2 cell model was developed as a model for intestinal permeability. Since the results obtained in the Caco-2 cell model can vary among different laboratories, quantitative comparison of results is not possible, and each laboratory should have a set of its own standards. As a part of this thesis, we have cultured cell model Caco-2 in a new cell laboratory.

By cultivation of Caco-2 cells in an aseptic environment under controlled conditions and by the specific protocol it was ensured that the cells formed a compact monolayer and that they differentiated appropriately during the growth period.

Permeability of active substances through the cell monolayer was tested automatically by using Freedom Evo robot, Tecan. Six poorly permeable substances, which are classified in the III<sup>rd</sup> or IV<sup>th</sup> class according to the BCS, and 9 well permeable substances that are listed in the I<sup>st</sup> or II<sup>nd</sup> class were tested. With the use of the Caco-2 cell model we were able to adequately distinguish well and poorly permeable active substances. Metoprolol ( $P_{app}=1,5 \times 10^{-05}$  cm/s) was chosen as the optimal internal standard, because it has the lowest apparent permeability coefficient ( $P_{app}$ ) of all active substances with good permeability tested in our cell model. In the case of furosemide, losartan and ranitidine active efflux was confirmed. In the case of oxacilline active transport in the direction of absorption was observed. In order to evaluate the usefulness of the Caco-2 cell model, we have calculated the correlation between the acquired  $P_{app}$  values and the extent of absorption ( $f_a$ ) for humans for 14 model compounds. On the basis of the result ( $R^2=0,80$ ) it was estimated that the model is adequate despite the low number of tested compounds.

**KEY WORDS:** Biopharmaceutical classification system, Caco-2 cell model, apparent permeability coefficient ( $P_{app}$ )

## OKRAJŠAVE

ABC	ATP-binding cassette
AP-BL	smer prehoda skozi Caco-2 celice z apikalne na bazolateralno stran
ADME	absorpcija, distribucija, metabolizem, eliminacija
ASBT	transporter žolčnih kislin (Apical sodium dependent bile acid transporter)
ATP	adenozin-trifosfat
BCS	biofarmacevtski klasifikacijski sistem/Biopharmaceutics Classification System
BL-AP	smer prehoda skozi Caco-2 celice z bazolateralne na apikalno stran
Caco-2	rakave celice debelega črevesa
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
ER	razmerje med vrednostjo $P_{app}$ v BL-AP smeri in AP-BL smeri (Efflux ratio)
EMA	Evropska agencija za zdravila/European Medicines Agency
$f_a$	faktor/obseg absorpcije
FDA	Ameriška agencija za hrano in zdravila/Food and Drug Administration
HBSS	Hank's Balanced Salt Solution
HEPES	4-(2-hidroksietil)-1-piperazinetan-sulfonska kislina
MCT1	monokarboksilat transporter 1
MEM	Minimum Essential Media
OATP-B	organski anion-transportni polipeptid
OCTN2	organski kation/karnitin transporter
$P_{app}$	navidezni permeabilnostni koeficient
PEPT1	oligopeptidni prenašalec/Oligopeptide Transporter
PET	polietilen tereftalat
$P_{gp}$	P-glikoprotein
protein BCRP	Breast Cancer Resistance Protein
protein MDR2	Multidrug Resistance Protein
TEER	transepitelijska električna upornost/Transepithelial Electrical Resistance
USP	Ameriška farmakopeja/United States Pharmacopoeia

# 1 UVOD

## 1.1 Peroralna aplikacija zdravil

Peroralno jemanje je najbolj razširjen in navadno za bolnika tudi najbolj udoben način aplikacije zdravil s sistemskim delovanjem. Razširjenost tega načina aplikacije potrjuje dejstvo, da je 84 % od petdesetih najbolj prodajanih farmacevtskih izdelkov na ameriškem in evropskem trgu namenjenih za peroralno uporabo (1). Pomembna farmakokinetična lastnost zdravilnih učinkovin, ki se absorbirajo skozi intestinalni epitelij, je njihova biološka uporabnost (2). S tem pojmom označujemo hitrost in obseg, v katerem aktivna učinkovina doseže sistemski krvni obtok in je posledično razpoložljiva na mestu delovanja (3).

### 1.1.1 Dejavniki, ki vplivajo na absorpcijo zdravilnih učinkovin po peroralni aplikaciji

Zdravilna učinkovina, ki jo apliciramo peroralno, je podvržena različnim procesom, preden doseže sistemski krvni obtok. Ti procesi lahko zmanjšajo njeno biološko uporabnost. Najprej se mora učinkovina sprostiti iz farmacevtske oblike in se raztopiti v prebavnem soku. Nato sledi njen prehod skozi hidrofilno difuzno plast mukusa do apikalne membrane enterocitov. Prehajanje skozi sluznico tankega črevesa v kapilare portalnega krvnega obtoka in limfni sistem poteka po različnih poteh, ki so opisane spodaj. Absorpcija zdravilnih učinkovin je zelo kompleksna in odvisna od številnih dejavnikov:

#### 1. Fizikalno-kemijske lastnosti zdravilne učinkovine:

- topnost
- hitrost raztapljanja
- polimorfizem in amorfizem
- velikost delcev in njihova aktivna površina
- hidratne/solvatne oblike
- logP
- oblika soli
- pKa
- stabilnost
- molekulska masa



2. Fiziološki dejavniki:

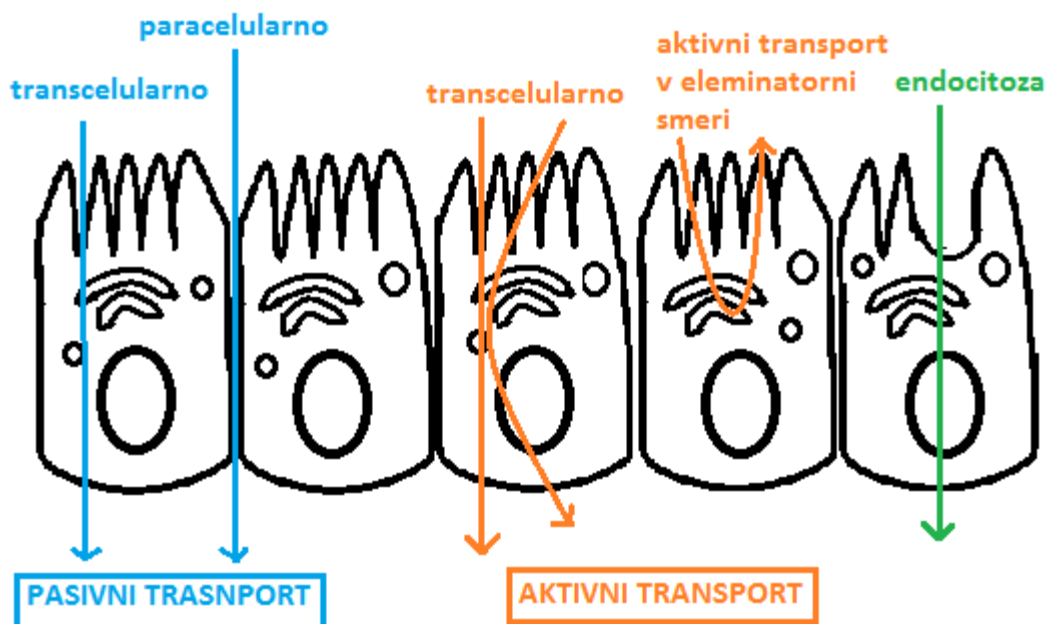
- hitrost praznjenja želodca
- čas potovanja skozi tanko črevo
- pH vzdolž prebavnega trakta
- črevesna vsebina
- predsistemski metabolizem, ki poteka v lumnu prebavnega trakta, enterocitih in jetrih
- pretok krvi skozi prebavni trakt

3. Lastnosti farmacevtske oblike:

- čas razpada
- sestava (zdravilna učinkovina in pomožne snovi)
- tip farmacevtske oblike (4,5).

## 1.2 Mehanizmi prehoda zdravilnih učinkovin skozi sluznico tankega črevesa

V osnovi lahko učinkovina prehaja iz lumna prebavnega trakta skozi enterocite (transcelularni transport) ali pa skozi celične stike med celicami (paracelularni transport)(slika 1). Večina učinkovin se absorbira skozi celice (6).



Slika 1: Pasivni transcelularni transport, transcelularni transport s pomočjo prenašalnih proteinov, paracelularni transport, aktivni transport v eliminatorni smeri, endocitoza zdravilnih učinkovin skozi sluznico tankega črevesa (povzeto po referenci 7)

### 1.2.1 Pasivni transcelularni transport

Učinkovine se absorbirajo s pasivno difuzijo vzdolž koncentracijskega gradienta. Značilna je linearna kinetika absorpcije. Da se lahko absorbirajo s pasivno difuzijo, morajo imeti ustrezne fizikalno-kemijske lastnosti. Neionizirane lipofilne spojine se hitro absorbirajo, ker so dobro topne v lipidnem dvosloju celične membrane. Pri zelo lipofilnih učinkovinah, ki imajo  $\log D_{\text{Oct},7.4} > 4$ , je lahko absorpcija zmanjšana, ker so slabo topne v hidrofilni difuzni plasti (mukusu), ki se nahaja pred enterociti. V tem primeru je zelo pomembna vloga žolčnih soli, ki izboljšajo njihovo topnost. Zelo hidrofilne molekule, ki imajo  $\log D_{\text{Oct},7.4} < -1$ , niso topne v lipidnem dvosloju in zato ne morejo prehajati skozi celično membrano enterocitov. V splošnem velja grob približek, da učinkovine slabše prehajajo s pasivnim transportom skozi celice, kadar ustrezajo naslednjim lastnostim: imajo več kot 5 donorjev za vodikovo vez, več kot 10 akceptorjev za vodikovo vez, molsko maso  $> 500$  g/mol in  $\log D_{\text{Oct},7.4} > 4,15$  (8).

### 1.2.2 Transcelularni transport s pomočjo prenašalnih proteinov

Hidrofilne učinkovine lahko prehajajo skozi celice z olajšano difuzijo ali z aktivnim transportom. Pri obeh oblikah transporta lahko pride do zasičenja prenašalca s substratom in ne izkazujejo linearne kinetike absorpcije. Absorpcija z olajšano difuzijo lahko poteka samo v smeri višje proti nižji koncentraciji substrata. Aktivni transport je mogoč tudi proti višji koncentraciji substrata, za kar je potrebna energija. Kot primarni vir energije služi hidroliza ATP, druga možnost pa je sklopljen transport z  $\text{Na}^+$  ali  $\text{H}^+$  (8).

### 1.2.3 Paracelularni transport

Transport skozi tesne stike med enterociti poteka le v manjši meri, saj ti predstavljajo zgolj 0,1 % celotne površine, ki je na voljo za absorpcijo. Prehajajo lahko le majhne hidrofilne molekule, za makromolekule pa so tesni stiki neprehodni. Transport skozi tesne stike ni nujno obratno sorazmeren z molsko maso spojine, ampak je bolj odvisen od velikosti molekule. Značilna je linearna kinetika absorpcije (8).

### 1.2.4 Endocitoza

Makromolekule, kot so peptidi in proteini, se lahko transportirajo z endocitozo. Ta praviloma nima bistvenega pomena za transport zdravilnih učinkovin (8).

### 1.2.5 Aktivni transport v eliminatorni smeri

Zdravilne učinkovine, ki prehajajo epitelij s pasivnim transcelularnim transportom, so lahko substrati za aktivni transport iz enterocitov nazaj v lumen prebavnega trakta. Glavno vlogo pri tem ima P-glikoprotein, ki sodi v družino ABC-transportnih proteinov. V prebavnem traktu se nahaja na apikalni membrani zrelih enterocitov (8).

## 1.3 Biofarmacevtski klasifikacijski sistem

V začetku 90. let prejšnjega stoletja so ameriški znanstveniki sodelovali pri razvoju novih regulatornih standardov za dokazovanje bioekvivalence generičnih zdravil, ki bi bili manj komplicirani, hkrati pa bi zagotavljali enako kakovost izdelkov. Eden glavnih rezultatov njihovega dela je bila postavitve biofarmacevtskega klasifikacijskega sistema (9). Pred nastopom BCS so bili bioekvivalentni standardi izključno empirični. Temeljili so na podlagi *in vivo* študij na ljudeh. Nato so z razlago temeljnih procesov, ki narekujejo peroralni proces absorpcije, v nekaterih primerih omogočili zagotavljanje bioekvivalence na osnovi BCS namesto z *in vivo* študijami. Koncept BCS sloni na predvidevanju, da se bo iz dveh farmacevtskih izdelkov, ki vsebujeta enako aktivno snov in imata enak koncentracijsko-časovni profil pri vseh pogojih v prebavnem traktu, aktivna snov absorbirala z enako hitrostjo in v enakem obsegu, torej bosta bioekvivalentna (10). Ta koncept lahko povzamemo s 1. Fickovim zakonom:

$$J_W = P_W \times C_W \quad (1)$$

$J_W$  ..... pretok skozi črevesno steno

$P_W$  ..... permeabilnost membrane

$C_W$  ..... koncentracija učinkovine na površini intestinalne membrane

Predpostavljeno je, da so ob membrani zagotovljeni *sink* pogoji (10).

Teorija, na kateri temelji BCS, definira tri brezdimenzijska števila, s katerimi opredeli zdravilne učinkovine. Ta števila izražajo kombinacijo fizikalno-kemijskih in fizioloških parametrov ter predstavljajo temeljni pogled na absorpcijo zdravilne učinkovine (7).

1) *Absorption number –  $A_n$* :

Predstavlja kvocient med povprečnim časom zadrževanja učinkovine in povprečnim časom absorpcije (12).

$$A_n = P_{eff} \times t_{res} / R \quad (2)$$

2) *Dissolution number –  $D_n$* :

Gre za kvocient med povprečnim časom zadrževanja učinkovine in povprečnim časom raztapljanja, kar vključuje topnost, hitrost raztapljanja, difuzibilnost, gostoto, prvotni polmer delcev zdravilne učinkovine in povprečni čas prehoda skozi gastrointestinalni trakt (7).

$$D_n = t_{res} / t_{diss} \quad (3)$$

3) *Dose number –  $D_0$* :

$D_0$  je definirano kot razmerje med koncentracijo zdravilne učinkovine in njeno topnostjo (12).

$$D_0 = M_0 / C_s V_0 \quad (4)$$

$M_0$  ..... apliciran odmerek

$C_s$  ..... topnost učinkovine

$V_0$  ..... količina vode, ki jo zaužijemo z odmerkom (250 mL)

$t_{res}$  ..... povprečni čas zadrževanja v tankem črevesu

$t_{diss}$  ..... čas, potreben za raztopitev učinkovine

$P_{eff}$  ..... efektivni permeabilnostni koeficient

$R$  ..... polmer tankega črevesa (12).

Od vseh dejavnikov, ki vplivajo na absorpcijo zdravilnih učinkovin, sta ključna topnost zdravilne učinkovine in njena permeabilnost skozi steno prebavnega trakta. BCS predlaga štiri razrede, v katere lahko uvrstimo zdravilno učinkovino na podlagi podatkov o njeni topnosti, permeabilnosti in hitrosti sproščanja iz farmacevtske oblike (7).

#### I. razred:

V prvi razred uvrščamo zdravilne učinkovine, ki so dobro topne in dobro permeabilne skozi epitelij prebavnega trakta. Imajo visoko vrednost  $A_n$  in  $D_n$ . Hitrost praznjenja želodca je edini dejavnik, ki določa hitrost absorpcije učinkovin, ki so uvrščene v ta razred (12).

#### II. razred:

Zdravilne učinkovine iz II. razreda so slabše topne in so dobro permeabilne. Značilna je visoka vrednost  $A_n$ , medtem ko je vrednost  $D_n$  nizka (10). Hitrost raztapljanja *in vivo* je dejavnik, ki omejuje hitrost absorpcije. To pride še posebej do izraza pri zelo visoki vrednosti  $D_0$ . Absorpcija učinkovin iz II. razreda je običajno počasnejša kot pri učinkovinah iz I. razreda in traja skozi daljši časovni interval (12).

#### III. razred:

Za ta razred učinkovin je značilna dobra topnost in slaba permeabilnost skozi steno prebavnega trakta. Pojavlja se visoka neskladnost v hitrosti in obsegu absorpcije. Kadar se učinkovina hitro raztopi, to je 85 % v manj kot 15 min, je neskladnost posledica sprememb fizioloških dejavnikov, in sicer črevesne vsebine, časa potovanja vzdolž tankega črevesa, permeabilnosti membrane. Faktorji, ki so povezani z lastnostmi farmacevtske oblike, v tem primeru niso tako pomembni, če te ne vplivajo na permeabilnost in čas potovanja vzdolž prebavnega trakta. Nekateri trdijo, da bi tudi v primeru teh učinkovin lahko opuščali bioekvivalentne študije na prostovoljcih (11).

#### IV. razred:

V IV. razred uvrščamo zdravilne učinkovine, ki so slabo topne in permeabilne. Zato so problematične za peroralni način aplikacije. Običajno imajo nizko biološko uporabnost, ki je praviloma tudi ni možno dobro predvideti z *in vitro* testi (11).

## 1.4 Opustitev *in vivo* bioekvivalentnih študij osnovana na BCS

FDA in EMA v svojih smernicah dopuščata možnost, da se uporablja opustitev *in vivo* bioekvivalentnih študij osnovana na BCS, kadar so izpolnjeni ustrezni pogoji za trdne peroralne farmacevtske oblike s takojšnjim sproščanjem, ki so namenjene sistemski uporabi. Opustitev je mogoča samo za zdravilne učinkovine, ki nimajo ozkega terapevtskega okna (13,14). Splošne zahteve, ki jih navaja EMA so, da mora zdravilna učinkovina izkazovati visoko topnost in popolno absorpcijo (14). Po smernicah FDA mora biti zdravilna učinkovina dobro permeabilna (13). Prav tako mora biti dokazano zelo hitro (> 85 % znotraj 15 min) ali podobno hitro (85 % znotraj 30 min) *in vitro* sproščanje za testno in referenčno zdravilno učinkovino s strani EMA (14). FDA zahteva, da je sproščanje referenčne in testne substance zelo hitro (ne manj kot 85 % znotraj 30 min) (13). Po navodilih EMA morajo biti pomožne snovi, ki bi lahko imele vpliv na biološko uporabnost, kvalitativno in kvantitativno enake pri referenčnem in testnem izdelku. Zaželeno je uporaba enakih pomožnih snovi v enakih količinah (14). Po priporočilih FDA ne sme biti verjetno, da bi pomožne snovi imele kakršen koli pomemben vpliv na absorpcijo učinkovin. Tem kriterijem lahko ustrezajo zdravilne učinkovine, ki so po BCS uvrščene v I. razred (13,14).

EMA razširja možnost opustitve *in vivo* bioekvivalentnih študij tudi za III. razred. Zdravilna učinkovina ima lahko omejeno absorpcijo, mora pa imeti dobro topnost. *In vitro* sproščanje testne in referenčne substance mora biti zelo hitro (> 85 % znotraj 15 min). Pomožne snovi, ki bi lahko imele vpliv na bioekvivalenco, morajo biti kvalitativno enake in kvantitativno zelo podobne (14).

Tako FDA kot tudi EMA predpisujeta na kakšen način določimo profil topnosti učinkovine, njeno permeabilnost oz. absorpcijo in sproščanje iz farmacevtske oblike. Predpisi se med posameznima agencijama nekoliko razlikujejo.

### 1.4.1 Topnost

EMA: Zdravilna učinkovina je dobro topna, kadar se najvišji enkratni odmerek popolnoma raztopi v 250 mL pufra v pH območju 1–6,8 pri  $37 \pm 1$  °C. Potrebna je določitev topnosti v najmanj treh raztopinah pufrov znotraj predpisanega pH območja. Priporočeno je

določanje pri pH 1,2, 4,5, in 6,8 ter pri vrednosti pKa, če je ta znotraj območja. pH vrednosti raztopin moramo preveriti pred in po dodatku zdravilne učinkovine pufri (14).

FDA: Tudi FDA zahteva določitev profila topnosti v odvisnosti od pH. Smernica navaja določanje topnosti v pH območju 1–7,5 pri  $37\pm 1$  °C v vodnem mediju. Potrebno je izvesti zadostno število meritev pri različnih pH vrednostih. Te lahko določimo na podlagi ionizacijskih lastnosti zdravilne učinkovine. Na primer, kadar je pKa zdravilne učinkovine v območju 3–5, lahko določimo topnost pri  $\text{pH} = \text{pKa}$ ,  $\text{pH} = \text{pKa} + 1$ ,  $\text{pH} = \text{pKa} - 1$ , ter pri pH 1 in 7,5. Priporočeno je, da se opravijo najmanj tri ponovitve meritev pri posamezni pH vrednosti. Zdravilna učinkovina je dobro topna, kadar se odmerek najvišje jakosti raztopi v  $\leq 250$  mL vodnega medija znotraj pH območja 1–7,5 (13).

Kot je opisano, se smernici glede določanja topnosti med FDA in EMA razlikujeta v tem, da se topnost pri EMA določa glede na najvišji odmerek, pri FDA pa za najvišjo jakost. Pri FDA pa je širši pH interval.

#### **1.4.2 Permeabilnost oz. absorpcija**

EMA: Po EMA smernici za raziskovanje bioekvivalence (Guideline on the investigation of bioequivalence) je popolna absorpcija dosežena, kadar je izmerjen obseg absorpcije pri ljudeh  $\geq 85\%$ . Običajno je povezana z visoko permeabilnostjo. Dokažemo jo lahko z določanjem absolutne biološke uporabnosti ali študijami masne bilance pri ljudeh. Slednjo lahko uporabimo samo v primeru, kadar se izloči več kot 85 % apliciranega odmerka v urin, in sicer v obliki prvotne zdravilne učinkovine, oksidativnih metabolitov faze 1 in konjugativnih metabolitov faze 2. Kot podpora študijam absolutne biološke uporabnosti in masne bilance pri ljudeh, so lahko različni *in vitro* testi permeabilnosti, med katere sodi tudi celični model Caco-2 (preglednica I). Predložimo lahko tudi pridobljene podatke o bioekvivalenci med peroralno aplicirano trdno farmacevtsko obliko in vodno raztopino za izbrano zdravilno učinkovino (14).

FDA: Zdravilna učinkovina je dobro permeabilna, če se absorbira več kot 90 % apliciranega odmerka. Po FDA smernici je na voljo več različnih metod za določanje razreda permeabilnosti kot pri EMA.

Preglednica I: Metode za testiranje permeabilnosti učinkovin (15)

<b>Metode na ljudeh</b>	študije masne bilance študije absolutne biološke uporabnosti <i>in vivo</i> intestinalna perfuzija
<b>Metode na živalih</b>	<i>in vivo</i> intestinalna perfuzija <i>in situ</i> intestinalna perfuzija
<b><i>In vitro</i> metode</b>	permeabilnost skozi izrezano človeško ali živalsko tkivo transport skozi monosloj epitelijskih celic

V veliko primerih zadostuje ena sama metoda (npr. kadar je absolutna biološka uporabnost vsaj 90 % ali kadar se z urinom izloči najmanj 90 % aplicirane učinkovine). Če z uporabo ene same metode ne moremo dokončno določiti razreda permeabilnosti, uporabimo dve različni metodi. Metode na živalih in *in vitro* so primerne za testiranje permeabilnosti učinkovin, ki prehajajo s pasivnim transportom. Kot podpora lahko služijo tudi podatki o kemijski strukturi zdravilne učinkovine in porazdelitveni koeficient v sistemu olje/voda (13).

#### 1.4.3 Določanje *in vitro* sproščanja

Z *in vitro* študijami sproščanja proučujemo in potrjujemo podobno *in vitro* sproščanje testne in referenčne substance in pri tem upoštevamo fiziološko pomembne eksperimentalne pH pogoje. Test izvajamo v USP aparaturi I (aparatura s košarico) pri 100 obr./min ali v USP aparaturi II (aparatura z veslastim mešalom) pri 50 obr./min. Po smernicah EMA določamo *in vitro* sproščanje v naslednjih raztopinah, ki imajo volumen 900 mL ali manj:

- 0,1 N HCl ali umetni želodčni sok brez encimov pri pH 1,0–1,2
- pufer s pH 6,8 ali umetni črevesni sok brez encimov pri pH 6,8

V primeru želatinastih kapsul ali tablet z želatinasto oblogo je lahko sprejemljiva uporaba encimov. Vzorčenje med poskusom je priporočeno v naslednjih časovnih točkah: 10, 12, 20, 30 in 45 min (14).

Smernice so pri FDA zelo podobne kot pri EMA. Testiranje poteka v enakih aparaturah pod enakimi pogoji. Razen v primeru 0,1 N HCl se testiranje izvaja samo pri pH 1 in ne v območju 1–1,2 kot pri EMA. FDA dodatno priporoča uporabo USP aparature I za kapsule



in USP aparaturo II v primeru tablet. Predlagane časovne točke vzorčenja so tudi nekoliko drugačne, in sicer pri 10, 15, 20 in 30 min (13).

Obe agenciji priporočata uporabo najmanj 12 enot zdravila za vsak poskus, da lahko ustrezno statistično ovrednotimo rezultate. Z namenom, da bi se zagotovila reprezentativnost rezultatov, EMA dodatno priporoča testiranje več kot ene same serije testne in referenčne formulacije (13,14).

V primeru, ko se iz testne in referenčne formulacije ne sprosti 85 % ali več predpisane količine zdravilne učinkovine v  $\leq 15$  minutah, FDA zahteva primerjavo profilov sproščanja s faktorjem podobnosti  $f_2$ , sicer pa s strani obeh agencij ni potrebno izvajati  $f_2$  testa (13,14). Faktor podobnosti je logaritemska recipročna transformacija kvadratnega korena vsote kvadratov napake. Predstavlja merilo podobnosti sproščanja med dvema krivuljama in se izraža v odstotkih.

$$f_2 = 50 \log \{ [1 + (1/n) \sum_{t=1}^{t=n} (R_t - T_t)^2]^{-0.5} \cdot 100 \} \quad (5)$$

$n$ ..... število časovnih točk

$R_t$ ..... aritmetična sredina odstotka sproščene učinkovine referenčnega zdravila v času  $t$  po začetku študije

$T_t$ ..... aritmetična sredina odstotka sproščene učinkovine testnega zdravila v času  $t$  po začetku študije

Profila sproščanja sta podobna, kadar je  $f_2$  vrednost  $\geq 50$  % (13).

## 1.5 Celični model Caco-2

V 70. letih prejšnjega stoletja so razvili celične linije iz celic, ki so jih pridobili iz različnih tumorjev v prebavnem traktu z namenom raziskovanja rakavih obolenj in citostatične terapije. Desetletje kasneje so tudi drugi usmerili pozornost na nekatere specifične lastnosti, ki so jih izkazovale posamezne celične linije. V večini primerov so lahko delno inducirali diferenciacijo celic s pomočjo bioloških faktorjev, ki so jih dodali mediju. Ena od teh linij pa se je spontano diferencirala skozi daljši čas gojenja in to so bile rakave celice debelega črevesa (Caco-2). Prve študije na Caco-2 celicah so pokazale, da te

izražajo določene kemijske in biokemijske karakteristike enterocitov v tankem črevesu, čeprav celice izvirajo iz tumorja debelega črevesa (16).

Do danes so celični model Caco-2 zelo dobro preučili in ga sedaj v velikem obsegu uporabljajo v farmaciji v okviru ADME študij, v katerih med drugim ugotavljajo absorpcijske lastnosti učinkovin. Na modelu Caco-2 raziskujejo mehanizem prehajanja učinkovin skozi gastrointestinalni epitelij in manj pogosto tudi predsistemiški metabolizem (17). V smernici FDA predlagajo celični model Caco-2 kot eno od možnih metod za določitev permeabilnosti učinkovin, ki prehajajo s pasivnim transportom skozi steno prebavnega trakta, z namenom opustitve *in vivo* bioekvivalentnih študij za dokazovanje bioekvivalence generičnega zdravila z referenčnim, osnovane na BCS (13). V smernici EMA pa modela Caco-2 ne priznavajo kot primarno metodo za dokazovanje dobre permeabilnosti učinkovin za opustitev *in vivo* bioekvivalentnih študij, ampak kot podporen dokaz k pridobljenim podatkom v literaturi o študijah permeabilnosti učinkovin *in vivo* pri ljudeh (14).

### **1.5.1 Lastnosti celičnega modela Caco-2**

Celični model Caco-2 je enostaven za izvajanje testov permeabilnosti pod kontroliranimi pogoji. Z ustrezno opremo lahko izvedemo poskus tudi povsem avtomatizirano. Caco-2 celice tvorijo na filtrih insertov zraščeni epiteljski monosloji s tesnimi stiki med sosednjimi celicami. Tesni stiki med celicami so dosti manjši kot so v tankem črevesu pri ljudeh. Njihov polmer je 4 Å, polmer tesnih stikov med celicami v tankem črevesu pa je približno 8-13 Å. Zaznamo jih lahko že po štirih dneh od nasaditve celic na membrano. Integriteto monosloja lahko preverjamo z merjenjem transepiteljske električne upornosti (TEER) ali pa z določitvijo permeabilnosti ene od nizko permeabilnih spojin, ki se uporablja kot modelna spojina za določanje integritete monosloja (npr. manitol, inulin, Dekstran, PEG 4000, Lucifer yellow). Površinsko aktivne snovi, pomožne snovi, maščobne kisline in hormoni lahko spremenijo strukturo in funkcijo tesnih stikov in tako vplivajo na paracelularni transport učinkovin (18). Gre za heterogeno populacijo celic, pri katerih se na apikalni strani izoblikujejo mikrovili. Celice izločajo prebavne encime (npr. saharaza izomaltaza, laktaza, alkalna fosfataza), nekatere metabolne encime faze 1 (citokromi P450) in tudi konjugativne encime faze 2 metabolizma (sulfotransferaze, UDP-glukoroniltransferaze, glutation S-transferaze) (7). Ena od ključnih podobnosti z enterociti je tudi ta, da so na Caco-2 celicah izraženi nekateri prenašalni proteini za transport snovi

skozi celice. Na apikalni strani se nahajajo naslednji transporterji: oligopeptidni prenašalec (PEPT1), organski anion-transportni polipeptid (OATP-B), monokarboksilat transporter 1 (MCT1), transporter žolčnih kislin (ASBT), organski kation/karnitin transporter (OCTN2). Prav tako pa se na apikalni strani nahajajo tudi trije pomembni prenašalci za izločanje snovi iz celic nazaj na apikalno stran, in sicer P-glikoprotein, protein MRP2 (multidrug resistance protein) in protein BCRP (breast cancer resistance protein; ATP-binding cassette (ABC) family member) (18). Kljub temu, da se na Caco-2 celicah nahaja večina znanih transporterjev v tankem črevesu, se ti izražajo v drugačnem obsegu in je njihov nivo izražanja močno odvisen od starosti celic in tudi od pogojev gojenja (8). Prav tako na površini monosloja ni prisotne hidrofilne plasti mukusa kot je sicer v tankem črevesu (16). Zato moramo pri interpretaciji rezultatov, dobljenih s celičnim modelom Caco-2, upoštevati tudi omejitve, ki jih model ima (8).

## 1.6 Lastnosti testiranih učinkovin

Preglednica II: Pregled lastnosti testiranih učinkovin

Ime učinkovine	Molska masa [g/mol]	logP	BCS		f <sub>a</sub> pri ljudeh [%]
antipirin	188,23 (19)	1,2 (19)	I	(34)	99,0 (35)
karbamazepin	236,27 (20)	2,7 (20)	II	(34)	98,0 (35)
ketoprofen	254,28 (21)	3,6 (21)	I	(34)	95,0 (35)
metoprolol	267,36 (22)	1,8 (22)	I	(34)	95,0 (35,36)
propranolol	259,34 (23)	2,6 (23)	I	(34)	100,0 (35)
ropinirol	260,37 (24)	3,1 (24)	I	(35)	90,0 (35)
rosiglitazon	357,43 (25)	2,5 (25)	I	(34)	97,0 (35)
teofilin	180,16 (26)	-0,77 (26)	I	(34)	100,0 (35)
verapamil	454,60 (27)	5,0 (27)	I	(34)	100,0 (36,37)
amoksicilin	365,40 (28)	-2,3 (28)	III	(34)	72,0 (36,37)
atenolol	266,34 (29)	0,43 (29)	III	(34)	50,0 (35,36)
furosemid	330,74 (30)	1,8 (30)	IV	(34)	61,0 (35,36)
lozartan	422,91 (31)	5,1 (31)	III	(34)	65,0 (35)
oksacilin	401,44 (32)	1,7 (32)	III	(35)	33,0 (35)
ranitidin	314,40 (33)	0,98 (33)	III	(34)	50,0 (36)

## 2 NAMEN DELA

Celični model Caco-2 je enostaven in cenovno ugoden model za študije permeabilnosti učinkovin skozi prebavni trakt in je zato njegova uporaba zelo razširjena. Ugotovili so, da zaradi variabilnosti ni možna kvantitativna primerjava dobljenih vrednosti  $P_{app}$  med različnimi laboratoriji in je zato potrebno postaviti interne standarde v vsakem laboratoriju, če želimo, da bo model uporaben.

S tem namenom bomo v novem celičnem laboratoriju najprej definirali protokol gojenja celic, sestavo hranilnega medija, vrsto in velikost filtra in izbrano območje pasaj celic, ki jih bomo gojili. S postavljenim protokolom bomo poskusili zagotoviti celicam ustrezne pogoje, da bodo te po 21 dneh gojenja tvorile kompakten monosloj s tesnimi stiki med celicami, ki bodo tudi ustrezno diferencirane.

Določili bomo vrednosti  $P_{app}$  za FITC-Dekstrane s tremi različnimi molekulskimi masami (3000-5000, 10000 in 20000 g/mol). Na ta način bomo preverili, če smo s postavljenim protokolom gojenja res vzgojili monosloj z ustrezno integriteto, saj so FITC-Dekstrani, zaradi dokazane slabe permeabilnosti, modelne spojine za dokazovanje primerne integritete monosloja.

Pred testiranjem permeabilnosti bomo postavili protokol eksperimenta. Izbrali bomo delovni pufer, koncentracije učinkovin in časovne točke vzorčenja. Integriteto monosloja bomo preverili z merjenjem TEER pred poskusom. Prav tako jo bomo preverili po koncu poskusa, in sicer z določitvijo permeabilnosti spojine Lucifer Yellow na monoslojih, ki smo jih predhodno uporabili za testiranje permeabilnosti učinkovin.

Z določitvijo referenčnih vrednosti  $P_{app}$  15 izbranim učinkovinam, iz vseh štirih razredov BCS, bomo poskušali dobiti model, ki bo jasno ločil med dobro in slabo permeabilnimi učinkovinami. Uporabnost našega modela bomo ovrednotili tako, da bomo izračunali korelacijo med  $P_{app}$  testiranih učinkovin in vrednostmi  $f_a$  pri ljudeh.

Na celičnem modelu bomo preverili tudi, kako deluje mehanizem aktivnega transporta v absorptivni in eliminatorni smeri.

### 3 MATERIALI IN METODE

#### 3.1 Spojine za pripravo donorskih raztopin

Preglednica III: Natehtane količine spojin za pripravo donorskih raztopin

Ime spojine	Natehtana količina (mg)
antipirin	5
karbamazepin	1
ketoprofen	2,5
metoprolol	10
propranolol	4
ropinirol	0,4
rosiglitazon	1
teofilin	6
verapamil	7,5
amoksicilin	21
atenolol	5
furosemid	4
lozartan	5
oksacilin	50
ranitidin	30
FITC – Dekstran 3000-5000	5
FITC – Dekstran 10000	5
FITC – Dekstran 20000	5
Lucifer Yellow	0,67

#### 3.2 Raztopine

##### 3.2.1 Donorske raztopine

Donorske raztopine smo pripravili tako, da smo v 25 mL bučko natehtali predpisane količine spojin in dopolnili do oznake z raztopino pufra, katerega priprava in sestava je opisana v poglavju 3.2.3..

### **3.2.2 Donorska raztopina spojine Lucifer Yellow**

V vialo smo natehtali 0,67 mg Lucifer Yellow in ga raztopili v 258  $\mu$ L pufru. Nato smo odvzeli 100  $\mu$ L raztopine in jo prenesli v 25 mL bučko ter dopolnili s pufrom do oznake.

### **3.2.3 Raztopina pufru s pH 7,4**

5 ml 1 M Gibco® HEPES, Life technologies corporation (kataloška številka: 15639-056), smo dodali k 500 mL Gibco® HBSS, Life technologies corporation (kataloška številka: 14025-050) in premešali.

### **3.2.4 Hranilni medij za celice**

Hranilni medij smo pripravili pod aseptičnimi pogoji v mikrobiološki komori. Sestava:

- 500 mL Gibco® DMEM, Life technologies corporation, (kataloška številka: 32430-027)
- 50 mL Gibco® Fetal Bovine Serum, Life technologies corporation, (kataloška številka: 10500-0649)
- 5 mL Gibco® MEM Non-Essential Amino Acids Solution, Life technologies corporation, (kataloška številka: 11140050)
- 5 mL 1 mM Gibco® Sodium pyruvate, Life technologies corporation, (kataloška številka: 11360-039)

### **3.2.5 Raztopina za odcepitev pritrjenih celic na podlago**

Gibco® TrypLE™ (1X), Life technologies, (kataloška številka: 12563-029)

### **3.2.6 Raztopine in reagenti za pripravo celic na slikanje z elektronskim mikroskopom**

- raztopina fiksativa: 4,5 % paraformaldehid in 2 % glutaraldehid v 0,1 M kakodilatnem pufru, pH 7,2
- izpiralni pufer: 0,33 M saharoza v 0,1 M kakodilatnem pufru, pH 7,3
- raztopina za postfiksacijo: 1 % osmijev tetroksid v 0,1 M kakodilatnem pufru
- kontrastno sredstvo: 2 % uranil acetat, nasičena raztopina uranil acetata
- raztopina za prepojitev celic: 100 % etanol in umetna smola Epon v razmerju 1:1
- etanol (30 %, 50 %, 70 %, 90 %, 100 %)

- umetna smola Epon

### 3.3 Aparature in pribor

- aparat za merjenje števila in deleža živih celic v celični populaciji: ViCell™ XR, Beckman Coulter corporation
- CO<sub>2</sub> celični inkubator, Sanyo
- CO<sub>2</sub> celični inkubator, LiCONiC
- invertni mikroskop CKX4SF2 z digitalno kamero colorwiev II CCD, Olympus
- inkubator, Memmert
- naprava za centrifugiranje MIKRO 22R, Hettich
- naprava za centrifugiranje Centrifuge 5810 R, Eppendorf
- mikrotiterski čitalec Infinite M1000, Tecan in Infinite F200, Tecan
- analitska tehtnica XP105 Delta Range®, Mettler Toledo
- avtomatski merilnik TEER, Rems 141238 01B
- visokotlačna črpalka, Welch
- mikrobiološka komora, Iskra PIO Max pro 130
- mehanska pipeta 20–200 µL, Biohit mLINE
- mehanska pipeta 100–1000 µL, Biohit mLINE
- mehanska multikanalna pipeta 30–300 µL, Biohit mLINE
- insert s 24 poroznimi membranami, Millicell – 24 Cell Culture Insert Plate PET 1µm, Merck Millipore
- inkubacijske plošče Millicell-24 reciver trail, PSMW010R5, Merck Millipore
- steklenička za celično kulturo s površino 75 cm<sup>2</sup>, SARSTEDT
- plošče črne z ravnim dnom za merjenje fluorescence, 781092 Greiner Bio-one
- plošče s filtrom, Multiscreen HTS 384-well (0.45 µm durapore PVDF Membrane), Greiner Bio-one
- plošče za pripravo raztopin za umeritveno premico, Multiple Well Plate 96-well Round bottom with Lid, Sarstadt inc.
- plošče za UPLC analizo, Costar
- nastavek za avtomatsko pipetiranje Easypet, Eppendorf
- komplet za aspiracijo gojišča za celice, HandE – Vac
- serološke pipete standardne (2 mL, 5 mL, 10 mL, 25 mL), TPP Switzerland

- serološke pipete z rezervoarjem (25 mL, 50 mL), TPP Switzerland
- nastavki za pipete za vzorčenje z robotom, sterilne (200  $\mu$ L, 1000  $\mu$ L), TipOne robotic Tip for Tecan Genesis/Freedom EVO Series
- robot Freedom EVO, Tecan
- UPLC sistem: Acquity<sup>TM</sup> Ultra Performance LC, Waters
- oprema za detekcijo okužbe celic z Mycoplasma: MycoAlert<sup>TM</sup> mycoplasma detection kit, Lonza Walkersville, Inc.
- ultramikrotom Leica EM UC6, Leica Microsystems
- elektronski mikroskop Philips CX 100

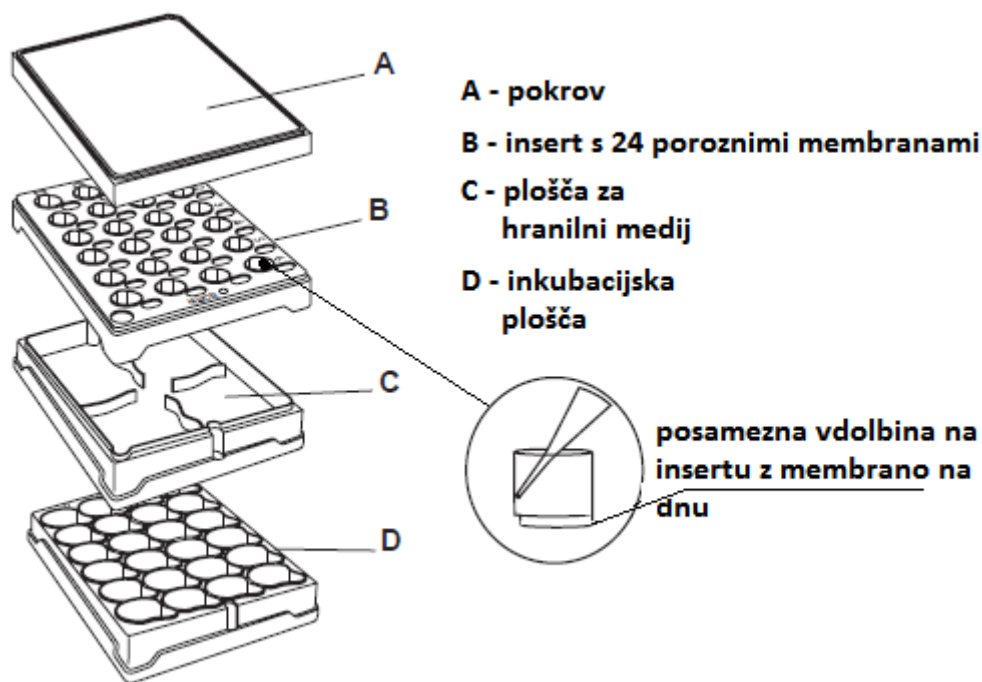
### **3.4 Caco-2 celice**

Caco-2 celice, ki smo jih uporabili, so pridobili iz adenokarcinoma kolona pri 72 let starem belopoltem moškemu. Poskuse smo izvajali na celicah s pasažo med 51–57. Kataloška številka celic je 86010202, Public Health England Culture Collection.

#### **3.4.1 Postopek gojenja Caco-2 celic**

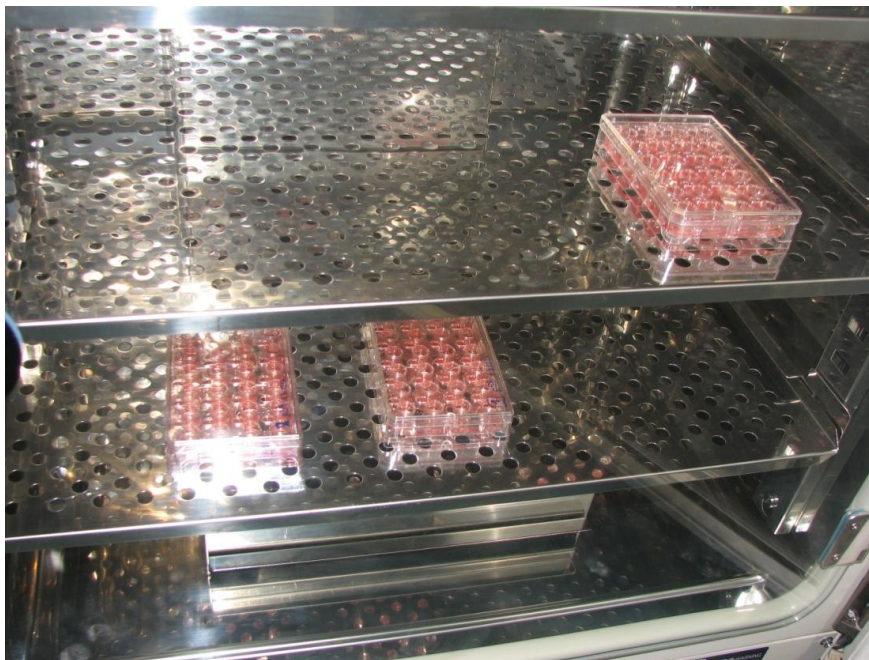
Celice smo gojili v celičnem laboratoriju pod aseptičnimi pogoji. Globoko zamrznjene celice v tekočem dušiku, pasaža 49, smo odtalili. Suspenzijo smo prenesli v centrifugirko, kamor smo predhodno dodali 10 mL hranilnega medija, in premešali. Hranilni medij smo vedno pred vsako uporabo segreli v inkubatorju na 37 °C. Odvzeli smo 1 mL suspenzije, v kateri smo z aparatom ViCell XR prešteli število živih celic v suspenziji. Na podlagi tega smo izračunali, koliko suspenzije s celicami in koliko hranilnega medija potrebujemo, da bomo dosegli želeno nasaditveno gostoto 10000 celic/cm<sup>2</sup> v steklenički s površino 75 cm<sup>2</sup>. Nasaditev celic smo izvedli v mikrobiološki komori, kjer je bil laminaren pretok zraka. Celice smo gojili v inkubatorju Sanyo pod naslednjimi pogoji: 37 °C, 95 % vlažnost, 5 % CO<sub>2</sub>. Hranilni medij smo menjali na vsake 2 do 3 dni, in sicer smo aplicirali količino 17 mL. Z invertnim mikroskopom smo spremljali razrast celic po površini stekleničke. Ko so celice prerasle približno 90 % površine, smo nasadili celice na inserte s 24 poroznimi membranami (slika 2). Površina posamezne membrane v insertu je 0,7 cm<sup>2</sup>.





Slika 2: Komplet za gojenje Caco-2 celic (povzeto po referenci 38)

Iz stekleničke s celicami smo z vakuumsko črpalko posrkali hranilni medij in dodali 3 mL raztopine Gibco® TrypLE™ ter stekleničko postavili za 10 min v celični inkubator Sanyo. Celice so se v tem času odlepile od podlage. Nato smo dodali v stekleničko 5 mL hranilnega medija za deaktivacijo encima in premešali. Suspenzijo s celicami smo prenesli v 50 mL-centrifugirko. Stekleničko smo še enkrat sprali s 5 mL hranilnega medija in tudi to prenesli v centrifugirko. Z napravo za centrifugiranje MIKRO 22R smo izvedli centrifugiranje suspenzije pri 200 obratih/min 5 min. Iz centrifugirke smo odlili supernatant in celice resuspendirali v 15 mL hranilnega medija. Odvzeli smo 1 mL suspenzije in z aparatom ViCell XR prešteli število živih celic v suspenziji. Na podlagi podatka o številu živih celic v suspenziji smo zmešali suspenzijo s hranilnim medijem v takšnem razmerju, da smo po aplikaciji 400  $\mu\text{L}$  v vsako vdolbino na insertu dobili nasaditveno gostoto 100000 celic/cm<sup>2</sup>. Na bazolateralno stran, kjer smo imeli ploščo za hranilni medij, smo dodali 22 mL hranilnega medija. Nato smo ga na apikalni in bazolateralni strani menjali na 2–3 dni v obdobju 21 dni, plošče smo hranili v celičnem inkubatorju Sanyo (slika 3). Z merjenjem TEER z avtomatskim merilnikom TEER smo preverjali integriteto celičnega monosloja v obdobju rasti.



Slika 3: Plošče za gojenje celic v celičnem inkubatorju

### 3.4.2 Priprava monoslojev Caco-2 celic na poskus

Poskus smo izvedli na monoslojih celic, ki so bili stari med 21 in 23 dni. Z insertov smo odstranili hranilni medij in jih sprali s pufrom (0,1 M HEPES v HBSS), ki smo ga v inkubatorju pred tem segreti na 37 °C. Insete smo prenesli v inkubacijske plošče, kjer smo predhodno v vdolbine dodali po 800  $\mu$ L pufra. Na apikalno stran smo dodali po 400  $\mu$ L pufra. Z avtomatskim merilnikom TEER smo izmerili upornost celičnih monoslojev.

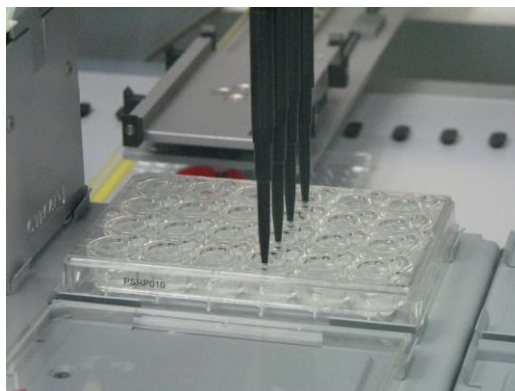
### 3.5 Avtomatska izvedba poskusa

Permeabilnost spojin preko celičnega monosloja smo testirali avtomatsko s pomočjo robota Freedom EVO, Tecan. Ta je voden preko računalniškega programa EVOware Standard, Tecan, v katerem smo napisali ukaze za potek poskusa. Hkrati smo testirali permeabilnost 6 spojin iz AP-BL strani in obratno. Za to smo potrebovali 2 inkubacijski plošči z insertoma. Upoštevajoč shemo, ki je bila prikazana v računalniškem programu, smo na delovno površino robota postavili raztopino pufra, donorske raztopine, ploščo za raztopine za umeritveno premico in ploščo za zbiranje vzorcev (slika 4).



Slika 4: Delovna površina robota

Pred začetkom poskusa je robot odstranil pufer z inkubacijskih plošč. V primeru testiranja permeabilnosti iz apikalne na bazolateralno stran monosloja je robot na apikalno stran nanesel po 400  $\mu\text{L}$  donorskih raztopin in na bazolateralno stran po 800  $\mu\text{L}$  pufra v vsako vdolbino. Pri testiranju permeabilnosti iz bazolateralne na apikalno stran pa je na apikalno stran nanesel po 400  $\mu\text{L}$  pufra in na bazolateralno stran po 800  $\mu\text{L}$  donorskih raztopin v vsako vdolbino. Robot je s tekočim trakom povezan s  $\text{CO}_2$  celičnim inkubatorjem LiCONiC (37 °C, 95 % vlažnost, 5 %  $\text{CO}_2$ ), kjer sta bili inkubacijski plošči z insertoma v času med vzorčenjem. Vzorečnje donorskih raztopin je potekalo ob času 0 in 180 min. Volumen odvzetega vzorca je bil 10  $\mu\text{L}$ , ki ga je robot razredčil s 60  $\mu\text{L}$  pufra. Vzorečnje akceptorskih raztopin (slika 5) je potekalo v naslednjih časovnih točkah: 30 min, 60 min, 90 min, 120 min, 180 min. Volumen odvzetega vzorca je bil 70  $\mu\text{L}$ .



Slika 5: Avtomatski odvzem vzorcev z apikalne strani monoslojev

### 3.6 Testiranje kompatibilnosti pufra (0,1 M HEPES v HBSS) s celičnim monoslojem Caco-2

Po 21 dneh gojenja celic smo odstranili hranilni medij z apikalne in bazolateralne strani in ga zamenjali s pufrom. Na apikalno stran smo dodali po 400  $\mu\text{L}$  pufra v vsako vdolbino, na bazolateralno stran pa 800  $\mu\text{L}$ . Z avtomatskim merilnikom TEER smo izmerili transepitelijsko električno upornost monoslojev ob času 0 ter po 1, 2, 3 in 4 urah.

### 3.7 Preverjanje integritete celičnega monosloja po koncu poskusa

Po koncu vzorčenja z robotom smo s celic odstranili raztopine spojin in pufër. Inserta smo sprali s pufrom in ju prestavili v novi inkubacijski plošči, kamor smo predhodno dodali po 800  $\mu\text{L}$  pufra v vsako vdolbino. Na apikalno stran membran smo nanegli po 400  $\mu\text{L}$  10  $\mu\text{M}$  raztopine Lucifer Yellow. Plošči smo za 1 h postavili v celični inkubator Sanyo, kjer so bili vzdrževani enaki pogoji kot med gojenjem celic. Po 1 h smo ročno odvzeli vzorce z bazolateralne strani membrane z mehansko pipeto in jih prenesli na ploščo za merjenje fluorescence. Volumen odvzema vzorcev je bil 70  $\mu\text{L}$ .

### 3.8 Testiranje Caco-2 celic na okužbo z Mycoplasma

Oprema za detekcijo vsebuje MycoAlert<sup>TM</sup> reagent in substrat v obliki liofiliziranih pelet ter Mycoalert<sup>TM</sup> testni puffer. Po 600  $\mu\text{L}$  testnega pufra smo dodali v steklenički s substratom in reagentom ter rahlo premešali. Raztopini smo pustili stati za 15 min pri sobni temperaturi. 2 mL suspenzije celic smo dali v centrifugirko in 5 min centrifugirali pri 1500 obratih/min. 100  $\mu\text{L}$  supernatanta smo prenesli na ploščo za merjenje luminiscence in dodali 100  $\mu\text{L}$  MycoAlert<sup>TM</sup> reagenta ter pustili stati 5 min. Z mikrotiterskim čitalcem Infinite F200 smo izmerili luminscenco (meritev A). Nato smo v isti vzorec dodali 100  $\mu\text{L}$  MycoAlert<sup>TM</sup> substrata in počakali 10 min. Še enkrat smo izmerili luminiscenco (meritev B). Izračunali smo razmerje med meritvijo B in A ter interpretirali rezultate (preglednica IV).

Preglednica IV: Interpretacija rezultatov (39)

razmerje B/A	rezultat
< 0,9	ni okužbe
0,9 – 1,2	mejno območje (ponovimo test znotraj 24 ur)

> 1,2	okužba z Mycoplasma
-------	---------------------

### 3.9 Priprava celičnega monosloja za slikanje z elektronskim mikroskopom

Na insertu s 24 poroznimi membranami smo odstranili hranilni medij na apikalni strani. Nato smo insert prestavili na inkubacijsko ploščo. Na apikalno stran smo dodali po 400  $\mu\text{L}$  fiksativa. Po 1 min smo odstranili fiksativ in ga zamenjali s svežim ter dodali po 800  $\mu\text{L}$  fiksativa tudi na bazolateralni strani. Po petih minutah smo zamenjali fiksativ na apikalni in bazolateralni strani z enakimi količinami svežega in postavili inkubacijsko ploščo za 2 h na 4 °C. Nato smo odstranili fiksativ z obeh strani monosloja in trikrat izpirali celice z izpiralnim pufrom, tako da smo ga na apikalno stran aplicirali po 400  $\mu\text{L}$  in na bazolateralno stran po 800  $\mu\text{L}$ . Po zadnjem izpiranju smo s skalpelom izrezali z insertov dve membrani s celičnima monoslojema in ju prenesli v steklenički, v kateri smo predhodno dodali takšno količino izpiralnega pufra, da sta bili membrani popolnoma potopljeni vanj. V izpiralnem pufri smo celice inkubirali čez noč pri 4 °C. Sledila je 1-urna postfiksacija in 2-urno kontrastiranje. Dehidracija je potekala pri sobni temperaturi z naraščajočimi koncentracijami etanola (15 min v 30 % etanolu, 15 min v 50 % etanolu, 30 min v 70% etanolu, 30 min v 90 % etanolu in dvakrat po 30 min v 100 % etanolu). Nato smo celice najprej prepajali v mešanici 100 % etanola in umetne smole Epon (razmerje 1:1), zatem pa še 3-krat po 1 uro v Eponu. Polimerizacija je potekala v termostatu, in sicer: 24 ur pri 35 °C, 24 ur pri 45 °C, 24 ur pri 60 °C, 24 ur pri 70 °C in 24 ur pri 80 °C. Sledilo je rezanje rezin debeline 60 nm z ultramikrotomom ter kontrastiranje z nasičeno raztopino uranil acetata (25 min) in s svinčevim citratom (10 min). Preparate smo pregledali s presevnim elektronskim mikroskopom pri 80 kV.

### 3.10 Določevanje Lucifer Yellow in FITC-Dekstranov v vzorcih

Z mikrotiterskim čitalcem Infinite M1000 smo izmerili fluorescenco spojine Lucifer Yellow ( $\lambda_{\text{ex}}=430\text{nm}$ ,  $\lambda_{\text{em}}=540\text{nm}$ ) in FITC-Dekstranov ( $\lambda_{\text{ex}}=495$ ,  $\lambda_{\text{em}}=515$ ). Na osnovi umeritvene krivulje smo določili koncentracije spojine Lucifer Yellow oz. FITC-Dekstranov v vzorcih, odvzetih z akceptorske strani membrane. Vzorce smo analizirali isti dan po koncu poskusa.

### **3.11 Določevanje učinkovin v vzorcih**

Vzorci učinkovin smo prefiltrirali s plošče s filtrom na plošče za UPLC analizo. Če analize nismo izvedli isti dan, smo vzorce prekrili s folijo, da smo preprečili izhlapevanje, in jih shranili v hladilniku. Vzorce smo analizirali s tekočinskim kromatografom ultra visoke ločljivosti – UPLC, Acquity™ Ultra Performance LC, Waters. Koncentracije učinkovin smo izračunali na osnovi umeritvene krivulje. UPLC parametri so opisani v preglednici V.

Preglednica V: UPLC parametri

spojina	mobilna faza	kolona	valovna dolžina detekcije (nm)	pretok (mL/min)	retencijski čas [min]
amoksisicilin	A: amonijev fosfat pH 3.0 (2.5 mL 85% H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> + 3 mL 25% NH <sub>3</sub> /1 L H <sub>2</sub> O) B: acetonitril	Kinetex C18 100A, 2.6 µm, 50x2.1 mm	229	0,25	0,81
antipirin	A: amonijev fosfat pH 3.0 (2.5 mL 85% H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> + 3 mL 25% NH <sub>3</sub> /1 L H <sub>2</sub> O) B: acetonitril	Kinetex C18 100A, 2.6 µm, 50x2.1 mm	243	1,5	1,65
atenolol	A: amonijev fosfat pH 3.0 (2.5 mL 85% H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> + 3 mL 25% NH <sub>3</sub> /1 L H <sub>2</sub> O) B: acetonitril	Kinetex C18 100A, 2.6 µm, 50x2.1 mm	225	1,5	0,67
furosemid	A: amonijev fosfat pH 3.0 (2.5 mL 85% H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> + 3 mL 25% NH <sub>3</sub> /1 L H <sub>2</sub> O) B: acetonitril	Kinetex C18 100A, 2.6 µm, 50x2.1 mm	277	1,5	2,70
karbamazepin	A: metanol B: H <sub>2</sub> O	Acquity BEH C18, 1.7 µm, 50x2.1 mm	286	0,25	0,88
ketoprofen	acetonitril : KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> : H <sub>2</sub> O = 42 : 2 : 55	Acquity BEH Shield RP C18, 1.7 µm, 50x2.1 mm	256	0,35	1,15
lozartan	A: amonijev fosfat pH 3.0 (2.5 mL 85% H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> + 3 mL 25% NH <sub>3</sub> /1 L H <sub>2</sub> O) B: acetonitril	Kinetex C18 100A, 2.6 µm, 50x2.1 mm	225	1,5	3,37
metoprolol	A: amonijev fosfat pH 3.0 (2.5 mL 85% H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> + 3 mL 25% NH <sub>3</sub> /1 L H <sub>2</sub> O) B: acetonitril	Kinetex C18 100A, 2.6 µm, 50x2.1 mm	226	1,5	2,00
oksacilin	A: amonijev fosfat pH 3.0 (2.5 mL 85% H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> + 3 mL 25% NH <sub>3</sub> /1 L H <sub>2</sub> O) B: acetonitril	Kinetex C18 100A, 2.6 µm, 50x2.1 mm	225	1,5	3,35
propranolol	A: amonijev fosfat pH 3.0 (2.5 mL 85% H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> + 3 mL 25% NH <sub>3</sub> /1 L H <sub>2</sub> O) B: acetonitril	Kinetex C18 100A, 2.6 µm, 50x2.1 mm	292	1,5	2,40
ranitidine	A: amonijev fosfat pH 3.0 (2.5 mL 85% H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> + 3 mL 25% NH <sub>3</sub> /1 L H <sub>2</sub> O) B: acetonitril	Kinetex C18 100A, 2.6 µm, 50x2.1 mm	322	1,5	0.50
ropinirol	A: amonijev fosfat pH 3.0 (2.5 mL 85% H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> + 3 mL 25% NH <sub>3</sub> /1 L H <sub>2</sub> O) B: acetonitril	Kinetex C18 100A, 2.6 µm, 50x2.1 mm	250	1,5	1,72
rosiglitazon	A: amonijev fosfat pH 3.0 (2.5 mL 85% H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> + 3 mL 25% NH <sub>3</sub> /1 L H <sub>2</sub> O) B: acetonitril	Kinetex C18 100A, 2.6 µm, 50x2.1 mm	254	1,5	2,23
teofilin	A: amonijev fosfat pH 3.0 (2.5 mL 85% H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> + 3 mL 25% NH <sub>3</sub> /1 L H <sub>2</sub> O) B: acetonitril	Kinetex C18 100A, 2.6 µm, 50x2.1 mm	272	1,5	0,62
verapamil	A: acetonitril B: 0.4% TEA do pH 3.95	Acquity BEH C18, 1.7 µm, 50x2.1 mm	230	0,35	2,32

### 3.12 Izračun permeabilnostnega koeficienta ( $P_{app}$ )

Količino snovi, ki difundira skozi membrano na časovno enoto ( $dQ/dt$ ), izračunamo iz izmerjenih koncentracij preiskovane snovi v vzorcih, ki smo jih odvzeli na akceptorski strani celičnega monosloja:

$$Q_t = (\sum_{i=1}^{N-1} V_s \cdot C_i) + C_t \cdot V_A \quad (6)$$

$Q_t$ ....količina snovi, ki difundira v času  $t$  [mol]

$V_s$ ....volumen vzorca [L]

$C_i$ ....koncentracija snovi na akceptorski strani, izmerjena v predhodnih vzorcih [mol/L]

$C_t$ ....koncentracija snovi na akceptorski strani v času  $t$  (čas vzorčenja) [mol/L]

$V_a$ ....volumen akceptorske raztopine [L]

Količino snovi, ki difundira skozi membrano v časovni enoti, opisuje tudi naslednja enačba:

$$\frac{dQ}{dt} = k \cdot (C_d - C_a) \quad (7)$$

$C_d$ ....koncentracija preiskovane snovi na donorski strani membrane [mol/L]

$C_a$ ....koncentracija preiskovane snovi na akceptorski strani membrane [mol/L]

Ker je med eksperimentom  $C_a \ll C_d$ , lahko razliko vključimo v konstanto difuzije  $k_d$  in velja;

$$\frac{dQ}{dt} = k_d \quad (8)$$

$$\int_0^{Q(t)} dQ = k_d \cdot \int_0^t dt \quad (9)$$

$$Q_t = k_d \cdot t + n \quad (10)$$

$Q_t$  je izračunan iz enačbe (6).

Pretok ( $J$ , [nmol/h·cm<sup>2</sup>]) izračunamo z naslednjo enačbo:

$$J = \frac{k_d}{A} \quad (11)$$



A....površina monosloja, skozi katerega prehaja preiskovana snov [cm<sup>2</sup>]

Navidezni permeabilnostni koeficient  $P_{app}$  izračunamo po enačbi:

$$P_{app} = \frac{J}{C_d} \quad (12)$$

### 3.13 Statistična obdelava podatkov

Podatke smo statistično obdelali v programu Microsoft Excel 2007. Najprej smo izvedli F-test, s katerim smo ugotovili ali sta varianci za  $P_{app}$  v AP-BL smeri in  $P_{app}$  v BL-AP smeri enaki ali različni. Na podlagi rezultata F- testa pa smo naredili še Studentov t-test.

$$s^2 = \frac{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2}{n-1} \quad (13)$$

$s^2$ .....varianca

Postavimo ničelno hipotezo  $H_0$  in njej nasprotno alternativno hipotezo  $H_1$ :

$H_0: s_x^2 = s_y^2$  ..... varianci dveh vzorcev se ne razlikujeta signifikantno

$H_1: s_x^2 \neq s_y^2$  ..... varianci dveh vzorcev se signifikantno razlikujeta

F- test izvedemo po naslednji enačbi:

$$F = \frac{s_x^2}{s_y^2} \quad (14)$$

V primeru, da določimo  $F_{eks} < F_{tab} (p > \alpha)$ , ničelne hipoteze ne zavrnemo in privzamemo, da sta varianci dveh vzorcev enaki in za primerjavo aritmetičnih sredin uporabimo t-test za enaki varianci:

$$t = \frac{\bar{x} - \bar{y}}{s} \sqrt{\frac{mn}{m+n}} \quad (15)$$

$\bar{x}$ .....povprečna vrednost meritev v prvi skupini primerjalnih meritev

$\bar{y}$ .....povprečna vrednost meritev v drugi skupini primerjalnih meritev

$s$ .....skupni standardni odklon

$m$ .....število meritev v prvi skupini primerjalnih meritev

$n$ .....število meritev v drugi skupini primerjalnih meritev

$\alpha$ .....stopnja tveganja

$f$ .....stopnje prostosti ( $f = m + n - 2$ )

Kadar pa določimo, da je  $F_{eks} > F_{tab} (p > \alpha)$ , zavrnilo ničelno hipotezo in sprejmemo alternativno. V tem primeru uporabimo t-test za različni varianci:

$$t = \frac{x-y}{\sqrt{\frac{s_1^2}{m} + \frac{s_2^2}{n}}} \quad (16)$$

$s_1^2$ .....standardni odklon v eni skupini primerjalnih meritev

$s_2^2$ .....standardni odklon v drugi skupini primerjalnih meritev

V primeru, da dobimo  $t_{eks} < t_{tab} (\alpha, f)$  in s tem  $p < \alpha$ , ni signifikantne razlike med skupinama (NS). Če dobimo  $t_{eks} > t_{tab} (\alpha, f)$  in s tem  $p > \alpha$ , je razlika med skupinama signifikantna (S).

## 4 REZULTATI IN RAZPRAVA

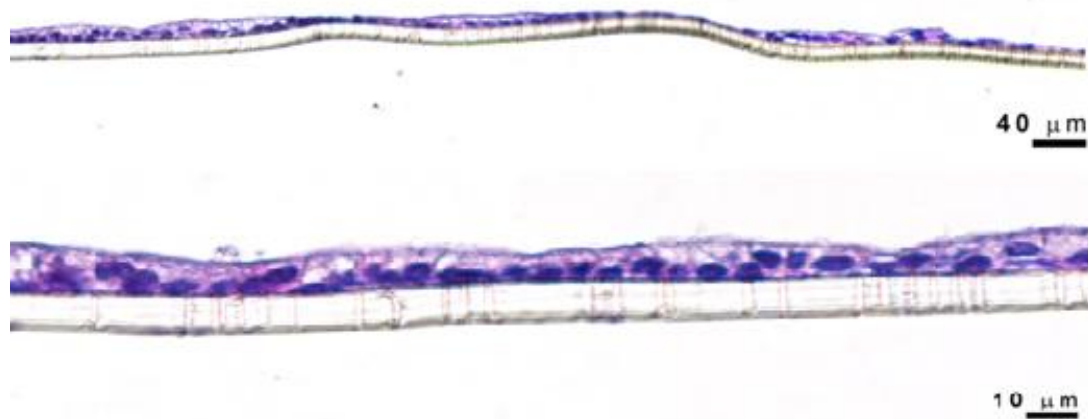
### 4.1 Lastnosti monosloja Caco-2 celic

#### 4.1.1 Razrast celic po površini membrane v monosloju in njihova diferenciacija

Da smo lahko izvedli poskuse na *in vitro* celičnem modelu Caco-2, smo morali doseči, da so se celice razrastle po površini membran iz polietilen tereftelata (PET) v monosloju in ne v plasteh. Če se celice razrastejo v plasteh, tesni stiki niso omejeni na najbolj zgornjo plast celic, ampak se pojavijo tudi v nižjih plasteh, kjer pa ne tvorijo horizontalne mreže. Posledično je polarnost celic manj izražena ali pa celo izgubljena (40). V primeru, ko učinkovine prehajajo s pasivnim transportom, je ta vpliv na transport minimalen, na prehajanje učinkovin s prenašalci pa ima lahko pomemben vpliv (39).

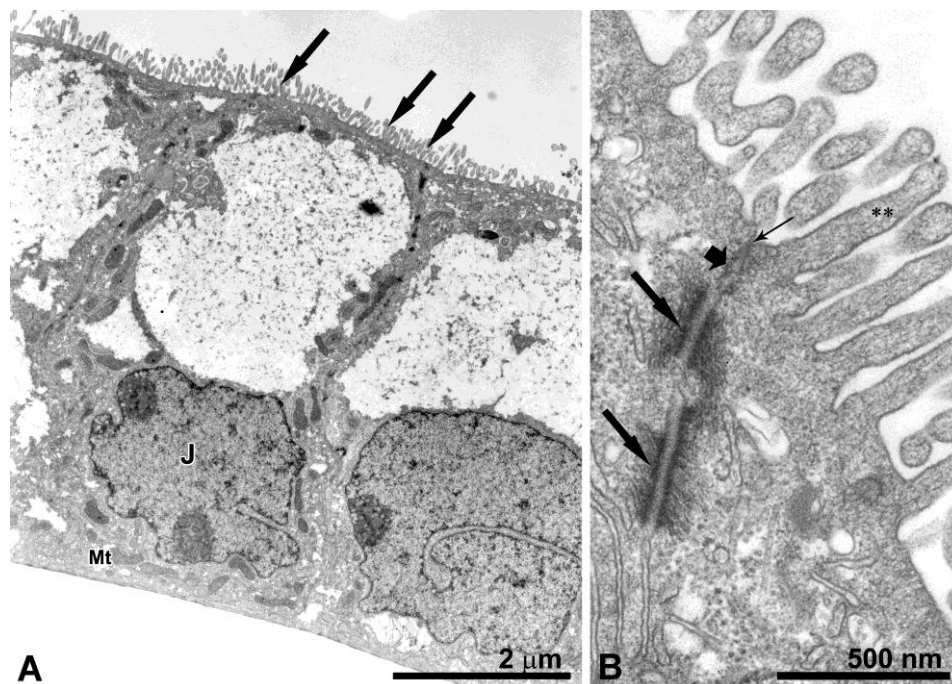
Ker je uporaba celičnega modela Caco-2 zelo razširjena, smo pri gojenju celic upoštevali že postavljene pogoje gojitve, ki so jih uporabljali v preteklih raziskavah. Gojitveni protokoli niso natančno določeni, ampak se med različnimi laboratoriji nekoliko razlikujejo. Pomembno je, da smo skozi celotno obdobje uporabljali enake pogoje rasti, saj lahko že majhne spremembe vodijo do signifikantnih razlik v fenotipu Caco-2 celic (39). Za eksperimentalne namene je optimalno, da uporabljamo celice s pasažo med 28 in 65. Pri nižjih in višjih pasažah se lahko prej pojavi več plasti (40). Mi smo poskuse izvajali na celicah s pasažami med 50 in 57. Nasaditvena gostota celic je pomemben dejavnik, tako za samo diferenciacijo celic kot za njihovo razrast v monosloju. Časovni potek diferenciacije je pogojen s tem, kdaj se celice povsem razrastejo. Previsoka nasaditvena gostota lahko vodi do tvorbe plasti celic (16). Vseeno predlagajo široko območje nasaditvene gostote, ki je ustrezna za nasaditev na PET membrano, in sicer od  $3.5 \times 10^3$  do  $5 \times 10^5$  celic/cm<sup>2</sup> (16). Mi smo celice vedno nasadili z gostoto  $1 \times 10^5$  celic/cm<sup>2</sup>, kar je znotraj predlaganega območja. Z opazovanjem membran pod mikroskopom smo lahko po 4 dneh že opazili, da so se celice razrastle po membrani. Celice smo gojili na PET membranah, ki jih priporočajo za gojitev celic v monosloju (39). Velikost por na membranah je bila 1  $\mu$ m. Manjša velikost por je preprečevala, da bi celice rastle v pore in na drugo stran filtra, kar se lahko zgodi pri uporabi PET membran z večjim premerom por (41). Hranilni medij, ki ga uporabljamo, vpliva na proliferacijo in diferenciacijo celic (16). Uporabljali smo hranilni medij, katerega komponente imajo certifikat za uporabo pri gojenju celic. Medij smo pred aplikacijo vedno segreti na 37 °C, tako da je bila temperatura enaka tisti v celičnem

inkubatorju, kjer so celice rastle. Hranilni medij smo redno menjali na 2 do 3 dni in se pri menjavi nismo dotikali površine monosloja. Aplicirali smo ga počasi z mehansko pipeto ob robu vdolbine, sicer so se celice ob premočnem curku pomaknile proti robu vdolbine in se je monosloj uničil. Kot je razvidno na sliki 6, so celice zrasle v monosloju po površini PET membrane.



Slika 6: Razrast celic v monosloju po površini PET membrane

S presevno elektronsko mikroskopijo smo potrdili, da so celice Caco-2 visokoprizmatske oblike in tvorijo enoskladen epitelij (slika 7). Na sliki 7 je razvidno, da so celice podobne čašastim črevesnim celicam *in vivo*, saj imajo tudi celice Caco-2 številne sekrecijske vezikle v apikalni citoplazmi in apikalno plazmalemo, oblikovano v mikrovile. Med celicami Caco-2 so dobro razviti medcelični stiki.



Slika 7: Presevna elektronska mikroskopija *in vitro* modela celic Caco-2. Legenda: (A) jedro (J), mitohondrij (Mt), sekrecijski vezikli v apikalni citoplazmi (svelejši predeli), mikrovili (puščice); (B) tesni stik (ozka puščica), adherentni stik (debela puščica), dezmosomi s pripetimi intermediarnimi filamenti (dve puščici), aktinski filamenti v notranjosti mikrovilov (zvezdici).

#### 4.1.2 Testiranje Caco-2 celic na okužbo z *Mycoplasma*

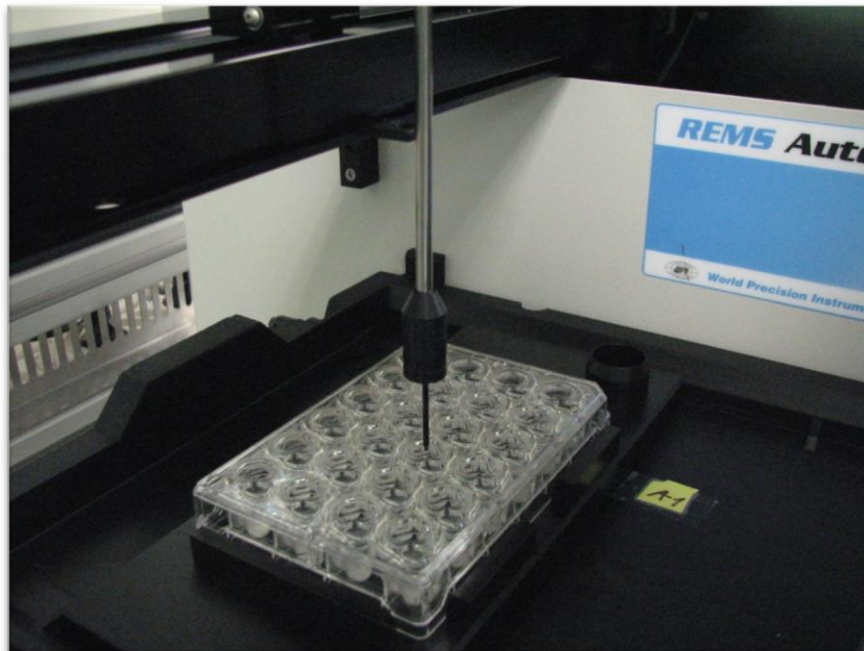
Če se Caco-2 celice okužijo z bakterijo *Mycoplasma*, tega vizualno ne opazimo, spremenijo pa se lastnosti celic. Zato smo jih testirali na okužbo z bakterijo *Mycoplasma*. Testirali smo celice s pasažo 57. Test je negativen, kadar dobimo razmerje luminiscence med B in A nižje od 0,9. V našem primeru je bila izmerjena luminiscenca A 3555 in B 695, tako da smo dobili razmerje 0,19, kar pomeni, da celice niso bile okužene.

#### 4.1.3 Integriteta celičnega monosloja

Integriteto celičnega monosloja smo spremljali med obdobjem rasti, ko se je ta še vzpostavljajal, pred poskusom in po koncu poskusa. Testirali smo tudi permeabilnost FITC-Dekstranov, ki jih uporabljamo kot modelne spojine za določanje integritete monosloja zaradi dokazane nizke permeabilnosti.

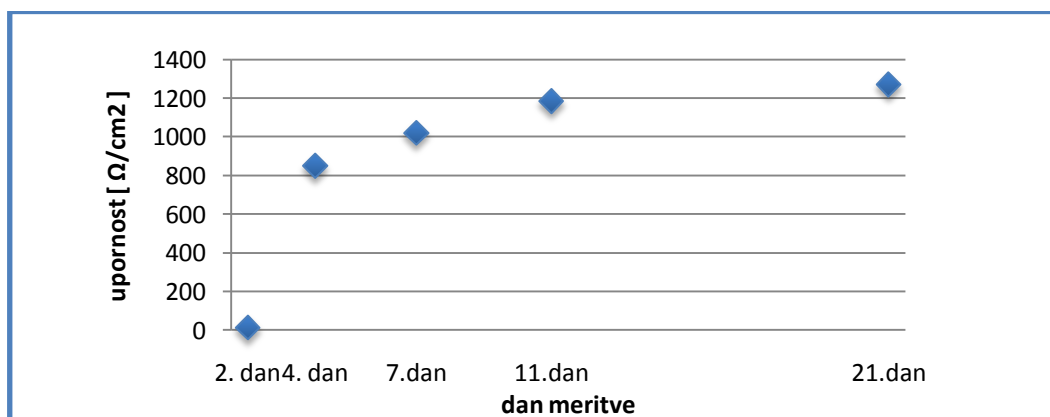
#### 4.1.3.1 Integriteta monosloja v obdobju rasti

V obdobju rasti celic na PET membranah insertov smo petkrat izmerili TEER z avtomatskim merilnikom (slika 8).



Slika 8: Merjenje TEER monoslojev z avtomatskim merilnikom

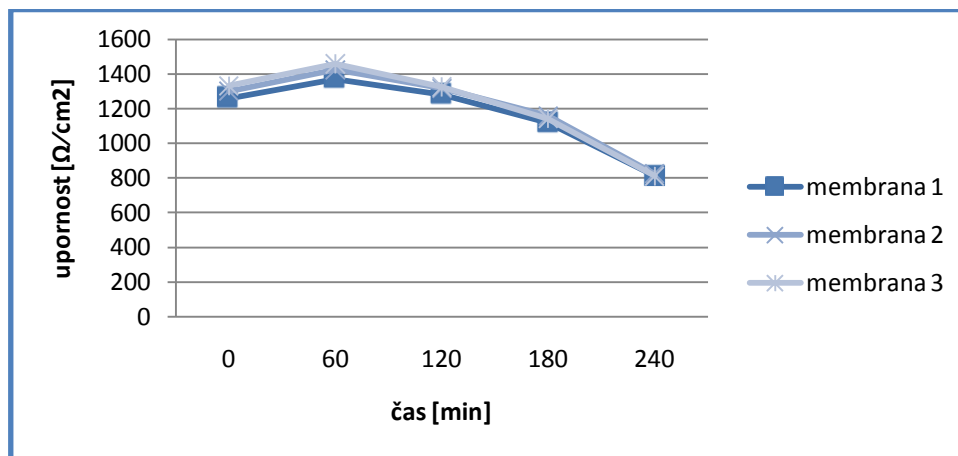
Meritve so grafično prikazane na sliki 9. Opazimo lahko, kako je prišlo do visokega porasta upornosti med 2. in 4. dnevom po nasaditvi, kar nakazuje na vzpostavitev tesnih stikov med celicami, ki naj bi jih zaznali po štirih dneh rasti (18). Nato upornost po 11. dnevu od nasaditve ni več bistveno naraščala, kar pomeni, da se je že izoblikoval kompakten monosloj.



Slika 9: TEER monosloja v obdobju rasti celic

#### 4.1.3.2 Kompatibilnost 0.1 M HEPES v HBSS z monoslojem Caco-2 celic

Testirali smo vpliv delovnega pufru (0,1 M HEPES v HBSS) na integriteto monosloja Caco-2 celic. Ker je vzorčenje pri testih permeabilnosti trajalo 180 min, smo celice tretirali s pufram 240 min. Na grafu lahko vidimo, da pride najprej do porasta TEER po 1 uri inkubacije celic v pufru. Vzrok za to je lahko drugačna ionska sestava pufru, kot je sestava hranilnega medija, kar vpliva na vrednosti TEER. Nato vrednosti TEER s časom počasi padajo, saj celice nimajo več na voljo optimalnih pogojev, ki jim jih sicer zagotavlja hranilni medij. Po 180 min, kolikor traja vzorčenje, se vrednosti TEER ne spremenijo bistveno (slika 10), kar pomeni, da se integriteta monosloja, ki je izpostavljen pufru, ohrani.



Slika 10: Vrednosti TEER monosloja v različnih časovnih točkah po inkubaciji celic v delovnem pufru

#### 4.1.3.3 Permeabilnost celičnih označevalcev integritete monosloja

S celičnim modelom Caco-2 smo določili permeabilnostne koeficiente FITC-Dekstranom s povprečno molekularno maso 3000-5000, 10000 in 20000 g/mol. FITC-Dekstrane z visoko molekularno maso lahko uporabimo za testiranje integritete celičnega monosloja, saj so zelo slabo permeabilni in lahko le v manjšem obsegu prehajajo skozi tesne stike (18). Vsem trem FITC-Dekstranom smo določili vrednost  $P_{app} < 2,0 \times 10^{-07}$  cm/s (preglednica VI). To pomeni, da je integriteta monosloja ustrezna, saj so bili vsi slabše permeabilni od testiranih učinkovin, kjer smo določili najnižjo vrednost za furosemid, in sicer 3,7 (preglednica VIII).

Preglednica VI:  $P_{app}$  za FITC-Dekstrane (3000–5000, 10000 in 20000 g/mol) in statistični rezultati pri poskusu s celičnim modelom Caco-2;  $P_{app}$  za FITC-Dekstrane (3000–5000, 10000 in 20000 g/mol), ki so jih pridobili na modelu izoliranega podganjega črevesa (35).

	FITC-Dekstran 3000-5000	FITC-Dekstran 10000	FITC-Dekstran 20000
<b>Molekulska masa [g/mol]</b>	3000–5000	10000	20000
<b>n</b>	3	3	5
<b><math>P_{app}</math> [cm/s]</b>	$9,7 \times 10^{-08}$	$3,3 \times 10^{-08}$	$3,1 \times 10^{-08}$
<b>SD [cm/s]</b>	$2,3 \times 10^{-08}$	$2,3 \times 10^{-09}$	$5,7 \times 10^{-09}$
<b>RSD [%]</b>	23,82	6,86	18,39
<b>SEM [cm/s]</b>	$1,3 \times 10^{-08}$	$1,3 \times 10^{-09}$	$2,6 \times 10^{-09}$
<b><math>P_{app}</math> [cm/s] podganje črevo</b>	$2,2 \times 10^{-06}$	$2,1 \times 10^{-06}$	$1,5 \times 10^{-06}$

Iz rezultatov je razvidno, da sta FITC-Dekstrana z molsko maso 10000 in 20000 g/mol že praktično nepermeabilna. Njuni vrednosti  $P_{app}$  se ne razlikujeta, čeprav je med njima velika razlika v molekulski masi. Z dobljenimi rezultati lahko potrdimo, da so celice Caco-2 po 21 dneh gojenja tvorile kompakten monosloj z dobro vzpostavljenimi tesnimi stiki.

Če primerjamo vrednosti  $P_{app}$ , ki smo jih določili s celičnim modelom Caco-2 s tistimi, ki so jih določili z modelom izoliranega podganjega črevesa, smo dobili več kot dvajsetkrat nižje vrednosti  $P_{app}$  za FITC-Dekstran 3000–5000 in približno petdesetkrat nižje vrednosti  $P_{app}$  za FITC-Dekstran 10000 in 20000. Testirali smo enake koncentracije kot so jih na modelu izoliranega podganjega črevesa, in sicer 0,2 mg/mL (35). Dobljene nižje vrednosti  $P_{app}$  v primerjavi z vrednostmi na modelu izoliranega podganjega črevesa potrjujejo, da je velikost tesnih stikov med celicami Caco-2 zelo majhna. V literaturi navajajo, da je velikost tesnih stikov pri Caco-2 celicah približno 4 Å, pri ljudeh pa je 10-13 Å (18).

#### 4.1.4 Vitalnost monosloja po koncu poskusa

Po koncu testiranja permeabilnosti zdravilnih učinkovin smo preverili vitalnost monosloja. Na ta način smo ugotovili, da ni prišlo do sprememb v integriteti monosloja, ki bi sicer lahko vplivala na dobljene rezultate. Inserte s celicam smo takoj po poskusu sprali s pufrom in jim na apikalno stran dodali po 400 µL 20 µM raztopine Lucifer Yellow in po 1 uri inkubacije v celičnem inkubatorju odvzeli vzorce z akceptorske strani. Lucifer Yellow



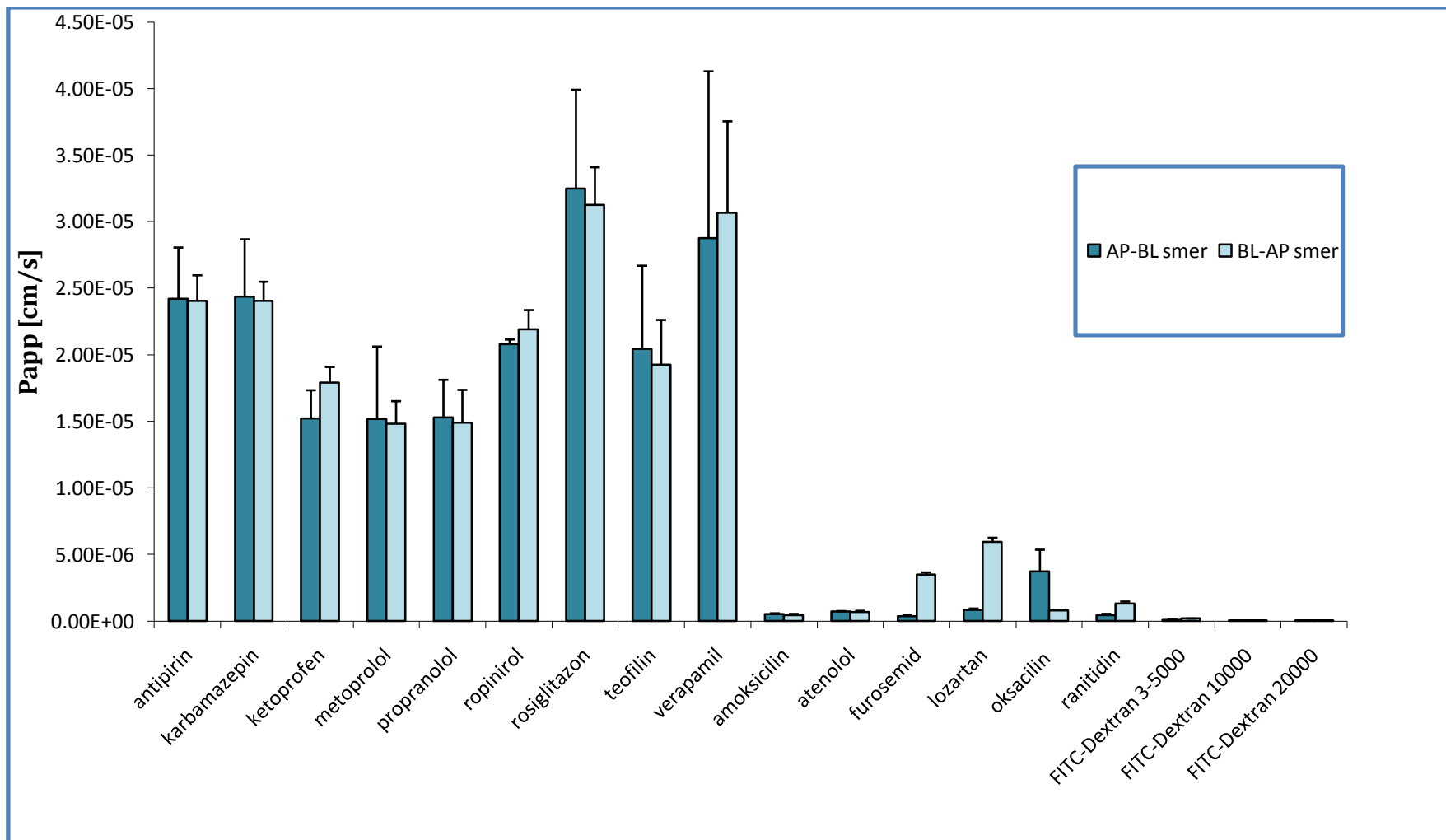
je paracelularni marker, saj prehaja samo preko tesnih stikov (18). Ker je pri Caco-2 celicah premer tesnih stikov zelo majhen, ima Lucifer Yellow pri nepoškodovanem monosloju nizko vrednost  $P_{app}$ . Upoštevali smo meritve permeabilnosti na tistih monoslojih, pri katerih smo po koncu poskusa določili  $P_{app}$  za raztopino Lucifer Yellow manjšo od  $5,0 \times 10^{-07}$  cm/s.

## **4.2 Določitev permeabilnostnih koeficientov učinkovin s celičnim modelom Caco-2**

Permeabilnostne koeficiente smo določili 15 učinkovinam, ki smo jih izbrali iz vseh štirih razredov BCS. Tako smo lahko na podlagi korelacije med vrednostmi  $P_{app}$  izbranih učinkovin in  $f_a$  pri ljudeh določili tudi učinkovino (interni standard), katere  $P_{app}$  predstavlja mejo med slabo in dobro permeabilnimi učinkovinami, če jih testiramo na našem modelu. S celičnim modelom Caco-2 smo testirali permeabilnost učinkovin v AP-BL in BL-AP smeri. S testiranjem permeabilnosti v obeh smereh monosloja smo lahko ugotovili, kako se na našem modelu transportirajo učinkovine, ki so znani substrati membranskih prenašalcev za aktivni transport v eliminatorni smeri.

Permeabilnost vsake spojine smo testirali na najmanj treh monoslojih.  $P_{app}$  smo izračunali kot povprečno vrednost posameznih meritev. Predvsem pri dobro permeabilnih učinkovinah smo dobili znatno večjo SD za  $P_{app}$  v AP-BL kot v BL-AP smeri. Pri testiranju v BL-AP smeri je bil manjši volumen akceptorske raztopine iz katere smo vzorčili, in sicer 400  $\mu$ L. Volumen akceptorske raztopine v AP-BL smeri je bil 800  $\mu$ L. Zato smo imeli v BL-AP smeri vzorce z višjo koncentracijo učinkovin in je bila posledično manjša napaka.

S celičnim modelom Caco-2 smo lahko ustrezno ločili dobro in slabo permeabilne učinkovine. Vrednost  $P_{app}$  v AP-BL smeri najslabše dobro permeabilne učinkovine, metoprolola, je približno štirikrat večja od vrednosti  $P_{app}$  oksacilina, ki ima med slabo permeabilnimi učinkovinami najvišjo vrednost  $P_{app}$  (slika 11).



Slika 11:  $P_{app}$  testiranih spojin v AP-BL smeri in BL-AP smeri ter standardni odklon

#### **4.2.1 Dobro permeabilne zdravilne učinkovine**

Za testiranje smo izbrali 9 učinkovin, ki so uvrščene v I. ali II. razred BCS, kar pomeni, da so dobro permeabilne pri ljudeh. Sedem izmed teh jih najdemo tudi na seznamu smernice FDA, kjer jih predlagajo kot dobro permeabilne modelne spojine za ugotavljanje ustreznosti določenega modela oziroma metode za študije permeabilnosti učinkovin. Te učinkovine so: antipirin, karbamazepin, ketoprofen, metoprolol, propranolol, teofilin, verapamil (13). Poleg teh smo kot dobro permeabilni učinkovini testirali še rosiglitazon in ropinirol (preglednica VII).

Preglednica VII: Vrednosti  $P_{app}$  dobro permeabilnih učinkovin v AP-BL in BL-AP smeri, razmerje med vrednostjo  $P_{app}$  v BL-AP smeri in AP-BL smeri (ER), statistični rezultati

	<b>ANTIPIRIN <math>P_{app}</math> [cm/s]</b>				<b><math>\overline{P_{app}} \mp SD</math> [cm/s]</b>	<b>SEM [cm/s]</b>	<b>RSD [%]</b>
<b>AP-BL</b>	$2,3 \times 10^{-05}$	$2,1 \times 10^{-05}$	$2,3 \times 10^{-05}$	$3,0 \times 10^{-05}$	$2,4 \times 10^{-05} \pm 3,87 \times 10^{-06}$	$1,93 \times 10^{-06}$	16,0
<b>BL-AP</b>	$2,2 \times 10^{-05}$	$2,4 \times 10^{-05}$	$2,4 \times 10^{-05}$	$2,7 \times 10^{-05}$	$2,4 \times 10^{-05} \pm 1,93 \times 10^{-06}$	$9,67 \times 10^{-07}$	8,0
<b>ER</b>	0,99	<b>F-test</b>	0,28	<b>T-test</b>	0,95	NS	
	<b>KETOPROFEN <math>P_{app}</math> [cm/s]</b>				<b><math>\overline{P_{app}} \mp SD</math> [cm/s]</b>	<b>SEM [cm/s]</b>	<b>RSD [%]</b>
<b>AP-BL</b>	$1,8 \times 10^{-05}$	$1,6 \times 10^{-05}$	$1,4 \times 10^{-05}$	/	$1,6 \times 10^{-05} \pm 2,01 \times 10^{-06}$	$1,16 \times 10^{-06}$	13,9
<b>BL-AP</b>	$1,6 \times 10^{-05}$	$1,8 \times 10^{-05}$	$1,9 \times 10^{-05}$	/	$1,8 \times 10^{-05} \pm 1,35 \times 10^{-06}$	$7,80 \times 10^{-07}$	6,7
<b>ER</b>	1,11	<b>F-test</b>	0,62	<b>T-test</b>	0,27	NS	
	<b>METOPROLOL <math>P_{app}</math> [cm/s]</b>				<b><math>\overline{P_{app}} \mp SD</math> [cm/s]</b>	<b>SEM [cm/s]</b>	<b>RSD [%]</b>
<b>AP-BL</b>	$1,4 \times 10^{-05}$	$1,2 \times 10^{-05}$	$1,2 \times 10^{-05}$	$2,3 \times 10^{-05}$	$1,5 \times 10^{-05} \pm 5,46 \times 10^{-06}$	$2,73 \times 10^{-06}$	36,0
<b>BL-AP</b>	$1,7 \times 10^{-05}$	$1,3 \times 10^{-05}$	$1,4 \times 10^{-05}$	$1,4 \times 10^{-05}$	$1,5 \times 10^{-05} \pm 1,70 \times 10^{-06}$	$8,52 \times 10^{-07}$	11,5
<b>ER</b>	0,98	<b>F-test</b>	0,087	<b>T-test</b>	0,91	NS	
	<b>PROPRANOLOL <math>P_{app}</math> [cm/s]</b>				<b><math>\overline{P_{app}} \mp SD</math> [cm/s]</b>	<b>SEM [cm/s]</b>	<b>RSD [%]</b>
<b>AP-BL</b>	$1,5 \times 10^{-05}$	$1,6 \times 10^{-05}$	$2,0 \times 10^{-05}$	$1,4 \times 10^{-05}$	$1,6 \times 10^{-05} \pm 2,48 \times 10^{-06}$	$1,24 \times 10^{-06}$	18,5
<b>BL-AP</b>	$1,6 \times 10^{-05}$	$1,6 \times 10^{-05}$	$1,7 \times 10^{-05}$	$1,4 \times 10^{-05}$	$1,6 \times 10^{-05} \pm 1,07 \times 10^{-06}$	$5,36 \times 10^{-07}$	16,6
<b>ER</b>	0,99	<b>F-test</b>	0,20	<b>T-test</b>	0,89	NS	

	<b>ROPINIROL P<sub>app</sub> [cm/s]</b>				<b><math>\bar{P}_{app} \pm SD</math> [cm/s]</b>	<b>SEM [cm/s]</b>	<b>RSD [%]</b>	
<b>AP-BL</b>	2,1×10 <sup>-05</sup>	2,1×10 <sup>-05</sup>	2,1×10 <sup>-05</sup>	/	2,1×10 <sup>-05</sup> ±3,61×10 <sup>-07</sup>	2,08×10 <sup>-07</sup>	1,7	
<b>BL-AP</b>	2,1×10 <sup>-05</sup>	2,1×10 <sup>-05</sup>	2,3×10 <sup>-05</sup>	2,4×10 <sup>-05</sup>	2,2×10 <sup>-05</sup> ±1,44×10 <sup>-06</sup>	7,22×10 <sup>-07</sup>	6,6	
<b>ER</b>	1,05	<b>F-test</b>	0,12	<b>T-test</b>	0,25	NS		
	<b>ROSIGLITAZON P<sub>app</sub> [cm/s]</b>				<b><math>\bar{P}_{app} \pm SD</math> [cm/s]</b>	<b>SEM [cm/s]</b>	<b>RSD [%]</b>	
<b>AP-BL</b>	4,3×10 <sup>-05</sup>	3,3×10 <sup>-05</sup>	2,7×10 <sup>-05</sup>	2,8×10 <sup>-05</sup>	3,3 ×10 <sup>-05</sup> ±7,42×10 <sup>-06</sup>	3,71×10 <sup>-06</sup>	22,8	
<b>BL-AP</b>	3,4×10 <sup>-05</sup>	3,1×10 <sup>-05</sup>	2,8×10 <sup>-05</sup>	3,3×10 <sup>-05</sup>	3,1×10 <sup>-05</sup> ±2,82×10 <sup>-06</sup>	1,41×10 <sup>-06</sup>	9,0	
<b>ER</b>	0,96	<b>F-test</b>	0,15	<b>T-test</b>	0,77	NS		
	<b>VERAPAMIL P<sub>app</sub> [cm/s]</b>				<b><math>\bar{P}_{app} \pm SD</math> [cm/s]</b>	<b>SEM [cm/s]</b>	<b>RSD [%]</b>	
<b>AP-BL</b>	1,9×10 <sup>-05</sup>	4,4×10 <sup>-05</sup>	1,8×10 <sup>-05</sup>	3,5×10 <sup>-05</sup>	2,9×10 <sup>-05</sup> ±1,25×10 <sup>-05</sup>	6,27×10 <sup>-06</sup>	43,6	
<b>BL-AP</b>	3,5×10 <sup>-05</sup>	3,2×10 <sup>-05</sup>	3,5×10 <sup>-05</sup>	2,1×10 <sup>-05</sup>	3,1×10 <sup>-05</sup> ±6,89×10 <sup>-06</sup>	3,45×10 <sup>-07</sup>	22,5	
<b>ER</b>	1,07	<b>F-test</b>	0,35	<b>T-test</b>	0,80	NS		
	<b>TEOFILIN P<sub>app</sub> [cm/s]</b>					<b><math>\bar{P}_{app} \pm SD</math> [cm/s]</b>	<b>SEM [cm/s]</b>	<b>RSD [%]</b>
<b>AP-BL</b>	2,9×10 <sup>-05</sup>	1,4×10 <sup>-05</sup>	2,1×10 <sup>-05</sup>	1,8×10 <sup>-05</sup>	2,0×10 <sup>-05</sup>	2,1×10 <sup>-05</sup> ±6,28×10 <sup>-06</sup>	2,08×10 <sup>-07</sup>	30,7
<b>BL-AP</b>	2,1×10 <sup>-05</sup>	2,1×10 <sup>-05</sup>	2,3×10 <sup>-05</sup>	2,4×10 <sup>-05</sup>	1,9×10 <sup>-05</sup>	2,2×10 <sup>-05</sup> ±3,35×10 <sup>-06</sup>	7,22×10 <sup>-07</sup>	17,4
<b>ER</b>	0,94	<b>F-test</b>	0,33	<b>T-test</b>		0,76	NS	
	<b>KARBAMAZEPIN P<sub>app</sub> [cm/s]</b>				<b><math>\bar{P}_{app} \pm SD</math> [cm/s]</b>	<b>SEM [cm/s]</b>	<b>RSD [%]</b>	
<b>AP-BL</b>	3,0×10 <sup>-05</sup>	2,0×10 <sup>-05</sup>	2,5×10 <sup>-05</sup>	2,3×10 <sup>-05</sup>		2,4×10 <sup>-05</sup> ±4,31×10 <sup>-06</sup>	2,16×10 <sup>-06</sup>	17,7
<b>BL-AP</b>	2,2×10 <sup>-05</sup>	2,5×10 <sup>-05</sup>	2,4×10 <sup>-05</sup>	2,5×10 <sup>-05</sup>		2,4×10 <sup>-05</sup> ±1,45×10 <sup>-06</sup>	7,24×10 <sup>-07</sup>	6,0
<b>ER</b>	0,99	<b>F-test</b>	0,11	<b>T-test</b>		0,89	NS	

Vse učinkovine, z izjemo verapamila, prehajajo skozi monosloj Caco-2 celic predvsem transcelularno s pasivno difuzijo (42). Gre za majhne molekule, med njimi ima največjo molsko maso rosiglitazon ( $MM = 357,4 \text{ g/mol}$ ) (25). Da lahko molekule prehajajo skozi membrano, morajo biti dovolj lipofilne in pretežno v neionizirani obliki pri pH donorske raztopine. Npr. v primeru ketoprofena bi dobili višjo vrednost  $P_{app}$ , če bi znižali pH donorske raztopine iz 7,4 na 6,0, ker je ketoprofen šibka kislina in bi bila v tem primeru v večji meri v neionizirani obliki (18). Za spojine, ki prehajajo skozi epiteljske celice pretežno s pasivnim transportom in njihov prehod ni pomembno odvisen od aktivnosti prenašalnih proteinov, je značilno, da imajo ER nižji od 2 (42). Tudi na s celičnim modelom Caco-2 smo vsem tem spojinam določili vrednost ER nižjo od 2.

Med dobro permeabilnimi učinkovinami je tudi verapamil, ki je poleg tega, da prehaja transcelularno s pasivnim transportom, tudi substrat in inhibitor P-gp. V smernici FDA ga predlagajo kot modelno spojino za ugotavljanje prisotnosti mehanizma aktivnega transporta v eliminatorni smeri na različnih modelih za določanje permeabilnosti (13). Na podlagi tega bi lahko pričakovali, da bo vrednost  $P_{app}$  za verapamil v BL-AP smeri signifikantno večja od vrednosti  $P_{app}$  v AP-BL smeri. Vendar smo s celičnim modelom Caco-2 dobili ER 1,1, kar pomeni, da ni bilo signifikantne razlike med vrednostmi  $P_{app}$  v obeh smereh. Torej smo dobili lažno negativni rezultat, da verapamil ni substrat P-gp. Teoretično bi lahko bil P-gp izražen v tako majhnem obsegu na celicah, da bi bil transport verapamila iz celice nazaj na donorsko stran zanemarljiv v primerjavi s pasivnim transportom skozi celico (43). Za verapamil smo določili drugo najvišjo vrednost  $P_{app}$ , torej je bil zelo dobro permeabilen. Vemo, da je lahko izražanje P-gp močno odvisno od izbrane pasaže celic in pogojev gojenja. Celice smo skozi celotno obdobje gojili pod kontroliranimi pogoji in poskuse smo izvajali na celicah s pasažami med 50 in 57, kar je ozek interval in pri drugih znanih substratih P-gp nismo dobili lažno negativnega rezultata. Gotovo je vzrok za lažno negativen rezultat zelo visoka koncentracija verapamila, ki smo jo aplicirali na donorsko stran ( $660 \mu\text{M}$ ). Namreč za preučevanje mehanizma aktivnega transporta v eliminatorni smeri priporočajo čim nižje koncentracije učinkovine, in sicer pod  $50 \mu\text{M}$ . Ugotovili so, da se pri višjih koncentracijah lahko P-gp zasiti s substratom in posledično prevlada pasivni transport nad aktivnim transportom v eliminatorni smeri (44).

#### **4.2.2 Slabo permeabilne zdravilne učinkovine**

Testirali smo 6 učinkovin, ki sodijo v III. ali IV. razred po BCS. V smernici FDA predlagajo furosemid, ranitidin, atenolol in amoksicilin kot slabo permeabilne modelne spojine za ugotavljanje ustreznosti določenega modela oziroma metode za študije permeabilnosti (13). Poleg teh smo testirali še lozartan in oksacilin (preglednica VIII).

Preglednica VIII: Vrednosti  $P_{app}$  slabo permeabilnih učinkovin v AP-BL in BL-AP smeri, ER, statistični rezultati

	AMOKSICILIN $P_{app}$ [cm/s]				$\overline{P_{app}} \pm SD$ [cm/s]	SEM [cm/s]	RSD [%]
<b>AP-BL</b>	$4,4 \times 10^{-07}$	$5,0 \times 10^{-07}$	$6,0 \times 10^{-07}$	/	$5,1 \times 10^{-07} \pm 8,17 \times 10^{-08}$	$4,72 \times 10^{-08}$	15,94
<b>BL-AP</b>	$3,8 \times 10^{-07}$	$5,6 \times 10^{-07}$	$4,3 \times 10^{-07}$	/	$4,5 \times 10^{-07} \pm 9,33 \times 10^{-08}$	$5,39 \times 10^{-08}$	20,59
<b>ER</b>	0,88	<b>F-test</b>	0,87	<b>T-test</b>	0,45	NS	
	ATENOLOL $P_{app}$ [cm/s]				$\overline{P_{app}} \pm SD$ [cm/s]	SEM [cm/s]	RSD [%]
<b>AP-BL</b>	$7,6 \times 10^{-07}$	$7,2 \times 10^{-07}$	$6,6 \times 10^{-07}$	/	$7,1 \times 10^{-07} \pm 5,21 \times 10^{-08}$	$3,01 \times 10^{-08}$	7,33
<b>BL-AP</b>	$5,9 \times 10^{-07}$	$6,3 \times 10^{-07}$	$7,3 \times 10^{-07}$	$8,0 \times 10^{-07}$ $8,2 \times 10^{-07}$	$7,1 \times 10^{-07} \pm 9,91 \times 10^{-08}$	$4,43 \times 10^{-08}$	15,72
<b>ER</b>	1,0	<b>F-test</b>	0,46	<b>T-test</b>	0,96	NS	
	FUROSEMID $P_{app}$ [cm/s]				$\overline{P_{app}} \pm SD$ [cm/s]	SEM [cm/s]	RSD [%]
<b>AP-BL</b>	$3,0 \times 10^{-07}$	$3,1 \times 10^{-07}$	$4,9 \times 10^{-07}$	/	$3,7 \times 10^{-07} \pm 1,09 \times 10^{-07}$	$6,29 \times 10^{-08}$	29,56
<b>BL-AP</b>	$3,7 \times 10^{-06}$	$3,3 \times 10^{-06}$	$3,4 \times 10^{-07}$	$3,6 \times 10^{-06}$	$3,5 \times 10^{-06} \pm 1,75 \times 10^{-07}$	$8,73 \times 10^{-08}$	5,00
<b>ER</b>	9,5	<b>F-test</b>	0,58	<b>T-test</b>	1,3E-06	S	
	LOZARTAN $P_{app}$ [cm/s]				$\overline{P_{app}} \pm SD$ [cm/s]	SEM [cm/s]	RSD [%]
<b>AP-BL</b>	$8,2 \times 10^{-07}$	$1,0 \times 10^{-06}$	$8,1 \times 10^{-07}$	$7,7 \times 10^{-07}$	$8,5 \times 10^{-07} \pm 1,02 \times 10^{-07}$	$5,11 \times 10^{-08}$	12,01
<b>BL-AP</b>	$5,5 \times 10^{-06}$	$6,0 \times 10^{-06}$	$6,1 \times 10^{-06}$	$6,2 \times 10^{-06}$	$6,0 \times 10^{-06} \pm 3,12 \times 10^{-07}$	$1,57 \times 10^{-07}$	5,26
<b>ER</b>	7,0	<b>F-test</b>	0,1	<b>T-test</b>	$7,5 \times 10^{-08}$	S	
	OKSACILIN $P_{app}$ [cm/s]				$\overline{P_{app}} \pm SD$ [cm/s]	SEM [cm/s]	RSD [%]
<b>AP-BL</b>	$1,9 \times 10^{-06}$	$5,8 \times 10^{-06}$	$3,4 \times 10^{-06}$	$3,9 \times 10^{-06}$	$3,7 \times 10^{-06} \pm 1,63 \times 10^{-06}$	$8,14 \times 10^{-07}$	43,48
<b>BL-AP</b>	$8,5 \times 10^{-07}$	$6,7 \times 10^{-07}$	$7,8 \times 10^{-07}$	$8,4 \times 10^{-07}$	$7,9 \times 10^{-07} \pm 8,19 \times 10^{-08}$	$4,10 \times 10^{-08}$	10,42
<b>ER</b>	0,21	<b>F-test</b>	$4,3 \times 10^{-04}$	<b>T-test</b>	0,01	S	



	<b>RANITIDIN P<sub>app</sub> [cm/s]</b>				<b>P<sub>app</sub> ± SD [cm/s]</b>	<b>SEM [cm/s]</b>	<b>RSD</b>
<b>AP-BL</b>	$6,1 \times 10^{-07}$	$4,1 \times 10^{-07}$	$3,7 \times 10^{-07}$	$3,4 \times 10^{-07}$	$4,3 \times 10^{-07} \pm 1,21 \times 10^{-07}$	$6,06 \times 10^{-08}$	28,15
<b>BL-AP</b>	$1,4 \times 10^{-06}$	$1,3 \times 10^{-06}$	$1,5 \times 10^{-06}$	$1,1 \times 10^{-06}$	$1,3 \times 10^{-06} \pm 1,83 \times 10^{-07}$	$9,14 \times 10^{-08}$	14,12
<b>ER</b>	3,0	<b>F-test</b>	0,51	<b>T-test</b>	$2,2 \times 10^{-04}$	S	

#### 4.2.2.1 Aktivni transport amoksicilina in oksacilina

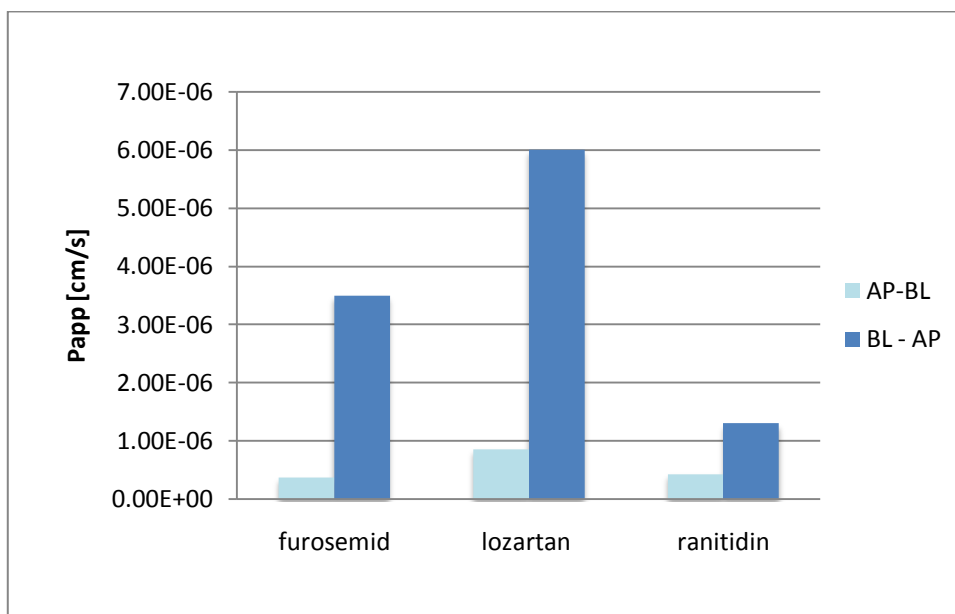
Amoksicilin in oksacilin sodita v skupino betalaktamskih antibiotikov, sta strukturna analoga tripeptidov. Znano je, da so poleg hranil tudi betalaktamski antibiotiki substrati oligopeptidnega prenašalca PEPT1, ki je tudi izražen na apikalni strani Caco-2 celic (45). Za amoksicilin je značilen kompleksen mehanizem prehoda skozi epitelij prebavnega trakta. Prehaja tako transcelularno s pasivnim transportom in je hkrati substrat oligopeptidnega prenašalca PEPT1 (46). Za oksacilin v literaturi nismo našli natančnega mehanizma transporta. S testiranjem permeabilnosti v obeh smereh monosloja smo določili vrednost ER za oksacilin 0,21. Torej je bil transport oksacilina v AP-BL smeri znatno višji kot v obratni smeri, kar pomeni da se je v veliki meri transportiral z aktivnim transportom in na podlagi literaturnih virov lahko sklepamo (45), da s prenašalcem PEPT1. Za amoksicilin smo določili vrednost ER 0,88. Dobljena vrednost še ne predstavlja significantne razlike pri prehajanju v obeh smereh monosloja in smo zato dobili lažno negativen rezultat, da amoksicilin ne prehaja z aktivnim transportom. Tudi v tem primeru je lahko tako kot pri verapamilu prišlo do zasičenja prenašalca. Kot že navajajo v literaturi (47), smo tudi mi ugotovili, da s celičnim modelom Caco-2 ne moremo pravilno ovrednotiti aktivnega transporta učinkovin. Namreč na enterocitih ljudi je PEPT1 izražen v vsaj 10-krat večjem obsegu kot pri Caco-2 celicah, kar onemogoča kvantitativno primerjavo (47).

#### 4.2.2.2 Aktivni transport v eliminatorni smeri pri slabo permeabilnih učinkovinah

Furosemid, lozartan in ranitidin so znani substrati P-gp in to lahko potrdimo tudi z rezultati, ki smo jih dobili na našem celičnem modelu, tako da smo izračunali ER. Določitev ER velja za najbolj direktno metodo določanja aktivnega transporta skozi epitelij (43). Ker smo testirali dosti višje koncentracije, kot jih predlagajo za študije mehanizma aktivnega transporta (43), lahko sklepamo, da je v našem primeru P-gp visoko izražen na apikalni strani celic oziroma, da ima veliko kapaciteto za prenos testiranih učinkovin. Namreč v nasprotnem primeru bi lahko dobili lažno negativne rezultate, saj bi prišlo zaradi visoke koncentracije substrata do zasičenja P-gp, če bi bil ta izražen v manjši meri.

Na nivo izražanja P-gp na celicah lahko vplivajo že majhne razlike v pogojih gojenja celic (npr. nasaditvena gostota, pogostost hranjenja, sestava hranilnega medija) in starost celic. Različen protokol izvedbe eksperimenta (začetna donorska koncentracija učinkovin, sestava pufra, način izpiranja monosloja itd.) tudi vpliva na to, kakšne vrednosti ER

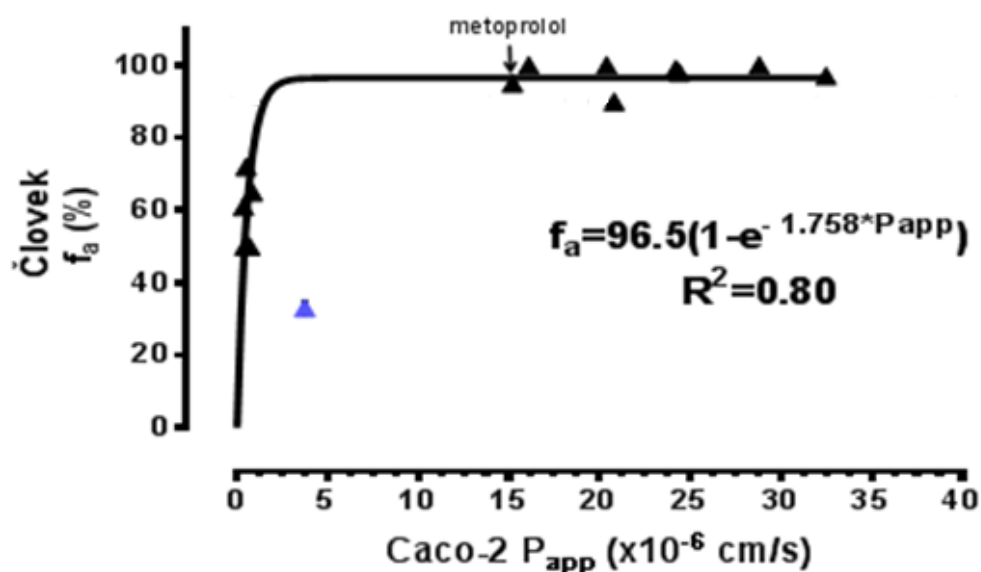
dobimo. Posledica tega je velika intralaboratorijska variabilnost dobljenih vrednosti ER za posamezne spojine (43). Vseeno v različni literaturi navajajo, da če določimo vrednost ER  $\geq 3$ , lahko potrdimo, da je prišlo do aktivnega transporta učinkovine v eliminatorni smeri (22,29). Tudi mi smo določili za furosemid, lozartan in ranitidin vrednosti ER nad to mejo (slika 12).



Slika 12: Vrednosti  $P_{app}$  učinkovin, ki imajo ER večji od 3, v AP-BL smeri in BL-AP smeri

### 4.3 Korelacija med permeabilnostnimi koeficienti ( $P_{app}$ ), določenimi s celičnim modelom Caco-2, in absorbirano frakcijo učinkovine pri ljudeh ( $f_a$ )

Z namenom, da bi ovrednotili uporabnost celičnega modela Caco-2, smo izračunali korelacijo med dobljenimi vrednostmi  $P_{app}$  za 14 modelnih učinkovin in  $f_a$  pri ljudeh. Ocenjujemo, da smo dobili dobro korelacijo, saj smo izračunali  $R^2=0,80$  (slika 13).



Slika 13: Korelacija med  $f_a$  pri ljudeh in vrednostmi  $P_{app}$  testiranih učinkovin na *in vitro* celičnem modelu Caco-2; z modro barvo je označen oksacilin, ki ga nismo upoštevali pri izračunu korelacije.

Vrednost  $R^2=0,80$  je primerljiva z vrednostjo, ki so jo izračunali na modelu izoliranega podganjega črevesa ( $R^2=0,85$ ,  $n=20$ ) (35). Vendar so v tem primeru izračunali korelacijo na večjem številu spojin, zato bi morali mi še dodatno testirati manjkajoče spojine, da bi lahko dejansko primerjali naš model z modelom izoliranega podganjega črevesa. V literaturi navajajo, da moramo določiti referenčne vrednosti najmanj 20 modelnim učinkovinam (15), kar pomeni, da je potrebno naš model še razširiti.

Vsem testiranim učinkovinam, ki imajo  $f_a$  pri ljudeh višji od 90 %, smo določili vrednost  $P_{app}$  v območju nad  $1 \times 10^{-05}$  cm/s. Izmed teh učinkovin ima najnižjo vrednost  $P_{app}$  metoprolol. Zato smo metoprolol določili za interni standard. Spojine, katerih

permeabilnost se bo v prihodnje testirala na tem modelu, bodo uvrščene med dobro permeabilne, če bodo imele višjo vrednost  $P_{app}$ , kot jo ima metoprolol. Metoprolol je tudi v smernici FDA predlagan kot interni standard, ki predstavlja mejo med dobro in slabo permeabilnimi učinkovinami in ga vključimo v donorsko raztopino za vsakokratno sočasno meritev skupaj z novo preiskovano učinkovino (13).

Kot smo že napisali, je popravljiva pomanjkljivost našega celičnega modela Caco-2 ta, da smo določili referenčne vrednosti  $P_{app}$  premalo učinkovinam. Z grafa (slika 13) je razvidno, da ima edino oksacilin  $f_a$  nižji od 50 %, zato bi bilo dobro, da bi model dopolnili predvsem s spojinami, ki imajo pri ljudeh nizek obseg absorpcije. Na splošno pa je za celični model Caco-2 značilno, da dobimo pri učinkovinah, katerih transport je kompleksnejši in ne prehajajo samo s pasivno difuzijo, kljub vrednostim  $f_a$  med 50–89 % približno tako nizke vrednosti  $P_{app}$  kot pri učinkovinah, katerih  $f_a$  je nižji od 50 % (15). To se je pokazalo tudi pri našem celičnem modelu. Na grafu (slika 13) vidimo, kako so slabo permeabilne učinkovine razporejene navpično ena nad drugo, ker imajo kljub zelo različnim vrednostim  $f_a$ , približno enake  $P_{app}$ . V teh primerih je prispevek z aktivnim transportom (npr. amoksicilin) in po paracelularni poti manjši kot pa pri absorpciji učinkovine iz prebavnega trakta.

## 5 SKLEPI

Na podlagi literature o gojenju Caco-2 celic smo natančno definirali pogoje in protokol gojenja celic. Delo pod aseptičnimi pogoji, primerna nasaditvena gostota, izbrana pasaja celic, hranilni medij, redno menjavanje gojišča, konstantni pogoji v celičnem inkubatorju so dejavniki, ki so pomembno vplivali na to, da so bile celice po 21 dneh gojenja ustrezno diferencirane in so tvorile kompakten monosloj s tesnimi stiki med posameznimi celicami. Z merjenjem TEER v obdobju rasti celic smo potrdili, da so tesni stiki med celicami že v veliki meri vzpostavljeni po štirih dneh od njihove nasaditve na membrane insertov.

Delovni pufer (0,1 M HEPES v HBSS), ki smo ga uporabljali pri testiranju učinkovin, ni zmanjšal integritete celičnega monosloja, ki mu je bil izpostavljen med testiranjem, kar pomeni, da na ta način ni vplival na dobljene rezultate.

S tem ko smo določili nizke vrednosti  $P_{app}$  trem različnim FITC-Dekstranom z visoko molekulsko maso na našem celičnem modelu Caco-2, smo potrdili, da je integriteta monosloja ustrezna.

Določili smo referenčne vrednosti permeabilnostnih koeficientov 15 učinkovinam, ki izhajajo iz enega od štirih možnih razredov po BCS. Izračunali smo korelacijo med vrednostmi  $P_{app}$  štirinajstih učinkovin z  $f_a$  pri ljudeh. Glede na to, da celični model slabše posnema *in vivo* pogoje pri ljudeh kot npr. model izoliranega podganjega črevesa, smo dobili dobro korelacijo z  $R^2=0,80$ , vendar je vseeno moč našega modela za določanje permeabilnosti slabša iz tega vidika, ker je postavljen na tako majhnem številu učinkovin. Zato predlagamo, da se model v prihodnosti še nadgradi tako, da se določi referenčne vrednosti  $P_{app}$  še več učinkovinam.

Menimo, da je celični model Caco-2 primeren za ugotavljanje permeabilnosti učinkovin, ki prehajajo skozi epitelij prebavnega trakta s pasivnim transportom in bodo dobljeni rezultati lahko služili kot podpora pridobljenim literaturnim podatkom o dobri permeabilnosti izbrane učinkovine, ki so potrebni za opustitev *in vivo* bioekvivalentnih študij na osnovi BCS. Za učinkovine, ki prehajajo tudi z aktivnim transportom ali pa pretežno paracelularno, pa zaradi omejitev modela kot so ožji tesni stiki in drugačen nivo izražanja prenašalnih proteinov kot pri ljudeh, predlagamo uporabo drugih modelov, ki v teh primerih bolje posnemajo *in vivo* situacijo.

## 6 VIRI IN LITERATURA

1. Lennernäs H, Abrahamsson B: The use of biopharmaceutic classification of drugs in drug discovery and development: current status and future extension. *J Pharm Pharmacol* 2005; 57: 273-285.
2. <http://en.wikipedia.org/wiki/Bioavailability>, 21.04.2013.
3. Schmidt RF, Gebhart GF: *Encyclopedia of Pain*, Springer, Berlin-Heidelberg, 2007: 159.
4. Anshul the pharmacist  
<https://sites.google.com/site/anshulthepharmacist/pharmacy/biopharmaceutics/absorption-of-drugs/factors-affecting-absorption-of-drugs>, 27.04.2013.
5. Burton PS, Goodwin JT, Vidmar TJ, Amore BM: Predicting drug absorption: how nature made it a difficult problem. *JPET* 2002; 303: 889-895.
6. Pelkonen O, Boobis AR, Gundert-Remy U: In vitro prediction of gastrointestinal absorption and bioavailability: an experts' meeting report. *J Pharmacol Exp Ther* 2001; 57: 621-629.
7. Löbenberg R, Amidon GL: Modern bioavailability, bioequivalence and biopharmaceutics classification system. *New scientific approaches to international regulatory standards. Eur J Pharm Biopharm* 2000; 50: 3-12.
8. Versantvoort CHM, Rempelberg CJM, Sisp AJAM: Methodologies to study human intestinal absorption. A review. RIVM report 630030001, 2000.
9. Butler JM, Dressman JB: The developability classification system: application of biopharmaceutics concepts to formulation development. *J Pharm Sci*, 2010; 99: 4940-4954.
10. Dahan A, Miller JM, Amidon L: Prediction of solubility and permeability class membership: Provisional BCS classification of the world's top oral drugs. *The AAPS Journal* 2009; 11: 740-746.
11. Amidon GL, Lennernäs H, Shah VP, Crison JR: A theoretical basis for a biopharmaceutic drug classification: The correlation of *in vitro* drug product dissolution and *in vivo* bioavailability. *Pharm Res* 1995; 12: 413-420.
12. Basanta Kumar Reddy B, Karunakar A: Biopharmaceutics classification system: A regulatory approach. *Diss tech* 2011; 18: 31-37.

13. U. S. Food and Drug Administration: Guidance for Industry, Waiver of In Vivo Bioavailability and Bioequivalence Studies for Immediate-Release Solid Oral Dosage Forms Based on a Biopharmaceutics classification System.  
<http://www.fda.gov/downloads/Drugs/GuidanceComplianceRegulatoryInformation/Guidances/ucm070246.pdf>, april 2013.
14. European Medicines Agency: Guideline on the investigation of bioequivalence.  
[http://www.ema.europa.eu/docs/en\\_GB/document\\_library/Scientific\\_guideline/2010/01/WC500070039.pdf](http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Scientific_guideline/2010/01/WC500070039.pdf), april 2013.
15. Erhardt C, Kim KJ: Drug absorption studies, Springer US, New York, 2008: 665-680.
16. Sambuy Y, De Angelis I, Ranaldi G, Scarino ML, Stammati A, Zucco F: The Caco-2 cell line as a model of the intestinal barrier: influence of cell and culture-related factors on Caco-2 cell functional characteristics. *Cell Biology and Toxicology*, 2005; 21: 1-26.
17. Yan Z, Caldwell GW: Optimization in Drug Discovery: In Vitro Methods, New Jersey, 2004: 19-35.
18. Sun H, Chow EC, Du Y, Pang KS: The Caco-2 cell monolayer: usefulness and limitations. *Expert Opin Drug Met* 2008; 4: 395-411.
19. Drug Bank, Open Data & Drug Target Database:  
<http://www.drugbank.ca/drugs/DB01435>, april 2013.
20. Drug Bank, Open Data & Drug Target Database:  
<http://www.drugbank.ca/drugs/DB00564>, april 2013.
21. Drug Bank, Open Data & Drug Target Database:  
<http://www.drugbank.ca/drugs/DB01009>, april 2013.
22. Drug Bank, Open Data & Drug Target Database:  
<http://www.drugbank.ca/drugs/DB00264>, april 2013.
23. Drug Bank, Open Data & Drug Target Database:  
<http://www.drugbank.ca/drugs/DB00571>, april 2013.
24. Drug Bank, Open Data & Drug Target Database:  
<http://www.drugbank.ca/drugs/DB00268>, april 2013.
25. Drug Bank, Open Data & Drug Target Database:  
<http://www.drugbank.ca/drugs/DB00412>, april 2013.



26. Drug Bank, Open Data & Drug Target Database:  
<http://www.drugbank.ca/drugs/DB00277>, april 2013.
27. Drug Bank, Open Data & Drug Target Database:  
<http://www.drugbank.ca/drugs/DB00661>, april 2013.
28. Drug Bank, Open Data & Drug Target Database:  
<http://www.drugbank.ca/drugs/DB01060>, april 2013.
29. Drug Bank, Open Data & Drug Target Database:  
<http://www.drugbank.ca/drugs/DB00335>, april 2013.
30. Drug Bank, Open Data & Drug Target Database:  
<http://www.drugbank.ca/drugs/DB00695>, april 2013.
31. Drug Bank, Open Data & Drug Target Database:  
<http://www.drugbank.ca/drugs/DB00678>, april 2013.
32. Drug Bank, Open Data & Drug Target Database:  
<http://www.drugbank.ca/drugs/DB00713>, april 2013.
33. Drug Bank, Open Data & Drug Target Database:  
<http://www.drugbank.ca/drugs/DB00863>, april 2013.
34. Benet LZ, Wu CY: Predicting Drug Disposition via Application of BCS: Transport/ Absorption/ Elimination Interplay and Development of a Biopharmaceutics Drug Disposition Classification System. *Pharm Res*, 2005; 22: 11-23.
35. Peternel L, Kristan K, Petruševska M, Lanišnik Rižner T, Legen I: Suitability of Isolated Rat Jejunum Model for Demonstration of Complete Absorption in Humans for BCS-Based Biowaiver Request. *J Pharm Sci*, 2012; 101: 1436-1449.
36. Zakeri-Milani P, Valizadeh H, Tajerzadeh H, Azarmi Y, Islambolchilar Z, Barzegar S, Barzegar-Jalali M: Predicting human intestinal permeability using single pass intestinal perfusion in rat. *J Pharm Sci*, 2007; 10: 368-379.
37. Legen I, Kračun M, Salobir M, Kerč J: The evaluation of some pharmaceutically acceptable excipients as permeation enhancers for amoxicillin. *Int J Pharm*, 2006; 308, 84-90.
38. Millicell<sup>®</sup>-24 and Millicell-96 Cell Culture Devices:  
[http://www.millipore.com/userguides.nsf/a73664f9f981af8c852569b9005b4eee/77e6be842d5417b0852570bc0066375f/\\$FILE/PR02400.pdf](http://www.millipore.com/userguides.nsf/a73664f9f981af8c852569b9005b4eee/77e6be842d5417b0852570bc0066375f/$FILE/PR02400.pdf), april 2013

39. MycoAlert<sup>TM</sup> mycoplasma detection kit-Lonza:  
[http://bio.lonza.com/uploads/tx\\_mwaxmarketingmaterial/Lonza\\_ManualsProductInstructions\\_MycoAlert\\_Mycoplasma\\_Detection\\_Kit.pdf](http://bio.lonza.com/uploads/tx_mwaxmarketingmaterial/Lonza_ManualsProductInstructions_MycoAlert_Mycoplasma_Detection_Kit.pdf), april 2013
40. Rothen-Rutishauser B, Braun A, Günthert M, Wunderli-Allenspach H: Formation of multilayers in the Caco-2 cell culture model: a confocal laser scanning microscopy study. *Pharm Res*, 2000; 17: 460-465.
41. Van der Waterbeemd H, Lennernäs H, Artusson P: Drug Bioavailability: Estimation of Solubility, Permeability, Absorption and Bioavailability, Willey-VCH, Weinheim, 2003: 72-82.
42. Skolnik S, Lin X, Wang J, Chen X, He T, Zhang B: Towards Prediction of *In vivo* Intestinal Absorption Using a 96-Well Caco-2 Assay. *J Pharm Sci*, 2010; 99: 3246-3265.
43. Sandström R, Kevilsson A, Knuston L, Lennernäs H: Jejunal Absorption and Metabolism of R/S - Verapamil in Humans. *Pharm Res* 1998; 15: 856-862.
44. Balimane PV, Han YH, Chong S: Current Industrial Practices of Assessing Permeability and P-Glycoprotein Interaction. *AAPS J*, 2006; 8: E1-13.
45. Behrens I, Kissel T: Do cell culture conditions influence the carrier-mediated transport of peptides in Caco-2 cell monolayers?. *Eur J Pharm Sci*, 2003; 19: 433-442.
46. Lennernäs H, Knuston L, Knuston T, Hussain A, Lesko L, Salmonson T, Amidon GL: The effect of amiloride on the *in vivo* effective permeability of amoxicillin in human jejunum: experience from a regional perfusion technique. *Eur J Pharm Sci*, 2001; 15: 271-277.
47. Larregieu CA, Benet LZ: Drug Discovery and Regulatory Considerations for Improving *In Silico* and *In Vitro* Predictions that Use Caco-2 as a Surrogate for Human Intestinal Permeability Measurements. *The AAPS Journal*, 2013; 15: 483-494.
48. Soldner A, Benet LZ, Mutschler E, Christians U: Active transport of the angiotensin-II antagonist losartan and its main metabolite EXP 3174 across MDCK-MDR1 and caco-2 cell monolayers. *Br J Pharmacol*, 2000; 129: 1235-1243.