

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO

PETRA ŠENICA

**PERMEABILNOST FLUORESCENTNO
OZNAČENEGA DEKSTRANA, RODAMINA 123 IN
ENALAPRILATA V RAZLIČNIH DELIH
IZOLIRANEGA ČREVESJA PODGANE *IN VITRO***

DIPLOMSKA NALOGA
UNIVERZITETNI ŠTUDIJ FARMACIJE

Ljubljana, 2013

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO

PETRA ŠENICA

**PERMEABILNOST FLUORESCENTNO
OZNAČENEGA DEKSTRANA, RODAMINA 123 IN
ENALAPRILATA V RAZLIČNIH DELIH
IZOLIRANEGA ČREVESJA PODGANE *IN VITRO***

**PERMEABILITY OF FLUORESCENTLY LABELLED
DEXTRAN, RHODAMIN 123 AND ENALAPRILATE
IN DIFFERENT REGIONS OF ISOLATED RAT
INTESTINE *IN VITRO***

DIPLOMSKA NALOGA

Ljubljana, 2013

Diplomsko nalogo sem opravljala v farmacevtski družbi Lek pod somentorstvom dr. Luka Peternela. Mentor na Fakulteti za farmacijo je bil doc. dr. Simon Žakelj.

Zahvala

Iskreno se zahvaljujem mentorjema doc. dr. Simonu Žaklju in dr. Luku Peternelu za vso pomoč pri delu, strokovno vodenje in zaupanje pri nastajanju diplomske naloge. Zahvaljujem se tudi Petri Dujmovič in Mariji Petruševski, ki sta mi praktično delo mnogokrat olajšali. Hvala družini, ki mi je stala ob strani skozi celotno šolanje. Hvala prijateljem za nepozabna študijska leta.

Izjava

Izjavljam, da sem nalogo samostojno izdelala pod mentorstvom doc. dr. Simona Žaklja in somentorstvom dr. Luka Peternela.

Ljubljana, februar 2013

Predsednik diplomske komisije: prof. dr. Joško Osredkar

Članica diplomske komisije: doc. dr. Mojca Lunder

VSEBINA

VSEBINA.....	I
POVZETEK	IV
ABSTRACT	VI
SEZNAM OKRAJŠAV	VIII
1 UVOD.....	1
1.1 PREBAVNI TRAKT.....	1
1.1.1 Želodec	1
1.1.2 Tanko črevo	2
1.1.2.1 Duodenum	2
1.1.2.2 Jejunum.....	3
1.1.2.3 Ileum.....	3
1.1.3 Sestava stene tankega črevesja	3
1.1.4 Debelo črevo.....	4
1.1.5 Podganje črevo	5
1.1.6 Primerjava lastnosti človeškega gastrointestinalnega trakta s podganjim.....	6
1.2 BIOLOŠKA UPORABNOST	6
1.3 BCS KLASIFIKACIJA	7
1.4 TRANSPORT SNOVI SKOZI EPITELIJ	8
1.4.1 Paracelularni transport.....	11
1.4.2 Transcelularni transport.....	12
1.4.2.1 Pasivni transport	12
1.4.2.2 Aktivni transport.....	12
1.4.2.2.1 Prenašalci, ki delujejo v absorptivni smeri.....	12
1.4.2.2.2 Prenašalci, ki delujejo v eliminatorni smeri	14

1.5 EKSPERIMENTALNI MODELI PERMEABILNOSTI	17
1.6 PREISKOVANE SUBSTANCE	17
1.6.1 FITC–dekstran	17
1.6.2 Rodamin 123	18
1.6.3 Enalaprilat.....	18
2 NAMEN DELA	20
3 MATERIALI IN METODE	21
3.1 REAGENTI	21
3.2 RAZTOPINE	21
3.2.1 Osnovne raztopine	21
3.2.2 Raztopine za pripravo donorskih in akceptorskih raztopin	22
3.2.3 Raztopine za pripravo elektrod.....	23
3.3 APARATURE	23
3.4 POTEK POSKUSA IN UPORABLJENE METODE	24
3.4.1 PAMPA	24
3.4.2 Dvoprostorne difuzijske celice	26
3.4.2.1 Priprava in vzdrževanje elektrod	27
3.4.2.2 Priprava difuzijskih celic	27
3.4.2.3 Živali.....	28
3.4.2.4 Priprava tkiva.....	28
3.4.2.5 Potek poskusa pri nižani temperaturi.....	29
3.5 ELEKTROFIZIOLOŠKI PARAMETRI IN VITALNOST TKIVA.....	29
3.6 PRIPRAVA VZORCEV, VZORČENJE TER DOLOČANJE P_{app}	30
3.7 STATISTIČNA OBDELAVA PODATKOV	34
4 REZULTATI	37
4.1 Rezultati PAMPA modela	37

4.2 Poskusi elektrofizioloških parametrov	38
4.3 Poskusi s FITC-dekstranom.....	39
4.3.1 Regionalna odvisnost.....	39
4.4 Poskusi z rodaminom 123	42
4.4.1 Regionalna odvisnost.....	42
4.4.2 P_{app} rodamina 123 pri $T = 7\text{ °C}$	44
4.4.3 P_{app} rodamina 123 s sočasno aplikacijo verapamila	45
4.5 Poskusi z enalaprilatom	48
4.5.1 Regionalna odvisnost.....	48
4.5.2 P_{app} enalaprilata pri $T = 7\text{ °C}$	51
5 RAZPRAVA.....	52
5.1 PAMPA	52
5.2 Elektrofiziološki parametri	52
5.3 FITC-dekstran.....	53
5.4 Rodamin 123	54
5.4.1 Regionalna odvisnost.....	54
5.4.2 P_{app} rodamina 123 pri $T = 7\text{ °C}$	55
5.4.3 P_{app} rodamina 123 s sočasno aplikacijo verapamila	56
5.5 Enalaprilat.....	57
5.5.1 Regionalna odvisnost.....	58
5.5.2 P_{app} enalaprilata pri $T = 7\text{ °C}$	58
6 ZAKLJUČEK	60
7 LITERATURA	62

POVZETEK

V človeškem črevesju obstajajo različni pasivni in aktivni mehanizmi absorpcije peroralno apliciranih učinkovin. Pasivna transcelularna difuzija je prevladujoč mehanizem privzema mnogih lipofilnih substanc, aktivni privzem s specifičnimi prenašalnimi proteini pa je pomemben le za spojine, ki so njihovi substrati. Prenášalci s široko substratno specifičnostjo delujejo predvsem v eliminatorni smeri in lahko zmanjšajo biološko uporabnost učinkovin. Pasivna paracelularna difuzija oziroma prehod pa je lahko pot absorpcije za majhne hidrofilne substance. K privzemu določene učinkovine lahko istočasno prispeva več različnih mehanizmov absorpcije (1). Poleg tega je transport učinkovin skozi steno gastrointestinalnega trakta (GIT) odvisen od fizikalnokemijskih lastnosti učinkovin in fizioloških lastnosti intestinalne membrane ter lumna prebavnega trakta.

V diplomski nalogi smo v dveh smereh (absorptivni in eliminatorni) ovrednotili navidezne permeabilnostne koeficiente modelnih učinkovin (FITC-dekstrana, rodamina 123 in enalaprilata) v različnih delih izoliranega črevesja podgane *in vitro* z metodo dvostranskih Sweetana-Grass difuzijskih celic. Dodatno smo testirali tudi od pH odvisno permeabilnost substanc s PAMPA (parallel artificial membrane permeability assay) modelom, s čimer smo ocenili doprinos pasivne transcelularne difuzije k celokupni permeabilnosti modelnih učinkovin.

Zaradi manjše absorptivne površine kolona v primerjavi s tankim črevesjem smo tako v absorptivni kot tudi v eliminacijski smeri določili nižje vrednosti permeabilnostnih koeficientov za vse tri modelne učinkovine. Poleg transcelularne je tudi paracelularna pasivna difuzija v kolonu znatno omejena zaradi večje tesnosti tesnih stikov, kar smo potrdili z značilno višjimi vrednostmi transcelularne električne upornosti (TEER) v kolonu glede na druge dele podganjega črevesja.

Pri FITC-dekstranu, označevalcu integritete tesnih stikov, smo v vseh delih črevesja določili primerljiv proces transporta v obeh smereh, absorptivni ($M \rightarrow S$) in eliminatorni ($S \rightarrow M$), iz česar lahko sklepamo, da absorpcija FITC-dekstrana ni odraz delovanja transportnih prenašalcev. Opazili smo nižje vrednosti permeabilnosti v debelem črevesju v primerjavi s tankim. Zelo nizke vrednosti pasivne transcelularne difuzije in nekoliko višji

rezultati regionalne permeabilnosti na izoliranem podganjem črevesju se ujemajo s predhodno predlaganim mehanizmom absorpcije FITC-dekstrana z endocitozo. Zaključek se ujema tudi iz regionalnega vidika, saj sta jejunum in ileum endocitotsko najbolj aktivna.

Pri rodaminu¹²³ se privzem vzdolž tankega črevesja bistveno ne spreminja, izločanje v lumen pa v distalni smeri vztrajno raste in doseže najvišjo vrednost v ileumu, kar tudi kaže na aktiven mehanizem izločanja rodamina¹²³ v GIT. Kolon ima od vseh delov črevesja najvišjo vrednost efluksnega razmerja. Kljub temu, da je rodamin 123 substrat večih prenašalcev, je njegovo izločanje vezano predvsem na P-gp. Tudi naraščanje vrednosti navideznih permeabilnostnih koeficientov rodamina¹²³ v eliminatorni smeri vzdolž GIT se ujema z naraščujočo ekspresijo omenjenega prenašalca. Z uporabo inhibitorja P-gp verapamila smo v ileumu in kolonu dosegli znatno znižanje permeabilnostnega koeficienta rodamina¹²³ v smeri eliminacije.

Ker enalaprilat spada v BCS razred III, ocenjujemo, da je bila njegova *in vitro* permeabilnost v vseh delih podganjega črevesja nekoliko višja od pričakovanih vrednosti; blizu navideznih permeabilnostnih koeficientov visoko permeabilnih učinkovin. S poskusom pri nižani temperaturi smo dokazali, da so visoke vrednosti izključno prispevek pasivne difuzije. Na osnovi nizkih vrednosti permeabilnostnih koeficientov v PAMPA sistemu pa smo sklepali, da pomemben prispevek k absorpciji enalaprilata najverjetneje predstavlja paracelularna difuzija.

ABSTRACT

In human organism there are different active and passive absorption mechanisms for orally administered drugs. Passive transcellular diffusion plays an important role in the uptake of lipophilic substances, whereas absorption via specific active transporters is important only for their substrates. Transporters with broad substrate specificity may also drive compounds in the eliminatory direction from inside the epithelial cells back into the intestinal lumen, limiting their bioavailability. Small hydrophilic substances can be absorbed also by passive paracellular diffusion. In some cases drugs are transported through several different paths. Besides, transport of drugs across intestinal membrane depends on the interplay between physicochemical properties of the substance and the function of the intestinal membrane in different regions.

We measured the bidirectional apparent permeability coefficients of model substances (FITC-dextran, rhodamin 123 and enalaprilate) in different regions of isolated rat intestine *in vitro* using two-sided Sweetana-Grass diffusion chambers. We also measured the pH-dependent permeability with PAMPA (parallel artificial membrane permeability assay), which revealed the contribution of passive transcellular diffusion.

All three model substances showed lower permeability coefficients in both, absorptive and eliminatory direction in the colon due to its smaller absorption surface area. Passive paracellular diffusion there is also limited by tightness of the epithelium, for colon has significantly higher transepithelial electric resistance (TEER) compared to the regions of the small intestine.

We observed similar transport of FITC-dextran in both directions, $M \rightarrow S$ and $S \rightarrow M$, which tells us that FITC-dextran is not absorbed via transporting proteins. Taken together, both, PAMPA data and results we obtained with excised rat intestine with Sweetana-Grass diffusion chambers, we concluded that FITC-dextran could also be transported via endocytosis. This is also in accordance with the fact that endocytosis is most active in jejunum and ileum.

The uptake of rhodamin 123 did not change along small intestinal regions, whereas the permeability coefficients in the eliminatory direction increase towards distal parts of gastrointestinal tract (GIT) and are highest in the ileum. Colon had the highest efflux ratio

(ER) value compared to other intestinal regions. Despite the fact that rhodamin 123 is a substrate of several transporters, its transport in the eliminatory direction is mostly mediated by P-gp; rhodamin 123 permeability values along GIT correlate well with the expression of P-gp transporter. After P-gp inhibition with verapamil significant decrease of rhodamin123 active efflux in ileum and colon was observed.

Our third tested substance was ACE inhibitor – enalaprilate. Considering the fact enalaprilate is in BCS class III, the results in all regions of the rat intestine exceeded the expected values and were close to permeability of highly permeable drugs. Modified test under lower temperature, which inhibited active transport processes, showed that high permeability values are exclusively the contribution of passive diffusion mechanisms. Furthermore, the relatively low permeability coefficients of enalaprilate we obtained by PAMPA measurements indicated that the paracellular diffusion may be very important for enalaprilate absorption.

SEZNAM OKRAJŠAV

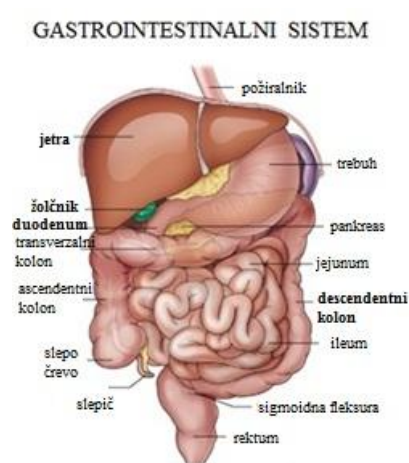
ABC	ang.: ATP-Binding Cassette
API	ang.: Active Pharmaceutical Ingredient
ATP	ang.: adenzin trifosfat
AUC	ang.: Area Under the Curve = površina pod krivuljo
BCRP	ang.: Breast Cancer Resistance Protein = protein odpornosti na rak dojke
BCS	ang.: Biopharmaceutical Classification System = biofarmacevtski klasifikacijski sistem
Caco-2	ang.: Human Colorectal Adenocarcinoma Cells = človeške celice kolorektalnega raka
CYP	ang.: Cytochrome P = citokrom P
dPe	sprememba električnega potenciala
EMA	ang.: European Medicine Agency = evropska agencija za zdravila
ER	ang.: efflux ratio = efluksno razmerje
F	biološka uporabnost
F _a	frakcija absorbirane doze
F _g	frakcija, ki se izogne metabolizmu v črevesni steni
F _h	frakcija, ki se izogne metabolizmu v jetih
FDA	ang.: Food and Drug Administration = Uprava za prehrano in zdravila
FITC-dekstran	fluoresceinizotiocianat-dekstran
GIT	gastrointestinalni trakt
IVIVC	ang.: In Vitro In Vivo Correlation = in vitro in vivo korelacija
MCT	ang.: Monocarboxylic Transporter = Prenašalec monokarboksilnih kislin
MDR	ang.: Multi-Drug Resistance Proteins = proteini za odpornost na več zdravil

MRP	ang.: Multi-Drug Resistance Proteins of group ABC = proteini za odpornost na več zdravil skupine ABC
M → S	prehod spojine iz mukozne na serozno stran tkiva
OAT	ang.: Organic Anion Transporter = organski anionski transporter
OATP	ang.: Organic Anion-Transporting Polypeptide = polipeptid, ki prenaša organske anione
OCT	ang.: Organic Cation Transporter = organski kationski transporter
P	permeabilnostni koeficient
P _{app}	ang.: apparent permeability coefficient = navidezni permeabilnostni koeficient
P _{eff}	ang.: effective permeability coefficient = efektivni permeabilnostni koeficient
P-gp	P-glikoprotein
PAMPA	ang.: Parallel Artificial Membrane Permeability Assay
SEM	ang.: Standard Error of Mean = standardna napaka aritmetične sredine
SLC	ang.: Solute Carrier = prenašalec topljencev
S → M	ang.: prehod spojine iz serozne na mukozno stran tkiva
TEER	ang.: Transepithelial Electric Resistance = transepitelijska električna upornost
UPLC	ang.: Ultra Performance Liquid Chromatography = zelo visoko zmogljiva tekočinska kromatografija
WHO	ang.: World Health Organisation = Svetovna zdravstvena organizacija

1 UVOD

1.1 PREBAVNI TRAKT

Peroralne farmacevtske oblike po zaužitju potujejo v prebavni trakt. Sledi sproščanje učinkovine iz farmacevtske oblike in raztapljanje, vendar ne nujno v tem vrstnem redu (1). Raztopljena učinkovina se absorbira skozi sluznico prebavil v krvni obtok. Hitrost raztapljanja in permeabilnost učinkovin, ki sta osnova biofarmacevtskega klasifikacijskega sistema (BCS), se zaradi spreminjanja pogojev vzdolž delov prebavnega trakta razlikujeta (2). V nadaljevanju bomo predstavili anatomske in fiziološke lastnosti posameznih delov prebavnega trakta in opisali pot učinkovin skozi prebavni trakt.



Zgornji del prebavnega trakta zajemajo usta, žrelo, požiralnik in želodec. Hrano zaužijemo skozi usta, jo prežvečimo, nato potuje skozi žrelo in požiralnik do želodca. Spodnji del prebavnega trakta sestavljajo tanko in debelo črevo ter zadnjik (3).

Slika 1: Shema gastrointestinalnega trakta. Povzeto po referenci (3).

1.1.1 Želodec

Mejo želodca definirata ezofagealni sfinkter in pilorus. Osnovni deli želodca so: antrum, corpus in fundus (3). Iz vidika absorpcije zdravilnih učinkovin je pomen želodca zaradi majhne epitelijske površine zanemarljiv, pomemben je lahko le za absorpcijo neioniziranih lipofilnih molekul zmerne velikost. Npr. kar 50 % visokopermeabilnega antipirina se absorbira v želodcu (4; 5). Zelo pomembno vlogo pa ima želodec pri raztapljanju, kadar je to odvisno predvsem od pH. Na tešče je pH močno kisel (od 1 do 3), po obroku se dvigne na 5-6; odvisno od vrste in količine hrane (2). Topnost učinkovin je odvisna tudi od časa zadrževanja v želodcu, ki je definirano s hitrostjo želodčnega praznjenja (odvisno od kontrakcij miškulature polnega in praznega želodca) ter od želodčne vsebine. Slednja vsebuje vodo, klorovodikovo kislino, soli, pepsine in mukus, ki obvaruje želodčno sluznico

pred škodljivimi vplivi sestavin želodčnega soka. Poleg vpliva na topnost, lahko kislo okolje bistveno zmanjša stabilnost acidolabilnih učinkovin (2).

1.1.2 Tanko črevo

Tanko črevo je specializiran del prebavnega trakta za absorpcijo snovi iz lumna. Epitelijske celice, ki gradijo viluse so še dodatno prekrute s številnimi mikrovilusi. Omenjena zgradba in struktura poveča absorptivno površino tankega črevesja za 600-krat (2; 6). Zahvaljujoč značilni zgradbi, se 90 % vse absorpcije iz gastrointestinalnega trakta zgodi prav v njem (2; 6). V tankem črevesju poteka prebava in privzem hranil (ogljikovih hidratov, beljakovin, maščob, elektrolitov) ter absorpcija zdravilnih učinkovin (6). Razdeljeno je na 3 odseke:

- Duodenum ali dvanajstnik
- Jejunum ali tešče črevo
- Ileum ali vito črevo

1.1.2.1 Duodenum

Dvanajstnik je dobil ime po svoji dolžini, ki zajema pri človeku 12 palcev, kar znaša okoli 24 cm. Prehod snovi skozi duodenum je glede na druge dele črevesja hiter. Pomembna vloga je nevtralizacija kisle želodčne vsebine na območje pH med 5 in 7 (2). Iz vidika absorpcije učinkovin iz FO je duodenum zaradi majhne površine in hitrega prehoda manj pomemben (7).

V duodenum se skupaj izločata žolč in pankreatični sok. Žolčne soli solubilizirajo slabo topne učinkovine, s čimer lahko povečajo količino raztopljenih učinkovin, ki je na voljo za absorpcijo. V določenih primerih pa lahko celo poslabšajo absorpcijo s tvorbo netopnih kompleksov (8). Skupaj z žolčem se v duodenum izločajo tudi metaboliti iz jeter, ki se lahko izločajo iz organizma s fecesom, ali pa se spet absorbirajo iz prebavnega trakta in vstopijo v enterohepatično cirkulacijo. Pankreatični sok se izloča kontinuirano, neodvisno od hrane. Vsebuje hidrogenkarbonatne ione, ki nevtralizirajo kislo želodčno kašo, in encime, ki so potrebni za prebavo vseh treh komponent hrane: maščob, polisaharidov in proteinov (2).

1.1.2.2 Jejunum

Jejunum je srednji in najdaljši od treh odsekov tankega črevesja. Leži med dvanajstnikom in vitim črevesom. Mešanje in prehajanje vsebine naprej poteka s pomočjo različnih vrst kontrakcij. Gibanje praznega želodca se začne v želodcu, nadaljuje vzdolž GIT, prisoten je tudi v tankem črevesu. Primarna funkcija jejunuma je absorpcija snovi, kar neposredno vpliva na biološko uporabnost zaužite učinkovine, zato je poznavanje procesov v tem delu črevesja ključno pri načrtovanju zdravil. Za uspešno absorpcijo je potrebna zelo velika površina, zato je notranja površina povečana z gubami, vilusi in mikrovilusi. Absorpcijo pospešuje še mreža krvnih kapilar pod bazalno membrano ter odprte limfne kapilare, ki se slepo končujejo v sredini resic. Pretok krvi skozi jejunum znaša v fazi absorpcije do 1500 ml/min, kar je skoraj 10-krat več kot v želodcu (2; 3).

1.1.2.3 Ileum

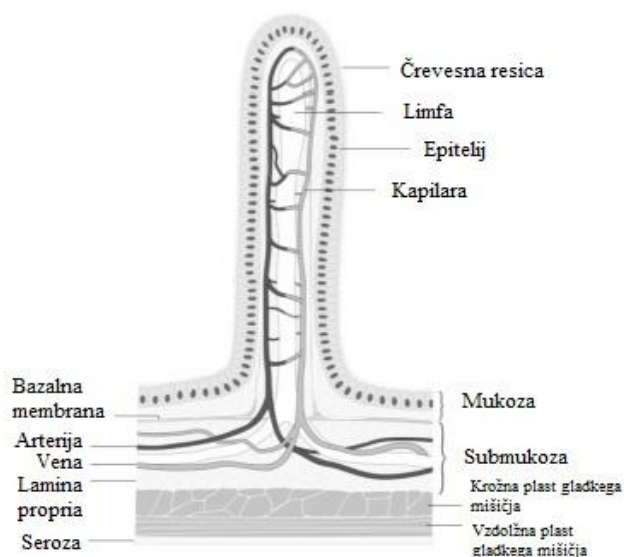
Vito črevo ali ileum je končni odsek tankega črevesa; od slepega črevesa ga ločuje ileocekalna guba. Od jejunuma se anatomsko ne loči, obstajajo pa številne razlike med njima, kar je razvidno iz Preglednice I. Okolje v ileumu je rahlo alkalno, njegova površina pa sorazmerno velika. Tudi tu stene tvorijo viluse, ki so nadalje razvejani v mikroviluse, vendar v manjši meri kot pri jejunumu. V steni ileuma najdemo Peyerjeve plošče, združene limfatične folikle, in druge celice imunskega sistema (2; 3).

1.1.3 Sestava stene tankega črevesja

Prebavna cev je zgrajena iz:

- Sluznice (mucosa)
- Podsluznice (submucosa)
- Mišične plasti (muscularis mucosa)
- Zunajne plasti (serosa)

Sluznica je sestavljena iz epiteljske plasti, rahlega veziva s krvnimi in limfnimi žilami in limfatičnega tkiva ter mišične plasti iz gladkih celic. Enterociti so površinske absorpcijske celice, pokrite s ščetkastim obrobkom. To so mikroresice, ki se nahajajo na apikalni membrani in povečujejo površino za absorpcijo za 20-krat. Površino dodatno še 10-krat povečajo črevesne resice. V vsako resico sega krvna in limfna žilica. Nazadnje, dodatno 3-krat površino povečajo tudi krožne gube, ki jih tvori sluznica in podsluznica. S tem olajšajo



vsrkavanje hranilnih snovi, saj se hranilna vsebina v črevesju razlije po zelo veliki površini (2; 3).

Slika 1: Morfološka sestava črevesne stene. Prirejeno po referenci (3).

1.1.4 Debelo črevo

Deli debelega črevesa so: slepo črevo (cekum), slepič (appendix), kolon, ki ga delimo na ascendentni, transverzalni, descendentni in sigmoidni del, ter zadnji del debelega črevesa, rektum, in analni kanal. V debelem črevesju se vsebina dobro premeša. S pasivnim procesom osmoze (paracelularno) in s transcelularnim privzemom prek apikalnih prenašalcev akvaporinov, se absorbira vsa preostala voda; na dan se z blatom izloči le 100 ml vode (2). Tako kot vzdolž tankega črevesja, se tudi v kolonu pH zvišuje v distalni smeri. Poleg tega je v steni veliko limfatičnega tkiva, luminalna vsebina debelega črevesja pa je bogata z bakterijsko mikrofloro. Bakterije s procesi hidrolize, deaminacije, hidroksilacije, dekarboksilacije in redukcije azidnih skupin metabolizirajo ksenobiotike (9). Omejitev pri absorpciji zdravil v kolonu je slaba permeabilnost, feces je tako viskozen, da učinkovina ne more difundirati do sluznice. Za absorpcijo oralno apliciranih zdravil sta primerna le ascendentni in transverzalni del kolona, in še to ob upoštevanju bistveno manjše absorptivne površine zaradi odsotnosti vilusne in mikrovilusne strukture (Preglednica I) (2; 3). Ker pa številne študije na podganah kljub drastičnemu zmanjšanju absorptivne površine v kolonu, beležijo nesorazmerno manjše znižanje permeabilnosti v tem delu črevesja kot bi sklepali (pri antipirinu in atenololu le za 1,4-krat), neznatne spremembe, oziroma se permeabilnost učinkovin v distalni smeri celo viša (naproksen, griseofulvin), absorptivna površina ni glavni oziroma edini faktor, ki povzroča regionalne razlike v permeabilnosti učinkovin (4). Posebej to velja za dobro permeabilne substance, ki imajo v nekaterih primerih višjo permeabilnost v kolonu. Razlogi za to še niso popolnoma

pojasnjeni. Eden od možnih je tudi vpliv mukusa, saj je njegova debelina pri tešči podgani večja v zgornjih plasteh v primerjavi s spodnjimi plastmi in kolonom, in omejuje permeabilnost dobro permeabilnih učinkovin v zgornjih plasteh (4).

Poleg manjše efektivne površine dodaten omejitveni dejavnik za transcelularno permeabilnost predstavlja tudi povečana čvrstost epitelija v primerjavi s tankim črevesjem (5). Zaradi vseh omenjenih lastnosti kolon ne velja za glavno mesto absorpcije, je pa lahko pomemben za absorpcijo farmacevtskih oblik s podaljšanim sproščanjem (4).

Preglednica I: Lastnosti tankega in debelega črevesja pri človeku in razmerje absorptivnih površin pri podgani¹.

	Duodenum	Jejunum	Ileum	Kolon
	Tanko črevo			
	Človek			
pH	5 - 7	6,2 - 6,6	7,5	5,5 - 6,5 - 7
Čas prehajanja	nekaj min	3 - 4 h		12 - 36 h
Dolžina	cca 6,80 m			1,1-1,6 m
	24 cm	4 - 5 m	1,5 - 2 m	
Površina	cca 200 m ²			0,35 m ²
	Podgana			
Razmerje površin	/	1	0,453	0,221
Radij por tesnih stikov [Å]	/	6,19	5,31	6,23

1.1.5 Podganje črevo

Anatomija in fiziologija prebavne cevi se med živalskimi vrstami in človekom razlikujeta. Tanko črevo podgane je dolgo 125 cm in predstavlja 83 % celotne dolžine črevesnega trakta, ostalo je kolon. Jejunum obsega 90 % tankega črevesja, kar je precej večji delež kot pri človeku, kjer jejunum predstavlja le 31 % tankega črevesja. Druga velika razlika je delež cekuma, kjer se vrši bakterijska razgradnja. Ta predstavlja pri podgani 26 % debelega črevesja, pri človeku pa le 5 %. Poleg tega podgane nimajo sigmoidnega kolona. Lumen podganjega črevesja je prekrit z resicami in mikroresicami in za razliko od človeškega tankega črevesja nima črevesnih gub sluznice. To je tudi vzrok za kar 200-krat manjšo absorpcijsko površino v primerjavi s človekom, čeprav je dolžina črevesja pri podgani le 5-krat manjša (10).

¹ Vrednosti med viri se zaradi različnih metod merjenja in razlik med posamezniki lahko nekoliko razlikujejo.

Kljub nekaterim razlikam, so podgane najpogosteje uporabljena eksperimentalna žival za študij absorpcije učinkovin in dobro napovejo permeabilnost pri človeku (11; 12; 13).

1.1.6 Primerjava lastnosti človeškega gastrointestinalnega trakta s podganjim

Pri primerjavi permeabilnosti med človeškim jejunumom *in vivo* in jejunomom podgane *in vitro*, so bile narejene korelacije med P_{app} podgane ter P_{eff} in frakcijo absorbirane doze (F_a) pri človeku. Model izoliranega podganjega jejunuma je kljub nekaterim razlikam izkazal visoko napovedno moč za napoved obsega absorpcije pri človeku (11).

Pri primerjavi ekspresije genov pri podgani, ki kodirajo pomembnejše prenašalce učinkovin (prenašalci superdružin ABC in SLC) z nivojem ekspresije človeških genov, je bilo 65 % prenašalcev (17 od 26) podobno izraženih v jejunumu podgane in človeka. Pri genih, ki niso izkazovali enake izraženosti (MDR1 in MRP1-3), se je ekspresija razlikovala za en velikostni razred (11). Pri drugi študiji primerjave permeabilnosti različnih učinkovin prek črevesne stene duodenuma in kolona pri podgani in človeku prek mehanizma pasivne difuzije in aktivnega transporta, je bila korelacija $r^2 = 0,80$. Korelacija med ekspresijo prenašalcev je bila zmerna ($r^2 = 0,56$). Pri primerjavi ekspresije metabolnih encimov (CYP1A1, CYP3A4/3A9, UDPG) v enterocitih obeh vrst, pa so ugotovili zanemarljivo korelacijo. Zaključimo lahko, da je z modelom črevesja podgane (P_{app}) mogoče z zadovoljivo točnostjo predvideti mehanizem transporta in s tem frakcijo absorbirane doze (F_a) pri človeku, ne pa tudi metabolizma učinkovin (F_g in F_h) niti celokupne biološke uporabnosti pri človeku (F) (1; 11).

1.2 BIOLOŠKA UPORABNOST

Izmed številnih različnih poti administracije učinkovin velja peroralni način aplikacije za najbolj enostavnega in pogosto uporabljenega. Več kot 60 % vseh zdravil na trgu je v obliki peroralnih formulacij (4).

Biološka uporabnost (BU, F) peroralno apliciranih učinkovin je odvisna od treh dejavnikov: frakcije absorbirane doze (F_a); frakcije učinkovine, ki se izogne metabolizmu v steni črevesja (F_g) in frakcije učinkovine, ki se izogne hepatičnemu metabolizmu (F_h). Izračun je prikazan v Enačbi 1. Iz tega sledi, da je biološka uporabnost peroralno apliciranih učinkovin večinoma funkcija efektivne permeabilnosti (P_{eff}) skozi črevesno

sluznico, topnostnih karakteristik v gastrointestinalnem okolju in metabolične stabilnosti (14; 15; 16).

$$F = F_a \times F_g \times F_h \quad [\%] \quad \text{Enačba 1:}$$

EMA biološko uporabnost po dodatku 'Note for guidance on the investigation of bioavailability and bioequivalence' definira kot hitrost in obseg, s katero aktivna učinkovina prispe iz farmacevtske oblike v sistemski krvni obtok. S to dopolnjeno definicijo razlikuje med absorpcijo, ki se nanaša na prehod substance skozi črevesno sluznico gastrointestinalnega trakta (F_a), in sistemsko razpoložljivostjo (F), ki pomeni količino substance, ki vstopi v sistemski obtok in upošteva tudi očistek in metabolizem (16).

Slaba biološka uporabnost je tako lahko posledica nizke permeabilnosti učinkovine prek črevesne sluznice ali pa obsežnega metabolizma prve stopnje v enterocitih in hepatocitih. Poleg tega lahko tako v črevesju kot v jetrih k slabi BU prispeva tudi aktivni transport s prenašalci v eliminatorni smeri, med katerimi je najbolj znan P-gp prenašalec.

Na hitrost in obseg absorpcije učinkovin iz GIT vpliva več različnih faktorjev. Tri glavne kategorije so (11):

- fiziološki pogoji na mestu absorpcije,
- fizikalnokemijske lastnosti učinkovine in
- biofarmacevtske lastnosti končnega produkta.

1.3 BCS KLASIFIKACIJA

Biofarmacevtski sistem klasifikacije (BCS) je pomembno prognostično orodje, ki postavlja standarde bioekvivalence za odobritev aktivne učinkovine. Oblikovano je bilo z namenom razširitve pogojev za opustitev bioekvivalenčnih študij *in vivo*; smernice BCS podajajo EMA, WHO in FDA (14; 15). Dolga pot aktivnih učinkovin na tržišče je v veliko primerih odvisna od skladnosti z bioekvivalenčnimi zahtevami; biofarmacevtskimi lastnostmi in kvaliteto (16). S pomočjo podatkov o topnosti in permeabilnosti, ki služijo kot osnovne spremenljivke, s katerimi opišemo masni tok skozi membrano (Enačba 2), aktivno učinkovino uvrstimo v enega od štirih biofarmacevtskih razredov (Preglednica II). Uveljavitev BCS smernic pomeni pomemben korak naprej v določitvi biofarmacevtskih

lastnosti učinkovin, saj z njihovo pomočjo postavimo standarde za raztapljanje učinkovin z namenom ugotavljanja potenciala za IVIV korelacijo ter zmanjšanja obsega testiranj *in vivo* (16). V Preglednici II smo prikazali biofarmacevtski klasifikacijski sistem. Za visokopermeabilne po standardih EMA-e sodijo učinkovine s frakcijo absorbirane doze (F_a) 85 % in več (17). Spodnje meje navideznih permeabilnostnih koeficientov (P_{app}) se razlikujejo, v Lekovem laboratoriju znaša 11×10^{-6} cm/s (11).

Enačba 2: Fick-ov prvi zakon (16):

$$J_w = P_w \times C_w = \frac{dm}{dt} \times \frac{1}{A} \quad \text{Enačba 2}$$

J_w masni transport prek stene črevesja

P_w efektivna permeabilnost

C_w koncentracija učinkovine ob membrani

dm sprememba mase

A stična površina

Preglednica II: BCS klasifikacija (16):

BCS Razred	Topnost	Permeabilnost
I	Visoka	Visoka
II	Nizka	Visoka
III	Visoka	Nizka
IV	Nizka	Nizka

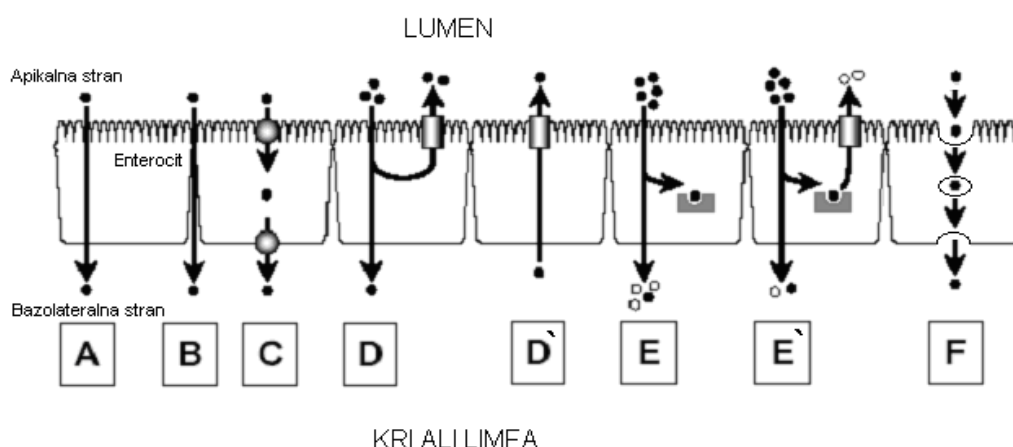
1.4 TRANSPORT SNOVI SKOZI EPITELIJ

Transport učinkovin skozi steno GIT je odvisen od fizikalnokemijskih lastnosti učinkovin in fizioloških faktorjev intestinalne membrane ter lumna prebavnega trakta (2).

Preglednica III: Dejavniki, ki vplivajo na permeabilnost/absorpcijo učinkovin prek črevesne membrane (5).

Fizikalnokemijske lastnosti učinkovine	Fiziološki faktorji intestinalne membrane
Porazdelitveni koeficient (logD)	Celokupna lipidna površina
Konstanta ionizacije (pKa)	Upornost tesnih stikov
Molska masa (M)	Celokupna površina tesnih stikov
Sposobnost tvorbe vodikovih vezi	Količina prenašalcev
Odstotek polarne površine (PSA)	Kapaciteta prenašalcev
Fleksibilnost molekule	Vodni fluks
Molekularni volumen	gradient Na^+ in/ali H^+
	Metabolni encimi
	Nemešajoče vodne plasti
	Kapilarni tok
	Lipidna sestava (razmerje holesterol/fosfolipidi)

S poznavanjem obeh skupin spremenljivk in procesov prehajanja skozi črevesno membrano lahko predvidevamo spreminjanje permeabilnosti učinkovin glede na različne regije GIT in primernost izbire določene učinkovine za vgrajevanje v formulacije s podaljšanim sproščanjem. Poznavanje je bistveno za napoved regionalne absorpcije pri človeku (5). Slika 3 prikazuje različne mehanizme transporta učinkovin skozi epitelij tankega črevesja ter procese, ki lahko vplivajo na prehod učinkovine.



Slika 3: Poti učinkovin skozi epitelij tankega črevesja. Prirejeno po referenci (18).

- A] Pasivna difuzija učinkovine po transcelularni poti skozi celični membrani in lumen celice;
- B] Pasivna difuzija učinkovine po paracelularni poti skozi tesne stike;
- C] Transcelularni transport z absorpcijskimi prenašalnimi proteini;
- D] Transcelularna difuzija, zmanjšana zaradi sekrecije prek apikalnih sekretornih prenašalcev;
- D'] S sekrecijo prek apikalnih sekretornih prenašalcev se lahko izloča v lumen tudi učinkovina, ki je že bila v krvi (proces eliminacije);
- E] Znotrajcelični encimi v enterocitih lahko pretvorijo učinkovino še pred vstopom v kri ali limfo;
- E'] Metaboliti učinkovine, ki nastanejo v enterocitih, so lahko substrati za apikalne sekretorne prenašalce;
- F] Transcelularna endocitoza.

Učinkovitost mnogih učinkovin je močno odvisna od sposobnosti prehajanja bioloških membran na poti do tarčnega mesta. Prva pomembna ovira je intestinalni epitelij, saj predstavlja glavno absorpcijsko mesto za vnešena hranila, terapevtske učinkovine in toksine (19).

Ozkospecifični apikalni prenašalci, ki delujejo v absorptivni smeri, so lahko razlog za dobro biološko uporabnost učinkovin, ki so njihovi substrati in na pasiven način slabo prehajajo biološke membrane. Lipofilne učinkovine lahko prehajajo biološke bariere tudi samo z difuzijo, v smeri od višje proti nižji koncentraciji brez specializiranih transportnih sistemov (18; 20). Kritični za biološko uporabnost mnogih peroralno apliciranih učinkovin, ki na pasiven način težko ali srednje dobro prehajajo biološko membrano, so predvsem širokospecifični apikalni prenašalci, ki delujejo v eliminatorni smeri (18).

Hidrofilne in nabite molekule pogosto prehajajo apikalno membrano s pomočjo olajšane difuzije ali aktivnega transporta s specifičnim transportnim mehanizmom za celularni privzem (18). Prek apikalne membrane, ki zaradi manjšega kapilarnega pretoka velja za večjo omejitev intestinalne absorpcije kot bazolateralna membrana, prehajajo skozi citosol in izhajajo prek bazolateralne membrane v kri, vse do tarčnega mesta (21). Učinkovine v citosolu so nato lahko substrati za efluksne prenašalce (12), ki le-te transportirajo preko apikalne membrane nazaj v črevesni lumen, ali pa se s prenašalci na bazolateralni strani prenašajo preko bazolateralne membrane v kri. Te iste učinkovine so lahko sočasno

substrati citokrom P450 encimskih sistemov in so tako podvržene intracelularnemu metabolizmu v enterocitih. Nastali metaboliti se lahko skupaj z aplicirano učinkovino absorbirajo v plazmo ali pa so tudi sami substrati sekretornih prenašalcev, ki jih izločijo nazaj v lumen. Delež aplicirane učinkovine, ki preide to prvo intestinalno bariero, nato s krvjo preko portalnega sistema preide v jetra, kjer poteka metabolizem in sekrecija s podobnimi encimi in ABC prenašalci kot v črevesju, vendar z drugačno ravniyo ekspresije, saj niso koordinirano regulirani (18).

Celotna biološka uporabnost učinkovin je tako vezana na sposobnost pasivnega prehoda, aktivnosti apikalnih in bazolateralnih sistemov, ki omogočajo privzem in/ali eliminacijo učinkovin iz organizma, ter intracelularnega metabolizma, tako v jetrih kot v črevesju (18).

1.4.1 Paracelularni transport

Paracelularna pot absorpcije poteka pasivno med epitelijskimi celicami preko negativno nabitih tesnih stikov (7). Odvisna je tako od velikosti kot od naboja molekul. Služi za transport ioniziranih nizko molekularnih substanc, ki se zaradi hidrofилnosti in slabšega porazdeljevanja v lipidno fazo membrane po transcelularni poti slabo absorbirajo. Intercelularni tesni stiki omejujejo prosto gibanje med celicami ter preprečujejo vračanje že absorbiranih hranil iz bazalne strani nazaj v črevesni lumen. Prispevek paracelularne poti privzema k celokupni absorpciji je ponavadi majhen (6), večji pomen ima pri hidrofilih substancah z molsko maso do 400 g/mol (5). Nekatere študije omenjajo kot substrate paracelularnega transporta kationske molekule (7). Za študije paracelularnega transporta uporabljamo paracelularne označevalce: manitol, lucifer rumeno, ranitidin, sečnino, fluorescein in FITC-dekstran (4; 7).

Tesni stiki predstavljajo od 0,01 do 0,1 % celokupne površine tankega črevesja (7). Vrednosti radija por v različnih delih tankega in debelega črevesja so dokaj podobne, prikazane so v Preglednici I (4). Bistveno pa se različni deli tankega in debelega črevesja razlikujejo v številu tesnih stikov na enoto dolžine. Z manjšo nagubanostjo in absorptivno površino se manjša tudi absorptivna površina paracelularne poti absorpcije v kolonu (6; 4).

1.4.2 Transcelularni transport

1.4.2.1 Pasivni transport

Absorpcija učinkovin s pasivno difuzijo je odvisna od porazdeljevanja v lipidno fazo epiteljske celične membrane, koncentracijskega gradienta in površine (7). Za dobro pasivno permeabilne substance so se v vseh delih GIT izkazale neionizirane učinkovine z nizko molsko maso in vrednostjo $\log D$ med 0,0 in 2,5. Permeabilnost slednjih se je višala v distalni smeri in je dosegla najvišjo vrednost v kolonu, medtem ko nasprotno velja za pasivno nizko permeabilne učinkovine. Te dosežejo najvišjo permeabilnost v proksimalnih delih GIT, kjer je anatomsko površina večja, s tem pa je tudi vilov, največ (5). Sicer so si mnenja v literaturi deljena. Nekateri viri navajajo, da se dobro pasivno permeabilne učinkovine večinoma absorbirajo v proksimalnih delih črevesja, kar bi lahko razložili tudi z njihovo zelo hitro absorpcijo (4). Na razlike v intestinalni pasivni permeabilnosti slabo permeabilnih učinkovin v različnih delih GIT ima pomemben vpliv tudi luminalni pH (4).

1.4.2.2 Aktivni transport

Aktivni transport učinkovin poteka skozi biološke membrane iz območja z nižjo koncentracijo v območje z višjo koncentracijo. Za to so odgovorne številne skupine prenašalcev. Prenašajo visokomolekularne hidrofilne substance, ki se le v majhni meri absorbirajo pasivno (različne vodotopne vitamine, monokarboksilne kisline, fosfate, karbonate, maščobne kisline, sladkorje). Pomembni sta predvsem SLC (*solute carrier family of proteins*) in ABC (*ATP-binding cassette proteins*) superdružini (11).

Med aktivne procese sodi tudi transcelularna endocitoza; poteka prek tvorbe veziklov, prevlečenih s klaretinom in kaveolinom (22). Pomembno prispeva k privzemu mnogih endogenih in eksogenih makromolekularnih substanc v centralno-živčnem sistemu, ledvicah in črevesju. Odvisna je od aktinskega citoskeleta in fosfolipidnega dvosloja. V črevesju poteka tako iz apikalne kot iz bazolateralne smeri, največji pomen naj bi imela v jejunumu in kolonu (23).

1.4.2.2.1 Prenašalci, ki delujejo v absorptivni smeri

Permeabilnost aktivno absorbiranih substanc se praviloma večja z večjo ekspresijo prenašalca, katerega substrat je učinkovina. Kot posledica zmanjšane absorptivne površine se število prenašalnih proteinov navadno zmanjšuje vzdolž GIT, vendar ne nujno. P_{app}

vrednosti učinkovin, ki so vezane na transport s prenašalci, so ponavadi primerljive P_{app} visoko pasivno permeabilnih substanc (7).

SLC družina prenašalcev za topljence (*solute carrier family of proteins*) je največja superdružina prenašalcev za privzem, ki kodira kar 225 različnih prenašalcev. To so prenašalci, ki omogočajo transport, sklopljen z ioni, lahko pa delujejo kot izmenjevalci ali prenašalci in omogočajo olajšano difuzijo. V Preglednici IV smo razvrstili pomembnejše prenašalce gastrointestinalnega trakta, ki delujejo v absorptivni smeri iz vidika organizma.

Preglednica IV: Pomembnejši prenašalci gastrointestinalnega trakta družine SLC, ki delujejo v absorptivni smeri, njihovo nahajališče na membrani in substratna specifičnost².

ČLOVEK		PODGANA		EKSPRESIJA	SUBSTRATI	INHIBITORJI
Ime prenašalca	Mesto prenašalca na črevesni membrani	Ime prenašalca	Mesto prenašalca na črevesni membrani			
OATP (organic anion transporter, 9 različnih oblik)	apikalno	Oatp (11 različnih oblik)	apikalno	pada vzdolž GIT	žolčne soli, bilirubin, glukuronidi bilirubina, digoksin, metotreksat, statini, imatinib	monokarboksilne (pravastatin, benzojska kislina, nikotinska kislina), dikarboksilne kisline (ftalna kislina), DIDS
PEPT1 (oligo-peptide transporter)	apikalno	PepT1	apikalno	pada vzdolž GIT (ekspresija v duodenumu podgane je 24-krat večja od ekspresije v kolonu, kjer je ekspresija zanemarljiva)	dipeptidi in tripeptidi (β -laktamski antibiotiki, inhibitorji renina, ACE inhibitorji, protitumorne in antivirusne učinkovine, inhibitorji trombina, antagonisti dopaminskega receptorja)	
MCT1 (monocarboxylic transporter)	apikalno	Mct1	apikalno	narašča vzdolž GIT	nesteroidni antirevmatiki, salicilna, nikotinska in benzojska kislina, piruvat, L-laktat, β -acetoacetat	CHC (ciano-4-hidroksicinamat), floretin in pCMB (parakloro-merkuribenzoat)
OCT1-3 ³ (organic cation transporter)	bazolateralno	Oct1	bazolateralno		šibke heterociklične baze (dopamin, noradrenalin, holin)	prazosin (OCT1 in 2), prokainamid (OCT2), kortikosteron (OCT3)

² Prenašalci so izraženi tudi v drugih organih; na tem mestu omenjamo le intestinalne prenašalce.

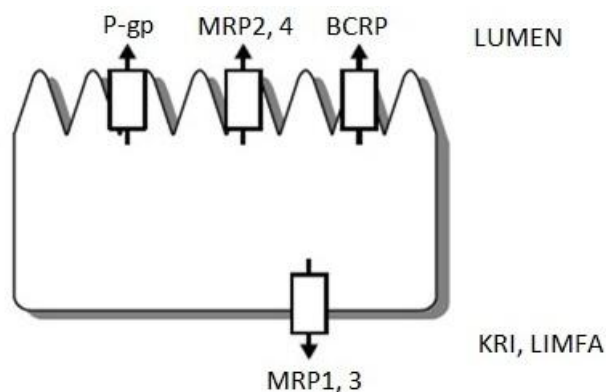
³ Prenašalci OCT1-3 so večinoma prisotni v jetrih.

1.4.2.2.2 Prenašalci, ki delujejo v eliminatorni smeri

Poleg ozkospecifičnih prenašalnih proteinov, ki delujejo v absorptivni smeri in pomembno povečujejo biološko uporabnost večjih polarnih molekul, poznamo tudi širokospecifične prenašalce, ki delujejo v eliminatorni smeri iz vidika enterocita. Ti apikalni izločevalni celični transportni mehanizmi že absorbirane substrate črpajo nazaj v intestinalni lumen in s tem bistveno zmanjšajo neto absorpcijo, bazolateralno locirani pa v kri (7). Sposobnost akumulacije učinkovine in ostalih snovi znotraj tkiva je pogosto bolj omejena zaradi tendence po aktivni sekreciji preko ABC (*ATP-binding cassette proteins*) – prenašalnih proteinov, kot po zmanjšani sposobnosti privzema v celico (18).

ABC proteini niso omejeni na višje razvite organizme, saj so bili najprej okarakterizirani v bakterijah (18). Fiziološko so prisotni v številnih tkivih, večja ekspresija je predvsem v organih z eliminacijsko funkcijo; v jetrih, tankem črevesju in ledvicah. V tkivih teh organov omejujejo absorpcijo in pospešujejo eliminacijo ksenobiotikov in potencialno toksičnih snovi za organizem. Povečana ekspresija prenašalcev, ki delujejo v eliminatorni smeri je posebno problematična v tumorskih celicah. Prenašalci P-gp, družina MRP prenašalcev ter drugi, klinično pomembno zmanjšujejo privzem protitumornih učinkovin in posledično pozročajo rezistenco na citostatično terapijo. Za ABC prenašalce, še posebej to velja za P-gp in MRP2, je značilen genski polimorfizem; obstajajo interindividualne razlike v farmakokinetiki in ekspresiji v tankem črevesu in jetrih. Prenašalni proteini, ki delujejo v eliminatorni smeri so, kot že omenjeno, velikokrat sklopljeni z metabolnimi encimi 1. in 2. faze; procesa delujeta sinergistično na eliminacijske procese (18). Glede na funkcijo, ki jo opravljajo, jih delimo na membranske prenašalce, receptorje in ionske kanale (18; 20). V Preglednici V smo razvrstili pomembnejše prenašalce gastrointestinalnega trakta, ki delujejo v eliminatorni smeri iz vidika enterocitov.

Apikalno locirani P-gp, MRP2, MRP4 ter BCRP delujejo v eliminatorni smeri glede na celoten organizem in iz vidika celice. Prenašalca MRP1 in MRP3 pa iz vidika epiteljske celice sodita med prenašalce za izločanje, saj zmanjšujeta celično akumulacijo učinkovin in drugih substratov. Glede na celoten organizem pa delujeta v absorptivni smeri (18; 20). Lokalizacija omenjenih apikalnih in bazolateralnih membranskih prenašalcev družine ABC v enterocitih je prikazana na Sliki 4.



Slika 4: Lokalizacija membranskih prenašalcev v enterocitih. Povzeto po referenci (18).

Preglednica V: Pomembnejši prenašalci gastrointestinalnega trakta družine ABC, ki delujejo v eliminatorni smeri iz vidika enterocita, njihovo nahajališče na membrani in substratna specifičnost⁴.

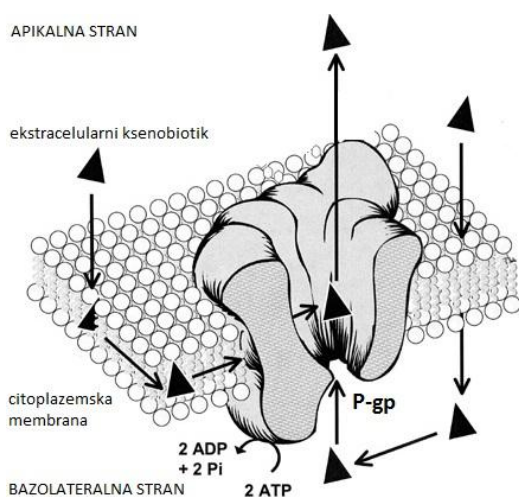
ČLOVEK		PODGANA		EKSPRESIJA	SUBSTRATI	INHIBITORJI
Ime prenašalca	Mesto prenašalca na črevesni membrani	Ime prenašalca	Mesto prenašalca na črevesni membrani			
MDR1 (multi-drug resistance protein, P-gp)	apikalno	Mdr1a/b	apikalno	narašča vzdolž GIT	protitumorne učinkovine, HIV proteazni inhibitorji, β -blokerji, diagnostična barvila (rodamin 123) kardiotonični glikozidi imunosupresivi, antibiotiki idr.	verapamil, nikardipin, ciklosporin A, elacridar, pantoprazol, PSC833
BCRP (breast cancer resistance protein)	apikalno	Bcrp	apikalno	največja v jejunumu	antraciklini, mitoksanton, topotekan, aktivni metaboliti irinotekana, azitromicin, lamivudin in poliglutaminska oblika metotreksata	GF120918, prazosin, funitremorgin C
MRP1 (multi-drug resistance associated protein)	bazolateralno	Mrp1	bazolateralno	bolj ali manj konstantna vzdolž GIT, a vedno nižja od ekspresije P-gp in BCRP	metotreksat, glukuronid estradiola, GSH, doksorubicin, vinkristin	ciklosporin A, probenacid, indometacin
MRP2	apikalno	Mrp2	apikalno	upada v distalni smeri	metotreksat, vinblastin, vinkristin	furosemid, indometacin, benzbromaron

⁴ Nekateri prenašalci so izraženi tudi v drugih organih; na tem mestu omenjamo le intestinalne prenašalce.

MRP3	bazolateralno	Mrp3	bazolateralno		metotreksat, vinkristin	
MRP4	apikalno	Mrp4	apikalno		glukuronid estradiola, GSH, ciklični nukleotidi, holati	dipiridamol, probenacid
MRP5	bazolateralno	Mrp5	bazolateralno		GSH, ciklični nukleotidi, težke kovine, 6-merkaptopurin	probenacid, sulfipirazon, sildenafil

- **P-glikoprotein (P-gp)**

P-glikoprotein je najpomembnejši in prvi odkrit efluksni protein; določili so ga v tumorskih celicah, odpornih na citostatike. Najpomembnejša spojina za karakterizacijo njegovega delovanja je diagnostično barvilo rodamin 123. P-gp je močno izražen v rakastih celicah in predstavlja glavni razlog za razvoj rezistence na citostatično terapijo (13). Poleg tega je P-gp v organizmu konstitutiven, najdemo ga predvsem v črevesju, jetrih, ledvicah in možganski barieri, prisoten pa je tudi v drugih organih (20).



Slika 5: P-glikoprotein (24).

Njegova ekspresija v gastrointestinalnem traktu narašča distalno, v smeri od želodca proti debelem črevesju; v kolonu podgane je ekspresija gena MDR1, ki kodira P-gp, kar 7-krat večja od duodenalne (1). Nahaja se na apikalni strani črevesnega epitelijskega celice, pretežno na vrhu resic enterocita, in tako zavzema idealno pozicijo za omejevanje absorpcije in biološke uporabnosti mnogih klinično pomembnih peroralno apliciranih zdravil; predstavlja nemetabolično bariero intestinalne absorpcije (18). P-gp ima široko substratno specifičnost, s tendenco predvsem za lipofilne kationske, povečini nekonjugirane substrate, z molekulsko maso 300-2000 kDa (20). Pomembno vlogo ima tudi pri farmakokinetičnih

procesih zdravilnih učinkovin v jetrih, kjer je sklopljen z metabolizmom s citokromi. V črevesni steni je sklopitev z najpomembnejšim metaboličnem encimom v enterocitih CYP3A4 veliko manjša, saj se ekspresija encima, v nasprotju s P-gp, v distalni smeri manjša, in je v kolonu odsotna (18).

Pri človeku sta normalno prisotni dve izoformi P-gp, in sicer MDR1 in MDR2. Imata različno tkivno distribucijo, kodirata ju dva različna gena. V tumorskih celicah je prekomerno izražena le MDR1 izooblika. Podgane imajo dve izoobliki MDR1 gena, MDR1a in MDR1b, ki skupaj delujeta enako kot človeška MDR1 izooblika (18; 20).

1.5 EKSPERIMENTALNI MODELI PERMEABILNOSTI

V primerjavi z visoko zmogljivimi permeabilnostnimi modeli, kot sta PAMPA in Caco-2 celice, je podganje črevesje fiziološko bolj relevantno, saj izkazuje podobno zgradbo stene in plasti mukusa. Poleg tega, model izoliranega podganjega črevesja omogoča mehanistično študijo regionalno odvisne permeabilnosti, to je permeabilnosti v različnih delih GIT (11).

Model podganjega črevesja je v uporabi tudi za klasifikacijo permeabilnosti glede na BCS in posledično za potrebe *BCS biowaiver* postopkov. Tako za izolirano podganje črevo kot za vse druge modele velja, da morajo biti za potrebe BCS v vsakem laboratoriju, kjer bodo v rutinski uporabi, ustrezno validirani (11).

1.6 PREISKOVANE SUBSTANCE

1.6.1 FITC–dekstran

Fluoresceinizotiocianat-dekstran (FITC-dekstran) je visokomolekularno hidrofilno fluorescentno označeno barvilo. Privzem v celice poteka z endocitozo in pasivno paracelularno pri zmanjšani barierni funkciji črevesnega epitelija (22; 25). Je biološko inerten, služi kot nizko permeabilni marker paracelularnega transporta in je dober indikator integritete črevesne stene, saj se pri zmanjšani barierni funkciji črevesnega epitelija transportira tudi pasivno paracelularno, kar znatno poviša permeabilnost (11; 22). Oblike se razlikujejo glede na molske mase (3-5000, 10000 in 20000 g/mol). Nekatere druge lastnosti so prikazane v Preglednici VI.

1.6.2 Rodamin 123

Rodamin 123 (Rho123) je zaradi svojih ugodnih lastnosti (komercialna dostopnost, enostavna detekcija z merjenjem fluorescence in nevmešavanje v metabolne procese) najbolj uporabljen predstavnik znotraj rodaminske družine fluronskih barvil. Privzem rodamina 123 v celice pri koncentracijah pod 2 μM poteka aktivno s prenašalcem OATP1A2 (pri podgani Oatp1a4), pri višjih koncentracijah pa zaradi njegove lipofilne narave s pasivno difuzijo. Uporablja se kot označevalec membranskega transporta *in vitro*. Je znan substrat prenašalcev P-gp, MRP1 in BCRP, in se ga največ uporablja za označevanje aktivnosti P-gp, ki ga kodira gen MDR1 (18; 26). Podrobnejše lastnosti rodamina 123 so prikazane v Preglednici VI.

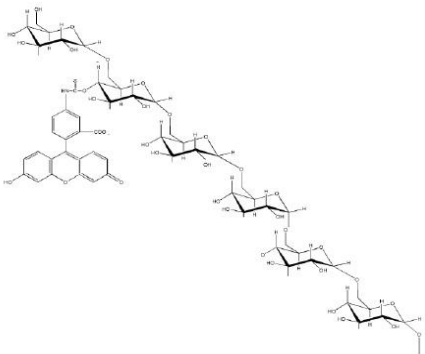
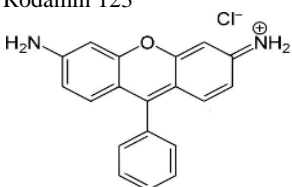
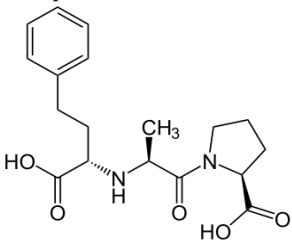
1.6.3 Enalaprilat

Enalaprilat je peptidomimetik, sestavljen iz aminokislinskih ostankov alanina in prolina. Je dikarboksilna kislina in aktivna oblika inhibitorja angiotenzin konvertaznega encima. Močno inhibira encim in ima dober klinični učinek po intravenski aplikaciji, ne pa tudi po peroralni. Neugodna kombinacija strukturnih lastnosti enalaprilata (umeščenost sekundarnega amina med dve karboksilatni skupini) in tvorba zwitteriona v lumnu tankega črevesja, je odgovorna za celokupno slabo biološko uporabnost po peroralni aplikaciji; tako za slabo pasivno difuzijo zaradi nizke lipofilnosti kot tudi za nizko afiniteto do prenašalca PepT1 (14; 27).

Slabo se absorbira iz GIT po peroralni aplikaciji, ima nizek P_{eff} in posledično nizek F_a (3%) pri človeku (10). Pri obravnavi enalaprilata je neizogibna primerjava z njegovim analogom – enalaprilom. Po esterifikaciji enalaprilata do predučinkovine enalaprila, ki se ponovno pretvori v aktivno obliko z biotransformacijo v jetrih (metabolizem v enterocitih je zanemarljiv) (14; 27; 28), dobimo učinkovino z boljšimi lastnostmi, saj je enalapril nekoliko bolj lipofilen in manj ioniziran pri fiziološkem pH. P_{eff} enalaprila je v primerjavi z enalaprilatom pri človeku 8x višji, medtem ko je F_a po peroralni aplikaciji 20 x večja (60 %) (10). Mnenja so sicer deljena, vendar večina študij povečanje P_{eff} pri enalaprilu pripisuje predvsem povečanemu aktivnemu transportu zaradi večje afinitete estra enalaprila do prenašalca PepT1 v primerjavi z dikarboksilno kislino enalaprilatom, in ne povečanemu prispevku pasivne difuzije. Tako sklepajo zaradi fizikalnokemijskih lastnosti enalaprila in drugih primerljivih substanc. Ta je kljub esterifikaciji preveč hidrofilen za

pasivno difuzijo. Poleg tega, nizke vrednosti P_{eff} pri Caco-2, permeabilnostnim modelom z zanemarljivo ekspresijo PepT1, v primerjavi z znatno višjimi P_{eff} rezultati *in vivo*, kažejo na prevladujoč mehanizem absorpcije enalapрила prek PepT1 (28; 27). Podobno kažejo tudi študije koncentracijske odvisnosti, pri katerih je prišlo do znatnega znižanja P_{app} enalapрила pri 1,00M v primerjavi z 0,01 mM, in nespremenjene permeabilnosti enalaprilata pri višji koncentraciji. To kaže na nasitljiv mehanizem absorpcije enalapрила in nenasitljivo, od koncentracije neodvisno, absorpcijo enalaprilata; prva je značilna za aktivni, druga pa za pasivni transport (27; 28). Nekatere druge lastnosti enalaprilata so prikazane v Preglednici VI.

Preglednica VI: Lastnosti preiskovanih substanc.

Preiskovana substanca	M [g/mol]	pKa	logD (pri pH 7,4)	Predviden mehanizem transporta	Intestinalni prenašalci	BCS
FITC-dekstran 	3000-5000			endocitoza	/	NA
Rodamin 123 	380,83		1,5	privzem aktivno in pasivno z difuzijo, aktivno izločanje	Oatp1 a4, P-gp, Bcrp, Mrp1	NA
Enalaprilat 	348,40	pKa1=1,60 pKa2=3,10 pKa3=8,02 (10)	-1,5	privzem s pasivno difuzijo in morebiten aktiven privzem	možen PepT1	III

2 NAMEN DELA

Namen tega diplomskega dela je preučiti mehanizme absorpcije v različnih delih črevesja treh preučevanih substanc: FITC-dekstrana, rodamina 123 in inhibitorja angiotenzinskega konvertaznega encima enalaprilata.

Izvajali bomo *in vitro* permeabilnostne poskuse na PAMPA modelu in na izoliranem tkivu podganjega črevesja z dvostranskimi Sweetana-Grass difuzijskimi celicami. Z metodama določamo navidezne permeabilnostne koeficiente (*apparent permeability coefficient* = P_{app}) učinkovin, kar služi kot dobro orodje za kvantitativno vrednotenje absorpcije *in vitro*. S PAMPA modelom določimo le prispevek pasivne transcelularne difuzije, z modelom podganjega črevesja pa tako pasiven kot aktiven transport. Slednji je v uporabi tudi za potrebe *BCS biowaiver* postopkov.

Ocenili bomo prehajanje označevalcev FITC-dekstrana in rodamina 123 ter učinkovine enalaprilata v absorptivni smeri iz mukozne na serozno stran ($M \rightarrow S$) in v eliminatorni smeri iz serozne na mukozno stran ($S \rightarrow M$) v črevesni lumen in sklepali na mehanizem absorpcije. Zanimalo nas bo, ali obstajajo statistično značilne razlike v navideznih permeabilnostnih koeficientih (P_{app}) v različnih delih podganjega črevesja; od duodenuma do kolona. Iz dobljenih rezultatov bomo sklepali na vpliv spreminjajoče absorptivne površine ter tesnih stikov in ekspresije eliminatornih prenašalcev na absorpcijo učinkovin v različnih delih vzdolž tankega in debelega črevesja ter sklepali na pasivne in aktivne mehanizme absorpcije. S pomočjo PAMPA modela bomo ovrednotili doprinos pasivne transcelularne difuzije k celokupni absorpciji proučevanih substanc.

V primeru rodamina 123 nas bo poleg pomena fizioloških parametrov zanimal tudi vpliv znižane temperature ter aplikacije inhibitorja P-gp efluksnega prenašalca, verapamila, na procese absorpcije. V vseh primerih bomo izračunali efluksno razmerje (ER), in tako videli, kako se spremeni razmerje med permeabilnostnima koeficientoma, izmerjenima v obeh smereh. Posebno pozornost bomo posvetili enalaprilatu, ki po biofarmaceutski klasifikaciji (BCS) sodi med slabo permeabilne učinkovine in je bil v terapiji zamenjan z esterificirano obliko, enalaprilom. Zanimala nas bo primerjava mehanizma absorpcije enalaprilata z do zdaj objavljenimi mehanizmi absorpcije za enalapril. Regionalno odvisno permeabilnost vseh substanc bomo ob zadostnem številu ponovitev še statistično ovrednotili in dobljene rezultate primerjali z literaturnimi viri.

3 MATERIALI IN METODE

3.1 REAGENTI

- D-glukoza
- manitol
- dinatrijev hidrogenfosfat dihidrat: stopnja čistosti: PA; Sigma Aldrich, Nemčija
- kalcijev klorid dihidrat: stopnja čistosti: PA; Sigma Aldrich, Nemčija
- kalijev klorid: stopnja čistosti: PA; Sigma Aldrich, Nemčija
- magnezijev klorid heksahidrat: stopnja čistosti: PA; Sigma Aldrich, Nemčija
- natrijev dihidrogenfosfat monohidrat: stopnja čistosti: PA; Sigma Aldrich, Nemčija
- natrijev hidrogenkarbonat: stopnja čistosti: PA; Sigma Aldrich, Nemčija
- natrijev klorid: stopnja čistosti: PA; Sigma Aldrich, Nemčija
- verapamil hidroklorid: stopnja čistosti: reagent grade; Sigma Aldrich, Nemčija
- rodamin 123 (Rho123): stopnja čistosti: reagent grade; Sigma Aldrich, Nemčija
- FITC-dekstran (3000 - 5000): stopnja čistosti: reagent grade; Sigma Aldrich, Nemčija
- enalaprilat: stopnja čistosti: reagent grade; USP Rockville

3.2 RAZTOPINE

3.2.1 Osnovne raztopine

Za pripravo osnovnih raztopin smo uporabili raztopine Ringerjevih pufrov z različnimi vrednostmi pH; 7,45 oziroma 7,85. Raztopino smo pripravili tako, da smo dvolitrsko bučo napolnili z bidestilirano vodo skoraj do značke, jo opremili z magnetnim mešalom in postopoma po predpisanem zaporedju dodajali navedene soli. Vsako naslednjo smo dodali šele, ko se je predhodna popolnoma raztopila. Ves čas raztapljanja soli je potekalo mešanje na primerni hitrosti.

- Ringerjev pufer; pH je 7,45

Sestava za 2L: 1,26 g NaHCO_3 ; 0,11 g $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \times \text{H}_2\text{O}$; 15,125 g NaCl ; 0,746 g KCl ; 0,352 g $\text{CaCl}_2 \times 2\text{H}_2\text{O}$; 0,488 g $\text{MgCl}_2 \times 6\text{H}_2\text{O}$; 0,570 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$.

- Ringerjev pufer; pH je 7,85

Sestava: 4,2 g NaHCO_3 ; 0,11 g $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \times \text{H}_2\text{O}$; 13,08 g NaCl ; 0,746 g KCl ; 0,352 g $\text{CaCl}_2 \times 2\text{H}_2\text{O}$; 0,488 $\text{MgCl}_2 \times 6\text{H}_2\text{O}$; 0,570 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$.

3.2.2 Raztopine za pripravo donorskih in akceptorskih raztopin

- 625 mM raztopina glukoze: v 50 mL bučko natehtamo 5,63 g glukoze in jo s prej pripravljeno raztopino Ringerjevega pufera s pH 7,85 dopolnimo do značke. Mešamo, dokler ne dobimo bistre raztopine.
- 625 mM raztopina manitola: v 50 mL bučko natehtamo 5,69 g manitola in jo s prej pripravljeno raztopino Ringerjevega pufera s pH 7,45 dopolnimo do značke. Mešamo, dokler ne dobimo bistre raztopine.
- 10 mM raztopina glukoze: 800 μL 625 mM raztopine glukoze odpipetiramo v 50 mL bučko in jo dopolnimo z Ringerjevim pufrom s pH 7,85 do značke.
- 10 mM raztopina manitola: 800 μL 625 mM raztopine manitola odpipetiramo v 50 mL bučko in jo dopolnimo z Ringerjevim pufrom s pH 7,45 do značke.
- 10 mM raztopina glukoze za prenos: 4 mL 625 mM glukoze redčimo z Ringerjevim pufrom pH 7,85 do 250 mL.
- akceptorska raztopina: to je 10 mM raztopina glukoze v Ringerjevem pufru pH 7,85. Pripravimo jo med poskusom tako da v komoro po vstavitvi tkiva na serozno stran odpipetiramo 2460 μL Ringerjevega pufera pH 7,85 in 40 μL 625 mM raztopine glukoze.

Pripravili smo tudi raztopini dveh označevalcev; FITC-dekstrana in rodamina 123, inhibitorja prenašalcev P-gp in BCRP verapamila ter API enalaprilata z naslednjimi koncentracijami:

- Označevalca:

0,2 mg/mL raztopina FITC-dekstrana: 5 mg FITC-dekstrana raztopimo v Ringerjevem pufru pH 7,45 oz. pH 7,85 v 25 mL bučki.

10 μM raztopina rodamina 123 (Rho123): najprej pripravimo 100 μM raztopino koncentrata, tako da 1,904 mg rodamina123 raztopimo v Ringerjevem pufru pH 7,45 v 50 mL bučki. Iz koncentrirane raztopine pripravimo 10-krat redčeno raztopino tako, da

odpipetiramo dvakrat po 1,5 mL in dopolnimo z Ringerjevim pufrom pH 7,45 oz. pH 7,85 do oznake v 15 mL bučki.

- API:

162,6 μ M raztopina enalaprilata: najprej pripravimo 5,664 mg/mL raztopino koncentrata, tako da 1,415 mg enalaprilata raztopimo v 250 μ L DMSO. Pripravljeno raztopino 10-krat redčimo.

Po stabilizaciji tkiva odpipetiramo 2460 μ L tako pripravljene raztopine in 40 μ L 625 mM raztopine manitola, če je donorska stran mukozna, oziroma 40 μ L 625 mM raztopino glukoze, če je donorska stran serozna.

- Inhibitor:

100 μ M raztopina verapamila: 2,456 mg verapamila raztopimo v 50 mL bučki v Ringerjevem pufu pH 7,45, ker je donorska raztopina v primeru inhibitorja vedno na mukozni strani.

3.2.3 Raztopine za pripravo elektrod

- 3 M raztopina KCl: 111,8 g KCl raztopimo v 500 mL demineralizirane vode.
- 3-4 % raztopina agarja v 3 M KCl: 100 mL 3 M KCl segrevamo v erlenmajerici na vodni kopeli, dodamo 3,5 g agarja in počasi mešamo, da ne vmešamo mehurčkov zraka.

3.3 APARATURE

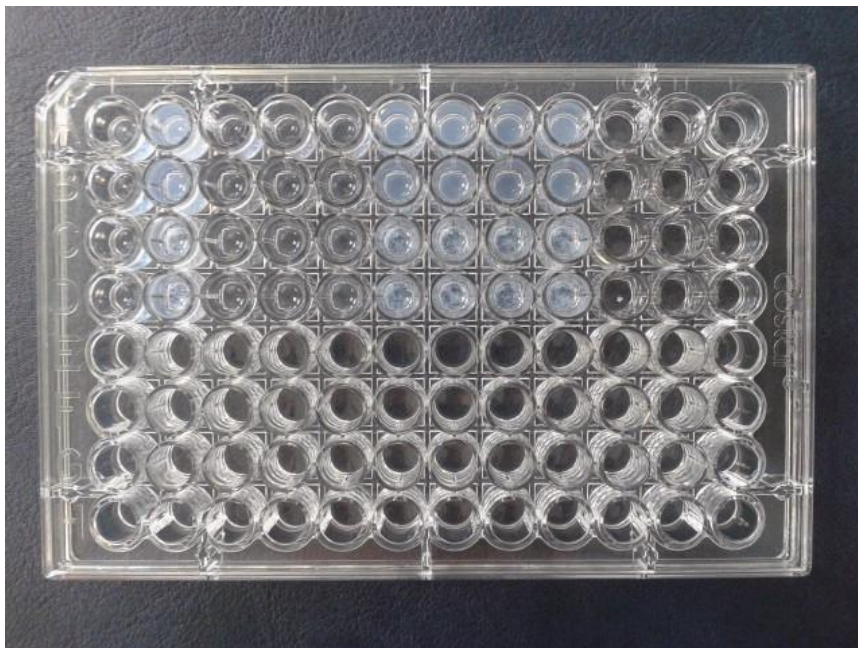
- Difuzijske celice *Easy mount*® s pripadajočimi elektrodami in naprava za merjenje električnih parametrov (*voltage-current clamp*) z računalniškim pretvornikom signala, Physiologic Instruments, Inc.,
- Osebni računalnik s programsko opremo »Clamp«,
- PAMPA (Pre-coated PAMPA Plate System), BD Gentest,
- Termostatirana vodna kopel, Lauda,
- Termostatirana vodna kopel, GFL,

- Analitska tehtnica, Mettler Toledo,
- Precizna tehtnica, Mettler Toledo,
- pH meter, Mettler Toledo,
- Vodoodporni digitalni termometer z vbodno sondo, Dostmann,
- Pipete, Biohit,
- Čitalec mikrotitrskih ploščic, Tecan Safire,
- UPLC sistem, Waters Acquity,
- MS sistem, Waters quattro Micro API

3.4 POTEK POSKUSA IN UPORABLJENE METODE

3.4.1 PAMPA

PAMPA (parallel artificial membrane permeability assay) je hiter in enostaven *in vitro* test merjenja pasivne transcelularne permeabilnosti učinkovin. Uporabili smo PAMPA model, kjer je PVDF filter prevlečen s tri-slojno lipidno/oljno/lipidno umetno membrano, prikazan je na Sliki 6 (29). Zanimala nas je od pH-odvisna permeabilnost. Na donorsko ploščo smo v jamice dodali raztopine FITC-dekstrana, rodamina123 oziroma enalaprilata; po 6 replik za vsak pH pogoj. Pripravili smo jih z raztapljanjem v DMSO in redčenjem z ustreznim pufrom, tako da končna koncentracija DMSO ni presegla 1 %. V jamice akceptorske plošče smo dodali pufer z ustreznim pH. Akceptorsko ploščo smo previdno poveznili nad donorsko, inkubirali 3 ure pri 37 °C in iz vsake jamice akceptorske plošče vzorčili 6 replik po 150 µL. Nekateri drugi parametri poskusa so prikazani v Preglednici VII. Kot standard visoko permeabilne učinkovine smo uporabili ketoprofen; z donorskim pufrom pri pH 6,2 in akceptorskim pri pH 7,4.



Slika 6: PAMPA model.

Preglednica VII: Parametri poskusa s PAMPA-o.

Koncentracija v jamici		FITC-dekstran	Rodamin 123	Enalaprilat	Ketoprofen			
		0,2 mg/mL	10 μ M	0,16 mM	0,80 mM			
Volumen akceptor [μ L]		200						
Volumen donor [μ L]		280						
pari	pH donor	5,5	6,2	6,8	7,4	5,5	6,2	6,8
	pH akceptor	7,4	7,4	7,4	7,4	5,5	6,2	6,8

Izračun navideznih permeabilnostnih koeficientov z metodo PAMPA poteka po Enačbi 3:

$$P_{app} = \frac{-\ln\left(\frac{1-C_A(t)}{C_{eq}}\right)}{A \times t \left(\frac{1}{V_D} + \frac{1}{V_A}\right)} \quad \text{Enačba 3}$$

P_{app} ... permeabilnost v [cm/s]

A ... efektivna filtrska površina

V_D ... volumen donorske jamice

V_A ... volumen akceptorske jamice

t ... čas inkubacije

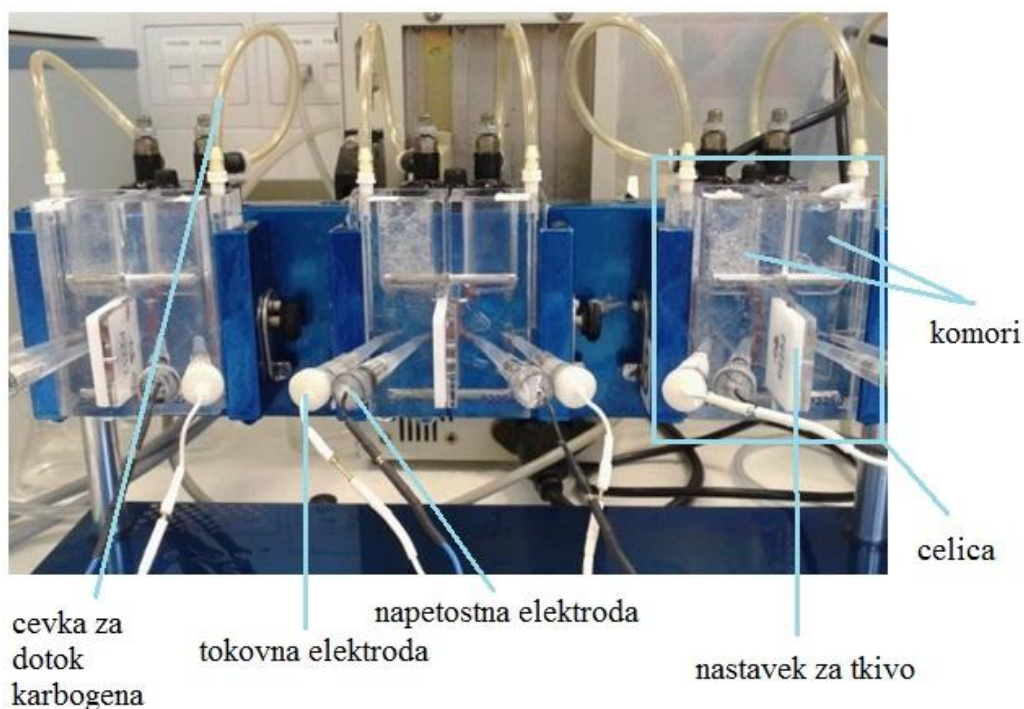
$C_{A(t)}$... koncentracija substance v akceptorski jamici v času t

$C_{D(t)}$... koncentracija substance v donorski jamici v času t

C_{eq} ... ravnotežna koncentracija

3.4.2 Dvoprostorne difuzijske celice

Permeabilnosti na izoliranem črevesju podgane smo vrednotili na modificiranih dvoprostornih difuzijskih celicah Sweetana-Grass; *Easy mount*®. Uporabljali smo sistem z osmimi celicami z inkubacijskim medijem v donorskem in akceptorskem prostoru. Vertikalno se med obema prostoroma nahaja tkivo, skozi katerega poteka transport preučevane spojine. Površina tkiva znaša 1cm^2 , volumen komore difuzijske celice pa po 2,5 ml (Slika 7). Sistem difuzijskih celic je dodatno opremljen tudi s po dvema tokovnicama (za spuščanje toka skozi tkivo) in napetostnima (za merjenje razlike v potencialu preko epitelija) Ag-AgCl elektrodama na vsaki celici (Slika 6), kar nam omogoča spremljanje elektrofizioloških parametrov na uporabljenem tkivu med poskusom. Tako imamo ves čas poskusa vpogled v vitalnost tkiva (30).



Slika 7: Difuzijske celice *Easy mount*®, Physiologic Instruments, Inc.

3.4.2.1 Priprava in vzdrževanje elektrod

Za merjenje kratkostičnega toka in spremembe električnega potenciala med poskusom smo uporabljali Ag/AgCl elektrode. Elektrolitski ključ je bil 3-4 % raztopina agarja v 3 M raztopini KCl, s katero je bila elektroda v stiku. Pripravili smo ga tako, da smo v plastično ohišje elektrolitskega ključa (modificiran pipetni nastavek, s konico odrezano pod kotom) s pipeto potegnili približno 110 μL 3-4 % agarja v KCl, pri čemer smo morali paziti, da v nastavek nismo dobili zračnih mehurčkov. Konico nastavka smo očistili, nastavek pa do vrha napolnili s 3 M raztopino KCl in vstavili elektrodo. Stik med ohišjem in elektrodo smo zatesnili s parafilmom. Elektrode smo shranili v hladilniku, tako da so bile konice potopljene v 3 M raztopino KCl. Pred poskusom smo elektrode testirali. Uporabili smo elektrode, ki so izkazovale stabilno asimetrijo napetosti ≤ 10 mV.

3.4.2.2 Priprava difuzijskih celic

- Vključimo obe termostahirani vodni kopeli in računalniški vmesnik.
- Ringerjev pufer pH = 7,85 damo segrevati v vodno kopel in hkrati začnemo preprihovati s karbogenom.

- Zažene programsko opremo »Clamp«. V zavihku »Options« obkljukamo COMT 1. Kliknemo ikono »Chamber definition« in obkljukamo prvih šest celic. Še enkrat zažene programsko opremo »Clamp« in v zavihku »Options« obkljukamo COMT 2. Kliknemo ikono »Chamber definition« in obkljukamo prvi dve celici (celici 7 in 8).
- Elektrode speremo z demineralizirano vodo in jih vstavimo v ustrezne odprtine v komorah. Črne, napetostne elektrode, vstavimo v odprtine bližje tkivu. Bele, tokovne elektrode pa vstavimo v odprtine ob straneh.
- V vsako celico odpipetiramo 5000 μL prepihanega Ringerjevega pufra $\text{pH} = 7,85$ in priključimo dotok karbogenea.
- V programski opremi »Clamp« pritisnemo na ikono Rf/dPe. Pokažejo se vrednosti upornosti pufra in razlike potenciala, ki ga elektrode izkazujejo v pufu. Upornost pufra mora biti med 30 in 60 Ω .
- Pritisnemo na zeleni gumb. Na ta način kompenziramo asimetrijo elektrod in upornost pufra. Začne se kontinuirano merjenje razlike potencialov, kratkostičnega toka in upornosti.

3.4.2.3 Živali

Pri delu smo uporabljali Sprague Dawley podganje samice (180 – 270 g; Lek Pharmaceuticals d.d. Ljubljana, Slovenija). Pred usmrtitvijo so bile podgane gojene v skupini od tri do pet na kletko. Sobna temperatura je znašala $23 \pm 1^\circ\text{C}$, vlažnost pa 40 % – 70 %. Za zagotavljanje cirkadialnega ritma so bile podganje samice izpostavljene 12 – urnemu ciklu svetlobe in teme. Hrana in voda je bila na voljo *ad libitum*. Vse živali so bile tretirane v skladu z evropsko konvencijo o zaščiti živali in zakonodajo RS, poskuse je priglasilo pristojno ministrstvo (11).

3.4.2.4 Priprava tkiva

Poskuse smo opravljali na izoliranem podganjem tankem in debelem črevesju. Pred usmrtitvijo živali 18 ur niso imele na voljo hrane, vodo pa so imele *ad libitum*, kar je pospešilo spiranje tankega črevesja in vzpostavilo stanje »na tešče«. Po dekapitaciji in laparotomiji, je bilo celotno črevesje nemudoma odrezano in shranjeno v 10 mM raztopini glukoze v ledeno hladem Ringerjevem pufu, s stalnim dovodom zmesi karbogenea (95:5 O_2/CO_2) (11). Takšna sestava pufra je dokazano omogočila vitalnost podganjega črevesja skozi celoten poskus (31). Podganje tanko črevo nismo zadržali več kot 30 minut. Nato

smo ga sprali s hladnim Ringerjevim pufrom, da bi odstranili luminalno vsebino, ga razrezali na 2 cm dolge segmente brez vidnih Peyerjevih plošč ter odprli vzdolž mezenterija. Odrezali smo tiste segmente tankega in debelega črevesja, preko katerih smo proučevali permeabilnost, ter ga pazljivo vpeli med dve akrilni ploščici Sweetana-Grass difuzijske celice. Mukozno oz. apikalno stran tankega črevesja smo obrnili proti levi strani, serozno oz. bazolateralno stran pa proti desni. V obeh primerih smo kot inkubacijski medij uporabili Ringerjev pufer. Na mukozni strani smo Ringerjevemu pufru s pH 7,45 dodali manitol do končne koncentracije 10 mM, na serozni strani pa je bila raztopina glukoze iste koncentracije v Ringerjevem pufru s pH 7,85. Med poskusom smo bili ves čas pozorni na vzdrževanje fizioloških pogojev in s tem zagotavljanje živosti tkiva. Temperaturo cca 37°C smo vzdrževali s pomočjo termostata, povezanega s celicami. Z dovodom plinske mešanice karbogene (5% CO₂ in 95% O₂) pa smo vzdrževali pH vrednost bikarbonatnega pufru, poskrbeli za ustrezno mešanje raztopin in predvsem za oksigenacijo tkiva v difuzijskih celicah. Preden smo začeli s poskusom, smo vedno poskrbeli, da je bil inkubacijski medij primerno termostatiran ter prepihan s karbogenom (30).

3.4.2.5 Potek poskusa pri nižani temperaturi

Opravili smo tudi poskus permeabilnosti rodamina pri $T = 7\text{ }^{\circ}\text{C}$, kjer so zaradi nizke temperature inhibirani vsi aktivni celični procesi in s tem seveda vsaka oblika aktivnega transporta. K permeabilnosti prispeva le pasivna difuzija. Tudi slednja se zaradi vpliva temperature na fluidnost membrane lahko nekoliko zniža, zaradi česar je včasih potrebno nekaj previdnosti pri interpretaciji rezultatov. Elektrofizioloških parametrov, ki so posledica aktivnega črpanja ionov, pri nižani temperaturi ni smiselno spremljati (30).

3.5 ELEKTROFIZIOLOŠKI PARAMETRI IN VITALNOST TKIVA

Tekom poskusa smo sproti (ob vstavitvi tkiva, začetku poskusa, po dodatku preiskovane substance, ob koncu poskusa in po dodatku glukoze) beležili električni potencial (dPe v mV) in transepitelijski električni upor tkiva (TEER v mΩ), s čimer smo dobili podatek o delovanju Na/K-črpalke in tako okarakterizirali vitalnost oz. živost tkiva v času trajanja poskusa (17). S pomočjo aplikacije 100 μl glukoze (625 μM) pa smo glede na dvig dPe in TEER ugotovili sposobnost tkiva za kotransport glukoze z natrijevimi ioni na koncu poskusa in s tem še enkrat potrdili vitalnost in integriteto tkiva do konca poskusa (30).

Izraz vitalnost (ang. *viability*; slo. lahko tudi *živost* (32)) izoliranega tkiva v difuzijskih celicah je uporabljen dokaj pogosto, vendar ni nikjer točno definiran (33; 34). Običajno se nanaša na normalno delovanje izoliranega tkiva v *in vitro* pogojih oz. na sposobnost tkiva, da bo normalno delovanje v *in vitro* pogojih vzdržalo še nekaj časa oz. do konca poskusa (34). Poškodovanost tkiva *in vitro* pa lahko na celičnem nivoju razdelimo v tri skupine – odstopanje od normalne morfologije celic, oslabitev normalnega delovanja celic in povečanje permeabilnosti citoplazemske membrane (35). Izraz integriteta (ang. *integrity*) epitelijskega tkiva lahko glede na kontekst nosi različen pomen. Tako slaba (zmanjšana) integriteta segmenta tankega črevesa v difuzijskih celicah lahko pomeni fizične poškodbe tkiva, zaradi katerih le-to ne deluje kot enovita bariera, kar lahko opazimo kot povečano permeabilnost nekaterih označevalcev (34). Zmanjšanje integritete lahko razumemo tudi kot poslabšanje kakovosti izoliranega epitelijskega tkiva zaradi zmanjšane vitalnosti (odmiranja) tkiva ali pa le kot odprtje tesnih stikov (32; 36).

Omeniti je potrebno, da smo v obdelovanje podatkov vključili in za interpretacijo rezultatov uporabili le meritve pridobljene na segmentih tkiva, ki so glede na omenjene elektrofiziološke parametre, nakazovali na vitalno tkivo, primerne integritete. V primeru padca potenciala (dPe) nad -1 mV, kar kaže na zmanjšano vitalnost tkiva, rezultatov nismo upoštevali. Če smo to opazili na začetku poskusa, smo zamenjali vpeto tkivo. Če pa je do zmanjšanja vitalnosti prišlo med poskusom, podatkov od tega tkiva nismo upoštevali. Ravno tako nismo upoštevali rezultatov, ki so po koncu poskusa po dodatku glukoze, izkazovali slabo vitalnost.

Možnost spremljanja elektrofizioloških pogojev je pomembna lastnost modificiranih Sweetana-Grass difuzijskih celic, saj se tako izognemo lažno visoki permeabilnosti zaradi zmanjšane vitalnosti in/ali poškodb tkiva (30).

3.6 PRIPRAVA VZORCEV, VZORČENJE TER DOLOČANJE P_{app}

Preučevana označevalca (FITC-dekstran in rodamin 123) sta dobro topna, zato smo ju pripravili z raztapljanjem v Ringerjevem puftru, bodisi v pH 7,45, če je bila donorska mukozna stran, bodisi v pH 7,85, če je bila donorska stran serozna.

Osnovno raztopino enalaprilata smo zaradi zagotavljanja boljše topnosti pripravili v DMSO. Koncentracija DMSO končne raztopine v celicah ni presegla 1% ter s tem ni vplivala na vitalnost in na permeabilnostne lastnosti tkiva.

V Sweetana-Grass difuzijsko celico smo odpipetirali 2460 μL raztopine preučevane substance ter 40 μL 625 mM raztopine manitola, ko smo substanco aplicirali na mukozno stran oziroma 40 μL 625 mM raztopine glukoze, ko smo substanco aplicirali na serozno stran.

Ko smo proučevali vpliv dodatka inhibitorja prenašalca P-gp verapamila na permeabilnost rodamina 123, smo pripravljeno raztopino dodali 30 minut pred dodatkom merjene substance.

Vpeto tkivo je med poskusom na eni strani v stiku z donorsko raztopino, ki poleg vseh sestavin za vzdrževanje vitalnosti tkiva, vsebuje še našo preiskovano učinkovino v znani koncentraciji, na nasprotni strani pa je v stiku z akceptorsko raztopino. Akceptorska raztopina na začetku poskusa ne vsebuje preiskovane spojine. Donorska raztopina je lahko na mukozni ali na serozni strani tkiva.

Pri ugotavljanju permeabilnosti, smo dali znano koncentracijo substance enkrat na mukozno, drugič na serozno stran, saj nas je zanimal transport v obeh smereh - tako iz apikalne v smeri bazolateralne strani ($M \rightarrow S$), kot obratno ($S \rightarrow M$). Posamezen poskus je trajal 180 minut. Vzorčili smo tako iz akceptorske kot tudi iz donorske celice. S tem, da smo iz akceptorske celice vzorčili vsakih 30 min, vključno z akceptorskim nultim vzorcem, iz donorske strani pa le na začetku poskusa ob času 0, na sredini (90. minuta) in na koncu (180. minuta), s čimer smo ugotavljali vpliv adsorpcije substanc na tkivo in/ali površino celic.

Permeabilnostni koeficient (P_{app}) smo določili na osnovi naraščanja množine preiskovane spojine na akceptorski strani difuzijske celice v odvisnosti od časa. P_{app} je od koncentracije neodvisen parameter, ki omogoča primerjavo permeabilnosti ne glede na uporabljene različne donorske koncentracije substanc (7; 30).

Na akceptorski strani smo jemali vzorce z znanim volumnom V_v in jih shranili. Po poskusu smo določili koncentracijo preiskovane substance v vzorcih (C_i). V primeru fluorescentnih označevalcev FITC-dekstrana in rodamina 123 smo vzorce analizirali z merjenjem

fluorescence, v primeru učinkovine enalaprilata pa smo merili vsebnost s sistemom UPLC-MS. Analitski parametri so navedeni v Preglednici VIII.

Preglednica VIII: Analitski parametri določanja substanc.

SUBSTANCA	Metoda	Aparatura	Pogoji meritve	Mikrotitrna plošča
FITC-dekstran	Spektrofotometrično, merjenje fluorescence	Reader Infinite1000, Tecan	$\lambda_{\text{ex}} = 495 \text{ nm}$ $\lambda_{\text{em}} = 515 \text{ nm}$	96-well plošče, flat bottom, black polystyrene, Corning
Rodamin 123	Spektrofotometrično, merjenje fluorescence	Reader Infinite1000, Tecan	$\lambda_{\text{ex}} = 505 \text{ nm}$ $\lambda_{\text{em}} = 525 \text{ nm}$	96-well plošče, flat bottom, black polystyrene, Corning
Enalaprilat	kromatografsko, določanje AUC	UPLC MS (detekcija)	MF = MFA ⁵ , MFB ⁶ SF = BEH C18 (50 mm × 2,1 mm × 1,7 mm) $\Phi = 0,30 \text{ mL/min}$ $V_{\text{injiciranja}} = 5 \mu\text{L}$ $T_{\text{kolone}} = 60 \text{ }^\circ\text{C}$ m/z = 349 čas mirovanja = 0,8 s; 0-1,5 min	96-well plošče, filtrske: MSGVN22, Milipore

Koncentracije substanc C_i smo določili iz predhodno pripravljene umeritvene krivulje. Znanim koncentracijam smo pomerili odziv. Dobili smo premico z določenim R, nadalje smo glede na odziv vzorca s pomočjo ekstrapolacije dobili koncentracijo proučevane substance v vzorcu. Za obdelavo podatkov smo uporabljali program Microsoft Office Excel 2007.

V akceptorsko stran celice smo po vsakem vzorčenju vračali enak volumen akceptorske raztopine brez učinkovine, torej 10 mM raztopino bodisi glukoze bodisi manitola. Množino učinkovine, ki preide skozi tkivo v določenem času (n_t), smo določili s pomočjo Enačbe 4:

⁵ MFA: 5 % acetonitril, 95 % pufer (priprava pufera: razredčimo NNDHA do $C = 10 \text{ mM}$ in po kapljicah dodamo HCOOH do $\text{pH} = 5,0$)

⁶ MFB: 60 % acetonitril, 40 % pufer (priprava pufera je opisana v zgornji sproti opombi)

$$n_t = (\sum_{i=1}^{N-1} V_v \times C_i) + C_t \times V_c \quad \text{Enačba 4}$$

n_t ... množina spojine, ki je difundirala v času t [mol]

V_v ... volumen vzorca [L]

C_i ... koncentracija substance na akceptorski strani v predhodnih vzorcih [mol/L]

C_t ... koncentracija substance na akceptorski strani v času t , ko odvezamemo vzorec [mol/L]

V_c ... volumen tekočine na akceptorski strani celice [L]

Hitrost difuzije opredeljuje Enačba 5:

$$\frac{dn}{dt} = k \times (C_d - C_a) \quad \text{Enačba 5}$$

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

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

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

Med poskusom je ves čas $C_a \ll C_d$; tako se člen $(C_d - C_a)$ zanemarljivo spreminja in ga lahko vključimo v konstanto difuzije - k_d , ki določa hitrost naraščanja koncentracije učinkovine na akceptorski strani.

$$\frac{dn}{dt} = k_d$$

$$\int_0^{n(t)} dn = k_d \times \int_0^t dt$$

$$n_t = k_d \times t + n \quad \text{Enačba 6}$$

n_t izračunamo s pomočjo Enačbe 6. Z linearno regresijo dobimo konstanto difuzije.

Hitrost prehoda J [$\frac{nmol}{h \cdot cm^2}$] izračunamo s pomočjo Enačbe 7:

$$J = \frac{k_d}{A} \quad \text{Enačbe 7}$$

A ... površina tkiva, skozi katero difundira spojina.

Donorsko koncentracijo in površino tkiva poznamo, zato lahko permeabilnostni koeficient izračunamo s pomočjo Enačbe 8:

$$P_{app} = \frac{J}{C_d} = \frac{k_d}{A \times C} \quad \text{Enačba 8}$$

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

3.7 STATISTIČNA OBDELAVA PODATKOV

Različnost navideznih permeabilnostnih koeficientov izmerjenih v obeh smereh smo preverili s testiranjem hipoteze o aritmetični sredini za dva neodvisna vzorca s pomočjo Studentovega t-testa. Pri tem smo morali predhodno izvesti F-test, da smo ugotovili, ali sta varianci obeh vzorcev enaki ali različni.

$$s^2 = \frac{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2}{n-1} \quad \text{Enačba 9}$$

s^2 ... varianca vzorca

x_i ... posamezna meritev znotraj vzorca

\bar{x} ... srednja vrednost meritev

n ... število meritev

Postavimo ničelno in alternativno hipotezo.

$$H_0: S_x^2 = S_y^2$$

$$H_0: S_x^2 \neq S_y^2$$

Ničelna hipoteza pravi, da se varianci dveh vzorcev ne razlikujeta, alternativna pa nasprotno, da se varianci signifikantno razlikujeta. F-test izvedemo po enačbi:

$$F = \frac{S_x^2}{S_y^2} \quad \text{Enačba 10}$$

F_{eks} ... eksperimentalna vrednost F

F_{tab} ... tabelarična vrednost F

Če ugotovimo, da je $F_{eks} < F_{tab}$; ($p > \alpha$), ničelne hipoteze ne zavrnemo in privzamemo, da sta varianci obeh vzorcev enaki. V tem primeru za primerjavo aritmetičnih sredin uporabimo t-test za enake variance:

$$t = \frac{\bar{x} - \bar{y}}{s} \sqrt{\frac{mn}{m+n}} \quad \text{Enačba 11}$$

Če ugotovimo, da je $F_{eks} > F_{tab}$; ($p < \alpha$), ničelno hipotezo zavrnemo in sprejmemo alternativno. Zato uporabimo t-test, kjer upoštevamo, da sta varianci vzorcev različni:

$$t = \frac{\bar{x} - \bar{y}}{\sqrt{\frac{S_1^2}{m} + \frac{S_2^2}{m}}} \quad \text{Enačba 12}$$

Kadar je $t_{eks} < t_{tab}$ in s tem $p > \alpha$, označimo razliko permeabilnostnih koeficientov v smeri $M \rightarrow S$ in smeri $S \rightarrow M$ kot neznačilno (nz). Če je $t_{eks} > t_{tab}$ in s tem $p < \alpha$, potem je razlika značilna (z).

Rezultati v vseh grafih (in preglednicah) so predstavljeni kot aritmetična sredina \pm standardna napaka (SEM) najmanj treh meritev.

Za statistično analizo vpliva večih faktorjev na vrednost navideznega permeabilnostnega koeficienta smo uporabili dvo-stransko ANOVO, saj primerjamo P_{app} glede na dva parametra (del črevesja in smer transporta). Za ugotavljanje morebitne signifikantnosti med skupinami znotraj proučevanega faktorja smo uporabili Bonferronijev »post-hoc« test.

Statistično analizo smo opravili v programu GraphPad Prism.

4 REZULTATI

Rezultate smo razdelili na več sklopov. Najprej smo testirali od pH odvisno permeabilnost substanc s PAMPA-o. Vse naslednje poskuse smo opravili na izoliranem črevesju podgane.

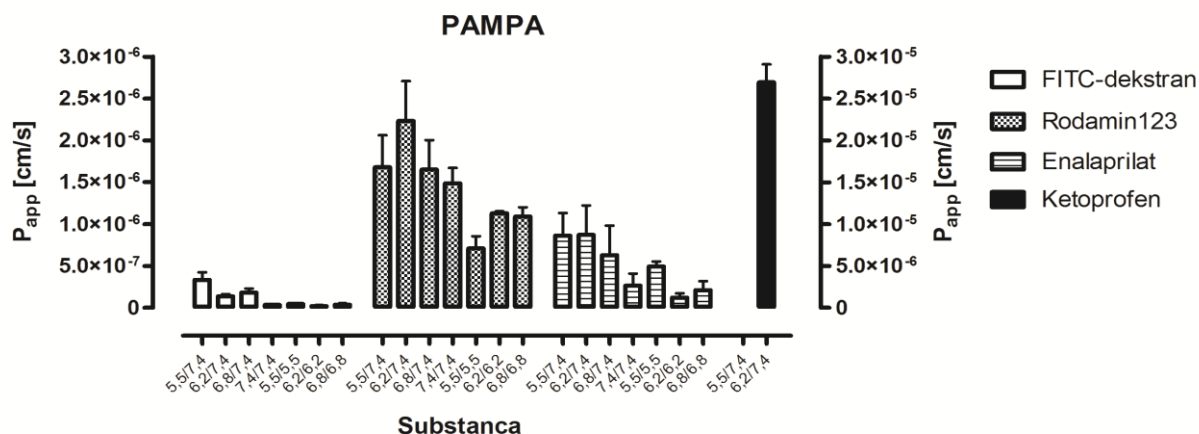
Prvi sklop poskusov na Sweetana-Grass difuzijskih celicah je namenjen predstavitvi meritev elektrofizioloških parametrov različnih delov tankega in debelega črevesja podgane. V naslednjih treh sklopih so zbrani rezultati permeabilnosti treh preučevanih substanc; FITC-dekstrana, rodamina 123 in enalaprilata. V vsakem posameznem sklopu nas je zanimala razlika v permeabilnosti izbrane substance glede na različne dele tankega in debelega črevesja in, ali se vrednosti P_{app} v smereh $M \rightarrow S$ in $S \rightarrow M$ razlikujeta. Pri posamezni substanci smo predstavili še vpliv spremembe pogoja meritve pri nižji temperaturi (pri rodaminu 123 in enalaprilatu) in/ali dodatka inhibitorja prenašalnega proteina (pri rodaminu 123) na vrednost permeabilnosti.

4.1 Rezultati PAMPA modela

V preglednici IX in na Sliki 8 je prikazana navidezna permeabilnost proučevanih substanc pri različnih pH. Levo je podana vrednost pH donorske celice, desno pa akceptorske. Rezultate P_{app} PAMPA-e lahko primerjamo le znotraj same metode, ne moremo pa jih primerjati z rezultati, pridobljenimi z metodo difuzijskih celic.

Preglednica IX: Permeabilnost proučevanih substanc s PAMPA-o pri različnih vrednostih pH; $n = 6$.

pH	FITC-dekstran		Rodamin 123		Enalaprilat		Ketoprofen	
	$P_{app} \times 10^{-7}$ [cm/s]	SEM $\times 10^{-7}$ [cm/s]	$P_{app} \times 10^{-7}$ [cm/s]	SEM $\times 10^{-7}$ [cm/s]	$P_{app} \times 10^{-7}$ [cm/s]	SEM $\times 10^{-7}$ [cm/s]	$P_{app} \times 10^{-7}$ [cm/s]	SEM $\times 10^{-7}$ [cm/s]
5,5/7,4	3,35	0,88	16,8	3,83	8,62	2,71		
6,2/7,4	1,38	0,23	22,3	4,76	8,70	3,54	269	20,0
6,8/7,4	1,82	0,49	16,5	3,52	6,28	3,55		
7,4/7,4	0,35	0,85	14,9	1,85	2,65	1,45		
5,5/5,5	0,45	0,22	7,1	1,44	4,92	6,37		
6,2/6,2	0,22	0,98	11,3	2,41	1,25	4,92		
6,8/6,8	0,37	0,16	10,9	1,10	2,13	1,05		

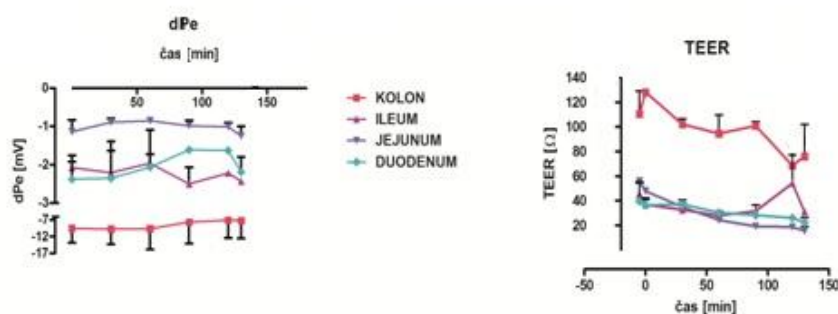


7

Slika 8: Permeabilnost proučevanih substanc s PAMPA-o pri različnih vrednostih pH.

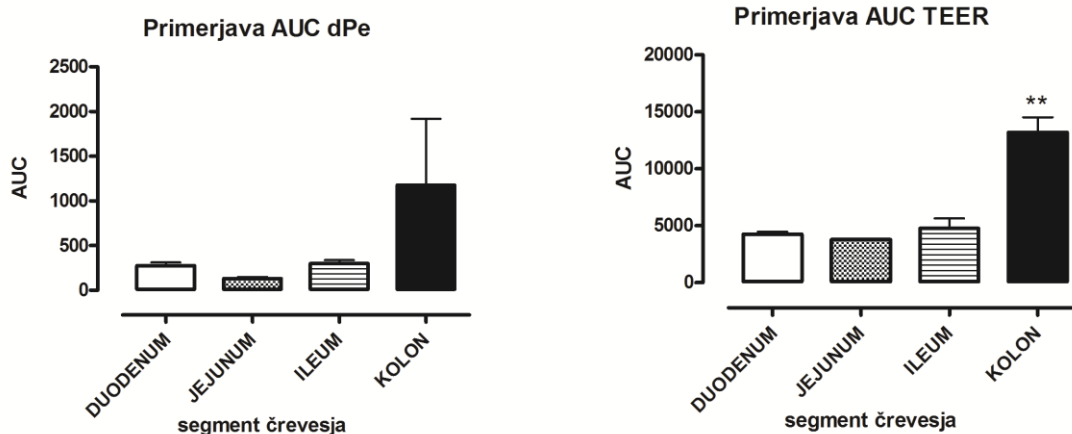
4.2 Poskusi elektrofizioloških parametrov

Pred začetkom testiranja navideznih permeabilnostnih koeficientov izbranih treh substanc, smo v preliminarnih poskusih merili dPe (sprememba potenciala tkiva) in TEER (transcelularna električna upornost) v različnih delih tankega in v debelem črevesju. S tem smo okarakterizirali lastnosti tkiva, uporabljenega v nadaljnjih poskusih. Rezultati so prikazani na Slikah 9 in 10.



Slika 9: Časovni potek dPe in TEER v različnih delih črevesja podgane. Vstavitev tkiva: ob času 0; začetek poskusa: 25. minuta; konec poskusa: 90. minuta; pred dodatkom glukoze: 120. minuta; po dodatku glukoze: 140. minuta.

⁷ Ker je P_{app} ketoprofena veliko višji od P_{app} ostalih treh substanc, smo za večjo razvidnost grafičnega prikaza, navidezno permeabilnost ketoprofena prikazali na desni y-osi.



8

Slika 10: Regionalna odvisnost vrednosti dPe in TEER.

4.3 Poskusi s FITC-dekstranom

4.3.1 Regionalna odvisnost

Vrednotili smo regionalno odvisnost permeabilnost FITC-dekstrana. Ker nas je zanimalo tudi, ali FITC-dekstran v enaki meri prehaja iz mukozne strani na serozno kot iz serozne na mukozno stran, smo poskus zasnovali tako, da smo donorsko raztopino aplicirali tako na mukozno kot na serozno stran in vzorčili akceptorsko raztopino na obeh straneh. Razlika v permeabilnosti v različnih delih podganjega črevesja nas je zanimala tako v primeru privzema kot eliminacije FITC-dekstrana.

Donorska raztopina je bila:

- na mukozni strani - 10 mM raztopina manitola in raztopina FITC-dekstrana z $\gamma = 0,2$ mg/mL v Ringerjevem pufru pH = 7,45
- na serozni strani - 10 mM raztopina glukoze in raztopina FITC-dekstrana z $\gamma = 0,2$ mg/mL v Ringerjevem pufru pH = 7,85

⁸ ** se nanaša na značilno razliko med skupinama, $p < 0,01$

Akceptorska raztopina:

- na mukozni strani - 10 mM raztopina manitola
- na serozni strani - 10 mM raztopina glukoze

Navidezne permeabilnostne koeficiente (P_{app}) smo v obliki povprečnih vrednosti in njihovih standardnih napak (SEM) prikazali v Preglednici X in na Sliki 11. Na Sliki 12 smo prikazali razliko med privzemom in eliminacijo FITC-dekstrana.

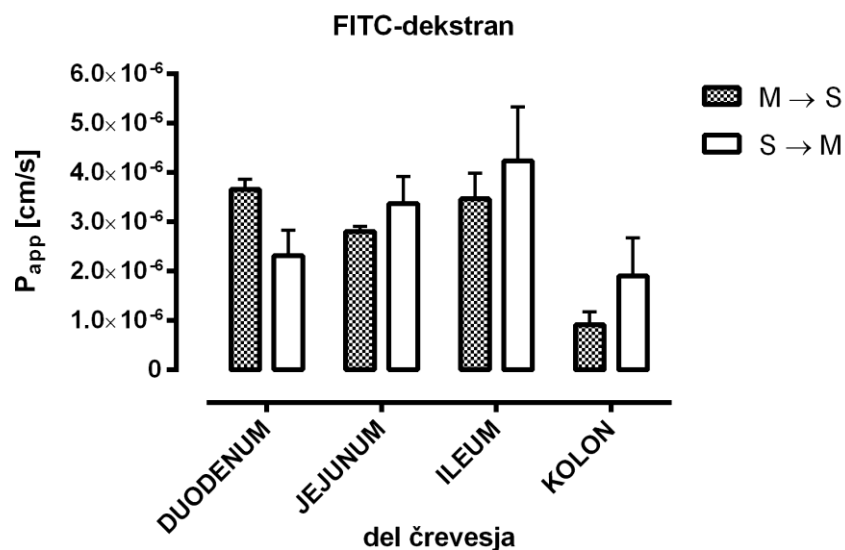
Preglednica X: Združeni rezultati regionalne permeabilnosti v obeh smereh za FITC-dekstran.

SUBSTANCA	FITC-dekstran							
	DUODENUM		JEJUNUM		ILEUM		KOLON	
DEL ČREVESJA								
SMER	M → S	S → M	M → S	S → M	M → S	S → M	M → S	S → M
$P_{app} \times 10^{-6}$ [cm/s]	3,66	2,32	2,81	3,38	3,47	4,24	0,92	1,91
SEM $\times 10^{-6}$ [cm/s]	0,22	0,51	0,11	0,55	0,52	1,10	0,26	0,77
n	3	3	3	3	3	4	3	3
ER ⁹	0,63		1,20		1,22		2,09	
ANOVA in Bonferroni-jev „post hoc“ test ¹⁰ ($\alpha=0,05$)	z	nz	nz	nz	nz	nz	z	nz
t-test ¹¹ ($\alpha=0,05$)	nz		nz		nz		nz	

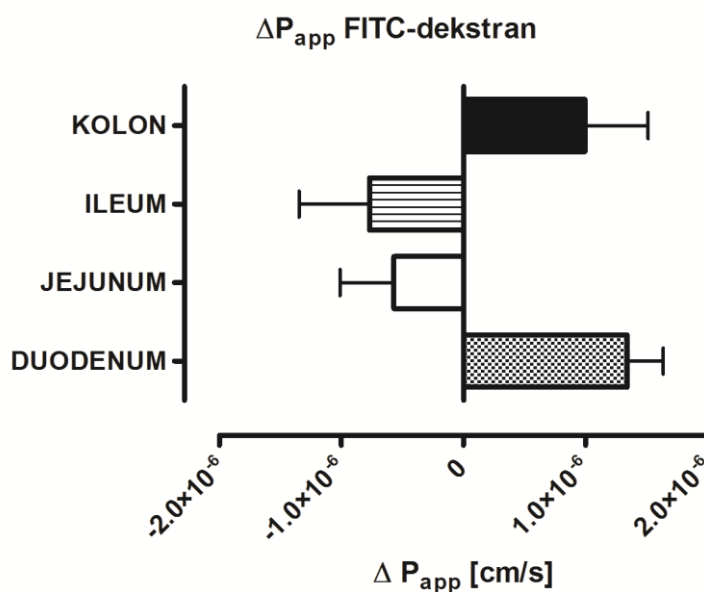
⁹ ER se nanaša na »efflux ratio«. Pomeni kvocient med $P_{app} S \rightarrow M$ in $P_{app} M \rightarrow S$.

¹⁰ ANOVA primerja razlike med skupinami, Bonferronijev »post hoc« test pa znotraj skupin.

¹¹ t-test se nanaša na ugotavljanje statistično (ne)značilnega vpliva smeri na P_{app} znotraj posameznega dela črevesja.



Slika 11: Stolpični grafikon povprečnih vrednosti navideznih permeabilnostnih koeficientov FITC-dekstrana v posameznih delih podganjega črevesja.



Slika 12: Razlike med P_{app} M → S in S → M FITC-dekstrana v različnih delih črevesja.

Dvo-stranska ANOVA je pokazala značilno razliko vrednosti navideznih permeabilnostnih koeficientov v različnih delih črevesja ($p < 0,05$), z Bonferronijevim »post-hoc« testom pa smo pokazali, da so omenjene značilne razlike le v absorptivni smeri (M → S) pri

primerjavi med duodenumom in kolonom. Razlike med P_{app} v različnih smereh so tako najverjetneje nastale le zaradi vpliva interindividualne razlike med testiranimi tkivi, saj so bili rezultati pridobljeni iz tkiv večih različnih podgan.

4.4 Poskusi z rodaminom 123

4.4.1 Regionalna odvisnost

Pri ugotavljanju navidezne permeabilnosti P-gp substrata rodamina 123 so nas ravno tako najprej zanimala vrednosti P_{app} samega rodamina 123 tako v smeri $M \rightarrow S$ kot v smeri $S \rightarrow M$ v vseh delih izoliranega črevesja podgane.

Izvedba serije poskusov je bila enaka kot pri FITC-dekstranu; enkrat je bila akceptorska mukozna stran, drugič serozna.

Donorska raztopina je bila:

- na mukozni strani - 10 mM raztopina manitola in raztopina rodamina 123 s $C = 10 \mu\text{M}^{12}$ v Ringerjevem pufru $\text{pH} = 7,45$
- na serozni strani - 10 mM raztopina glukoze in raztopina rodamina 123 s $C = 10 \mu\text{M}$ v Ringerjevem pufru $\text{pH} = 7,85$

Akceptorska raztopina:

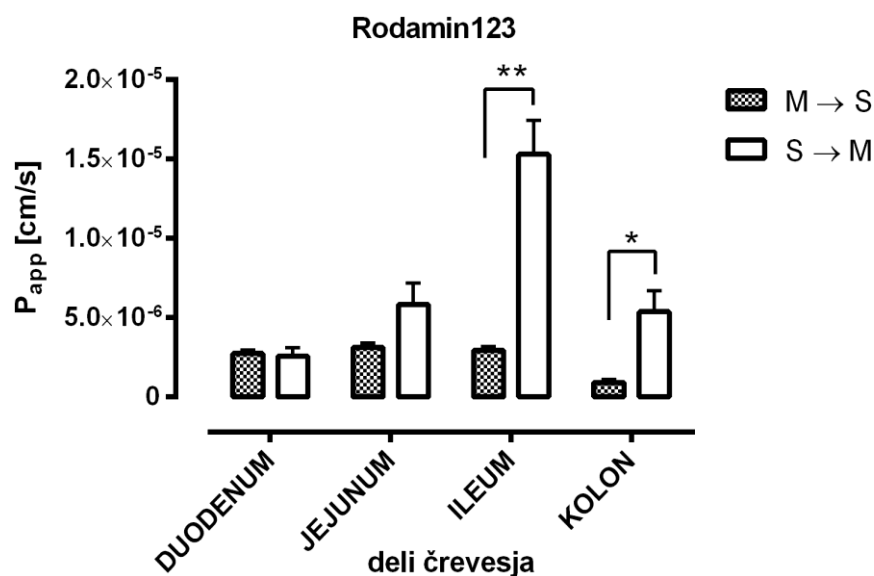
- na mukozni strani - 10 mM raztopina manitola
- na serozni strani - 10 mM raztopina glukoze

Navidezne permeabilnostne koeficiente (P_{app}) smo v obliki povprečnih vrednosti in njihovih standardnih napak (SEM) prikazali v Preglednici XI in na Sliki 13.

¹² Koncentracija rodamina 123, pri kateri se izognemo vplivu aktivnih inluksnih transportnih mehanizmov in potekata le privzem s pasivno difuzijo in efluks s P-gp ter še ni negativnega vpliva na vitalnost tkiva (26).

Preglednica XI: Združeni rezultati regionalne permeabilnosti rodamina 123 v obeh smereh.

SUBSTANCA	Rodamin 123							
	DUODENUM		JEJUNUM		ILEUM		KOLON	
DEL ČREVESJA								
SMER	M → S	S → M	M → S	S → M	M → S	S → M	M → S	S → M
$P_{app} \times 10^{-6}$ [cm/s]	2,75	2,56	3,12	5,83	2,94	15,3	0,92	5,38
$SEM \times 10^{-6}$ [cm/s]	0,22	0,56	0,29	1,35	0,26	2,15	0,19	1,33
n	3	3	3	4	3	3	3	3
ER	0,93		1,87		5,20		5,85	
ANOVA in Bonferroni-jev „post hoc“ test ($\alpha=0,05$)	značilna razlika med skupinami tako glede na del črevesja kot glede na smer							
t-test ($\alpha=0,05$)	nz	z	nz	nz	nz	z	nz	nz
	nz		nz		z		z	

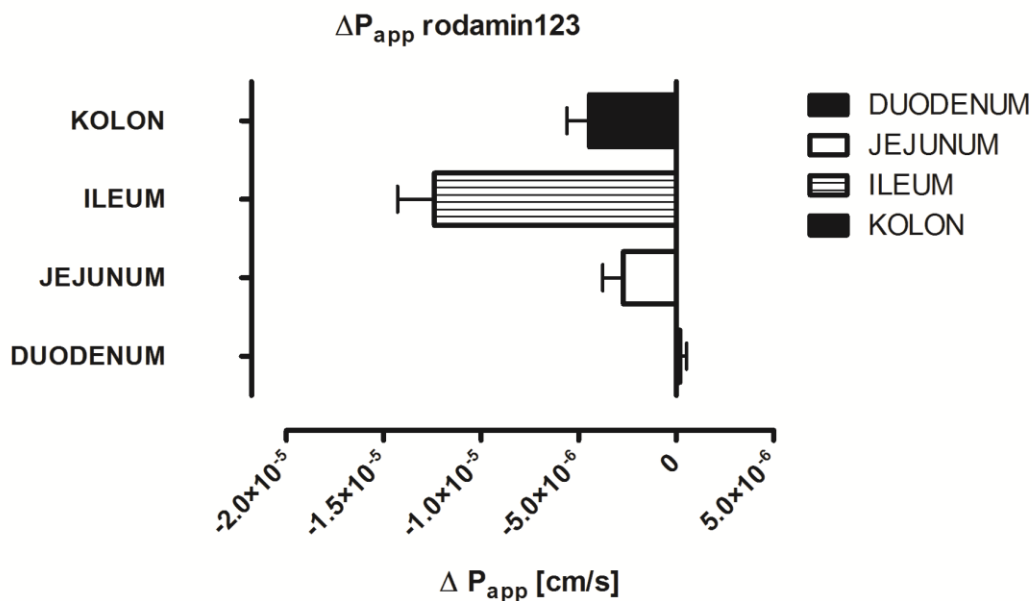


13

Slika 13: Stolpični grafikon povprečnih vrednosti navideznih permeabilnostnih koeficientov rodamina 123 v posameznih delih podganjega črevesja.

Na Sliki 14 smo prikazali razliko med privzemom in eliminacijo rodamina 123 v različnih delih podganjega črevesja.

¹³ * se nanaša na značilno razliko med skupinama, $p < 0,05$



Slika 14: Razlike med P_{app} M → S in S → M rodamina 123 v različnih delih črevesja.

Dvo-stranska ANOVA je pokazala značilno razliko navideznih permeabilnostnih koeficientov med analiziranimi skupinami ($p < 0,05$); tako v različnih delih črevesja kot v obeh smereh. Z Bonferronijevim »post-hoc« testom smo značilne razlike v P_{app} dokazali le v eliminatorni smeri (S → M) pri primerjavi med duodenumom in ileumom.

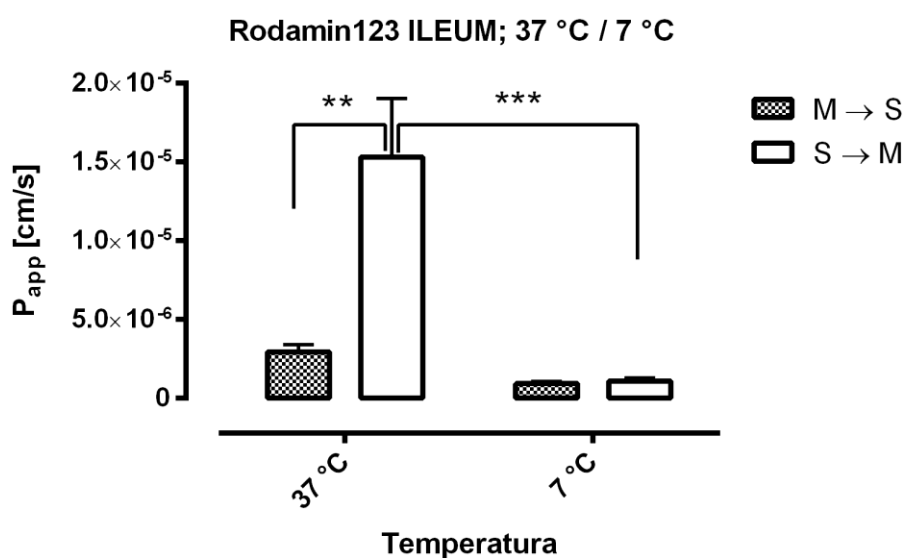
4.4.2 P_{app} rodamina 123 pri $T = 7\text{ }^{\circ}\text{C}$

V drugem sklopu poskusov smo na ileumu, ki je od vseh delov črevesja izkazoval najvišjo vrednost navidezne permeabilnosti rodamina 123 v obeh smereh, tako M → S kot S → M, in znaten ER, testirali vpliv znižane temperature na transportne procese rodamina 123. Te vrednosti smo primerjali z osnovnimi P_{app} ileuma pri 37 °C.

Poskus je potekal podobno kot pri začetnem poskusu z rodaminom 123, le da smo tu pred začetkom poskusa nastavili termostat na 0 °C in začeli z meritvijo po dosegu 7 °C, najnižje možne dosežene temperature z omenjenim režimom poskusa. Podroben opis poskusa je v poglavju Materiali in metode. Rezultati so prikazani v Preglednici XII in Sliki 15.

Preglednica XII: Primerjava rezultatov permeabilnosti za rodamin 123 v obeh smereh pri različnih temperaturah.

SUBSTANCA	Rodamin 123 pri 37 °C		Rodamin 123 pri 7 °C	
DEL ČREVESJA	ILEUM		ILEUM	
SMER	M → S	S → M	M → S	S → M
$P_{app} \times 10^{-6}$ [cm/s]	2,94	15,3	0,91	1,08
$SEM \times 10^{-6}$ [cm/s]	0,26	2,15	0,076	0,11
n	3	3	4	4
ER	5,20		1,19	
t-test ($\alpha=0,05$)	z		nz	



14

Slika 15: Primerjava rezultatov permeabilnosti za rodamin 123 v ileumu v obeh smereh pri različnih temperaturah.

4.4.3 P_{app} rodamina 123 s sočasno aplikacijo verapamila

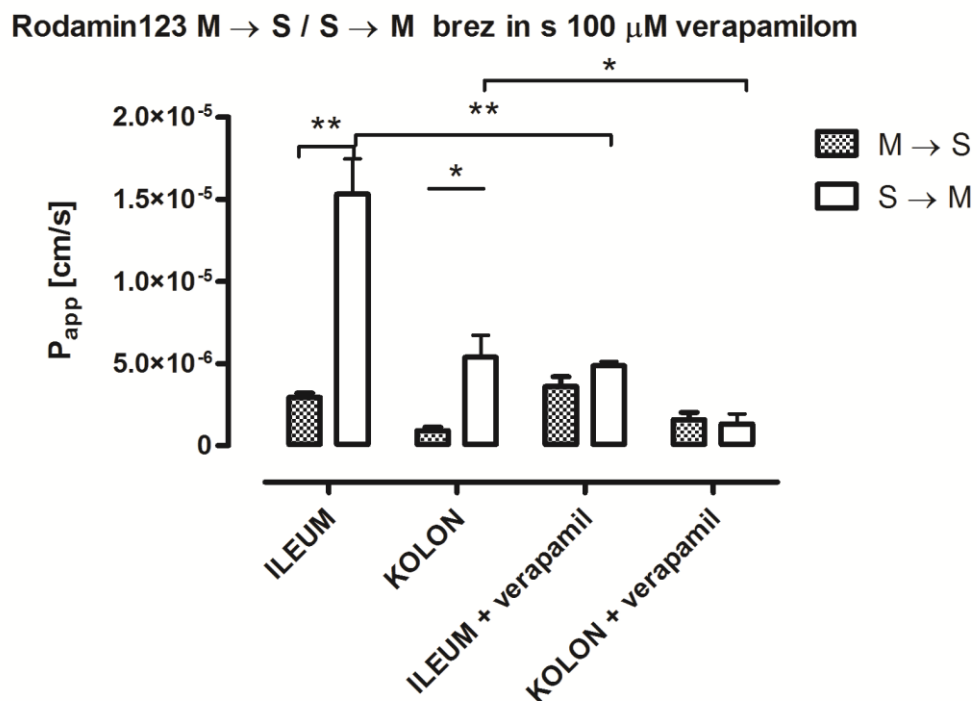
V tretjem sklopu poskusov smo vrednotili vpliv verapamila, inhibitorja P-gp in BCRP, na vrednost navidezne permeabilnosti rodamina 123. Raztopino inhibitorja smo vedno dali na mukozno stran, saj se P-gp sekretorni prenašalec, ki smo ga hoteli inhibirati, nahaja apikalno. Aplicirali smo ga pol ure pred dodatkom rodamina 123, tako da je bil P-gp

¹⁴ *** se nanaša na značilno razliko med skupinama, $p < 0,001$

uspešno inhibiran. Tako kot v prej omenjenem poskusu, smo rodamin 123 aplicirali enkrat na mukozno, drugič na serozno stran. Kljub temu, da smo značilne spremembe pričakovali v smeri $S \rightarrow M$, smo na ta način dosegli dodatno selektivnost inhibitorja in dobili vpogled v morebitne druge vplive verapamila, ki nas v danem poskusu zanimajo manj, recimo inhibicija prenašalcev za privzem spojin v celice (30). Navidezni permeabilnostni koeficienti so v obliki povprečnih vrednosti in standardnih napak predstavljeni v Preglednici XIII in na Sliki 16.

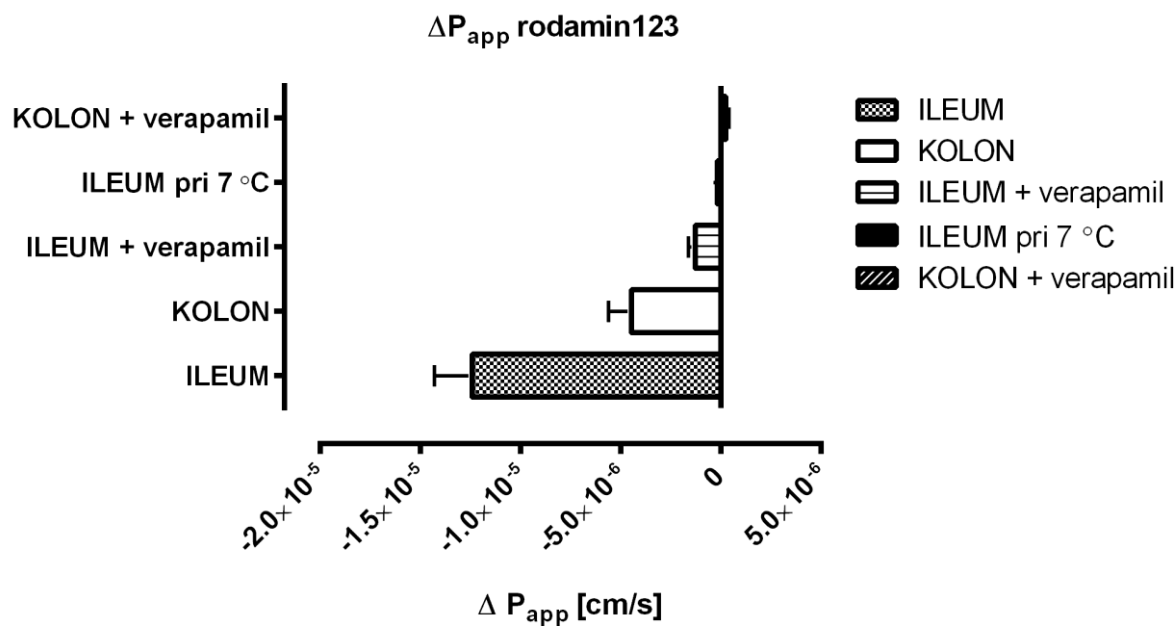
Preglednica XIII: Primerjava rezultatov permeabilnosti rodamina 123 v obeh smereh na ileumu in kolonu brez in s sočasno aplikacijo verapamila.

SUBSTANCA	Rodamin 123				Rodamin 123 + 100 μ M verapamil na M			
	ILEUM		KOLON		ILEUM		KOLON	
SMER	M \rightarrow S	S \rightarrow M	M \rightarrow S	S \rightarrow M	M \rightarrow S	S \rightarrow M	M \rightarrow S	S \rightarrow M
$P_{app} \times 10^{-6}$ [cm/s]	2,94	15,3	0,92	5,38	3,60	4,87	1,58	1,32
SEM $\times 10^{-6}$ [cm/s]	0,26	2,15	0,19	1,33	0,60	0,25	0,44	0,61
n	3	3	3	3	3	3	3	3
ER	5,20		5,85		1,35		0,84	
t-test ($\alpha=0,05$) M \rightarrow S vs M \rightarrow S + verapamil in S \rightarrow M vs S \rightarrow M + verapamil	nz p = 0,38	z p = 0,0085 **	nz p = 0,24	z p = 0,049 *	nz p = 0,38	z p = 0,0085 **	nz p = 0,24	z p = 0,049 *
t-test ($\alpha=0,05$) znotraj istega pogoja in dela črevesja	z		z		nz		nz	



Slika 16: Stolpični grafikon primerjave povprečnih vrednosti navideznih permeabilnostnih koeficientov skupaj s standardno napako za rodamin 123 v ileumu in v kolonu, z in brez dodatka verapamila.

Na Sliki 17 smo prikazali primerjavo razlike med privzemom in eliminacijo v ileumu in v kolonu brez in z dodatkom verapamila ter v ileumu pri $T = 7^\circ\text{C}$



Slika 17: Razlike med P_{app} $M \rightarrow S$ in $S \rightarrow M$ rodamina 123 v ileumu in v kolonu brez in z dodatkom verapamila ter v ileumu pri $T = 7^\circ\text{C}$

4.5 Poskusi z enalaprilatom

4.5.1 Regionalna odvisnost

Zadnji sklop poskusov smo opravili na učinkovini enalaprilatu. Tudi tu so nas zanimala vrednosti navideznih permeabilnosti enalaprilata tako v smeri $M \rightarrow S$ kot v smeri $S \rightarrow M$ v vseh delih izoliranega črevesja podgane.

Izvedba serije poskusov je bila enaka kot pri FITC-dekstranu in rodaminu 123; enkrat je bila akceptorska mukozna stran, drugič serozna.

Donorska raztopina je bila:

- na mukozni strani - 10 mM raztopina manitola in raztopina enalaprilata s $C = 163 \mu\text{M}^{15}$ v Ringerjevem pufru $\text{pH} = 7,45$
- na serozni strani - 10 mM raztopina glukoze in raztopina enalaprilata s $C = 163 \mu\text{M}$ v Ringerjevem pufru $\text{pH} = 7,85$

Akceptorska raztopina:

- na mukozni strani - 10 mM raztopina manitola
- na serozni strani - 10 mM raztopina glukoze

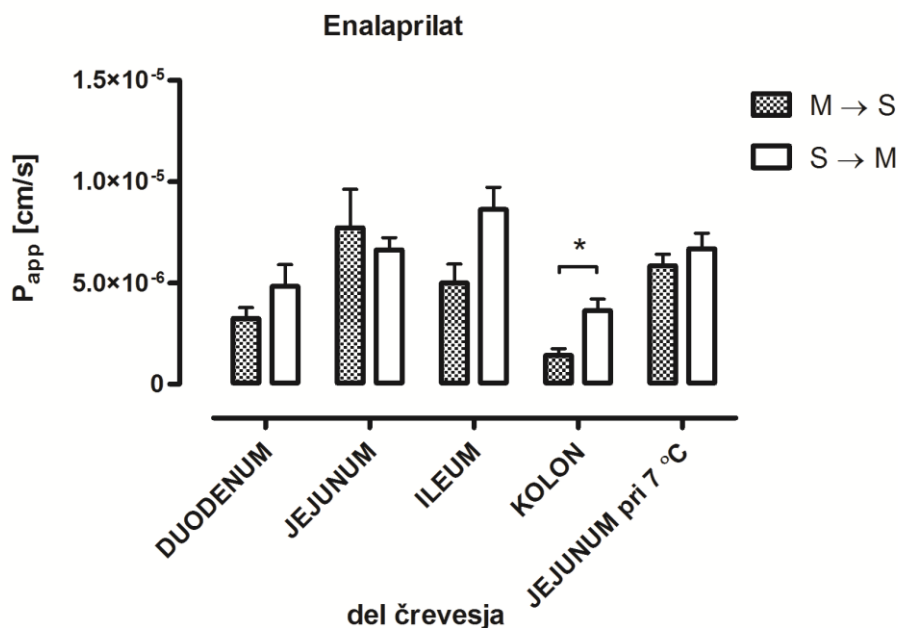
Navidezne permeabilnostne koeficiente (P_{app}) smo v obliki povprečnih vrednosti in njihovih standardnih napak (SEM) prikazali v Preglednici XIV in na Sliki 18.

Preglednica XIV: Združeni rezultati regionalne permeabilnosti enalaprilata v obeh smereh.

SUBSTANCA	Enalaprilat							
	DUODENUM		JEJUNUM		ILEUM		KOLON	
DEL ČREVESJA								
SMER	M → S	S → M	M → S	S → M	M → S	S → M	M → S	S → M
$P_{\text{app}} \times 10^{-6}$ [cm/s]	3,25	4,82	7,71	6,64	5,00	8,62	1,42	3,63
SEM $\times 10^{-6}$ [cm/s]	0,54	1,08	1,91	0,59	0,93	1,09	0,33	0,57
n	3	3	3	4	3	4	4	3
ER	1,48		0,86		1,72		2,56	
ANOVA in Bonferroni-jev „post hoc“ test ($\alpha=0,05$)	značilna razlika med skupinami tako glede na del črevesja kot na smer							
	z	nz	z	nz	nz	nz	nz	nz
t-test ($\alpha=0,05$)	nz		nz		nz		z	

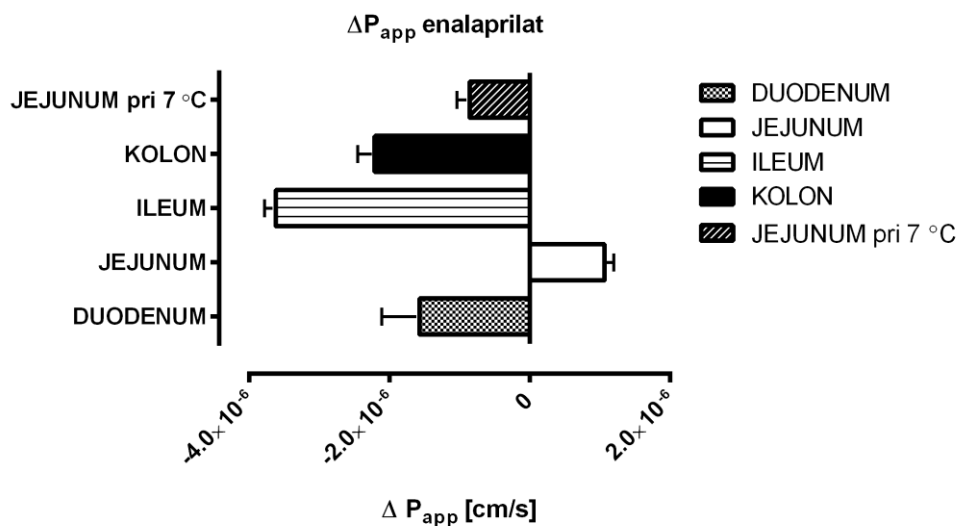
Dvo-stranska ANOVA je pokazala značilno razliko navideznih permeabilnostnih koeficientov v različnih delih črevesja med analiziranimi skupinami ($p < 0,05$). Vendar smo nato z Bonferronijevim »post-hoc« testom značilne razlike v P_{app} dokazali le v absorptivni smeri (M → S) pri primerjavi med duodenumom in jejunumom.

¹⁵ Koncentracija v donorski celici je preračunana glede na maksimalno dnevno dozo, raztopljen v 250 ml medija. Več koncentratov smo si pripravili vnaprej v DMSO. Končna koncentracija DMSO v celici ni presegala 1 %, kar je priporočena zgornja meja DMSO, ki še ne vpliva na vitalnost tkiva in lastnosti membrane.



Slika 18: Stolpični grafikon povprečnih vrednosti navideznih permeabilnostnih koeficientov enalaprilata v posameznih delih podganjega črevesja in v jejunumu pri T = 7 °C.

Na Sliki 19 je prikazana razlika med privzemom in eliminacijo enalaprilata v različnih delih podganjega črevesja in v jejunumu pri T = 7 °C.



Slika 19: Razlike med P_{app} M → S in S → M enalaprilata v različnih delih črevesja podgane in v jejunumu pri T = 7 °C.

4.5.2 P_{app} enalaprilata pri $T = 7\text{ }^{\circ}\text{C}$

V drugem sklopu poskusov smo na jejunumu, ki je od vseh delov črevesja izkazoval najvišjo vrednost navidezne permeabilnosti v absorptivni smeri ($M \rightarrow S$), testirali vpliv znižane temperature na transportne procese enalaprilata. Te vrednosti smo primerjali s P_{app} jejunuma pri $37\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Poskus je potekal podobno kot pri začetnem poskusu z enalaprilatom, le da smo tu pred začetkom poskusa nastavili termostat na $0\text{ }^{\circ}\text{C}$ in začeli z meritvijo po dosegu $7\text{ }^{\circ}\text{C}$, najnižje možne dosežene temperature z omenjenim režimom poskusa. Podroben opis poskusa je v poglavju Materiali in metode. Rezultati so prikazani v Preglednici XV in na Sliki 18. Na Sliki 19 je prikazana razlika med privzemom in eliminacijo enalaprilata v jejunumu pri $7\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Preglednica XV: Primerjava rezultatov permeabilnosti enalaprilata v obeh smereh pri različnih temperaturah.

SUBSTANCA	Enalaprilat pri 37°C		Enalaprilat pri 7°C	
	JEJUNUM		JEJUNUM	
SMER	$M \rightarrow S$	$S \rightarrow M$	$M \rightarrow S$	$S \rightarrow M$
$P_{app} \times 10^{-6}$ [cm/s]	7,71	6,64	5,83	6,69
SEM $\times 10^{-6}$ [cm/s]	1,91	0,59	0,58	0,76
n	3	4	3	3
ER	0,86		1,15	
t-test ($\alpha=0,05$)	nz		nz	

5 RAZPRAVA

Permeabilnostne študije v različnih delih GIT so bistvene pri ugotavljanju mehanizmov absorpcije učinkovin, še posebej, ko sumimo aktivno absorpcijo in/ali eliminacijo, pri načrtovanju formulacij s podaljšanim sproščanjem ter pri vpeljevanju metod *in vitro* (5).

Pri opisovanju privzema in/ali izločanja substanc, vezanega na aktivne procese, bomo govorili o prenašalcih, ki delujejo v absorptivni smeri in prenašalcih, ki delujejo v eliminatorni smeri glede na organizem.

5.1 PAMPA

Najprej smo testirali od pH odvisno permeabilnost substanc s PAMPA-o. S to metodo določimo le vpliv pasivne transcelularne difuzije na celotno vrednost navidezne permeabilnosti. Iz stolpičnega grafikona na Sliki 8 je dobro razvidna nizka permeabilnost vseh preiskovanih substanc v primerjavi s ketoprofenom, ki služi kot standard visoko permeabilne učinkovine. Pri FITC-dekstranu smo zabeležili še posebej nizke vrednosti; to je dokaz zanemarljive pasivne transcelularne permeabilnosti.

Nizke vrednosti smo dobili tudi v primeru enalaprilata. Zaradi nekoliko kislega značaja in posledično večjega deleža neionizirane oblike pri nižjih pH, je P_{app} enalaprilata večji v bolj kislih donorskih medijih, kjer je pasivna difuzija neionizirane oblike večja. Nižji rezultati pri poskusih z enakima pH donorskega in akceptorskega medija pa potrjujejo, da transcelularna difuzija enalaprilata poteka v nasprotni smeri koncentracijskega gradienta (od višje proti nižji koncentraciji), vezanega na od pH odvisen fluks.

5.2 Elektrofiziološki parametri

Med poskusi na izoliranem podganjem črevesju na Sweetana-Grass difuzijskih celicah smo beležili spremembo potenciala (dPe) in transepitelijsko upornost tkiva (TEER). Na koncu poskusa smo dodali 100 μ L 625 mM glukoze. Z absolutno vrednostjo sicer negativnega potenciala nad -1mV in upornostjo nad 12 m Ω , smo potrdili vitalnost in integriteto tkiva do konca poskusa. Sprememba potenciala je bolj pomemben podatek za vitalnost, saj kaže na sposobnost aktivnega prehajanja Na⁺ ionov skozi apikalno membrano črevesnega epitelija. Upornost pa kaže predvsem barierno funkcijo membrane oziroma njeno integriteto (32; 36).

Eno-stranska ANOVA je pokazala statistično značilno razliko v vrednosti TEER v različnih delih podganjega črevesja ($p = 0,0019$). Pri dPe tega zaradi visoke vrednosti SEM nismo dokazali. Tako dPe kot TEER sta primerljiva in dobro ponovljiva v različnih regijah tankega črevesja in dosejata najvišje vrednosti v kolonu. Pogosto je bila opažena slaba vitalnost kolona, torej prenizka vrednost dPe. V primerih vitalnega tkiva je bila vrednost dPe zelo visoka; to pripisujemo simportu Na^+ ionov z molekulami vode, saj je kolon glavno mesto reabsorpcije vode v GIT.

Visoke vrednosti TEER v kolonu so potrditev znatne transcelularne upornosti kolona in sposobnost omejevanja transcelularnega prehoda. To nakazuje na veliko tesnost epitelija in manjšo fluidnost membrane v primerjavi s tankim črevesjem, delom GIT, ki je fiziološko namenjen absorpciji. Glede manjše fluidnosti apikalnih membran sluznice kolona si literaturni viri niso enotni (4).

5.3 FITC-dekstran

Pri permeabilnosti FITC-dekstrana se navidezni permeabilnostni koeficienti v absorptivni ($M \rightarrow S$) v primerjavi z eliminatorno smerjo ($S \rightarrow M$) niso statistično značilno razlikovali, niti med skupinami (dvo-stranska ANOVA), niti znotraj posameznega dela črevesja (t-test). Slednje kaže na primerljiv proces transporta paracelularnega označevalca FITC-dekstrana v obeh smereh, $M \rightarrow S$ in $S \rightarrow M$, ne glede na del črevesja.

Iz regionalnega vidika smo opazili zmanjšan transport v kolonu v primerjavi s tankim črevesjem (Slika 11). Statistično značilne razlike smo dokazali le pri primerjavi P_{app} med duodenumom in kolonom v absorptivni smeri ($M \rightarrow S$). Slednja ugotovitev je posledica histoloških in fizioloških razlik med obema deloma črevesja, ki se kaže predvsem v zmanjšanju absorptivne površine. To je tudi v skladu z našimi predhodnimi meritvami elektrofizioloških lastnosti različnih delov podganjega črevesja (Slika 9, 10); te so pokazale znatno višje vrednosti tako TEER kot dPe v kolonu, v primerjavi s tankim črevesjem.

Trend gibanja vrednosti P_{app} FITC-dekstrana v različnih delih črevesja je primerljiv z literaturnimi podatki (7). Razlika je le v vrednostih P_{app} , saj smo v vseh delih črevesja, še posebej v duodenumu, zabeležili nekoliko višje vrednosti od $3,0 \times 10^{-6}$ cm/s, orientacijske vrednosti, ki kaže na dobro funkcijo tesnih stikov (11). Menimo, da gre za normalne razlike v rezultatih med različnimi laboratoriji, ko gre za delo na živem tkivu. Vrednosti

permeabilnosti FITC-dekstrana ob elektrofizioloških parametrih, ki so nakazovali na nevitalno tkivo, so bile nekoliko višje, predvsem pa bolj variabilne v primerjavi s tistimi, dobljenimi na vitalnem tkivu. Ugotovitev se tudi ujema z namenom uporabe tega označevalca, saj se pri nevitalnem tkivu in tkivu s poslabšano barierno funkcijo, FITC-dekstran absorbira tudi paracelularno, zato je permeabilnost višja.

S PAMPO smo dokazali zelo majhen prispevek pasivne transcelularne difuzije na celokupno navidezno permeabilnost FITC-dekstrana. Zaradi visoke molske mase (in nepoškodovane strukture tesnih stikov) pa ni možen pasivni paracelularni prehod. Ta bi bil mogoč pri mrtvem tkivu, ki ima porušeno strukturo tesnih stikov, vendar smo vse poskuse na črevesju opravili na živem tkivu. Za prevladujoč mehanizem absorpcije predlagamo transcelularno endocitozo. Gre za aktiven proces, ki poteka v obeh smereh in je vezan na absorpcijsko površino (23). To se tudi ujema z našimi rezultati, saj je P_{app} FITC-dekstrana, tako kot površina absorpcije, ki je na voljo, statistično značilno nižja v kolonu glede na tanko črevo. Tudi sicer tanko črevo velja za endocitotsko bolj aktivno.

5.4 Rodamin 123

5.4.1 Regionalna odvisnost

Pri permeabilnosti rodamina 123 smo z dvo-stransko ANOVO ugotovili tako statistično značilen vpliv različnih delov podganjega črevesja kot smer prehoda ($M \rightarrow S$ in $S \rightarrow M$) na vrednost navideznih permeabilnostnih koeficientov. V primerjavi posameznih dveh delov podganjega črevesja z Bonferroni-jevim »post-hoc« testom smo statistično značilno razliko dokazali le med P_{app} dveh skrajnih delov tankega črevesja, duodenumom in ileumom, v eliminatorni smeri. Slednje je v skladu z literaturnimi podatki, saj ti navajajo dvakratno razliko v ekspresiji P-gp med duodenumom in ileumom, v prid ileumu (1).

Pri primerjavi P_{app} po delih črevesja vidimo, da je privzem v različnih delih tankega črevesja nizek in da se bistveno ne spreminja, eliminacija pa v distalni smeri vztrajno raste in doseže najvišjo vrednost v ileumu (Slika 13). To je razvidno tudi iz efluksnih razmerij, ki znašajo 0,93 v duodenumu, 1,87 v jejunumu in 5,20 v ileumu. S tem smo dokazali funkcionalnost P-gp ($ER \geq 1,9$) v vseh delih črevesja razen v duodenumu, ki je edini del črevesja, ki ni kazal statistično značilne razlike v vrednostih P_{app} rodamina 123 v absorptivni smeri glede na eliminatorno. Glede na to, da trend transporta rodamina 123 od

duodenuma do kolona sovpada z naraščujočo ekspresijo P-gp, sklepamo, da je izločanje rodamina 123 vezano predvsem na prenašalec P-gp.

Ileum je del črevesja z najvišjimi vrednostmi P_{app} v obeh smereh, kolon pa ima od vseh delov črevesja največjo vrednost ER. V kolonu je vrednost P_{app} v obeh smereh bistveno nižja glede na primerjavo z najvišjimi vrednostmi P_{app} v ileumu; v absorptivni smeri za faktor 3,2, v eliminatorni smeri pa za faktor 2,8. Slednje je najverjetneje povezano z manjšo nagubanostjo in manjšim številom resic ter posledično manjšo efektivno absorptivno površino, kar vpliva tako na pasivne kot na aktivne procese, vezane na membranske prenašalce. Poleg tega ima kolon bolj tesen epitelij, kar smo dokazali v začetnih testiranjih elektrofizioloških parametrov (visok TEER) (Slika 9, 10). Opazimo tudi večje zmanjšanje privzema prek pasivne difuzije kot eliminacije prek P-gp, kar se kaže tudi v ER, ki je v kolonu višji kot v ileumu (5,85 oziroma 5,20). Višje absolutne vrednosti P_{app} v ileumu v $S \rightarrow M$ smeri kažejo na večje število efluksnih prenašalcev v primerjavi s kolonom, ki pa relativno izkazuje večje izločanje - višji ER. Razlogov za to je lahko več: možno, da zmanjšanje površine bolj vpliva na pasivne procese kot na aktivne, saj pasivna difuzija poteka preko celotne membrane, aktivno izločanje prek P-gp pa le na dvrhu mikroresic. Možno je tudi, da se ekspresija P-gp v kolonu poviša. Literaturni podatki so v primerjavi ekspresije P-gp med ileumom in kolonom nekonsistentni (1; 14).

5.4.2 P_{app} rodamina 123 pri $T = 7\text{ }^{\circ}\text{C}$

V drugem sklopu poskusov smo na ileumu, ki je izkazoval najvišjo vrednost navidezne permeabilnosti v obeh smereh, in statistično značilno eliminacijo z $ER = 5,20$, testirali vpliv znižane temperature na transportne procese rodamina 123 v obeh smereh. Naš glavni cilj poskusa pri $7\text{ }^{\circ}\text{C}$ je bil ovrednotiti vlogo aktivnega transporta, predvsem na P-gp vezano izločanje, na permeabilnost rodamina 123.

Dobljena vrednost navideznega permeabilnostnega koeficienta rodamina 123 v smeri $M \rightarrow S$ ni bila bistveno drugačna od vrednosti navideznega permeabilnostnega koeficienta pri normalnih pogojih; P_{app} se je znižal iz $2,94 \times 10^{-6}\text{ cm/s}$ na $9,11 \times 10^{-7}\text{ cm/s}$. Menimo, da je omenjeno znižanje P_{app} , prispevek zmanjšane fluidnosti membrane pri $7\text{ }^{\circ}\text{C}$, kar lahko nekoliko zniža permeabilnost. S tem smo potrdili, da privzem rodamina 123 pri koncentraciji $10\text{ }\mu\text{M}$ ne poteka aktivno, temveč s transcelularno pasivno difuzijo. To je tudi v skladu z literaturnimi podatki, ki kot odgovornega za absorpcijo rodamina 123 pri

koncentracijah $< 2 \mu\text{M}$ navaja prenašalec OATP1. Pri višjih koncentracijah substrata naj bi prišlo do nasičenosti omenjenega prenašalca, mehanizem transporta pa pasivna difuzija (26).

Dobljena vrednost navideznega permeabilnostnega koeficienta rodamina 123 v smeri $S \rightarrow M$ pri 7°C je znašala $1,08 \times 10^{-6} \text{ cm/s}$, kar je značilno (15-krat) nižja vrednost v primerjavi z izločanjem pri standardnih pogojih (Slika 15). S poskusom smo dokazali pomemben prispevek aktivnega transporta k eliminaciji rodamina 123 in funkcionalnost P-gp. Dober pokazatelj inhibicije vsakršnega aktivnega transporta je padec efluksnega razmerja (ER). V našem primeru pade iz 5,20 na 1,19, torej se permeabilnostna koeficienta, izmerjena v različnih smereh, praktično izenačita.

Dodaten razlog padca P_{app} bi lahko bila adsorpcija na stene celic in tkivo, vendar je ta vpliv zaradi upoštevanja tako donorske kot akceptorske koncentracije pri izračunu, izničen.

5.4.3 P_{app} rodamina 123 s sočasno aplikacijo verapamila

V tretjem sklopu poskusov z rodaminom 123 smo na ileumu in kolonu, deloma podganjega črevesja z najvišjima vrednostima P_{app} rodamina 123 v eliminatorni smeri, dodali raztopino P-gp in BCRP inhibitorja verapamila s koncentracijo $100 \mu\text{M}$.

V absorptivni smeri se je P_{app} rodamina 123 po dodatku verapamila tako v ileumu kot v kolonu nekoliko povečal, vendar statistično neznačilno v primerjavi s P_{app} brez dodatka inhibitorja ($p = 0,38$ oz. $p = 0,24$). Sklepamo, da je to povečanje le posledica nekoliko višje intracelularne koncentracije rodamina 123 zaradi zmanjšanega izločanja oziroma interindividualne razlike med testiranimi tkivi.

V eliminatorni smeri je dodatek $100 \mu\text{M}$ verapamila tako v ileumu kot v kolonu statistično značilno znižal P_{app} rodamina 123, v ileumu za trikrat, iz $15,3 \times 10^{-6} \text{ cm/s}$ na $4,87 \times 10^{-6} \text{ cm/s}$ ($p = 0,0085$), v kolonu pa za štirikrat iz $5,38 \times 10^{-6} \text{ cm/s}$ na $1,32 \times 10^{-6} \text{ cm/s}$ ($p = 0,0497$). V obeh proučevanih distalnih delih podganjega črevesja se je P_{app} $S \rightarrow M$ skoraj izenačil s P_{app} $M \rightarrow S$ (Slika 16), kar dodatno dokazuje velik pomen P-gp v uravnavanju permeabilnosti slabo permeabilnih substanc, ki so substrati P-gp.

Iz rezultatov je seveda razvidno, da je verapamil učinkovit inhibitor P-gp. Dobili smo podobne rezultate kot pri poskusu inhibicije aktivnega transporta z znižano temperaturo. To nakazuje tudi znaten padec vrednosti efluksnega razmerja; pri ileumu se je znižal iz

5,20 na 1,35, pri kolonu pa iz 5,85 na 0,83. Združeni rezultati ER pri različnih pogojih so prikazani v Preglednici XVI. Tako kot pri ER kolona brez uporabe verapamila kot inhibitorja tudi tu sklepamo na povišano ekspresijo ali pa vsaj povišano aktivnost P-gp v kolonu glede na ileum, saj se je P_{app} v kolonu v eliminatorni smeri ob inhibiciji z verapamilom znižal bolj kot P_{app} v ileumu.

Pomembno je, da smo za dokaz P-gp eliminacije uporabili rodamin 123, ki je nizko permeabilen substrat in bi ga glede na vrednosti P_{app} lahko uvrstili v BCS III, saj prenašalec na izločanje visoko permeabilnih spojin zaradi hitrega nasičenja skorajda nima vpliva (14). Rodamin 123 je tudi substrat apikalno lociranega BCRP in bazolateralno lociranega MRP1 (18), vendar se je njun vpliv izkazal za zanemarljivega. Glede na lokacijo in funkcijo prenašalca MRP1, bi opazili porast P_{app} v smeri $M \rightarrow S$, glede na BCRP pa povečano izločanje v jejunumu, vendar ne moremo potrditi ne prvega ne drugega. To potrjujejo tudi nekatere druge raziskave. Pri inhibiciji s selektivnim inhibitorjem P-gp PSC833, se je eliminacija spojin, ki so tako P-gp kot BCRP substrati, zmanjšala podobno kot pri inhibiciji z verapamilom, kar kaže na prevladujoč prispevek P-gp (30).

Preglednica XVI: Primerjava vrednosti efluksnih razmerij (ER) rodamina 123 v različnih delih podganjega črevesja brez in z inhibitorjem P-gp 100 μ M verapamilom ter pri 7 °C.

	DUODENUM	JEJUNUM	ILEUM	KOLON
ERrodamin 123	0,932	1,865	5,204	5,847
ERrodamin 123 pri 7°C	/	/	1,190	/
ERrodamin 123 + 100 μ M verapamil na M strani	/	/	1,352	0,833

5.5 Enalaprilat

Določanje navidezne permeabilnosti enalaprilata je bilo poleg težav z vitalnostjo tkiva, ki smo mu bili priča pri testiranju vseh substanc, težavno in časovno zamudno tudi zaradi neugodnih fizikalno-kemijskih lastnosti enalaprilata, ki so oteževale analitski postopek z UPLC-MS metodo.

5.5.1 Regionalna odvisnost

Pri permeabilnosti enalaprilata smo z dvo-stransko ANOVO in z nadaljno obravnavo z Bonferonijevim »post-hoc« testom dokazali značilno razliko med P_{app} duodenuma in jejunuma v absorptivni smeri, z višjo vrednostjo v jejunumu. Slednje se ujema s splošno sprejetim dejstvom, da je absorpcija učinkovin, še posebej slabše permeabilnih z mehanizmom pasivne difuzije, najvišja v jejunumu. V nobenem delu tankega črevesja privzem enalaprilata ni bil znatno višji od eliminacije, še najbolj se je temu približal jejunum; P_{app} v smeri $M \rightarrow S$ je tu znašal $7,71 \times 10^{-6}$ cm/s, ER pa 0,84 (Slika 18). V drugih delih črevesja je bil ER nekoliko nad 1, v kolonu pa kar 2,75, kar nakazuje na prevladujočo eliminacijo enalaprilata v tem delu črevesja. Ker je ER večji od 1,9, lahko sklepamo, da je za eliminacijo testirane spojine, tokrat enalaprilata, v kolonu odgovoren membranski prenašalec.

Tudi pri primerjavi vrednosti P_{app} med eliminatorno in absorptivno smerjo v različnih delih črevesja z dvostranskim t-testom ($\alpha = 0,05$), smo ugotovili statistično značilno razliko le v kolonu, v drugih delih sta primerljivi.

Glede na to, da je enalaprilat nizko permeabilna učinkovina in spada v BCS razred III, so bili rezultati permeabilnosti v vseh delih podganjega črevesja morda višji od pričakovanih in blizu visoko permeabilnim učinkovinam, vendar še vedno v območju nizko permeabilnih učinkovin; P_{app} v jejunumu v smeri $M \rightarrow S$ je znašal $7,71 \times 10^{-6}$ cm/s. V laboratoriju, kjer je delo potekalo, spadajo med visoko permeabilne substance, učinkovine s $P_{app} \geq 11 \times 10^{-6}$ cm/s (11).

5.5.2 P_{app} enalaprilata pri $T = 7 \text{ }^\circ\text{C}$

Ker smo pri testiranju P_{app} enalaprilata v različnih delih podganjega črevesja dobili dokaj visoke vrednosti, smo se na jejunumu, delu črevesja z najvišjo izkazano vrednostjo P_{app} v $M \rightarrow S$ smeri odločili testirati vpliv znižane temperature na transportne procese enalaprilata v obeh smereh. Podobno kot pri rodaminu 123 je bil naš cilj primerjati vrednosti P_{app} pri $7 \text{ }^\circ\text{C}$, temperaturi, pri kateri aktivni procesi ne potekajo, s P_{app} , merjeni pri telesni temperaturi ($T = 37 \text{ }^\circ\text{C}$), in ovrednotiti vlogo aktivnega transporta na celoten transport enalaprilata.

Ugotovili smo zelo primerljive vrednosti v obeh smereh. Tako razlika v absorptivni ($p = 0,40$) kot v eliminatorni smeri ($p = 0,96$) v jejunumu pri $T = 37\text{ °C}$ v primerjavi s $T = 7\text{ °C}$ je bila statistično neznačilna. S tem poskusom smo dokončno potrdili, da so relativno visoke vrednosti P_{app} enalaprilata izključno prispevek pasivnih procesov in ne aktivnega privzema s prenašalci ali endocitozo. Glede na dokaj visoke vrednosti P_{app} , dobljene na poskusih na črevih in nizke vrednosti, dobljene s PAMPO, ki prikaže le prispevek transcelularne difuzije, pri enalaprilatu sklepamo na prevladujočo paracelularno difuzijo. Prisotna je tudi od pH odvisna transcelularna difuzija, vendar v veliko manjši meri.

6 ZAKLJUČEK

Pri meritvah elektrofizioloških parametrov smo ugotovili značilno višje vrednosti transepitelijske električne upornosti (TEER) v kolonu glede na druge dele podganjega črevesja. S tem smo potrdili znatno transcelularno upornost kolona in sposobnost omejevanja transcelularnega prehoda. To nakazuje na veliko tesnost epitelija in manjšo fluidnost celičnih membran epitelija kolona. Pri dPe tega zaradi visoke vrednosti standardne napake nismo dokazali. Pogosto je bila opažena slaba vitalnost kolona, torej prenizka vrednost dPe.

Dokazali smo primerljiv proces transporta FITC-dekstrana v obeh smereh, $M \rightarrow S$ in $S \rightarrow M$, v vseh delih črevesja. Iz regionalnega vidika so vrednosti navideznih permeabilnostnih koeficientov primerljive vzdolž tankega črevesja in višje od P_{app} v kolonu. V vseh delih črevesja, še posebej v duodenumu smo zabeležili nekoliko višje vrednosti od $3,0 \times 10^{-6}$ cm/s, orientacijske vrednosti permeabilnosti, ki kaže na dobro funkcijo tesnih stikov. Glede na to, da smo poskuse opravljali na primerno vitalnem tkivu, to pripisujemo variabilnosti, ko gre za delo na živem tkivu in ne prispevku paracelularnega prehoda zaradi oslABLJENE funkcije tesnih stikov. Zaradi zelo nizkih vrednosti permeabilnosti, dobljenih z metodo PAMPA, kar kaže na zanemarljiv doprinos pasivne transcelularne difuzije k celotni permeabilnosti, in ob upoštevanju dejstva, da gre pri FITC-dekstranu za veliko molekulo, sklepamo na aktiven mehanizem absorpcije s transcelularno endocitozo. To se ujema tudi iz regionalnega vidika, saj smo pri poskusih na čreveh v jejunumu in ileumu, deloma črevesja z najvišjo endocitotsko aktivnostjo, dobili visoke vrednosti P_{app} . Možnost nadaljnjih raziskav je v inhibiciji endocitoze pri nižani temperaturi. S tem bi zanesljiveje opredelili mehanizem transporta FITC-dekstrana in določili prispevek endocitoze na celokupno permeabilnost.

Pri primerjavi P_{app} rodamina 123 v različnih delih črevesja vidimo, da se privzem vzdolž tankega črevesja bistveno ne spreminja, v kolonu se zniža, izločanje pa v distalni smeri vztrajno raste in doseže najvišjo vrednost v ileumu. Ileum je del črevesja z najvišjimi vrednostmi P_{app} v obeh smereh, kolon pa ima od vseh delov črevesja največjo vrednost ER; parameter, ki ravno tako raste v distalni smeri. Tako v ileumu kot v kolonu je privzem statistično značilno različen od eliminacije (t-test). Dokazali smo funkcionalnost P-gp (ER $\geq 1,9$) v vseh delih črevesja razen v duodenumu, kar je v skladu z ravnijo ekspresije P-gp.

S poskusoma pri znižani temperaturi in ob prisotnosti P-gp inhibitorja verapamila, smo v obeh proučevanih distalnih delih podganjega črevesja opazili, da se je prej visoka vrednost P_{app} v $S \rightarrow M$ smeri znižala za več kot faktor 10 in se skoraj izenačila s P_{app} v $M \rightarrow S$ smeri. S tem smo dokazali aktiven mehanizem izločanja rodamina 123 v črevesni lumen. Tako s poskusom z metodo PAMPA kot na čreveh smo dokazali, da privzem poteka prek mehanizma transcelularne pasivne difuzije in da je permeabilnost dokaj nizka. Če bi ga klasificirali po BCS, bi ga uvrstili med nizko permeabilne spojine. Kljub temu, da je rodamin 123 substrat večih prenašalcev, menimo, da je njegovo izločanje vezano predvsem na P-gp, saj se vrednosti navideznih permeabilnostnih koeficientov rodamina 123 vzdolž GIT ujemajo z naraščujočo ekspresijo omenjenega prenašalca. Aktiven mehanizem izločanja prek P-gp tako regulira celoten transport rodamina 123. Da bi dokončno opredelili tudi prispevek drugih prenašalcev, bi bilo smiselno selektivno inhibirati prenašalec P-gp ali BCRP.

Pri enalaprilatu je bil le v jejunumu privzem nekoliko višji od eliminacije. Ugotovili pa smo značilno večji transport v smeri $S \rightarrow M$ v kolonu, iz česar lahko sklepamo na aktivno eliminacijo v tem delu črevesja.

Glede na to, da je enalaprilat nizko permeabilna substanca in spada v BCS razred III, so bili rezultati permeabilnosti v vseh delih podganjega črevesja višji od pričakovanih, saj so blizu visoko permeabilnim učinkovinam. Ker so bili relativno visoki rezultati P_{app} enalaprilata pri normalni temperaturi primerljivi rezultatom pri 7 °C, lahko zaključimo, da so visoke vrednosti izključno prispevek pasivnih procesov. Glede na nizke rezultate PAMPE in razmeroma visoke vrednosti P_{app} na črevesju, pri enalaprilatu sklepamo na prevladujoč mehanizem absorpcije s paracelularno pasivno difuzijo. Prispevek transcelularne difuzije je majhen, a višje vrednosti P_{app} enalaprilata v donorskih medijih z nižjim pH nakazujejo, da je difuzija od pH odvisna in da je večja pri nižjih pH, kjer je tudi delež enalaprilata v neionizirani obliki večji.

7 LITERATURA

1. Cao X, Gibbs ST, Fang L et al. Why is it Challenging to Predict Intestinal Drug Absorption and Oral Bioavailability in Human Using Rat Model. *Pharmaceutical Research* 2006. 23(8): 1675-1685
2. Shargel L, Wu-Pong S, Yu A. *Applied Biopharmaceutics and Pharmacokinetics*, 5. izdaja : The McGraw-Hill, Inc., 2004
3. Berne RM, Levy MN, Koeppen BM, Stanton BA. *Physiology*, 3. izdaja. St. Louis : Mosby, 2005
4. Masaoka Y, Tanaka Y, Kataoka M, Sakuma S, Yamashita S. Site of drug absorption after oral administration: Assessment of membrane permeability and luminal concentration of drugs in each segment of gastrointestinal tract. *European Journal of Pharmaceutical Sciences* 2006. 29: 240-250
5. Ungell AL, Nylander S, Bergstrand S et al. Membrane transport of drugs in different regions of the intestinal tract of the rat. *Journal of Pharmaceutical Sciences* 1998. 87 (3): 360-365
6. Waterbeemd H van de, Lennernäs H, Artursson P. *Drug Bioavailability: Estimation of Solubility, Permeability, Absorption and Bioavailability*. Weinheim : Wiley-VCH, 2003
7. Lacombe O, Woodley J, Solleux C. Localisation of drug permeability along the rat small intestine, using markers of the paracellular, transcellular and some transporter routes. *European Journal of Pharmaceuticam Sciences* 2004. 23: 385-391
8. Eckhardt ER, van Erpecum KJ, de Smet MB et al. Lipid solubilization in human gallbladder versus hepatic biles. *Journal of Hepatology* 1999. 31(6): 1020-1025
9. El-Kattan A, Hurst S, Loi CM. Impact of physiological, physicochemical and biopharmaceutical factors in absorption and metabolism mechanisms on the drug oral bioavailability of rats and humans. *Expert Opinion in Drug Metabolism and Toxicology* 2007. 3(4): 469-489
10. Mannhold R, Kubinyi H, Folkers G. *Prodrugs and Targeted Delivery: Towards Better ADME Properties*. Weinheim : Wiley-VCH, 2011
11. Peternel L, Kristan K, Petruševska M et al. Suitability of isolated rat jejunum model for demonstration of complete absorption in humans for BCS-based biowaiver request. *Journal of Pharmaceutical Sciences* 2012. 101(4): 1436-1449

12. Lennernäs H. Animal data: The contributions of the Ussing Chamber and perfusion systems to predicting human oral drug delivery "in vivo". *Advanced Drug Delivery Reviews* 2007. 59: 1103-1120
13. Gotoh Y, Kamada N, Momose D. The Advantages of the Ussing Chamber in Drug Absorption Studies. *Journal of Biomolecular Screening* 2005. 517-523
14. Dahan A, Amidon GL. Segmental Dependent Transport of Low Permeability Compounds along the Small Intestine Due to P-Glycoprotein: The Role of Efflux Transport in the Oral Absorption of BCS Class III Drugs. *Molecular Pharmaceutics* 2008 6(1): 19-28
15. Dahan A, West BT, Amidon GL. Segmental-dependent membrane permeability along the intestine following oral drug administration: Evaluation of a triple single-pass intestinal perfusion (TSPiP) approach in the rat. *European Journal of Pharmaceutical Sciences* 2009. 36: 320-329
16. Löbenberg R, Amidon GL. Modern bioavailability, bioequivalence and biopharmaceutics classification system. New scientific approaches to international regulatory standards. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* 2000. 50: 3-12
17. http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Scientific_guideline/2009/09/WC500003011.pdf. (20.1.2013)
18. Chan LMS, Lowes S, Hirst BH. The ABCs of drug transport in intestine and liver: efflux proteins limiting drug absorption and bioavailability. *European Journal of Pharmaceutical Sciences* 2004. 21: 25-51
19. DeSesso JM, Jacobson CF. Anatomical and physiological parameters affecting gastrointestinal absorption in humans and rats. *Food Chem Toxicol* 2001. 39 (3): 209-228
20. Endres CJ, Hsiao P, Chung FS et al. The role of transporters in drug interactions. *European Journal of Pharmaceutical Sciences* 2006. 27: 501-517
21. Stenberg P, Bergström CAS, Luthman K et al. Theoretical predictions of drug absorption in drug discovery and development. *Clin Pharmacokinet* 2002. 41: 877-899
22. Jungmann P, Wilhelmi M, Oberleithner H et al. Bradykinin does not induce gap formation between human endothelial cells. *European Journal of Physiology* 2008. 1007-1016
23. Sanderson IR, Walker WA. *Development of the Gastrointestinal Tract*. Ontario: B.C. Decker Inc., 1999

24. http://www.nature.com/clpt/journal/v75/n1/fig_tab/clpt20042f1.html. (16.1.2013)
25. Vaslin A, Puyal J, Borsello T et al. Excitotoxicity-related endocytosis in cortical neurons. *Journal of Neurochemistry* 2007. 102: 789-800
26. Forster S, Thumser AE, Hood SR. Characterization of Rhodamin-123 as a Tracer Dye for Use in "In vitro" Drug Transport Assay. *Plos one* 2012. 7(3)
27. Lemke TL, Williams DA, Roche VF et al. *Foye's Principles of Medicinal chemistry*, 6. izdaja. Baltimore: Lippincott Williams & Wilkins, 2013
28. Friedman DI in Amidon GL. Passive and carrier-mediated intestinal absorption components of two angiotensin converting enzyme (ACE) inhibitor prodrugs in rats: Enalapril and Fosinopril. *Pharmaceutical Research* 1989. 6(12): 1043-1047
29. Chen X, Murawski A, Patel K. A Novel design of Artificial Membrane for Improving the PAMPA Model. *Pharmaceutical Research* 2008. 25(7): 1511-1520
30. Šenica P, Temova B. *Intestinalna absorpcija imatiniba in njegov aktivni transport s prenašalci P-gp, BCRP in OCT1 v eliminatorni smeri "in vitro"*. Raziskovalna naloga, Univerza v Ljubljani, Fakulteta za farmacijo, 2011
31. Brunton VG, MacPherson IRJ, Frame MC. Cell adhesion receptors, tyrosine kinases and actin modulators: a complex three-way circuitry. *Biochim Biophys Acta* 2004. 1692: 121-144
32. TT, Kararli. Comparison of the gastrointestinal anatomy, physiology, and biochemistry of humans and commonly used laboratory animals. *Biopharm Drug Dispos* 1995.16: 351-380
33. Martinez MN, Amidon GL. A mechanistic approach to understanding the factors affecting drug absorption: a review of fundamentals. *J Clin Pharmacol* 2002. 42: 620-643
34. Jackson MJ, Williamson AM, Dombrowski WA. Intestinal transport of weak electrolytes: Determinants of influx at the luminal surface. *J Gen Physiol* 1978. 71: 301-327
35. Boggiano BG, Gleeson M. Gastric acid inactivation of erythromycin stearate in solid dosage forms. *J Pharm Sci* 1976. 65: 497-502
36. Frau J, Coll M, Donoso J et al. Alkaline and acidic hydrolysis of the b-lactam ring. *Electronic Journal of Theoretical Chemistry* 2001. 2: 56 - 65