



KARMEN KNAP

**DOLOČANJE AKTIVNOSTI PRENAŠALCA PEPT1 V RAZLIČNIH  
REGIJAH ČREVESA PODGANE *IN VITRO* NA OSNOVI  
PERMEABILNOSTI ACIKLOVIRJA IN VALACIKLOVIRJA**

**DETERMINATION OF THE *IN VITRO* PEPT1 ACTIVITY IN  
DIFFERENT REGIONS OF THE RAT INTESTINE ON THE BASIS  
OF ACYCLOVIR AND VALACYCLOVIR PERMEABILITY**

Diplomsko naložbo sem opravljala na Katedri za biofarmacijo in farmakokinetiko na Fakulteti za farmacijo pod mentorstvom doc. dr. Simona Žaklja.

## **ZAHVALA**

- Mentorju, doc. dr. Simonu Žaklju, za nasvete in strokovno pomoč pri izdelavi diplomske naloge.
- Nevenki za pomoč pri izvedbi poskusov.
- Družini, Alenu in prijateljem, ki so mi tekom študija stali ob strani.

## **IZJAVA**

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

Karmen Knap

Ljubljana, 2014

Predsednik diplomske komisije:izr. prof. dr. Marko Anderluh

Članica diplomske komisije: doc. dr. Pegi Ahlin Grabnar

# VSEBINA

|  |            |
|--|------------|
| <b>POVZETEK.....</b>   | <b>iii</b> |
| <b>ABSTRACT .....</b>  | <b>iv</b>  |
| <b>SEZNAM OKRAJŠAV .....</b>   | <b>v</b>   |
| <b>1. UVOD .....</b>   | <b>1</b>   |
| 1.1.    Absorpcija zdravilnih učinkovin .....  | 1          |
| 1.1.1.    Zgradba stene tankega črevesa.....   | 1          |
| 1.1.2.    Zgradba celičnih membran .....   | 2          |
| 1.1.3.    Načini prehoda snovi skozi sluznico tankega črevesa.....                       | 3          |
| 1.2.    Prenašalci.....  | 5          |
| 1.2.1.    Oligopeptidna prenašalca PEPT1 in PEPT2 .....                                  | 6          |
| 1.2.1.1.    Struktura PEPT1 in PEPT2.....  | 6          |
| 1.2.1.2.    Odnos med strukturo substratov in afiniteto do prenašalca oz. prenosom ..... | 7          |
| 1.2.1.3.    Mehanizem transporta .....   | 8          |
| 1.2.1.4.    Izražanje PEPT1 in PEPT2 .....   | 9          |
| 1.3.    Aciklovir in valaciklovir.....   | 10         |
| <b>2. NAMEN DELA .....</b>   | <b>13</b>  |
| <b>3. MATERIALI IN METODE.....</b>   | <b>14</b>  |
| 3.1.    Preiskovane spojine.....   | 14         |
| 3.2.    Spojine za pripravo raztopin, elektrod .....                                     | 14         |
| 3.3.    Topila .....   | 15         |
| 3.4.    Plini.....   | 15         |
| 3.5.    Tkiva.....   | 15         |
| 3.6.    Raztopine .....  | 15         |
| 3.7.    Aparature in pribor .....  | 18         |
| 3.8.    Priprava tkiva za poskus .....   | 19         |
| 3.9.    Postopek dela z dvoprostornimi difuzijskimi celicami .....                       | 20         |
| 3.10.    Ocena vitalnosti tkiva .....  | 21         |
| 3.11.    Analiza vzorcev .....   | 23         |
| 3.11.1.    Določitev koncentracij aciklovirja in valaciklovirja v vzorcih.....           | 23         |
| 3.11.2.    Določitev koncentracije fluoresceina v vzorcih .....                          | 24         |

|           |  |           |
|-----------|--|-----------|
| 3.12.     | Izračun permeabilnostnega koeficiente.....                               | 24        |
| 3.13.     | Statistična obdelava podatkov .....                                      | 26        |
| <b>4.</b> | <b>REZULTATI IN RAZPRAVA .....</b>                                       | <b>29</b> |
| 4.1.      | Izbor pH raztopine na mukozni strani dvoprostorne difuzijske celice..... | 29        |
| 4.2.      | Permeabilnost aciklovirja.....   | 30        |
| 4.3.      | Permeabilnost valaciclovirja.....  | 32        |
| 4.4.      | Aktivnost prenašalca PEPT1 v različnih segmentih črevesa podgane .....   | 35        |
| <b>5.</b> | <b>SKLEPI .....</b>  | <b>41</b> |
| <b>6.</b> | <b>VIRI IN LITERATURA .....</b>  | <b>42</b> |

## **POVZETEK**

Absorpcija zdravil, apliciranih peroralno, navadno poteka v tankem črevesu. Transcelularni transport učinkovin lahko olajšajo prenašalni proteini, ki se nahajajo v membrani celic, saj njihova specifičnost ni omejena le na njihove fiziološke substrate. PEPT1 je oligopeptidni prenašalec, ki se nahaja v sluznici tankega črevesa in kot vir energije uporablja gradient protonov. Poleg oligopeptidov, ki izvirajo iz hrane, prenaša tudi nekatere zdravilne učinkovine s strukturo, podobno peptidom, kot so npr.  $\beta$ -laktamski antibiotiki, ACE-inhibitorji in predzdravila nukleozidov (npr. valaciklovir).

Z namenom določitve aktivnosti PEPT1 v posameznih regijah črevesa podgane smo določili permeabilnost protivirusne učinkovine aciklovirja in njegovega predzdravila valaciklovirja, ki je znani substrat PEPT1, v absorptivni in eliminatorni smeri skozi izolirane segmente črevesa podgane v dvoprostornih difuzijskih celicah *in vitro*. Za določitev aktivnosti PEPT1 smo nato uporabili dve metodi. Po prvi metodi smo primerjali permeabilnost valaciklovirja v absorptivni in eliminatorni smeri, po drugi pa smo permeabilnost aciklovirja uporabili kot oceno pasivne komponente difuzije valaciklovirja in tako določili, koliko k njegovi permeabilnosti v absorptivni smeri prispeva aktivni prenos s PEPT1.

Potrdili smo, da se valaciklovir v jejunumu in ileumu absorbira aktivno s pomočjo prenašalcev. Razlika med permeabilnostnima koeficientoma valaciklovirja v absorptivni in eliminatorni smeri v duodenumu ni bila statistično značilna, domnevamo da zaradi sočasnega aktivnega transporta v eliminatorni smeri. Permeabilnost valaciklovirja v kolonu je bila majhna in primerljiva s permeabilnostjo aciklovirja, saj se PEPT1 v kolonu ne izraža oziroma je tam izražen v manjši meri. Potrdili smo tudi, da sta aciklovir in valaciklovir podobna glede pasivne difuzije. Največjo aktivnost prenašalca PEPT1 smo določili v področju jejunuma in ileuma, najmanjšo pa v kolonu. Določeno aktivnost PEPT1 smo primerjali tudi z izražanjem njegovega gena Slc15a1 v različnih predelih črevesa podgane istega seva iste vzrejne organizacije ter ocenili, da je korelacija med njima dobra.

**Ključne besede:** permeabilnostni koeficient, aktivnost, PEPT1, valaciklovir, aciklovir

## ABSTRACT

The main site of absorption of orally administered drugs is the small intestine. Transport proteins in cell membranes can facilitate transcellular transport of drugs because their specificity is not limited only to their physiological substrates. PEPT1 is such an oligopeptide transporter located in the small intestine mucosa. It uses proton gradient as a driving force. Beside of oligopeptides derived from food PEPT1 can transport certain drugs with peptide-like structure, for example  $\beta$ -lactam antibiotics, ACE-inhibitors and nucleoside prodrugs (valacyclovir).

Our aim was to determine the »*in vitro*« activity of PEPT1 in various regions of the rat intestine. We determined the permeability of antiviral drug acyclovir and its prodrug valacyclovir, which is a known substrate of PEPT1, in absorptive and eliminatory direction through isolated segments of rat intestine in side-by-side diffusion chambers *in vitro*. We used two methods for the determination of PEPT1 activity. The first method was a comparison of the permeability of valacyclovir in the absorptive and in the eliminatory direction. The second method was based on a presumption that the permeability of acyclovir can be used to estimate the passive component of diffusion of valacyclovir. Thus we determined how much does the active transport with PEPT1 contribute to the permeability of valacyclovir in the absorptive direction.

We confirmed that valacylovir is absorbed actively with transporters in the jejunum and in the ileum. We assume that the difference between valacyclovir permeability coefficients in the absorptive and the eliminatory direction in duodenum was not statistically significant due to concomitant active transport in the eliminatory direction. The permeability of valacyclovir in the colon was low and comparable to the permeability of acyclovir, because PEPT1 is not expressed in the colon or it is expressed to a far lesser extent. We also confirmed that acyclovir and valacyclovir are comparable regarding the passive diffusion. The highest activity of PEPT1 transporter was determined in the jejunum and in the ileum and the lowest in the colon. We compared this activity with the expression of gene Slc15a1 which is coding for PEPT1 in different regions of the rat intestine from the animals of the same strain and from the same breeding facility and assessed that the correlation between the activity and the expression is good.

**Key words:** permeability coefficient, activity, PEPT1, valacyclovir, acyclovir

## SEZNAM OKRAJŠAV

|                  |   |
|------------------|---|
| ABC              | družina prenašalcev, ki vežejo ATP (ang: <i>ATP-binding cassette</i> )  |
| ACE              | encim angiotenzinska konvertaza (ang: <i>angiotensin-converting enzyme</i> )  |
| ATP              | adenozin trifosfat (ang. <i>adenosine triphosphate</i> )  |
| BCRP             | prenašalec povezan z rezistenco raka dojke (ang. <i>breast cancer resistance protein</i> )  |
| Caco-2           | celična linija iz človeškega raka kolona (ang. <i>human colon adenocarcinoma cells</i> )  |
| cDNA             | komplementarna DNA (ang. <i>complementary DNA</i> )   |
| CHO              | ovarijske celice kitajskega hrčka (ang. <i>Chinese hamster ovary cells</i> )  |
| DNA              | deoksiribonukleinska kislina (ang. <i>deoxyribonucleic acid</i> )   |
| ER               | razmerje med $P_{app}$ v smeri S→M in $P_{app}$ v smeri M→S (ang. <i>efflux ratio</i> )   |
| HeLa             | rakave celice materničnega vratu; ime HeLa so dobile po pacientki, iz katere so jih izolirali (ang. <i>uterine cervical carcinoma cells</i> ) |
| HPLC             | tekočinska kromatografija visoke ločljivosti (ang. <i>high-performance liquid chromatography</i> )  |
| HPT1             | človeški oligopeptidni prenašalec 1 (ang. <i>human peptide transporter 1</i> )  |
| K <sub>m</sub>   | Michaelis-Mentenova konstanta (ang. <i>Michaelis-Menten constant</i> )  |
| M→S              | smer prehoda skozi steno črevesa z mukozne na serozno stran   |
| MDR2             | protein odgovoren za odpornost na več učinkovin 2 (ang. <i>multidrug resistance protein 2</i> )   |
| mRNA             | informacijska RNA (ang. <i>messenger RNA</i> )  |
| MRP1             | protein povezan z odpornostjo na več učinkovin 1 (ang. <i>multidrug resistance-associated protein 1</i> )                                     |
| N                | število meritev   |
| NSR              | ni statistično značilne razlike   |
| P <sub>app</sub> | permeabilnostni koeficient  |
| PCR              | verižna reakcija s polimerazo (ang. <i>polymerase chain reaction</i> )  |
| PEPT1            | oligopeptidni prenašalec 1 (ang: <i>peptide transporter 1</i> )   |
| PEPT2            | oligopeptidni prenašalec 2 (ang: <i>peptide transporter 2</i> )   |
| PHT1             | peptid/histidin prenašalec 1 (ang: <i>peptide/histidine transporter 1</i> )   |
| PHT2             | peptid/histidin prenašalec 2 (ang: <i>peptide/histidine transporter 2</i> )   |

|     |  |
|-----|--|
| POT | oligopeptidni prenašalec, sklopljen s prenosom protonov (ang: <i>proton-coupled oligopeptide transporter</i> ) |
| RNA | ribonukleinska kislina (ang. <i>ribonucleic acid</i> )   |
| S→M | smer prehoda skozi steno črevesa s serozne na mukozno stran  |
| SEM | standardna napaka povprečja (ang. <i>standard error of mean</i> )  |
| SLC | prenašalec topljencev (ang. <i>solute carrier</i> )  |
| SR  | statistično značilna razlika   |
| TMD | transmembranska domena (ang. <i>transmembrane domain</i> )   |

# 1. UVOD

## 1.1. Absorpcija zdravilnih učinkovin

Zdravilo lahko apliciramo na različne načine in s tem dosežemo lokalni ali sistemski učinek (1). Absorpcija zdravilne učinkovine je definirana kot prehod molekul učinkovine z mesta aplikacije ali mesta absorpcije v sistemski krvni obtok (2). Do absorpcije pride pri vseh načinih aplikacije, razen pri topikalni aplikaciji, kjer zdravilo nanesemo na tarčno tkivo, ter pri intravenski aplikaciji, kjer zdravilo dostavimo neposredno v krvni obtok (3). Absorpcija učinkovine je odvisna od fizikalno-kemijskih lastnosti učinkovine, od farmacevtske oblike in od načina aplikacije (4). V primeru peroralne aplikacije trdne farmacevtske oblike s takojšnjim sproščanjem mora priti najprej do razgradnje farmacevtske oblike in raztopitve učinkovine v prebavnih sokovih, šele nato lahko pride do absorpcije, ki v glavnem poteka v tankem črevesu (duodenumu, jejunumu, ileumu), v manjši meri pa tudi v debelem črevesu (kolonu) in želodcu (5).

### 1.1.1. Zgradba stene tankega črevesa

Stena tankega črevesa je zgrajena iz sluznice (mukoze), podsluznice (submukoze), mišične plasti in seroze, le spodnjo tretjino duodenuma na zunanji strani pokriva adventicija (6). Sluznico tankega črevesa sestavlajo monosloj epitelijskih celic, lamina propria ter vzdolžna in krožna plast gladkih mišičnih celic. Podsluznica in sluznica tvorita krožne gube. Visoko število črevesnih resic (20–40 na 1 m<sup>2</sup>), ki jih tvorita zgubana lamina propria in epitelijske celice, približno 10-krat poveča površino epitelija, ki je na voljo za absorpcijo. Ob bazi črevesnih resic se nahajajo Lieberkühnove kripte, iz katerih izhajajo in se diferencirajo epitelijske celice in sicer: enterociti, Gobletove celice, Panethove celice, enteroendokrine celice, celice M (5, 7). Enterociti so odgovorni za absorpcijo nutrientov in zdravilnih učinkovin v tankem črevesu. So polarizirani – apikalna membrana (v stiku z lumenom) in bazolateralna membrana (v stiku s serozo) se po sestavi razlikujeta (5). Na vsakem enterocitu se na apikalni membrani nahaja okoli 3000 mikrovilov, dolgih približno 1 µm, ki tvorijo ščetkasti obrobek (7). Tu se nahajajo tudi prebavni encimi kot so na primer disaharidaze in peptidaze. Mikrovili povečajo površino, ki je na voljo za absorpcijo, za približno 20-krat (5). Krožne gube in črevesne resice so v ileumu manjše kot v duodenumu in jejunumu (5), v debelem črevesu črevesnih resic ni (6). S tem se tam zmanjša površina,

ki je na voljo za absorpcijo, zato je glavno področje absorpcije tanko črevo (5, 8). Dolžine in površine posameznih segmentov črevesa so zbrane v preglednici I. Molekule morajo pred vstopom iz lumna v enterocit preiti dve plasti. Na površini sluznice se nahaja rahlo kislo mikrookolje (8), nad njim pa je tanka nemešajoča vodna plast, ki lahko predstavlja oviro za absorpcijo lipofilnih molekul. S krčenjem mišične plasti sluznice se uravnava debelina te vodne plasti. Molekule, ki preidejo skozi monosloj epitelijskih celic (njihova apikalna membrana predstavlja glavno oviro za prehod skozi sluznico), se prenesejo v kri in v limfatične žile, ki se nahajajo v lamini propria (5).

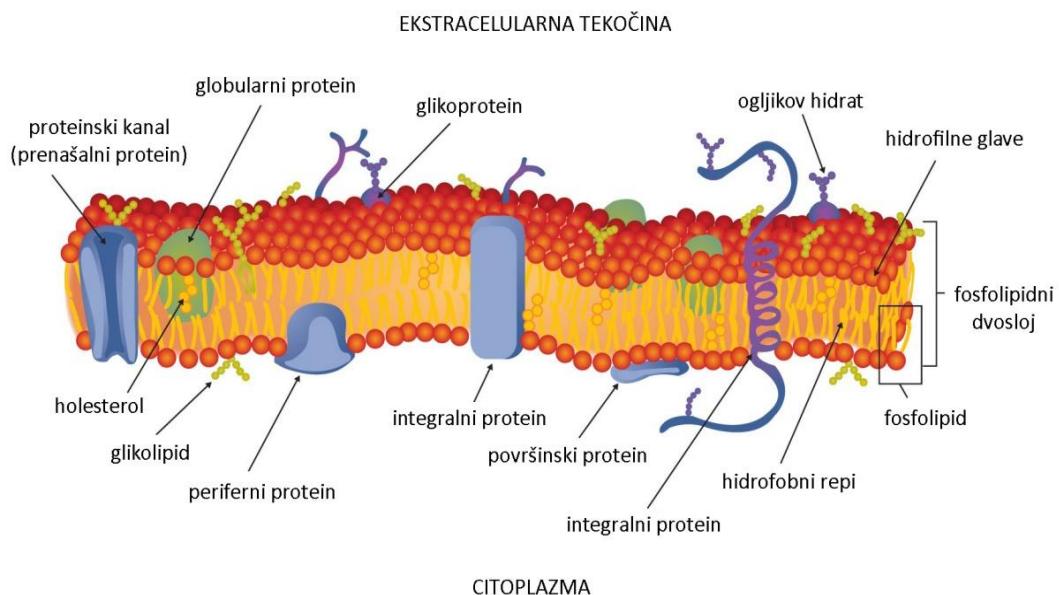
Preglednica I: Dolžina in površina različnih segmentov človeškega črevesa (5).

| segment         | dolžina | površina           |
|-----------------|---------|--------------------|
| duodenum        | 0,35 m  | 1,9 m <sup>2</sup> |
| jejunum         | 2,8 m   | 184 m <sup>2</sup> |
| ileum           | 4,2 m   | 276 m <sup>2</sup> |
| kolon in rektum | 1,5 m   | 1,3 m <sup>2</sup> |

### 1.1.2. Zgradba celičnih membran

Pred vstopom v sistemski krvni obtok mora učinkovina prečkati več polprepustnih celičnih membran. Celične membrane so biološke ovire, ki selektivno zavirajo prehod učinkovin (4). Obdajajo vse celice ter najpomembnejše celične organele (9). Primarno so sestavljene iz lipidov, proteinov in ogljikovih hidratov. Odvisno od lokacije in vloge v telesu lahko lipidi zavzemajo 20–80 % membrane (10). Fosfolipidi so glavna sestavina celičnih membran, tvorijo lipidni dvosloj. S hidrofilno stranjo so obrnjeni k citosolu oziroma zunajcelični tekočini, s hidrofobno stranjo pa stran od njiju. Lipidni dvosloj je polprepusten, skozenj lahko prehajajo le določene molekule. Poleg fosfolipidov je lipidna sestavina membrane tudi holesterol, ki membrano utrdji. Proteine, ki so sestavnji del celične membrane, delimo na integralne proteine, ki prebadajo lipidni dvosloj, in periferne proteine, ki se nahajajo le na eni strani lipidnega dvosloja. Integralni proteini imajo vlogo pri prenosu snovi preko celične membrane. Proteini, ki se nahajajo na notranji površini membrane, so navadno pritrjeni na citoskelet in sodelujejo pri ohranjanju oblike celice in

njene gibljivosti, lahko pa delujejo tudi kot encimi. Proteini na zunanji površini celične membrane so encimi ali receptorji in so lahko vpleteni v celično signalizacijo ter celično prepoznavanje. Na zunanji strani celičnih membran se nahajajo tudi ogljikovi hidrati, ki so pritrjeni na membranske proteine (glikoproteini) ali fosfolipide (glikolipidi), tvorijo pa glikokaliks, ki je vpletен v zaščito celice in celično prepoznavo (9). Zgradba celične membrane je prikazana na sliki 1.

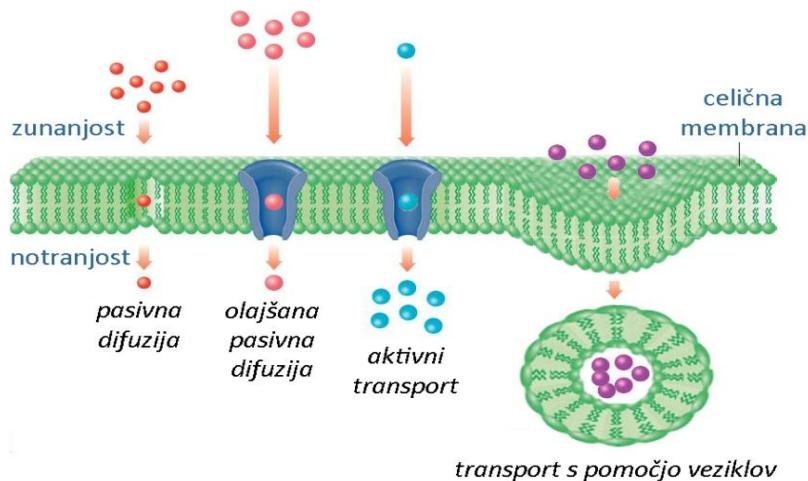


Slika 1: Zgradba celične membrane (prirejeno po 11).

### 1.1.3. Načini prehoda snovi skozi sluznico tankega črevesa

Snov lahko preide sluznico tankega črevesa skozi epitelijsko celico (*transcelularno*) ali med celicami (*paracelularno*).

Paracelularni prehod poteka skozi tesne stike med celicami enterocitov in je pasiven. Ker je površina tesnih stikov le okoli 0,1 % celotne površine, je absorpcija snovi na ta način majhna. Skozi tesne stike lahko prehajajo majhne hidrofilne molekule in ioni (5). Transcelularno lahko snovi prehajajo s pasivno difuzijo, olajšano pasivno difuzijo, aktivnim transportom in s pomočjo veziklov (4). Različni načini prehoda preko celične membrane so prikazani na sliki 2.



Slika 2: Načini prehoda snovi preko celične membrane (prirejeno po 12 in 13).

Pri *pasivni difuziji* snov difundira skozi celično membrano s področja z višjo koncentracijo (npr. prebavni sok) na področje z nižjo koncentracijo (npr. kri). Hitrost prehoda skozi celično membrano je odvisna od koncentracijskega gradiента, lipidotopnosti, velikosti in stopnje ionizacije molekule ter površine, ki je na voljo za prehod (4). Najhitreje difundirajo lipidotopne, majhne in neionizirane molekule kot so npr. steroidi in plina O<sub>2</sub> ter CO<sub>2</sub> (9). Kolikšen delež molekul bo neioniziran, je odvisno od pH okolja in pKa učinkovine. Teoretično se šibke kisline hitreje absorbirajo iz kislega medija kot šibke baze, saj je večji delež molekul neioniziranih (4).

*Olajšana pasivna difuzija* je vrsta pasivnega transporta, pri kateri snov prečka celično membrano s pomočjo posebnih integralnih proteinov, ki delujejo kot prenašalni proteini ali pa oblikujejo kanalčke (9). Na ta način se pospeši prenos snovi, ki s pasivno difuzijo prehajajo prepočasi. Prenos snovi poteka s področja z višjo koncentracijo na področje z nižjo koncentracijo. Z olajšano pasivno difuzijo prehajajo npr. glukoza, natrijevi, kloridni in bikarbonatni ioni (12, 14).

Pri *aktivnem transportu* prehaja snov s področja z nižjo koncentracijo na področje z višjo koncentracijo. Prenos poteka s pomočjo prenašalnih proteinov. Protein veže molekulo substrata na eni strani membrane, spremeni obliko in jo sprosti na drugi strani, pri tem pa se rabi energija (9). Prenos je selektiven in omejen na snovi s podobno strukturo kot jo imajo endogeni substrati kot so npr. vitamini, aminokisline in sladkorji (4).

S pomočjo *veziklov* lahko prehajajo tudi večje molekule kot so npr. proteini, polisaharidi in nukleotidi. Pri *endocitozi*, kjer gre za prenos snovi v celico, se celična membrana uviha in zajame tekočino ali delce na zunanjji strani membrane. Pri tem se tvori vezikel, ki se pomakne v notranjost celice. Pri *eksocitozi*, kjer gre za transport snovi iz celice, pa se v notranjosti celice tvori vezikel, ki se nato pomakne proti celični membrani, se z njo združi in sprosti vsebino iz celice (9). Za prenos je potrebna energija (4).

## 1.2. Prenašalci

Prenašalci so membranski proteini, katerih primarna funkcija je olajšati pretok molekul (npr. aminokislin, sladkorjev, nukleotidov, vitaminov) v in izven celice ter zaščititi telo pred toksini. Specifičnost ni omejena le na njihove fiziološke substrate, prepozna jo lahko tudi ksenobiotike, npr. zdravilne učinkovine (15). Prenašalci lahko vplivajo na biorazpoložljivost, terapevtsko učinkovitost in farmakokinetiko različnih učinkovin. Vključeni so v absorpcijo, izločanje in toksično delovanje zdravil ter v interakcije med njimi (16). Večina prenašalcev se izraža v tkivih, ki imajo funkcijo bariere (npr. v jetrih, ledvicah, prebavnem sistemu, placenti, možganih). V večini primerov je izražanje prenašalcev iste vrste omejeno na eno stran celice – apikalno ali bazolateralno. To je pomembno za usklajen prenos molekul v eno smer (15).

Glede na smer, v katero prenašajo substrate preko membrane, delimo prenašalce na prenašalce za privzem in prenašalce za izmet. S farmakodinamskega in farmakokinetičnega vidika jih delimo na absorptivne in sekretorne prenašalce. Absorptivni prenašalci prenašajo substrate v sistemski krvni obtok, sekretorni prenašalci pa prenašajo substrate iz sistemskega krvnega obtoka v žolč, urin ali lumen prebavil. Z molekularnega in mehanističnega vidika lahko prenašalce razporedimo v ABC ali SLC naddružino prenašalcev (15). ABC prenašalci (*ATP-binding cassette transporters*) so membranski prenašalni proteini, ki za svoje delovanje potrebujejo hidrolizo ATP. So primarni aktivni prenašalci (15, 16). Najbolj preučene družine prenašalcev iz te naddružine so MDR (*multidrug resistance protein*), MRP (*multidrug resistance-associated protein*) in BCRP (*breast cancer resistance protein*). Nekateri SLC prenašalci (*solute carrier*) za prenos substratov izkoriščajo razliko v njihovem elektrokemijskem potencialu, to je »facilitiran« transport. Nekateri izkoriščajo gradient ionov (npr.  $H^+$  ali  $Na^+$ ) preko membran, ki jih ustvarijo primarni aktivni prenašalci. To so sekundarni aktivni prenašalci. Večina

prenašalcev, ki prenaša zdravilne učinkovine v absorptivni smeri, spada v naddružino SLC prenašalcev. Mednje spada tudi družina oligopeptidnih prenašalcev, katere člani so PEPT1, PEPT2, PHT1 in PHT2 (15).

Oligopeptidni prenašalci imajo pomembno vlogo pri absorpciji dušik vsebujočih spojin iz prebavnega trakta, saj so te v veliki meri v obliki manjših di- in tripeptidov (15). Pred absorpcijo proteinov pride v prebavnem traktu do njihove razgradnje na proste aminokisline in manjše peptide. Absorpcija poteka skozi absorptivne epitelijske celice, ki obdajajo površino vilijev tankega črevesa (17). Pasivna transcelularna permeabilnost za aminokisline in peptide je omejena z njihovim nabojem in hidrofilnostjo, paracelularna difuzija pa je omejena zaradi velikosti in naboja (15). Aminokisline se absorbirajo s pomočjo aminokislinskih prenašalcev, di- in tripeptidi pa s pomočjo oligopeptidnih prenašalcev. Oligopeptidni prenašalci lahko prenašajo di- in tripeptide z različno molekulsko maso in nabojem, ne morejo pa prenašati prostih aminokisin in peptidov s štirimi ali več peptidnimi vezmi (16, 17). Poleg oligopeptidov, ki izvirajo iz hrane, lahko prenašajo tudi nekatere zdravilne učinkovine s strukturo, podobno peptidom, kot so npr.  $\beta$ -laktamski antibiotiki, ACE-inhibitorji, predzdravila L-dope, predzdravila nukleozidov (valaciclovir), bestatin (8, 15, 17, 18). V enterocitih je večina di- in tripeptidov podvržena nadaljnji hidrolizi s citoplazemskimi peptidazami do aminokisin, ki zapustijo enterocite s pomočjo različnih bazolateralnih aminokislinskih prenašalcev (8).

### **1.2.1. Oligopeptidna prenašalca PEPT1 in PEPT2**

PEPT1 in PEPT2 spadata v družino POT prenašalcev (*proton-coupled oligopeptide transporter*), ki za prenos substratov kot vir energije uporabljajo gradient protonov in negativni membranski potencial, ki se generirata s pomočjo primarnih prenašalcev. Poleg PEPT1 in PEPT2 spadata v to družino še PHT1 in PHT2 (*peptide/histidine transporter 1 in peptide/histidine transporter*). PEPT1 so najprej klonirali iz zajče intestinalne cDNA knjižnice, PEPT2 pa iz cDNA knjižnice človeških ledvic (8, 15).

#### **1.2.1.1. Struktura PEPT1 in PEPT2**

Vsi člani POT družine prenašalcev imajo 12 transmembranskih domen (TMD), N- in C-terminalna konca se nahajata v celici (15). Pri vseh se med TMD9 in TMD10 nahaja velika zunajcelična zanka (8). PEPT1 je sestavljen iz od 707 do 710 aminokislinskih ostankov,

PEPT2 pa iz 729 aminokislinskih ostankov. Proteina vsebuje večje število potencialnih N-glikozilacijskih in fosforilacijskih mest, kar nakazuje na možnost uravnavanja njunega delovanja preko reverzibilne fosforilacije (8, 18). Homologija aminokislinskih ostankov med PEPT1 in PEPT2 pri določeni vrsti je 50 % (18, 19, 20), medtem ko je homologija zaporedja za isti protein pri različnih vrstah približno 80 % (15, 19). S pomočjo različnih metod, kot so usmerjena mutageneza, izgradnja različnih himer in računalniško modeliranje, so skušali razložiti strukturo PEPT1 in PEPT2. Določili so, da je PEPT1 najverjetneje multimer (8). Fenotipske lastnosti prenašalca (afiniteto, specifičnost, elektrofiziološke parametre in odvisnost od pH) določa prva polovica proteina do TMD9. TMD na N-terminalnem koncu proteina tvorijo strukturo, podobno pori, TMD7 – TMD9 pa vezavno mesto. His57 je vpleten v vezavo protona, tirozinska ostanka na mestu 56 in 64 stabilizirata naboj, His121 pa sodeluje pri prepoznavanju substratov. Aminokislinski ostanki v TMD1, TMD3, TMD5 in TMD7 uravnavajo vezavo substratov (21).

#### ***1.2.1.2. Odnos med strukturo substratov in afiniteto do prenašalca oz. prenosom***

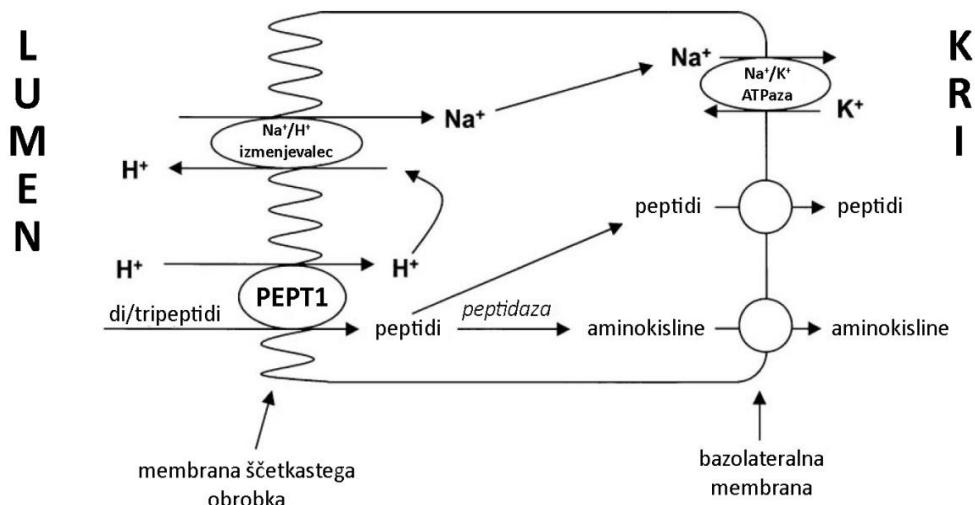
Odnos med strukturo substrata in afiniteto do prenašalca oz. prenosom določajo s pomočjo preučevanja inhibicije in privzema (8), pa tudi z računalniškim modeliranjem (22). PEPT1 je definiran kot prenašalec z nizko afiniteto ( $K_m$  od 200  $\mu\text{M}$  do 10 mM) in visoko kapaciteto, PEPT2 pa kot prenašalec z visoko afiniteto ( $K_m$  od 5  $\mu\text{M}$  do 500  $\mu\text{M}$ ) in nizko kapaciteto (15). Na afiniteto substrata do prenašalca vplivajo konformacija, velikost, naboj, hidrofobnost substrata in fleksibilnost stranske verige.

Tako PEPT1 kot PEPT2 prenašata di- in tripeptide, ne pa aminokislin, tetrapeptidov in cikličnih dipeptidov. Študije so pokazale, da selektivno vežeta in prenašata peptidne derivate v trans konformaciji. PEPT1 ima večjo afiniteto do L-izomerov aminokislin. Dipeptidi z neto nabojem  $>$  ali  $<$  od 0 imajo manjšo afiniteto v primerjavi s strukturno podobnimi ioni dvojčki. Peptidna vez ni nujni strukturni element za prepoznavo substrata. Namesto peptidne vezi je lahko ketometilenska ali tiookso vez, karbonilni kisik v peptidni vezi pa lahko nadomesti žveplo. Karbonilna skupina pri majhnih peptidih in peptidomimetikih je nujni strukturni element za prenos s PEPT1. N-terminalna aminska skupina in C-terminalna karboksilna skupina nista nujna strukturna elementa. Modifikacija  $\alpha$ -aminske skupine zmanjša afiniteto do obeh prenašalcev. Hidrofobnost stranske verige je odločilna za afiniteto. Aminokisline z bolj hidrofobnimi stranskimi verigami imajo višjo

afiniteto do obeh prenašalcev v primerjavi z aminokislinami s hidrofilnimi stranskimi verigami (8). Swaan in Tukker sta z računalniškim modeliranjem pokazala, da bi metilacija in acetilacija karboksilne skupine dipeptidov zmanjšala afiniteto do PEPT1 (22). Afiniteto do PEPT2 poveča prisotnost  $\alpha$ - ali  $\beta$ -aminokarbonilne skupine (15).

### 1.2.1.3. Mehanizem transporta

Tako PEPT1 kot PEPT2 za prenos substratov kot gonilno silo uporablja koncentracijski gradient protonov in negativni notranji membranski potencial.  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPaza in  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  izmenjevalec ustvarjata kislo zunajcelično mikrookolje.  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPaza v bazolateralni membrani ustvarja znotrajcelični negativni membranski potencial in gradient koncentracije  $\text{Na}^+$  preko celične membrane, ki poganja  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  izmenjevalec v apikalni membrani.  $\text{H}^+$  elektrokemijski gradient poganja terciarni aktivni prenos oligopeptidov preko membrane (prikazano na sliki 3) (8).



Slika 3: Celični procesi vključeni v prenos oligopeptidov v enterocit (prirejeno po 23).

Mehanizma prenosa s PEPT1 in s PEPT2 se razlikujeta. Razmerje proton : substrat je odvisno od naboja substrata. Pri PEPT1 je za prenos potreben celokupni nabolj (substrat + proton) +1, pri PEPT2 pa +2. Pri nabitih substratih na afiniteto do prenašalca vpliva zunajcelični pH. Afiniteta anionskih substratov narašča s padanjem pH. Kationski dipeptidi izražajo večjo afiniteto v nevtralnem ali šibko alkalnem pH. V splošnem imajoioni dvojčki brez celokupnega neto naboja v primerjavi z neto nabitimi substrati večjo afiniteto do

vezave in prenosa z oligopeptidnima prenašalcema. Elektrofiziološke analize toka pred doseženim stacionarnim stanjem so pokazale, da se  $H^+$  in substrati vežejo na PEPT1 in PEPT2 v zaporedju, prikazanem na sliki 4. Odkrili so tudi, da lahko PEPT1 prenaša dipeptide v obeh smereh, a ima pri normalnih fizioloških pogojih zunanje vezavno mesto višjo afiniteto do substratov (8).



Slika 4: Zaporedje dogodkov na PEPT1 in PEPT2, predno pride do prenosa substrata. Najprej pride do vezave  $H^+$  in prenašalca, njuna vezava povzroči spremembo afinitete prenašalca do vezave substrata, sledi vezava substrata in nato sočasen prenos substrata in  $H^+$  (8).

#### **1.2.1.4. Izražanje PEPT1 in PEPT2**

Domnevajo, da je PEPT1 primarni oligopeptidni prenašalec v tankem črevesu, ki je odgovoren za absorpcijo manjših peptidov, nastalih pri presnovi proteinov iz hrane. PEPT1 mRNA so odkrili v tankem črevesu zajca, človeka, podgane in miši, prav tako pa so iz tankega črevesa izolirali tudi protein. PEPT1 se izraža v membranah ščetkastega obrobka enterocitov. Izražanje pada vzdolž tankega črevesa – največ ga je v duodenumu, v ileumu ga je manj kot v jejunumu. V kolonu je PEPT1 izražen v manjši meri ali ga pa sploh ni. PEPT1 je izražen tudi v membranah S1 segmentov proksimalnih ledvičnih tubulov, kjer sodeluje pri reabsorpciji oligopeptidov. Manjšo raven PEPT1 mRNA so odkrili tudi v jetrih, trebušni slinavki, pljučih, žolčevodih, jajčnikih, placenti, testisih in prostati (8).

PEPT2 se primarno nahaja v ledvicah in možganih. V ledvicah se izraža v apikalni membrani celic v segmentih S2 in S3 proksimalnih ledvičnih tubulov, v možganih pa v astrocitih, subependimskih in ependimskih celicah in epitelijskih celicah horoidnega pleksusa. Izraža se tudi v pljučih (v epitelijskih celicah bronhijev in pneumocitih tipa II), mišicah, jetrih, srcu, mlečnih žlezah, retini, hipofizi, vranici, krvnih žilah, testisih, prostati, jajčnikih in maternici (8, 15). Vloga PEPT2 v ledvicah je aktivna reabsorpcija oligopeptidov iz primarnega urina. V drugih tkivih ima PEPT2 pomembno vlogo pri

absorpciji in akumulaciji oligopeptidov, sodeluje pa tudi pri homeostazi nevropeptidov ter izločanju oligopeptidov in peptidomimetičnih ksenobiotikov iz možanske tekočine (15).

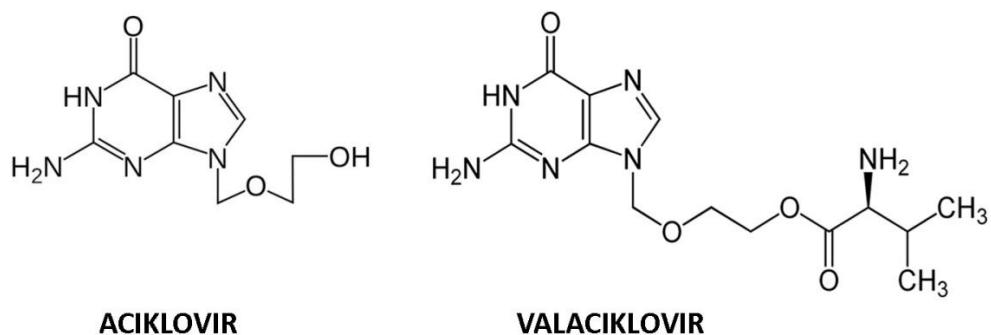
Spremembe v lastnostih in nivoju izražanja prenašalcev v tankem črevesu so lahko vzrok intra- in interindividualne variabilnosti v biorazpoložljivosti zdravil. Do sedaj so ugotovili, da na izražanje PEPT1 vplivajo dieta, hormoni, rastni dejavniki, cirkadiani ritem, različna zdravila in bolezni (8). Študije so pokazale, da izpostavitev Caco-2 celic dipeptidom in visokoproteinska dieta podgana povečata količino celične PEPT1 mRNA in izražanje proteina v membrani enterocitov preko regulacije izražanja gena za PEPT1 (8, 23). Stradanje poveča izražanje PEPT1 mRNA in s tem količino prenašalca (8, 17). Črevesna resekcija poveča količino PEPT1 mRNA in proteina v kolonu, prav tako pride do izražanja PEPT1 v kolonu pri pacientih s sindromom kratkega črevesa in vnetnimi boleznimi črevesa kot sta na primer ulcerozni kolitis in Chronova bolezen (8, 23, 24). Insulin in leptin vplivata na povečano translokacijo PEPT1 iz citoplazemskega bazenčka v membrano in s tem povečata privzem dipeptidov. Kronična hiperleptinemija povzroči povečanje količine mRNA, proteina in s tem privzema dipeptidov, saj leptin vpliva tako na transkripcijo kot tudi na translacijo gena za PEPT1. Dolgotrajna izpostavitev bazolateralne membrane Caco-2 celic epidermalnemu rastnemu dejavniku povzroči zmanjšano izražanje PEPT1 in s tem manjši privzem dipeptidov medtem ko ima kratkotrajna izpostavitev (< 1 h) nasproten učinek. Tiroidni hormon zmanjša aktivnost PEPT1 preko zmanjšane transkripcije in/ali zmanjšane stabilnosti PEPT1 mRNA. Na izražanje PEPT1 vplivajo tudi nekatera zdravila. 5-fluorouracil (protitumorna učinkovina), ki uniči sluznico črevesa, poveča izražanje gena. Klonidin (agonist  $\alpha$ 2-adrenergičnih receptorjev) poveča translokacijo PEPT1 v apikalno membrano Caco-2 celic. Pentazocin (opioidni analgetik) poveča količino PEPT1 mRNA v Caco-2 celicah in s tem večjo količino proteina v plazemski membrani (8, 23). Študije so pokazale, da se izražanje PEPT1 spreminja tudi tokom razvoja organizma. Najvišje izražanje PEPT1 v tankem črevesu podgane je okoli 5. dneva po rojstvu, izražanje pri odrasli podgani pa je 30 % manjše. V kolonu podgane se PEPT1 izraža prve dni po rojstvu, nato izražanje pada pod mejo detekcije (19).

### **1.3. Aciklovir in valaciclovir**

Aciklovir je ena izmed najpogosteje uporabljenih protivirusnih zdravilnih učinkovin in se uporablja pri terapiji okužb povzročenih s herpes virusi (npr. herpes zoster), kot preventiva

pred okužbami s citomegalovirusom pri transplantacijah ter za supresijo latentnih bolezni (npr. genitalni herpes) (25). Je analog gvanozina ter deluje kot specifični in selektivni inhibitor herpesvirusne DNA-polimeraze. Privzem je večji v okužene celice, ker se molekula s pomočjo virusne timidin kinaze fosforilira do monofosfatne oblike in s tem ustvari koncentracijski gradient. Fosforilirana oblika ne prehaja celičnih membran, zato se zadržuje v z virusom okuženi celici. Pretvorba aciklovir monofosfata v aciklovir trifosfat, ki je aktivna oblika, poteče s pomočjo celičnih kinaz. Aciklovir trifosfat je substrat za virusno DNA-polimerazo in z deoksigvanozin trifosfatom tekmuje za vključitev v verigo. Ob vključitvi aciklovir trifosfata v rastočo verigo virusne DNA pride do terminacije verige, ker aciklovir ne vsebuje 3'-hidroksilne skupine, ki je potrebna za podaljševanje. DNA-polimeraza herpes simpleks virusa ima 10–30-krat večjo afiniteto do aciklovir trifosfata kot DNA-polimeraza neokuženih celic (26).

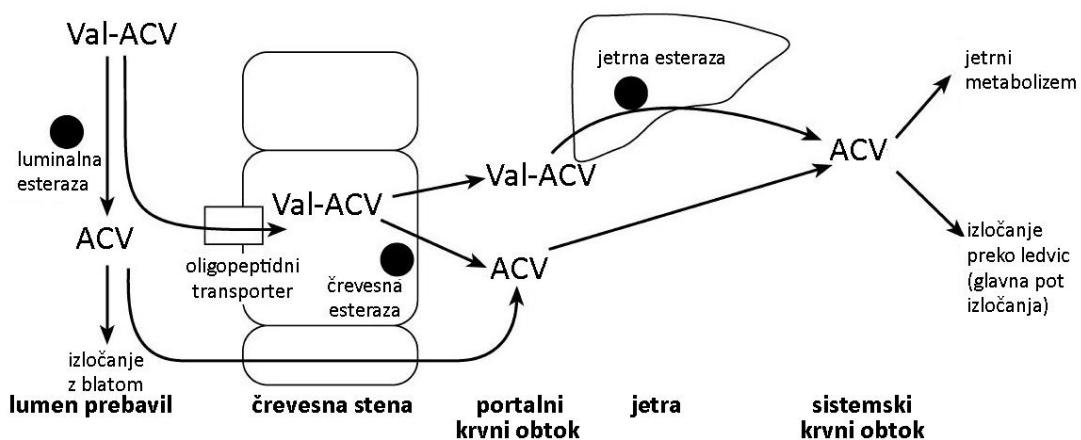
Aciklovir se počasi in nepopolno absorbira iz prebavnega trakta s pasivno difuzijo, biorazpoložljivost po peroralni aplikaciji je le 15–30 % apliciranega odmerka (25, 27). Zaradi tega so potrebni visoki odmerki in pogosta aplikacija (3-krat do 5-krat dnevno), pogosto pa ga je za želen učinek potrebno aplicirati intravensko. Posledica je slabo sodelovanje bolnikov in neuspešna terapija, pogosta izpostavljenost nizkim plazemskim koncentracijam aciklovirja pa lahko vodi do nastanka rezistentnih sevov (25). V preteklosti so se raziskovalci osredotočili na razvoj predzdravila aciklovirja z enakim profilom varnosti in učinkovitosti in boljšo biorazpoložljivostjo po peroralni aplikaciji (26). Prvi poskusi so vključevali spremembe na purinskem obroču, ki so privedle do večje toksičnosti zaradi akumulacije fosforilirane oblike predzdravila v celicah. Dodatek substituentov na hidroksilni rep aciklovirja je preprečil fosforilacijo pred pretvorbo predzdravila v aciklovir. Najboljše lastnosti je izkazoval ester aciklovirja z L-valinom – valaciclovir (25). Stukturni formuli aciklovirja in valaciclovirja sta prikazani na sliki 5.



Slika 5: Strukturni formuli aciklovirja in valaciklovirja (28, 29).

Dodatek valilnega aminokislinskega ostanka na aciklovir je izboljšal biološko uporabnost na ~54 % peroralno apliciranega odmerka (30). Večja biološka uporabnost ni posledica izboljšane pasivne difuzije, temveč aktivnega prenosa s prenašalcem (25, 30). Študije na celičnih linijah so pokazale, da je valaciclovir substrat oligopeptidnega prenašalca PEPT1 (31). Novejše študije nakazujejo, da so v absorpciji valaciclovirja pri človeku in podgani vključeni tudi drugi prenašalci in prenos s pomočjo PEPT1 verjetno ni prevladujoč mehanizem absorpcije pri človeku. Najpomembnejši prenašalec, vključen v absorpcijo valaciclovirja pri človeku, naj bi bil HPT1 (32).

Po peroralni aplikaciji se nekaj valaciclovirja hidrolizira do aciklovirja že v lumnu prebavil pred absorpcijo, preostala hidroliza pa poteče v enterocitih in jetrih. Večina aciklovirja se izloči nespremenjenega preko ledvic z glomerulno filtracijo in tubulno sekrecijo (25). Farmakokinetika valaciclovirja in aciklovirja je prikazana na sliki 6.



Slika 6: Farmakokinetika valaciclovirja in aciklovirja (prirejeno po 25).

## 2. NAMEN DELA

V okviru diplomske naloge bomo določili permeabilnost aciklovirja in njegovega predzdravila valaciklovirja skozi izolirane dele podganjega črevesa (duodenum, jejunum, ileum in kolon) v dvoprostornih difuzijskih celicah *in vitro*. Določili bomo permeabilnostne koeficiente ( $P_{app}$ ) za obe spojini v smeri mukoza→seroza (M→S) in seroza→mukoza (S→M). Na osnovi razlik med njimi bomo določili aktivnost prenašalca PEPT1 v različnih segmentih črevesa.

Znano je, da se aciklovir absorbira s pasivno difuzijo, zato ne pričakujemo signifikantnih razlik med  $P_{app(M \rightarrow S)}$  in  $P_{app(S \rightarrow M)}$  pri različnih segmentih črevesa. Valaciklovir, ki je predzdravilo aciklovirja, po navedbah literature poveča biološko uporabnost aciklovirja za 3 do 5-krat (8). Povečanje biološke uporabnosti je posledica izboljšane absorpcije predzdravila zaradi aktivnega prenosa z membranskim oligopeptidnim prenašalcem PEPT1, ki se nahaja v sluznici tankega črevesa. Zato pričakujemo višje vrednosti  $P_{app(M \rightarrow S)}$  valaciklovirja v primerjavi s  $P_{app(M \rightarrow S)}$  aciklovirja pri duodenumu, jejunumu in ileumu. V teh predelih pričakujemo pri valaciklovirju zaradi aktivnega prenosa v absorptivni smeri tudi statistično značilne razlike med  $P_{app(M \rightarrow S)}$  in  $P_{app(S \rightarrow M)}$ . V kolonu se PEPT1 ne izraža oziroma je izražen v zelo majhni meri, zato pričakujemo v tem področju podobno permeabilnost valaciklovirja in aciklovirja tako v smeri M→S kot tudi v smeri S→M.

Za določitev aktivnosti prenašalca PEPT1 bomo uporabili dve metodi. Po prvi bomo primerjali permeabilnost valaciklovirja v absorptivni in eliminatorni smeri. Po drugi pa bomo permeabilnost aciklovirja, ki je strukturno soroden valaciklovirju in ni substrat PEPT1, skušali uporabiti kot eksperimentalno oceno pasivne komponente difuzije valaciklovirja in tako določiti, koliko k njegovi permeabilnosti v absorptivni smeri prispeva PEPT1. Ker naj bi izražanje PEPT1 padalo vzdolž črevesa (8), sklepamo, da bo tudi njegova aktivnost padala od duodenuma proti kolonu. Aktivnost prenašalca bomo primerjali tudi z izražanjem v tankem črevesu podgan istega seva iz iste vzrejne organizacije.

### **3. MATERIALI IN METODE**

#### **3.1. Preiskovane spojine**

- valaciklovir hidroklorid, Sequoia Research Products, Velika Britanija, M = 360,80 g/mol
- aciklovir, sintetiziran na Kemijskem inštitutu v Ljubljani, Slovenija, M = 225,21 g/mol

#### **3.2. Spojine za pripravo raztopin, elektrod**

- natrijev hidrogenkarbonat, p.a., Merck KGaA, Darmstadt, Nemčija, M = 84,01 g/mol
- natrijev dihidrogenfosfat monohidrat, p.a., Merck - Alkaloid, Skopje, Makedonija, M = 137,99 g/mol
- natrijev klorid, p.a., Merck KGaA, Darmstadt, Nemčija, M = 58,44 g/mol
- kalijev klorid, p.a., Merck KGaA, Darmstadt, Nemčija, M = 74,55 g/mol
- kalcijev klorid dihidrat, p.a., Merck KGaA, Darmstadt, Nemčija, M = 147,02 g/mol
- magnezijev klorid heksahidrat, p.a., Riedel-de Haën, Seelze, Nemčija, M = 203,30 g/mol
- dinatrijev hidrogenfosfat dihidrat, p.a., Merck KGaA, Darmstadt, Nemčija, M = 177,99 g/mol
- D-glukoza, p.a., Sigma Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Nemčija, M = 180,18 g/mol
- D-manitol, p.a., Sigma Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Nemčija, M = 182,18 g/mol
- fluorescein - natrium, Krka, Slovenija, M = 376,28 g/mol
- dinatrijev hidrogenfosfat, brezvodni, p.a., Kemika Zagreb, Hrvatska, M = 174,18 g/mol
- orto-fosforna kislina 85 %, Merck, 1 L = 1,71 kg
- natrijev hidroksid 1 M, Sigma Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Nemčija
- agar-agar v granulah, Merck KGaA, Darmstadt, Nemčija

### **3.3. Topila**

- metanol, Sigma Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Nemčja, 32,04 g/mol
- prečiščena voda, Fakulteta za farmacijo, Ljubljana, Slovenija
- bidestilirana voda, Fakulteta za farmacijo, Ljubljana, Slovenija

### **3.4. Plini**

- karbogen (95 % kisika, 5 % ogljikovega dioksida), Messer, Ruše, Slovenija

### **3.5. Tkiva**

Duodenum, jejunum, ileum in kolon podgane *rattus norvegicus* (linija Sprague-Dawley), Lek, Enota KK, Ljubljana, Slovenija.

### **3.6. Raztopine**

- Standardni Ringerjev pufer s pH 7,4

V 1 L bučo nalijemo bidestilirano vodo do približno 2/3 ter v njej raztopimo soli v predpisanim vrstnem redu: 2,100 g NaHCO<sub>3</sub>, 0,055 g NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>×H<sub>2</sub>O, 6,541 g NaCl, 0,373 g KCl, 0,176 g CaCl<sub>2</sub>×2H<sub>2</sub>O, 0,244 g MgCl<sub>2</sub>×6H<sub>2</sub>O in 0,284 g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>×2H<sub>2</sub>O. Vsako naslednjo sol dodamo šele, ko se predhodna popolnoma raztopi. Na koncu dopolnimo z bidestilirano vodo do oznake 1 L.

- Modificiran Ringerjev pufer s pH 6,5

V 1 L bučo nalijemo približno 2/3 L bidestilirane vode ter v njej raztopimo soli v predpisanim vrstnem redu: 0,21 g NaHCO<sub>3</sub>, 0,966 g NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>×H<sub>2</sub>O, 15,781 g NaCl, 0,746 g KCl, 0,352 g CaCl<sub>2</sub>×2H<sub>2</sub>O, 0,488 g MgCl<sub>2</sub>×6H<sub>2</sub>O, 0,285 g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>×2H<sub>2</sub>O. Vsako naslednjo sol dodamo šele, ko se je predhodna popolnoma raztopila. Dopolnimo z bidestilirano vodo skoraj do oznake, nato pa s pomočjo 1 M NaOH uravnamo pH na 6,95 ter dopolnimo z bidestilirano vodo do 1 L. Po prepihanjanju s karbogenom v difuzijskih celicah pri 36 °C pade pH na 6,5.

- 625 mM raztopina glukoze

2,815 g D-glukoze damo v 25 mL bučko in dodamo bidestilirano vodo do oznake.

- 625 mM raztopina D-manitola

2,850 g D-manitola damo v 25 mL bučko in dopolnimo z bidestilirano vodo do oznake.

- Raztopina 10 mM glukoze za prenos tkiva

0,9400 g D-glukoze raztopimo v 500 mL standardnega Ringerjevega pufra.

- 0,625 mM raztopina fluoresceina

5,88 mg fluoresceina damo v 25 mL bučko in dopolnimo z bidestilirano vodo do oznake.

- 0,025 M raztopina NaOH

2,5 mL 1 M raztopine NaOH damo v 100 mL bučko in dopolnimo z bidestilirano vodo do oznake.

- Akceptorske raztopine

- 10 mM raztopina glukoze: v 100 mL bučko odpipetiramo 1,6 mL 625 mM raztopine glukoze ter dopolnimo do oznake s standardnim Ringerjevim pufrom.

- 10 mM raztopina manitola: v 100 mL bučko odpipetiramo 1,6 mL 625 mM raztopine manitola ter dopolnimo do oznake z modificiranim Ringerjevim pufrom.

- Donorske raztopine z valaciklovirjem

- S pH 7,4: V 100 mL bučko damo 36,08 mg valaciklovirja, 1,6 mL 625 mM raztopine glukoze, 1,6 mL 0,625 mM raztopine fluoresceina ter dopolnimo do oznake s standardnim Ringerjevim pufrom. Razapljanje pospešimo s pomočjo ultrazvočne kadičke.

- S pH 6,5: V 100 mL bučko damo 36,08 mg valaciklovirja, 1,6 mL 625 mM raztopine manitola, 1,6 mL 0,625 mM raztopine fluoresceina ter dopolnimo do oznake z modificiranim Ringerjevim pufrom. Razapljanje pospešimo s pomočjo ultrazvočne kadičke.

- Donorske raztopine z aciklovirjem

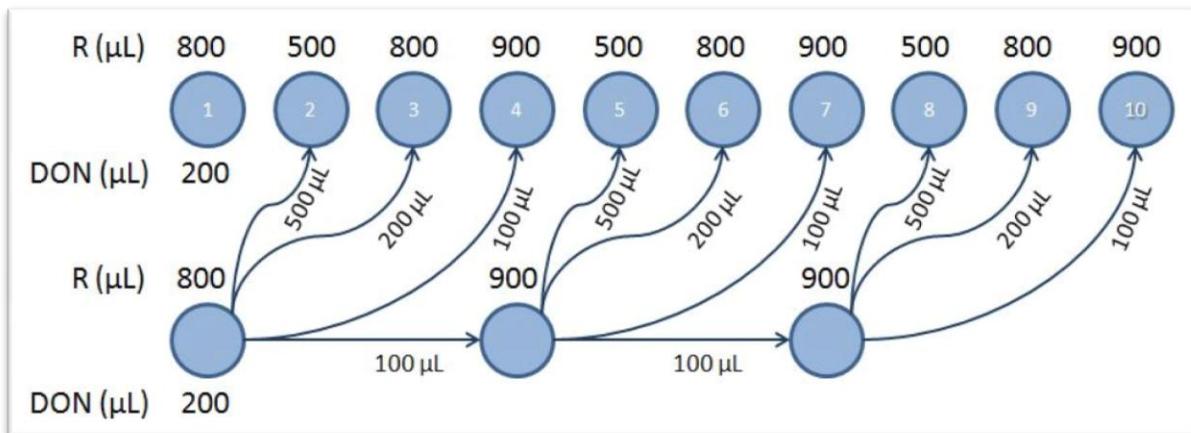
- S pH 7,4: V 50 mL bučko damo 11,25 mg aciklovirja, 0,8 mL 625 mM raztopine glukoze, 0,8 mL 0,625 mM raztopine fluoresceina ter dopolnimo do oznake s standardnim Ringerjevim pufrom. Raztpljanje pospešimo s pomočjo ultrazvočne kadičke.
- S pH 6,5: V 50 mL bučko damo 11,25 mg aciklovirja, 0,8 mL 625 mM raztopine manitola, 0,8 mL 0,625 mM raztopine fluoresceina ter dopolnimo do oznake z modificiranim Ringerjevim pufrom. Raztpljanje pospešimo s pomočjo ultrazvočne kadičke.

- Raztopine za pripravo umeritvenih premic

V epruvetah pripravimo raztopine valaciklovirja oziora aciklovirja ter fluoresceina s koncentracijami, prikazanimi v preglednici II. Pri redčenju upoštevamo shemo, prikazano na sliki 7.

Preglednica II: Št. epruvet in pripadajoče koncentracije aciklovirja oziora valaciklovirja ter fluoresceina.

| Št.<br>epruvete | Koncentracija<br>valaciklovirja oz.<br>aciklovirja [M] | Koncentracija<br>fluoresceina<br>[M] | Št.<br>epruvete | Koncentracija<br>valaciklovirja<br>oz. aciklovirja<br>[M] | Koncentracija<br>fluoresceina<br>[M] |
|-----------------|--|--------------------------------------|-----------------|---|--------------------------------------|
| 1               | $2 \times 10^{-7}$                                     | $2 \times 10^{-9}$                   | 6               | $1 \times 10^{-5}$  | $1 \times 10^{-7}$                   |
| 2               | $4 \times 10^{-7}$                                     | $4 \times 10^{-9}$                   | 7               | $2 \times 10^{-5}$  | $2 \times 10^{-7}$                   |
| 3               | $1 \times 10^{-6}$                                     | $1 \times 10^{-8}$                   | 8               | $4 \times 10^{-5}$  | $4 \times 10^{-7}$                   |
| 4               | $2 \times 10^{-6}$                                     | $2 \times 10^{-8}$                   | 9               | $1 \times 10^{-4}$  | $1 \times 10^{-6}$                   |
| 5               | $4 \times 10^{-6}$                                     | $4 \times 10^{-8}$                   | 10              | $2 \times 10^{-4}$  | $2 \times 10^{-6}$                   |



Slika 7: Shema redčenja za pripravo raztopin za umeritvene premice.

R: Ringerjeva raztopina, DON: donorska raztopina. Najprej v epruvete (modri krogci) odpipetiramo ustrezne količine standardnega Ringerjevega pufra (količine so označene nad krogci), nato pa še ustrezne količine donorske raztopine oziroma predpripravljenih raztopin iz epruvet v spodnji vrsti (količine so označene pod krogci ali zraven puščic) ter dobro premešamo.

- Fosfatni pufer s pH 6,4 za mobilno fazo

2,5 g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> raztopimo v 2 L bidestilirane vode in dopolnimo do oznake. S pomočjo orto-fosforne kisline uravnamo pH na 6,4 ter pufer prefiltriramo.

- Raztopine za pripravo elektrod

- 3 M raztopina KCl: 55,9 g KCl raztopimo v 250 mL prečiščene vode.
- 3–4 % raztopina agarja v 3 M KCl: 100 mL 3 M raztopine KCl nalijemo v erlenmajerico ter jo segrevamo na vodni kopeli, dodamo 3,5 g agarja. Mešamo počasi, da ne nastanejo mehurčki.

### 3.7. Aparature in pribor

- EasyMount difuzijske celice s tokovnimi in napetostnimi elektrodam ter šestkanalnim ali osemkanalnim potenciometrom z možnostjo vpenjanja napetosti ter toka – Multichannel voltage-current clamp (VCC MC6, VCC MC8) Physiologic Instruments, Inc.

- HPLC sistem Agilent 1100 Series (črpalka, avtomatski vzorčevalnik, razplinjevalec, UV-DAD detektor) in zbiralnik frakcij Agilent 1200 Series, Agilent Technologies, Nemčija
- čitalec mikrotitrskih ploščic Tecan GENios, Tecan, Avstrija
- termostatirana vodna kopel M3 LAUDA, LAUDA, Lauda-Königshofen, Nemčija
- magnetno mešalo MM-531, Tehnica, Železniki, Slovenija
- magnetno mešalo Rotamix 550 MMH, Tehnica, Železniki, Slovenija
- digitalni termometer Testo 926, Testo GmbH & Co., Lenzkirch, Nemčija
- analitska tehnica Mettler toledo XP105, Mettler Toledo, Schwarzenbach, Švica
- tehnica Exacta 300 EB, Tehnica, Železniki, Slovenija
- pH meter 330i, WTW, Weilheim, Nemčija
- polavtomatska pipeta 20–200  $\mu\text{L}$ , Eppendorf research, Hamburg, Nemčija
- polavtomatska pipeta 100–1000  $\mu\text{L}$ , Eppendorf research Hamburg, Nemčija
- multikanalna pipeta 100  $\mu\text{L}$ , Eppendorf research, Hamburg, Nemčija
- pipeta Lotrič 2500  $\mu\text{L}$ , Lotrič Meroslovje d.o.o., Selca, Slovenija
- steklovina: merilne bučke in buče, čaše, tehtiči
- ostali inventar: spatule, žlice, nastavki za pipete, epruvete, mikrotiterske plošče

### **3.8. Priprava tkiva za poskus**

Za poskuse z dvoprostornimi difuzijskimi celicami uporabljamo črevo podgan, starih 2 meseca in težkih 180–250 g. Podgane so 18 ur pred žrtvovanjem brez dostopa do hrane, dostop do vode pa jim je zagotovljen *ad libitum*. Tako zagotovimo stanje na tešče, ki je pomembno za stabilnost prenašalcev. Po žrtvovanju odvzeto tkivo shranimo v ledeno mrzlo oksigenirano 10 mM raztopino glukoze v standardnem Ringerjevem pufru. Najprej celotno črevo speremo. Dele duodenuma režemo 8 cm od pilorusa navzdol, dele jejunuma vsaj 25 cm stran od duodenuma in vsaj 25 cm stran od ileocekalnega sfinktra, dele ileuma pa do 15 cm od ileocekalnega sfinktra. Tkivo ne sme vsebovati Peyerjevih plošč. Režemo 3 cm koščke tkiva, jih prerežemo po mezenteralni meji in namestimo na nastavke za tkivo (z mukozno stranjo obrnjeno proti iglicam).

### 3.9. Postopek dela z dvoprostornimi difuzijskimi celicami

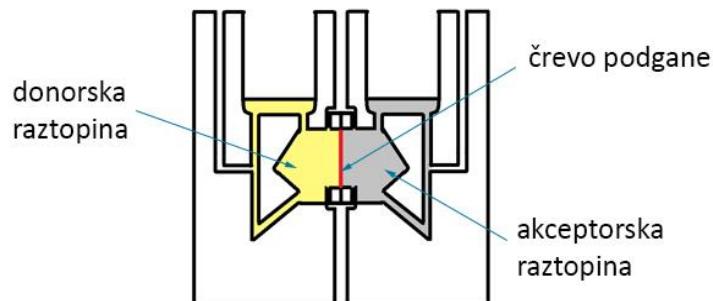
S pomočjo instrumenta VCC MC6 ali VCC MC8 (slika 8) merimo elektrofiziološke parametre tkiva v dvoprostornih difuzijskih celicah. Med poskusom spremljamo transepitelijski potencial, kratkostični tok in transepitelijsko upornost, po poskusu pa izmerimo še odziv tkiva na dodatek glukoze na mukozno stran.



Slika 8: Instrument VCC MC8 za merjenje elektrofizioloških parametrov (33).

Vse potenciometre nastavimo na 0 ter celice s praznimi nastavki za tkivo pritrdimo na stojala za celice. Vključimo vodno kopel in počakamo 10 minut, da se sistem segreje. Vključimo tudi napetostno tokovni izvir. Celice opremimo z elektrodami, ki smo jih sprali s prečiščeno vodo. Napetostne elektrode (črne) namestimo v odprtine blizu tkiva, tokovne elektrode (bele) pa na zunanjou stran dvoprostornih difuzijskih celic. Celice napolnimo s standardnim Ringerjevim pufrom ter priključimo dotok karbogena. Izmerimo napetost, ki je posledica asimetrije med elektrodama. Če je manjša od 10 mV, jo kompenziramo na 0, v nasprotnem primeru moramo zamenjati elektrodi. Nato izmerimo tok, ki mora biti stabilen in nekje med 60 in 68  $\mu$ A, v nasprotnem primeru zamenjamo elektrodi. Kompenziramo tudi upornost raztopine in vrednost nastavimo na 0. Iz difuzijskih celic odstranimo pufer ter izvlečemo nastavke za tkivo. Nanje namestimo tkivo tako, da je z mukozno stranjo obrnjeno proti iglicam. Nastavke s tkivom vstavimo nazaj v celice in dodamo ustrezeno raztopino (na mukozno stran 10 mM raztopino manitola, na serozno stran pa 10 mM raztopino glukoze).

Ob začetku poskusa si zapišemo napetost in tok ter nato raztopine z donorskih strani dvoprostornih difuzijskih celic zamenjamo z ustrezeno donorsko raztopino; na mukozno stran damo donorsko raztopino s pH 6,5, na serozno stran pa donorsko raztopino s pH 7,4 (slika 9). Z donorskih strani odvzamemo vzorce ( $50 \mu\text{L}$ ) ob času  $t = 0$ . Na akceptorskih straneh vzorčimo  $250 \mu\text{L}$  ob naslednjih časovnih točkah: 25 min, 50 min, 75 min, 100 min, 125 min, 150 min, 175 min. Vzorce zbiramo na mirkotiterski plošči. Ob teh časovnih točkah si zapisujemo tudi napetost in tok. Po vzorčenju vračamo  $250 \mu\text{L}$  ustrezne akceptorske raztopine (10 mM raztopine glukoze ali 10 mM raztopine manitola). V primeru poskusov z valaciklovirjem moramo zaradi razpadanja le-tega na aciklovir in L-valin po vsakem vzorčenju zamenjati celotno donorsko raztopino. Ob koncu poskusa vzorčimo  $50 \mu\text{L}$  z donorske strani. Na mukozno stran dodamo  $100 \mu\text{L}$  625 mM raztopine glukoze in po 1 minuti odčitamo napetost in tok. Iz celic odstranimo raztopine in v standardnem Ringerjevem pufru izmerimo asimetrijo elektrod, nato jih speremo ter shranimo s konicami v 3M KCl v hladilniku. Tkivo odstranimo z nastavkov, celice in nastavke očistimo v ultrazvočni kadički ter posušimo na sobni temperaturi.



Slika 9: Shema dvoprostorne difuzijske celice (prirejeno po 34).

### 3.10. Ocena vitalnosti tkiva

Da lahko ocenimo vitalnost tkiva, moramo tekom poskusa spremljati elektrofiziološke parametre tkiva.

*Transepiteljski potencial ( $U_{TE}$ )* predstavlja razliko v električnem potencialu med mukozno in serozno stranjo, ki je posledica aktivnega prehoda ionov preko membran in vzporedno ter pasivnega paracelularnega prehoda v primeru neenake ionske sestave na obeh straneh

dvoprostorne difuzijske celice. Serozna stran je ob meritvi ozemljena, mukozna stran pa je negativno nabita. Z instrumentom transepiteljski potencial direktno izmerimo, ko je napetost zaradi asimetrije elektrod kompenzirana.

*Kratkostični tok* predstavlja tok, ki mora steči skozi tkivo, da je vrednost transepiteljskega potenciala enaka nič. Enak je vsoti produktov ionov in njihovih pretokov preko epitelija z aktivnim transportom. Sestavljen je iz absorpcije natrijevih in kloridnih ionov ter sekrecije karbonatnih ionov. Izmerimo ga tako, da z instrumentom napetost vpnemo na nič.

$$I_{KS} = \sum_{i=1}^{i=n} z_i F J_i \quad (\text{enačba } 1)$$

$I_{KS}$  ..... *kratkostični tok [ $\mu A$ ]*

$z_i$  ..... *valenca iona i*

$F$  ..... *Faradayeva konstanta ( $96485 \text{ C mol}^{-1}$ )*

$J_i$  ..... *pretok iona i preko epitelija z aktivnim transportom [ $\text{mol/m}^2\text{s}$ ]*

*Transepiteljska upornost* je vsota upornosti preko obeh celičnih membran epiteljskih celic in vzporedne upornosti za prehod ionov po paracelularni poti. Je produkt Ohmovega zakona in površine tkiva v dvoprostorni difuzijski celici.

$$R = \frac{\Delta U}{I} \cdot A \quad (\text{enačba } 2)$$

$R$  ..... *transepiteljska upornost [ $\text{m}\Omega\text{cm}^2$ ]*

$\Delta U$  ..... *razlika potencialov na mukozni in serozni strani [ $\text{mV}$ ]*

$I$  ..... *tok, ki ga izmerimo, ko vpnemo napetost na 0 [ $\mu A$ ]*

$A$  ..... *površina tkiva v difuzijski celici ( $1 \text{ cm}^2$ )*

$\Delta U$  je lahko kar  $-U_{TE}$ ,  $I$  pa  $I_{KS}$ .

Na koncu poskusa dodamo na mukozno stran dvoprostorne difuzijske celice raztopino glukoze. pride do dodatnega vdora natrijevih ionov v notranjost celice, saj pride do kotransporta glukoze z natrijevimi ioni. Posledica je zmanjšanje elektronegativnosti notranjosti celice v primerjavi z raztopino na mukozni strani, pojav pa izkoriščamo za oceno vitalnosti tkiva.

Ob oceni vitalnosti tkiva gledamo več faktorjev:

- transepiteljski potencial,
- transepiteljsko upornost,
- porast  $\Delta U$  po dodatku glukoze na mukozno stran,
- Pearsonov koeficient korelacije na linearinem delu krivulje na grafu »množina snovi na akceptorski strani v odvisnosti od časa«,
- permeabilnostni koeficient fluoresceina.

Tkivo lahko opredelimo kot vitalno, če je bila vrednost transepiteljske upornosti vsaj  $18 \text{ m}\Omega\text{cm}^2$ , vrednost transepiteljskega potenciala pa  $-1,1 \text{ mV}$  ali bolj negativna. Ob dodatku glukoze na mukozno stran dvoprostorne difuzijske celice po koncu poskusa mora, če je tkivo vitalno,  $\Delta U$  narasti. Pearsonov koeficient korelacije na linearinem delu krivulje »množina snovi na akceptorski strani v odvisnosti od časa« mora biti vsaj 0,97.

Fluorescein dodamo v donorsko raztopino, določitev njegove permeabilnosti pa nam pomaga pri ocenjevanju vitalnosti tkiva. Je slabo permeabilna snov, steno črevesa prehaja paracelularno.  $P_{app}$  ima okoli  $6 \times 10^{-6} \text{ cm/s}$ . Vzrok za previsok  $P_{app}$  fluoresceina je lahko pretrgano tkivo ali pa puščanje difuzijskih celic.

### **3.11. Analiza vzorcev**

#### **3.11.1. Določitev koncentracij aciklovirja in valaciclovirja v vzorcih**

Vzorce smo analizirali s tekočinsko kromatografijo visoke ločljivosti (HPLC). Pred analizo smo vzorce, odvzete z donorskih strani redčili v razmerju 1:4 ( $50 \mu\text{L}$  vzorca smo dodali  $200 \mu\text{L}$  Ringerjeve raztopine). Parametri HPLC analize so zbrani v preglednici III.

### Preglednica III: Parametri HPLC analize.

|                                       |  |
|---------------------------------------|--|
| <i>kolona</i>                         | Chromolith; RP 8; 4,6×100 mm                 |
| <i>vodna faza</i>                     | fosfatni pufer s pH = 6,4                    |
| <i>organski modifikator</i>           | metanol                                      |
| <i>volumen injiciranja</i>            | 100 µL                                       |
| <i>temperatura kolone</i>             | 35 °C  |
| <i>gradient</i>                       | 0 – 2,5 – 2,5 – 5,0 min<br>1 – 1 – 16 – 16 % |
| <i>pretok</i>                         | 2 mL/min                                     |
| <i>valovna dolžina detekcije</i>      | 254 nm                                       |
| <i>retencijski čas aciklovirja</i>    | 2,0 min                                      |
| <i>retencijski čas valaciclovirja</i> | 4,7 min                                      |

### 3.11.2. Določitev koncentracije fluoresceina v vzorcih

Po 100 µL vsakega vzorca oziroma raztopine za pripravo umeritvene premice smo odpipetirali na črne mikrotiterske plošče ter dodali 100 µL 0,025 M NaOH. Na vsaki plošči so bile tudi raztopine za izdelavo umeritvene premice. S čitalcem mikrotiterskih plošč smo izmerili intenziteto emitirane svetlobe pri 525 nm po ekscitaciji s svetlobo valovne dolžine 483 nm.

## 3.12. Izračun permeabilnostnega koeficienta

Množino preiskovane snovi, ki preide skozi membrano na enoto časa ( $dQ/dt$ ), izračunamo s pomočjo izmerjenih koncentracij te snovi v vzorcih, ki jih jemljemo z akceptorske strani dvoprostorne difuzijske celice. Velja enačba:

$$Q_t = \left( \sum_{i=1}^{N-1} V_s \cdot C_i \right) + C_t \cdot V_a \quad (\text{enačba 3})$$

$Q_t$  ..... množina preiskovane snovi, ki je prešla v času  $t$  [mol]

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

$C_i$  ..... koncentracija, izmerjena pri prejšnjih vzorcih [mol/L]

$C_t$  ..... koncentracija ob času  $t$  [mol/L]

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

Množino preiskovane snovi, ki preide skozi črevesno steno na enoto časa, opisuje tudi naslednja enačba:

$$\frac{dQ}{dt} = k \cdot (C_d - C_a) \quad (\text{enačba 4})$$

$C_d$  ..... koncentracija preiskovane snovi na donorski strani dvoprostorne difuzijske celice [mol/L]

$C_a$  ..... koncentracija preiskovane snovi na akceptorski strani dvoprostorne difuzijske celice [mol/L]

Ker je med poskusom koncentracija preiskovane snovi na akceptorski strani mnogo manjša kot koncentracija snovi na donorski strani ( $C_a \ll C_d$ ), predpostavimo, da je razlika  $(C_d - C_a)$  konstantna, zato velja:

$$\frac{dQ}{dt} = k_d \quad (\text{enačba 5})$$

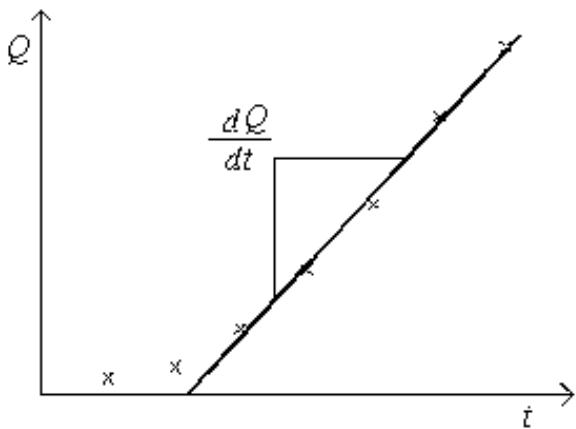
Enačbo integriramo po času od 0 do  $t$ :

$$\int_0^{Q(t)} dQ = k_d \cdot \int_0^t dt \quad (\text{enačba 6})$$

Dobimo:

$$Q_t = k_d \cdot t + n \quad (\text{enačba 7})$$

$Q_t$  izračunamo iz enačbe 3, narišemo graf  $Q_t$  v odvisnosti od  $t$  ter za izračun  $k_d = \frac{dQ}{dt}$  uporabimo linearni del krivulje (»steady state« stanje).



Slika 10: Graf  $Q$  v odvisnosti od  $t$ .

Pretok snovi skozi membrano je množina preiskovane snovi, ki preide določeno površino membrane na enoto časa. Izračunamo ga po formuli:

$$J = \frac{k_d}{A} \quad (\text{enačba } 8)$$

$J$  ..... pretok snovi skozi membrano [ $\text{nmol}/\text{h}\cdot\text{cm}^2$ ]

$A$  ..... površina tkiva, skozi katerega poteka difuzija [ $\text{cm}^2$ ]; v našem primeru  $1 \text{ cm}^2$

$k_d = dQ/dt$  izračunamo s pomočjo linearne regresije.

Permeabilnostni koeficient  $P_{app}[\text{cm}/\text{s}]$  izračunamo po enačbi:

$$P_{app} = \frac{J}{C_d} \quad (\text{enačba } 9)$$

### 3.13. Statistična obdelava podatkov

Pridobljene podatke smo obdelali z računalniškim programom Microsoft Excel 2007. S pomočjo F-testa smo preverili, ali se varianci za 2 skupini podatkov ( $P_{app(M \rightarrow S)}$  in  $P_{app(S \rightarrow M)}$ ) statistično značilno razlikujeta.

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

$s^2$  ..... varianca

$x_i$  ..... posamezna meritev v skupini

$\bar{x}$  ..... aritmetična sredina vseh meritev v skupini

$n$  ..... število vseh meritev v skupini

Postavili smo dve hipotezi; ničelno  $H_0$  in alternativno  $H_a$ .

$H_0$ : varianci dveh skupin podatkov se statistično značilno ne razlikujeta;  $s_x^2 = s_y^2$ .

$H_a$ : varianci dveh skupin podatkov se statistično značilno razlikujeta;  $s_x^2 \neq s_y^2$ .

$$F = \frac{s_x^2}{s_y^2} \quad (\text{enačba } 11)$$

$s_x^2$  ..... varianca prve skupine podatkov

$s_y^2$  ..... varianca druge skupine podatkov

V primeru podobnosti varianc ( $F_{eks} < F_{tab}$  ( $p > \alpha$ )) smo izvedli Studentov t-test za 2 neodvisna vzorca s podobnima variancama:

$$t = \frac{\bar{x} - \bar{y}}{s} \sqrt{\frac{mn}{m+n}} \quad (\text{enačba } 12)$$

$$s = \sqrt{\frac{(m-1)s_x^2 + (n-1)s_y^2}{m+n-2}} \quad (\text{enačba } 13)$$

$\bar{x}$  ..... aritmetična sredina podatkov v prvi skupini podatkov

$\bar{y}$  ..... aritmetična sredina podatkov v drugi skupini podatkov

- $s$  ..... skupni standardni odklon  
 $m$  ..... število podatkov v prvi skupini podatkov  
 $n$  ..... število podatkov v drugi skupini podatkov  
 $p$  ..... verjetnost dobljenega rezultata ob predpostavitvi ničelne hipoteze  
 $\alpha$  ..... stopnja tveganja  
 $f$  ..... stopnje prostosti ( $f = m + n - 2$ )

V primeru neenakosti varianc ( $F_{eks} > F_{tab}$  ( $p > \alpha$ )) smo izvedli Studentov t-test za 2 neodvisna vzorca z različnima variancama:

$$t = \frac{\bar{x} - \bar{y}}{\sqrt{\frac{s_x^2}{m} + \frac{s_y^2}{n}}} \quad (\text{enačba 14})$$

$H_0$ : med skupinama podatkov ni statistično značilne razlike

$H_a$ : med skupinama podatkov je statistično značilna razlika

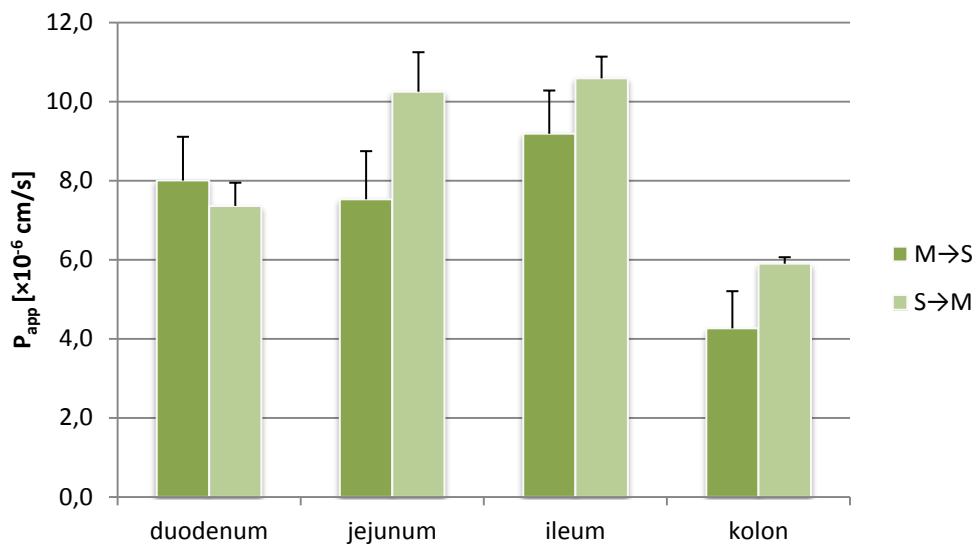
Če je  $t_{eks} < t_{tab}$  ( $\alpha, f$ ) in s tem  $p < \alpha$ , med skupinama podatkov ni statistično značilne razlike (NSR), zato sprejmemo ničelno hipotezo. Če je  $t_{eks} > t_{tab}$  ( $\alpha, f$ ) in s tem  $p > \alpha$ , je med skupinama podatkov prisotna statistično značilna razlika (SR), zato zavrnemo ničelno hipotezo in sprejmemo alternativno.

## **4. REZULTATI IN RAZPRAVA**

### **4.1. Izbor pH raztopine na mukozni strani dvoprostorne difuzijske celice**

Oligopeptidni prenašalec PEPT1 kot gonilno silo za prenos substratov uporablja gradient protonov. Njegova aktivnost je odvisna od pH mikrookolja na površini sluznice črevesa, na katero vpliva tudi luminalni pH (35, 36). To so dokazali tudi Nozawa in sodelavci, ki so preučevali vpliv proton-sproščajočega polimera Eudragita L100-55 na absorpcijo cefadroksila in cefeksima, ki sta znana substrata PEPT1. Predvidevali so, da je za slabšo absorpcijo substratov PEPT1 v distalnih predelih tankega črevesa kljub večjemu nivoju izražanja prenašalca krivo povišanje pH luminalne vsebine. Z *in situ* metodo zaprte intestinalne zanke na podgani so dokazali, da prisotnost Eudragita L100-55, ki zmanjša pH luminalne vsebine, močno poveča absorpcijo obeh spojin v področju ileuma. Tudi po sočasni peroralni aplikaciji Eudragita L100-55 in cefadroksila podganam se je njegova biološka uporabnost statistično značilno povečala (37). Pri *in vitro* metodah je v primerjavi z *in situ* metodami pH mikrookolja še bolj občutljiv na spremembe pH okolja (8). Zato smo pri poskusih na mukozni strani dvoprostorne difuzijske celice uporabili raztopino s pH 6,5 in s tem zagotovili kislo okolje za optimalno delovanje PEPT1. Da je aktivnost prenašalca PEPT1 pri pH raztopine na mukozni strani 6,5 večja kot pri pH 7,4, so s študijo dokazali tudi Šavor in sodelavci (38). Raztopina s pH 6,5 pa ni najbolj optimalna izbira za zagotovitev stabilnosti valaciclovirja. Le-ta je največja pri pH 4, pri višjem pH pa je valaciclovir podvržen bazično katalizirani hidrolizi do aciklovirja in L-valina, ki poteka po kinetiki prvega reda. Hitrost razpada molekule narašča z višanjem pH vrednosti. Poleg neugodnega pH hidrolizo pospešijo tudi encimi, prisotni v lumnu črevesa (30). Ker pa raztopina s pH 4 ne predstavlja realnih fizioloških razmer in tkivo pri tem pH ne bi bilo vitalno, smo na mukozni strani dvoprostorne difuzijske celice uporabili raztopino s pH 6,5 kljub manjši stabilnosti valaciclovirja. Analize so pokazale, da je bilo ob vsakem vzorčenju v donorski raztopini povprečno  $(62,2 \pm 19,0)\%$  valaciclovirja glede na vsoto valaciclovirja in aciklovirja. Razpad valaciclovirja na aciklovir in L-valin smo upoštevali pri izračunu njegovega permeabilnostnega koeficienta (izračunan je na osnovi vsote pretokov aciklovirja in valaciclovirja skozi steno črevesa).

## 4.2. Permeabilnost aciklovirja



Slika 11:  $P_{app}$  aciklovirja v absorptivni in v eliminatorni smeri v različnih segmentih črevesa podgane, standardna napaka povprečja (SEM).

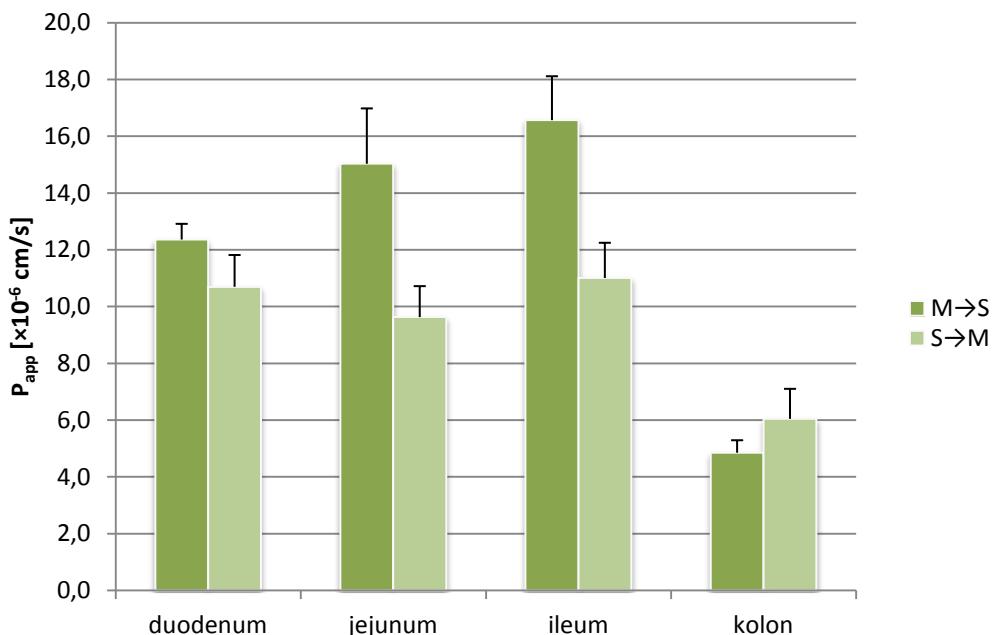
Preglednica IV:  $P_{app(M \rightarrow S)}$  in  $P_{app(S \rightarrow M)}$  aciklovirja v različnih predelih podganjega črevesa, število meritev (N), razmerja med  $P_{app(S \rightarrow M)}$  in  $P_{app(M \rightarrow S)}$  (ER), statistični podatki.

| segment črevesa | smer              | $(P_{app} \pm SD)$<br>$[\times 10^{-6} \text{ cm/s}]$ | N  | ER   | t-test<br>(p) | NSR/SR |
|-----------------|-------------------|---|----|------|---------------|--------|
| duodenum        | $M \rightarrow S$ | $8,0 \pm 1,9$   | 3  | 0,92 | 0,64          | NSR    |
|                 | $S \rightarrow M$ | $7,4 \pm 1,0$   | 3  |      |               |        |
| jejunum         | $M \rightarrow S$ | $7,5 \pm 3,2$   | 7  | 1,26 | 0,10          | NSR    |
|                 | $S \rightarrow M$ | $10,2 \pm 2,8$  | 8  |      |               |        |
| ileum           | $M \rightarrow S$ | $9,2 \pm 4,1$   | 14 | 1,15 | 0,27          | NSR    |
|                 | $S \rightarrow M$ | $10,6 \pm 1,3$  | 6  |      |               |        |
| kolon           | $M \rightarrow S$ | $4,3 \pm 1,6$   | 3  | 1,38 | 0,16          | NSR    |
|                 | $S \rightarrow M$ | $5,9 \pm 0,3$   | 3  |      |               |        |

Na sliki 11 so prikazane vrednosti permeabilnostnih koeficientov aciklovirja v absorptivni smeri ( $M \rightarrow S$ ) in eliminatorni smeri ( $S \rightarrow M$ ) v duodenumu, jejunumu, ileumu in kolonu podgane. Statistična analiza je pokazala, da med  $P_{app}$  vrednostmi v absorptivni in v eliminatorni smeri v nobenem segmentu črevesa ni bilo statistično značilne razlike (preglednica IV). Pri nekaterih študijah na živalih in ljudeh so opazili zmanjšanje biorazpoložljivosti pri večanju odmerka aciklovirja, kar nakazuje na absorptivni proces z možnostjo nasičenja (25). Ker ni statistično značilnih razlik med  $P_{app}$  v obeh smereh in ker je  $ER >$  od 1 ozziroma  $\sim 1$  (preglednica IV), lahko ovržemo možnost absorpcije aciklovirja aktivno s pomočjo prenašalcev. Potrdimo lahko literaturne podatke, da je glavni način absorpcije aciklovirja paracelularna pasivna difuzija (5, 39). Spojine, ki se absorbirajo pretežno s pasivnimi mehanizmi, imajo namreč  $ER < 2$  (40). Vrednosti ER so v jejunumu, ileumu in kolonu malenkost večje od 1, kar pomeni, da je bil prehod aciklovirja v smeri  $S \rightarrow M$  nekoliko večji kot v smeri  $M \rightarrow S$ . Vzrok te sicer majhne in statistično neznačilne razlike je lahko v aktivnem transportu aciklovirja v eliminatorni smeri. Možno je, da sta bila v morebitni aktivni transport v eliminatorni smeri vpletena prenašalca MDR1 in MRP2, ki se izražata v aplikalni membrani enterocitov (42), saj je Landowski sodelavci odkril negativno korelacijo med izražanjem genov teh dveh prenašalcev in farmakokinetičnimi parametri aciklovirja po peroralni aplikaciji pri človeku (43). Najnižji  $P_{app}$  aciklovirja v absorptivni smeri smo določili v kolonu. To smo pričakovali, saj je površina, ki je na voljo za absorpcijo, v kolonu v primerjavi s površino v tankem črevesu mnogo manjša, ker ne vsebuje črevesnih resic (6). Določena  $P_{app}$  za jejunum sta primerljiva s  $P_{app}$ , določenima po enakem postopku in pri enakih pogojih v našem laboratoriju leta 2008 ( $P_{app(M \rightarrow S)} = (6,0 \pm 2,5) \times 10^{-6} \text{ cm/s}$ ,  $P_{app(S \rightarrow M)} = (9,0 \pm 2,2) \times 10^{-6} \text{ cm/s}$ ) (38). Pri pregledu literature nismo našli podatkov o permeabilnosti aciklovirja, določeni na popolnoma primerljivem modelu z našim, zato lahko dobljene vrednosti primerjamo le z vrednostmi, ki so bile določene na drugih modelih. De Vruet je sodelavci preučeval permeabilnost aciklovirja in valaciclovirja na celičnem modelu Caco-2. Aciklovirju so določili  $P_{app(M \rightarrow S)} = (3,6 \pm 0,6) \times 10^{-7} \text{ cm/s}$  in  $P_{app(S \rightarrow M)} = (10,8 \pm 3,3) \times 10^{-7} \text{ cm/s}$  (44). Ponce in sodelavci so na celičnem modelu Caco-2 določili  $P_{app(M \rightarrow S)} = 2,5 \times 10^{-7} \text{ cm/s}$  (45), Shah in sodelavci pa  $P_{app(M \rightarrow S)} = (3,52 \pm 0,7) \times 10^{-7} \text{ cm/s}$  (46).  $P_{app}$  aciklovirja, določeni na celičnem modelu Caco-2, niso kvantitativno primerljivi s  $P_{app}$ , določenimi z našo metodo. Caco-2 celice so pridobljene iz rakavih celic debelega črevesa in imajo nekatere karakteristike enterocitov v tankem črevesu (izražajo prebavne encime, prenašalne sisteme ter metabolne

encime 1. In 2. faze metabolizma). Na vstavkih tvorijo polariziran monosloj s ščetkastim obrobkom na apikalni površini in tesnimi stiki med celicami (5). Tesni stiki, ki jih tvorijo Caco-2 celice, so majhni ( $4,5 \text{ \AA}$ ) (46) in tesnejši v primerjavi s tesnimi stiki med enterociti v tankem črevesu podgane (48), to pa vpliva predvsem na slabšo permeabilnost snovi, ki se absorbirajo pretežno paracelularno (5). Poleg tega pa je površina, ki je pri študijah permeabilnosti na celičnem modelu Caco-2 na voljo za prehod molekul, v primerjavi s površino pri izoliranem segmentu črevesa podgane manjša (49). Caco-2 celice namreč ne tvorijo črevesnih resic (48), ki povečajo površino tankega črevesa za približno 10-krat (5). Zato je razumljivo, da so  $P_{app}$  aciklovirja, določeni na celičnem modelu Caco-2, manjši kot ti, ki smo jih določili na izoliranih segmentih tankega črevesa podgane.

### 4.3. Permeabilnost valaciklovirja



Slika 12:  $P_{app}$  valaciklovirja v absorptivni in v eliminatorni smeri v različnih segmentih črevesa podgane, SEM.

Preglednica V:  $P_{app(M \rightarrow S)}$  in  $P_{app(S \rightarrow M)}$  valaciklovirja v različnih predelih podganjega črevesa, N, ER, statistični podatki.

| <b>segment<br/>črevesa</b> | <b>smer</b>                         | <b>(<math>P_{app} \pm SD</math>)<br/>[<math>\times 10^{-6}</math> cm/s]</b> | <b>N</b> | <b>ER</b> | <b>t-test<br/>(p)</b> | <b>NSR/SR</b> |
|----------------------------|-------------------------------------|---|----------|-----------|-----------------------|---------------|
| <b>duodenum</b>            | <b><math>M \rightarrow S</math></b> | $12,4 \pm 1,1$  | 4        | 0,87      | 0,29                  | NSR           |
|                            | <b><math>S \rightarrow M</math></b> | $10,7 \pm 2,7$  | 6        |           |                       |               |
| <b>jejunum</b>             | <b><math>M \rightarrow S</math></b> | $15,0 \pm 5,5$  | 8        | 0,64      | 0,04                  | SR            |
|                            | <b><math>S \rightarrow M</math></b> | $9,6 \pm 2,9$   | 7        |           |                       |               |
| <b>ileum</b>               | <b><math>M \rightarrow S</math></b> | $16,6 \pm 3,8$  | 6        | 0,66      | 0,03                  | SR            |
|                            | <b><math>S \rightarrow M</math></b> | $11,0 \pm 2,5$  | 4        |           |                       |               |
| <b>kolon</b>               | <b><math>M \rightarrow S</math></b> | $4,9 \pm 0,9$   | 4        | 1,25      | 0,34                  | NSR           |
|                            | <b><math>S \rightarrow M</math></b> | $6,0 \pm 2,1$   | 4        |           |                       |               |

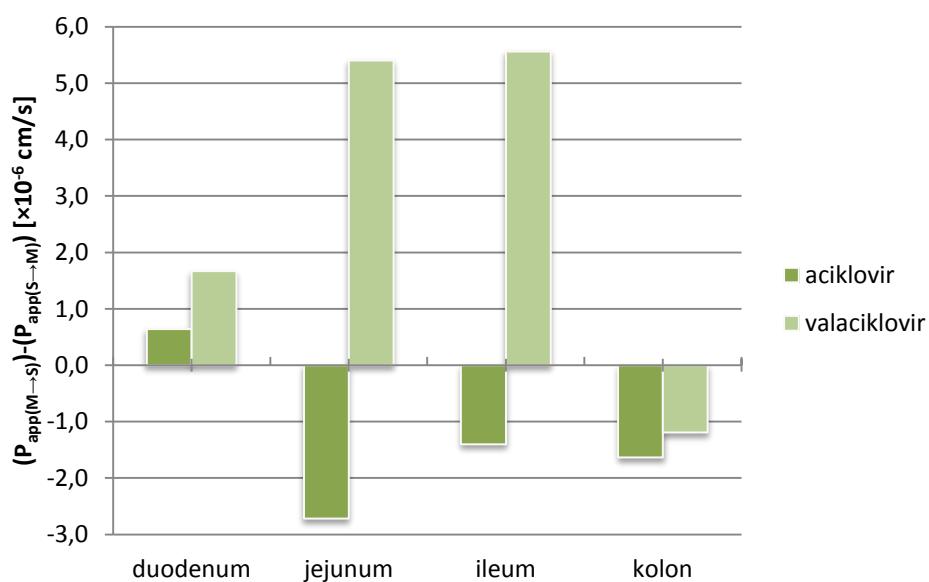
Na sliki 12 so prikazane vrednosti  $P_{app}$  valaciklovirja za obe smeri v duodenu, jejunumu, ileumu in kolonu podgane. V vseh treh predelih tankega črevesa so vrednosti  $P_{app}$  valaciklovirja v absorptivni smeri večje kot pripadajoče vrednosti  $P_{app}$  aciklovirja (preglednica IV in V). Vidimo, da je v teh treh predelih permeabilnost valaciklovirja v absorptivni smeri večja kot v eliminatorni smeri. Statistično značilna razlika med permeabilnostnima koeficientoma v obeh smereh je prisotna v predelu jejunuma in ileuma (preglednica V). Tudi vrednosti ER (preglednica V) so v vseh predelih tankega črevesa  $< 1$ , najnižji sta vrednosti ER v jejunumu in ileumu. Ker je bil prehod v absorptivni smeri večji kot prehod v eliminatorni smeri, se je valaciklovir najverjetneje absorbiral aktivno s pomočjo prenašalcev. Ganapathy je s sodelavci s kompetitivnimi študijami na celični liniji Caco-2, ki izraža PEPT1 strukturno identično kot pri človeku, preiskoval interakcijo med prenašalcem in valaciklovirjem. Ugotovili so, da valaciklovir kompetitivno inhibira prizem glicilsarkozina, ki je substrat PEPT1, v odvisnosti od odmerka (večji odmerek – večja inhibicija), medtem ko ga aciklovir ne. Te rezultate so potrdili tudi na kloniranem človeškem PEPT1 (hPEPT1), ki so ga izražale HeLa celice. Zaključili so, da valaciklovir in glicilsarkozin tekmujeta za isto vezavno mesto na PEPT1 (31). Da je za absorpcijo

valaciklovirja primarno odgovoren PEPT1, so dokazali tudi Han in sodelavci. Z *in situ* perfuzijo na podgani so preiskovali vpliv različnih kompetitivnih inhibitorjev PEPT1, estra L-glicina z aciklovirjem ter L-valilnega estra azidovudina na permeabilnost valaciklovirja in dokazali, da te spojine tekmujejo med sabo za isto pot absorpcije. Tudi inhibicijske študije na CHO/hPEPT1 celicah (ovarijske celice kitajskega hrčka, ki prekomerno izražajo hPEPT1) in transportne študije na celični liniji Caco-2 so jih privedle do enakega zaključka (50). Glede na rezultate preteklih raziskav torej vemo, da je valaciklovir substrat oligopeptidnega prenašalca PEPT1. V duodenumu razlika v permeabilnosti v absorptivni in eliminatorni smeri ni bila statistično značilna. Vzroka za manj izrazit aktivni transport valaciklovirja v absorptivni smeri v duodenumu ne poznamo. Če primerjamo  $P_{app(M \rightarrow S)}$  valaciklovirja v duodenumu, ileumu in jejunumu, določene v naši raziskavi, z vrednostmi  $P_{app(M \rightarrow S)}$ , ki so jih v različnih raziskavah določili na Caco-2 celičnem modelu ( $P_{app(M \rightarrow S)} = (5,5 \pm 0,8) \times 10^{-6}$  cm/s (44),  $P_{app(M \rightarrow S)} = (6,01 \pm 0,21) \times 10^{-6}$  cm/s (51), vidimo, da so v primerjavi z literurnimi vrednostmi višji. Vzrok je v tem, da je izražanje PEPT1 pri Caco-2 celicah mnogo manjše kot v enterocitih pri človeku (52) in podgani (53), poleg tega pa je izražanje prenašalcev pri Caco-2 celicah variabilno in močno odvisno od pogojev gojenja (5), časa gojenja in tudi izvora Caco-2 celic (54). Ob upoštevanju razlik med modeli pa so naši rezultati primerljivi z rezultati preteklih raziskav. Najnižji vrednosti  $P_{app}$  valaciklovirja v obeh smereh smo določili v kolonu. Permeabilnost valaciklovirja je v tem področju majhna, saj se PEPT1 v kolonu podgan po navedbi virov ne izraža (19, 55) oziroma je izražen v zelo majhnem obsegu (56). Kljub temu pa so v nekaterih drugih raziskavah dokazali, da se PEPT1 izraža v kolonu miši, podgan in človeka (35, 57, 58) ter potrdili njegovo aktivnost v distalnem kolonu miši (59). Vendar pa lahko sklepamo, da je bil v našem primeru aktivni prenos valaciklovirja v absorptivni smeri zelo majhen oziroma ga sploh ni bilo, saj je bila permeabilnost v absorptivni smeri manjša kot v eliminatorni smeri ( $ER = 1,25$ ). Poleg tega pa sta permeabilnostna koeficienta valaciklovirja v tem področju primerljiva s permeabilnostnima koeficientoma aciklovirja.

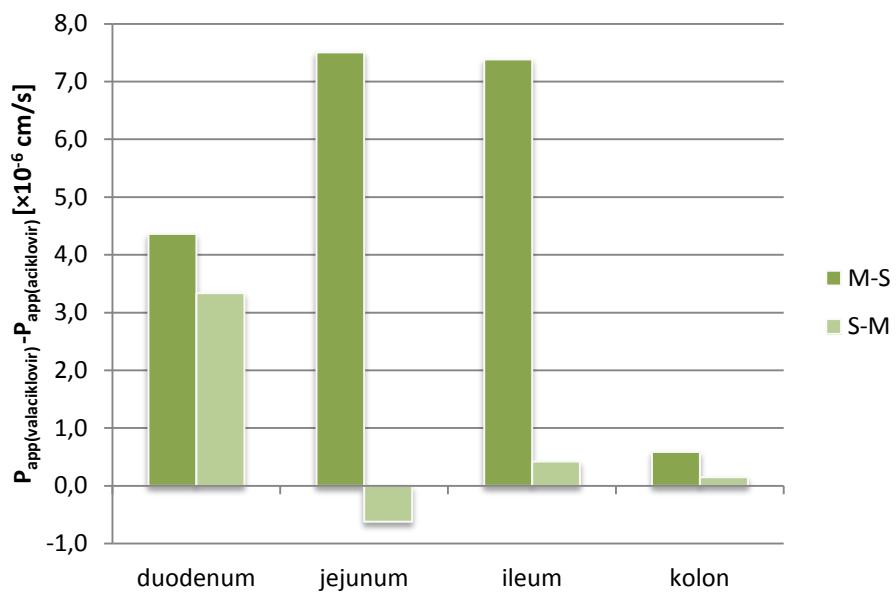
#### **4.4. Aktivnost prenašalca PEPT1 v različnih segmentih črevesa podgane**

Določevanje aktivnosti posameznih oligopeptidnih prenašalcev je težavno zaradi obstoja različnih peptidnih prenašalnih sistemov, katerih substratna specifičnost se prekriva (35). V uporabi so različne metode; mi smo za določitev aktivnosti PEPT1 uporabili 2 različna načina. Po prvem smo premerjali permeabilnost valaciklovirja v absorptivni in eliminatorni smeri, po drugem pa smo primerjali permeabilnost valaciklovirja s permeabilnostjo strukturno sorodne spojine, aciklovirja, ki pa ni substrat PEPT1.

Če predpostavimo, da je za absorpcijo valaciklovirja poleg pasivne difuzije bil odgovoren le PEPT1 in zanemarimo morebitni aktivni prenos v eliminatorni smeri, lahko določimo njegovo aktivnost s pomočjo razlike med permeabilnostnima koeficientoma v absorptivni in eliminatorni smeri (slika 13). Največjo aktivnost PEPT1 smo tako določili v ileumu, nekoliko manjšo pa v jejunumu, saj sta v teh dveh predelih vrednosti razlik največji. V duodenumu je aktivnost PEPT1 več kot 50 % manjša kot v jejunumu in ileumu. V kolonu aktivnosti PEPT1 ni (razlika med permeabilnostnima koeficientoma je negativna). Aciklovir ni substrat PEPT1, zato so vrednosti razlik najmanjše ter v jejunumu, ileumu in kolonu celo negativne.



Slika 13: Razlika med  $P_{app}$  v smeri  $M \rightarrow S$  in  $P_{app}$  v smeri  $S \rightarrow M$  za aciklovir in valaciklovir v različnih segmentih črevesa podgane.

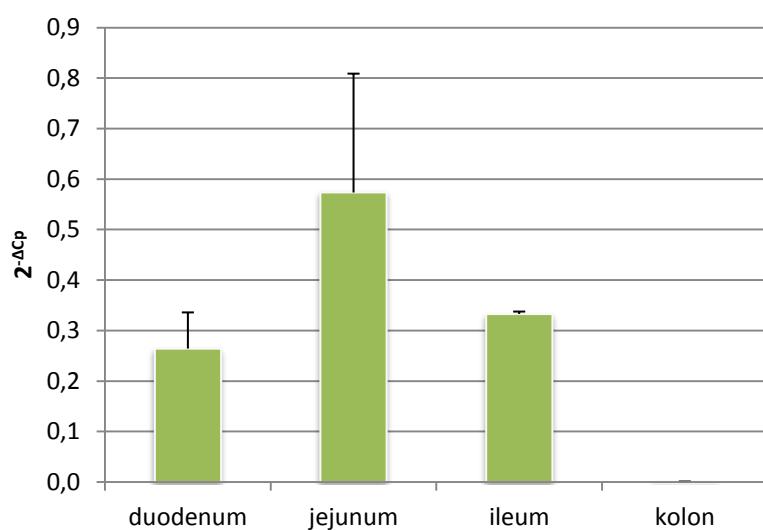


Slika 14: Razlika med  $P_{app}$  valaciclovirja in  $P_{app}$  aciklovirja v absorptivni in v eliminatorni smeri v različnih segmentih črevesa podgane.

Čeprav Ganero in Amidon trdita, da imata valaciclovir in aciklovir pri fiziološkem pH podobno ionizacijo in polarnost ter je zato izboljšanje absorpcije zaradi izboljšane pasivne difuzije malo verjetno (30), njuna trditev le delno drži. Valaciclovir ( $pK_{a1} = 1,90$ ,  $pK_{a2} = 7,47$ ,  $pK_{a3} = 9,43$  (30)) se pri fiziološkem pH nahaja v nevtralni in kationski obliki, medtem ko je aciklovir ( $pK_{a1} = 2,27$ ,  $pK_{a2} = 9,25$  (60)) pri fiziološkem pH praktično neioniziran. Kljub različni ionizaciji sta si učinkovini glede pasivne permeabilnosti podobni. To nam potrjujejo tudi naši rezultati, saj so vrednosti razlik med permeabilnostnimi koeficienti valaciclovirja in aciklovirja za smer S→M v jejunumu, ileumu in kolonu blizu 0 (slika 14). Opazno večja permeabilnost valaciclovirja kot aciklovirja v eliminatorni smeri (slika 14) skozi sluznico duodenuma morda podpira razlago, da je ER valaciclovirja (preglednica V) v tem področju črevesa manj izrazit prav zaradi prisotnosti aktivnega transporta v eliminatorni smeri. Aktivna eliminacija torej zmanjša razliko med permeabilnostnima koeficientoma valaciclovirja v absorptivni in v eliminatorni smeri, zato med njima ni bilo statistično značilne razlike (preglednica V). Ob predpostavki, da je bil v aktivni prenos valaciclovirja preko apikalne membrane enterocitov vključen le oligopeptidni prenašalec PEPT1, lahko njegovo aktivnost določimo s pomočjo razlik med permeabilnostnimi koeficienti valaciclovirja in aciklovirja, ki smo

jih določili za smer M→S (slika 14). Permeabilnost aciklovirja nam v tem primeru služi kot ocena pasivne komponente difuzije valaciklovirja. Prispevek PEPT1, izračunan po tej metodi, je bil največji v jejunumu in ileumu ( $7,5 \times 10^{-6}$  cm/s in  $7,4 \times 10^{-6}$  cm/s). Najmanjšo aktivnost PEPT1 smo zaznali v kolonu ( $0,6 \times 10^{-6}$  cm/s). Aktivnosti PEPT1 v duodenumu ne moremo dobro kvantificirati, saj sta tu potekala dva procesa v nasprotnih smereh; proces v eliminatorni smeri ni identificiran.

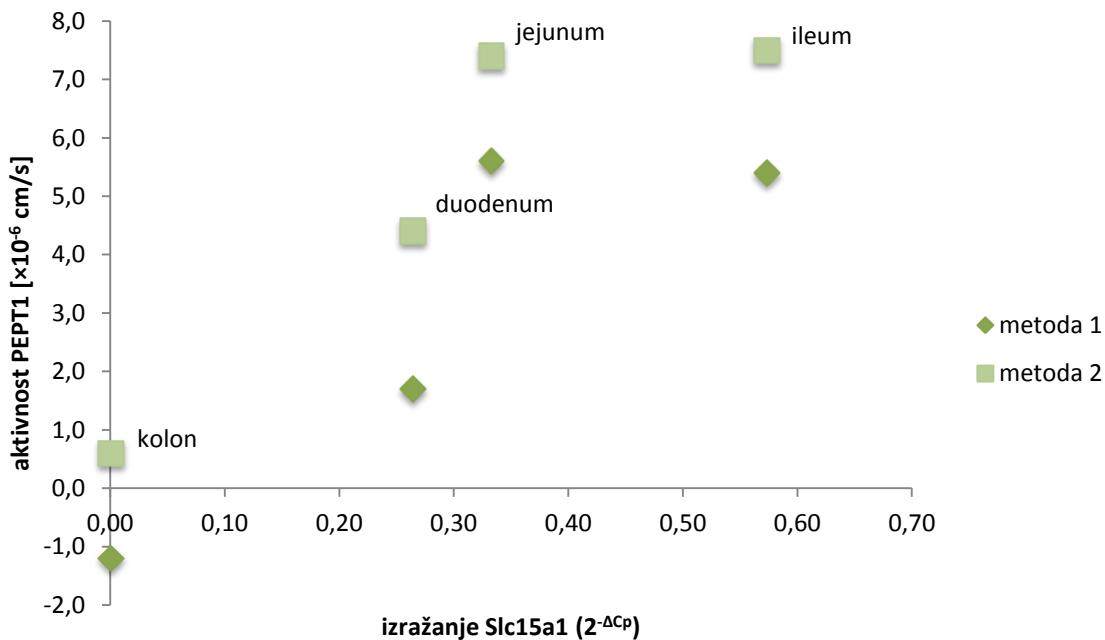
V laboratoriju, kjer uporabljajo isti sev podgan iste vzrejne organizacije kot so bile podgane, iz katerih smo pridobili segmente črevesa za naše poskuse, so preučili izražanje več genov v duodenumu, jejunumu, ileumu in kolonu podgane, med njimi tudi gena za PEPT1 (Slc15a1). Izražanje Slc15a1 je prikazano na sliki 15. Vidimo, da je bil gen najbolj izražen v jejunumu, najmanj pa v kolonu. V jejunumu je bila največja tudi variabilnost izražanja.



Slika 15: Izražanje Slc15a1 v različnih predelih podganjega črevesa (60).

Iz treh vzorcev posameznega segmenta črevesa podgane so izolirali RNA, jo očistili ter prepisali v cDNA z reakcijo PCR v realnem času. Izražanje genov so preverili v vzorcih cDNA z reakcijo PCR v realnem času in uporabo PCR mrež. Rezultate so analizirali z  $\Delta C_p$  metodo, kjer je  $\Delta C_p = C_p(\text{preiskovanega gena}) - C_p(\text{povprečja hišnih genov})$ . Rezultate so podali kot vrednosti  $2^{-\Delta C_p}$ . Slc15a1 sodi v skupino najbolj izraženih genov v duodenumu, jejunumu in ileumu, saj je  $2^{-\Delta C_p} > 0,1$ . Gen je slabo izražen le v kolonu ( $2^{-\Delta C_p}$  je med  $10^{-4}$  in  $10^{-3}$ ) (60).

Izražanje gena *Slc15a1* v različnih predelih črevesa smo primerjali z aktivnostjo PEPT1, ki smo jo določili po dveh metodah, ter izračunali njuni korelaciji (slika 16). Nivo izražanja PEPT1 mRNA v duodenumu, jejunumu in kolonu je primerljiv z aktivnostjo prenašalca v teh predelih. Najmanjše ujemanje je v področju jejunuma, vendar pa je bila tam tudi največja variabilnost izražanja. Kljub temu ocenujemo, da je korelacija med izražanjem gena PEPT1 in njegovo določeno aktivnostjo v obeh primerih dobra, saj Pearsonova koeficienta korelacije znašata 0,888 (aktivnost določena po prvi metodi – iz razlike med permeabilnostnima koeficientoma valaciklovirja v obeh smereh) in 0,914 (aktivnost določena po drugi metodi – iz razlike med permeabilnostnima koeficientoma obeh učinkovin v absorptivni smeri). Več točk, ki bi zagotavljale večjo zanesljivost naše trditve, pa ne moremo ustvariti, saj gre za naravno delitev črevesa na posamezne segmente.



Slika 16: Korelacija med izražanjem *Slc15a1* in aktivnostjo PEPT1 v različnih predelih črevesa podgane.

Poleg dveh, tukaj predstavljenih, obstajajo tudi drugi načini za določitev aktivnosti prenašalca PEPT1. Lahko bi določili  $P_{app(M \rightarrow S)}$  valaciklovirja ob prisotnosti inhibitorja PEPT1 (na primer glicilsarkozina, glicilprolina, kaptoprila ali cefadroksila, ki delujejo kot kompetitivni inhibitorji PEPT1 (35)). Tako bi s primerjavo  $P_{app(M \rightarrow S)}$ , določenim v

poskusih brez inhibitorja PEPT1, s  $P_{app(M \rightarrow S)}$ , določenim ob prisotnosti inhibitorja PEPT1, lahko določili, v kolikšni meri PEPT1 doprinese k permeabilnosti valaciklovirja in s tem njegovo aktivnost. Poskuse bi lahko vzporedno izvedli tudi na izoliranih segmentih črevesa podgan, pri katerih gen za PEPT1 ni izražen (»knock out« podgane) in določene permeabilnostne koeficiente primerjali s permeabilnostnimi koeficienti, ki smo jih določili na izoliranih segmentih črevesa podgan divjega tipa, vendar se take živali zaradi kompenzatornih mehanizmov le redko od divjega tipa razlikujejo le na pričakovan način.

Izsledki različnih študij, kjer so preučevali aktivnost prenašalca in/ali njegovo izražanje, se razlikujejo, kar pa je seveda pričakovano že zaradi razlik, ki jih lahko pričakujemo med podganami različnih sevov, starosti, teže itn. Poleg tega pa so razlike tudi v eksperimentalnih pristopih tako pri meritvah izražanja kot tudi pri meritvah aktivnosti prenašalca. Chu in sodelavci so določili statistično značilno korelacijo med izražanjem PEPT1 v podganjem jejunumu in permeabilnostjo njegovega substrata cefaleksina. Določili so tudi, da je izražanje PEPT1 v ileumu primerljivo oziroma nekoliko višje kot v jejunumu (62). Naruhashi in sodelavci so določili manjše izražanje PEPT1 mRNA v višjih predelih tankega črevesa podgane in večje izražanje v nižjih predelih. Permeabilnost cefadroksila, ki so jo preučevali v Ussingovih difuzijskih celicah, je bila skladna z izražanjem PEPT1 mRNA v posameznih predelih črevesa (63). Herrera-Ruiz in sodelavci pa so določili, da izražanje PEPT1 mRNA pri podgani ni omejeno le na določene predele črevesa, ampak je povsod široko izražena. Količine proteina v posameznih predelih črevesa niso določevali (58). Jappar in sodelavci so preučevali aktivnost PEPT1 v različnih regijah črevesa miši s pomočjo merjenja permeabilnosti glicilsarkozina, ki je znani substrat PEPT1. Največjo permeabilnost so določili v duodenumu in jejunumu, permeabilnost v ileumu je bila ~54 % manjša, permeabilnost v kolonu pa je bila le 6 % vrednosti v duodenumu in jejunumu. Pri miših, pri katerih PEPT1 ni bil izražen, je bila permeabilnost glicilsarkozina v vseh predelih črevesa zelo nizka. Aktivnost prenašalca v tankem črevesu je bila skladna z izražanjem PEPT1 mRNA in samega proteina (35). Vsi tukaj našteti rezultati predvsem poudarjajo prednost karakterizacije eksperimentalnega sistema, ki ga vsak raziskovalec uporablja v svojih raziskavah, pred uporabo literturnih vrednosti, saj te niso vedno prenosljive med laboratorijski.

Prenašalci so zanimivi z vidika načrtovanja zdravil in predzdravil. Sprememba strukture molekule v takšno, ki jo bo prenašalec prepoznal, lahko poveča absorpcijo sicer slabo

permeabilne molekule (64), tako načrtovana zdravila pa bi imela bolj predvidljive farmakokinetične lastnosti (57). Uspeh takšnega načina povečanja absorpcije je odvisen od specifičnosti in kapacitete prenašalca. PEPT1 je potencialno zanimiv ravno zaradi široke substratne specifičnosti, prav tako pa so strukturne modifikacije molekule v takšno, ki jo prenašalec prepozna, v veliko primerih izvedljive (37). Zato je poznavanje izražanja prenašalcev oziroma njihove aktivnosti pri različnih organizmih pomembno za izbiro primerenega modela za izvedbo študij. Ker se podgane pogosto uporabljajo v študijah permeabilnosti, nas je zanimala aktivnost prenašalca PEPT1 v različnih regijah črevesa podgane. Določili smo, da je PEPT1 v podganjem tankem črevesu močno izražen (slika 13) in tudi aktiven (sliki 14 in 15), zato menimo, da so podgane za študije absorpcije substratov PEPT1 zelo primerne. Ker pa študije nakazujejo, da je nivo izražanja PEPT1 pri miših in ljudeh medsebojno bolj primerljiv kot pri ljudeh in podganah, moramo pri *in situ* in *in vitro* študijah absorpcije peptidov in peptidomimetikov na podganah, če želimo ekstrapolirati rezultate na človeka, upoštevati različen vzorec izražanja prenašalcev. Prav tako moramo upoštevati, da obstajajo pri istih prenašalcih pri različnih vrstah organizmov razlike v primarni sestavi proteina, ki lahko vplivajo na kinetiko prenosa substratov (58).

## **5. SKLEPI**

S pomočjo dvoprostornih difuzijskih celic smo določili permeabilnostne koeficiente aciklovirja in valaciklovirja v različnih predelih črevesa podgane. Določili smo, da je bila v področju duodenuma, jejunuma in ileuma permeabilnost valaciklovirja v primerjavi s permeabilnostjo aciklovirja v absorptivni smeri precej večja. V teh treh področjih je bila večja tudi permeabilnost valaciklovirja v absorptivni smeri kot v eliminatorni smeri. To se popolnoma ujema s predvidenim prispevkom aktivne absorpcije valaciklovirja s pomočjo oligopeptidnega prenašalca PEPT1, ki se nahaja v sluznici tankega črevesa. V duodenumu razlika med permeabilnostjo valaciklovirja v obeh smereh ni bila statistično značilna. Domnevamo, da zaradi sočasne prisotnosti aktivnega transporta v eliminatorni smeri. Najnižjo permeabilnost valaciklovirja smo določili v kolonu, saj se PEPT1 v kolonu ne izraža oziroma je tu izražen v manjši meri. Potrdili smo tudi, da sta aciklovir in valaciklovir podobna glede pasivnega transporta. Na podlagi razlik med permeabilnostnimi koeficienti aciklovirja in valaciklovirja smo določili aktivnost PEPT1 v posameznih segmentih črevesa podgane. Največjo aktivnost prenašalca smo določili v področju jejunuma in ileuma, najmanjšo pa v kolonu. Profil aktivnosti PEPT1 smo primerjali s profilom izražanja njegovega gena Slc15a1 ter ocenili, da je korelacija med njima dobra.

## **6. VIRI IN LITERATURA**

1. Berggren S: Drug Transport and Metabolism in Rat and Human Intestine. Doktorska disertacija, Uppsala universitet, Faculty of Pharmacy. Uppsala 2006.
2. Obreza A, Šmid – Korbar J, Humar M, Janeš D, Razinger B, Frankič D idr.: Farmacevtski terminološki slovar. Založba ZRC, Ljubljana 2011; 17.
3. Brenner GM, Stevens SW: Pharmacology 4th edition. Saunders, ZDA 2013; 9.
4. The Merck Manual. Drug absorption. Julij 2012. Pridobljeno 27.9.2013 s [http://www.merckmanuals.com/professional/clinical\\_pharmacology/pharmacokinetics/drug\\_absorption.html](http://www.merckmanuals.com/professional/clinical_pharmacology/pharmacokinetics/drug_absorption.html).
5. Versantvoort C H M, Rompelberg C J M, Sips A J A M: Methodologies to study human intestinal absorption. RIVM report 630030 001. 2000.
6. Zorc Pleskovič R, Milutinović Živin A, Petrovič D: Histologija: učbenik za študente farmacije. Littera Picta, d.o.o., Ljubljana, 2006; 77-81.
7. Histology. The Small Intestine. Maj 2001. Pridobljeno 27.9.2013 s [http://www.courseweb.uottawa.ca/medicine-histology/english/gastrointestinal/gastro\\_small\\_intest.htm](http://www.courseweb.uottawa.ca/medicine-histology/english/gastrointestinal/gastro_small_intest.htm)
8. Jappar D: Role of proton-coupled oligopeptide transporters in small peptide absorption and disposition. Doktorska disertacija, The University of Michigan, College of Pharmacy, ZDA 2009.
9. Biology Mad. The Cell Membrane. Junij 2004. Pridobljeno 27.9.2013 s <http://www.biologymad.com/cells/cellmembrane.htm>.
10. About.com Biology. Bailey R: The Cell Membrane. Oktober 2013. Pridobljeno 19.10.2013 s <http://biology.about.com/od/cellanatomy/ss/cell-membrane.htm>.
11. Ball DW, Hill JW, Scott RJ: Introduction to Chemistry: General, Organic, and Biological. Februar 2011. Pridobljeno 19.10.2013 s <http://2012books.lardbucket.org/books/introduction-to-chemistry-general-organic-and-biological/s20-03-membranes-and-membrane-lipids.html>.
12. Timberlake KC: Chemistry : an introduction to general, organic, and biological chemistry 11<sup>th</sup> edition. Prentice Hall, ZDA, 2012; 546.
13. Biology Exams 4 U. Membrane Transport fot Macromolecules. 2013. Pridobljeno 19.10.2013 s <http://www.biologyexams4u.com/2012/06/membrane-transport-for-macromolecules.html>.

14. About.com Biology. Bailey R: Diffusion and Passive Transport. Julij 2013.  
Pridobljeno 19.10.2013 s  
[http://biology.about.com/od/cellularprocesses/ss/diffusion\\_2.htm](http://biology.about.com/od/cellularprocesses/ss/diffusion_2.htm)
15. Morris ME, You G: Drug transporters : molecular characterization and role in drug disposition. John Wiley & Sons, ZDA, 2007; 1-6, 106-112, 117.
16. Ehrhardt C, Kim KJ: Drug absorption studies : in situ, in vitro and in silico models. Springer Science+Business Media, ZDA, 2008; 560, 561.
17. Ogihara H, Suzuki T, Nagamachi Y, Inui K., Takata K: Peptide transporter in the rat small intestine: Ultrastructural localization and the effect of starvation and administration of amino acids. *Histochem J* 1999; 31(3): 169-174.
18. Terada T, Inui K: Peptide Transporters: Structure, Function, Regulation and Application for Drug Delivery. *Curr Drug Metab* 2004; 5(8): 85-94.
19. Shen H, Smith DE, Brosius FC 3rd: Developmental Expression of PEPT1 and PEPT2 in Rat Small Intestine, Colon, and Kidney. *Pediatr Res* 2001; 49(6): 789-795.
20. Inui K, Terada T, Masuda S, Saito H: Physiological and pharmacological implications of peptide transporters, PEPT1 and PEPT2. *Nephrol Dial Transplant* 2000; 15: 11-13.
21. Rubio-Aliaga I, Daniel H: Mammalian peptide transporters as targets for drug delivery. *Trends Pharmacol Sci* 2002; 9(23): 434-440.
22. Swaan WP, Tukker JJ: Molecular Determinants of Recognition for the Intestinal Peptide Carrier. *J Pharm Sci* 1997; 86(5): 596-602.
23. Adibi SA: Regulation of expression of the intestinal oligopeptide transporter (Pept-1) in health and disease. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2003; 285(5): G779-G788.
24. Zeigler RT, Fernandez-Estivariz C, Gu LH, Bazargan N, Umeakunne K, Wallance MT, Diaz EE, Rosado KE, Pascal RR, Galloway JR, Wilcox JN, Leader LM: Distribution of the H<sup>+</sup>/peptide transporter PepT1 in human intestine: up-regulated expression in the colonic mucosa of patients with short-bowel syndrome. *Am J Clin Nutr* 2002; 75(5): 922-930.
25. MacDougall C, Guglielmo BJ: Pharmacokinetics of valaciclovir. *J Antimicrob Chemother* 2004; 53: 899-901.
26. Beutner RK: Valacyclovir: a review of its antiviral activity, pharmacokinetics properties, and clinical efficacy. *Antiviral res* 1995; 28(4): 281-290.

27. Meadows KC, Dressman JB: Mechanism of Acyclovir Uptake in Rat Jejunum. *Pharm Res* 1990; 7(3): 299-303.
28. About.com Chemistry. Pridobljeno 31.10.2013 s <http://chemistry.about.com/od/factsstructures/ig/Chemical-Structures---A/Acyclovir.htm>.
29. Wikimedia commons. Pridobljeno 31.10.2013 s [http://commons.wikimedia.org/wiki/File:Valacyclovir\\_Structural\\_Formulae.png](http://commons.wikimedia.org/wiki/File:Valacyclovir_Structural_Formulae.png).
30. Granero EG, Amidon LG: Stability of valacyclovir: Implications for its oral bioavailability. *Int J Pharm* 2006; 317(1): 14-18.
31. Ganapathy ME, Huang W, Wang H, Ganapathy V, Leibach FH: Valacyclovir: A Substrate for the Intestinal and Renal Peptide Transporters PEPT1 and PEPT2. *Biochem Biophys Res Commun* 1998; 246(2): 470-475.
32. Valentino JS, Borchardt RT, Hageman MJ, Oliyai R, Maag H, Tilley JW: Prodrugs: Challenges and Rewards (Part 1). American Association of Pharmaceutical Scientists, ZDA, 2007; 672.
33. Physiologic Instruments. Voltage Clamps. 2009. Pridobljeno 17.10.2013 s [http://www.physiologicinstruments.com/VCC\\_MC8\\_Multichannel\\_Voltage\\_current\\_Clamp\\_p/vcc-mc8.htm](http://www.physiologicinstruments.com/VCC_MC8_Multichannel_Voltage_current_Clamp_p/vcc-mc8.htm).
34. Fakulteta za farmacijo. Katedra za biofarmacijo in farmakokinetiko. Pridobljeno 16.10.2013 s [http://wwwffa.uni-lj.si/fileadmin/homedirs/11/Katedra/Raziskovalna\\_dejavnost/KatedraBFPredstavitev.pdf](http://wwwffa.uni-lj.si/fileadmin/homedirs/11/Katedra/Raziskovalna_dejavnost/KatedraBFPredstavitev.pdf).
35. Jappar D, Wu SP, Hu Y, Smith DE: Significance and Regional Dependency of Peptide Transporter (PEPT) 1 in the Intestinal Permeability of Glycylsarcosine: In Situ Single-Pass Perfusion Studies in Wild-Type and Pept1 Knockout Mice. *Drug Metab Dispo* 2010; 38(10): 1740-1746.
36. Legen I, Kristl A: Factors Affecting the Microclimate pH of the Rat Jejunum in Ringer Bicarbonate Buffer. *Biol Pharm Bull* 2003; 26(6): 886-889.
37. Nozawa T, Toyobuku H, Kobayashi D, Kurkuma K, Tsuji A, Tamai I: Enhanced Intestinal Absorption of Drugs by Activation of Peptide Transporter PEPT1 Using Proton-Releasing Polymer. *J Pharm Sci* 2003; 11: 2208-2216.

38. Šavor N: Preučevanje mehanizmov absorpcije protivirusnih učinkovin, aciklovirja in njegovih strukturnih analogov, na izoliranem segmentu črevesa podgane. Magistrsko delo. Fakulteta za farmacijo, Ljubljana 2008.
39. Kristl A, Tukker JJ: Negative Correlation of n-Octanol Water Partition Coefficient and Transport of Some Guanine Derivatives Through Rat Jejunum In Vitro. *Pharm Res* 1998; 15(3): 499-501.
40. Skolnik S, Lin X, Wang J, Chen XH, He T, Zhang B: Towards Prediction of In Vivo Intestinal Absorption Using a 96-Well Caco-2 Assay. *J Pharm Sci* 2010; 99(7): 3246-3265.
41. Žakelj S, Berginc K, Roškar R, Kraljič B, Kristl A: Do the Recommended Standards for In Vitro Biopharmaceutic Classification of Drug Permeability Meet the »Passive Transport« Criterion for Biowaivers?. *Curr Drug Metab* 2003; 14(1): 21-27.
42. Suzuki H, Sugiyama Y: Role of metabolic enzymes and efflux transporters in the absorption of drugs from the small intestine. *Eur J Pharm Sci* 2000; 12(1): 3-12.
43. Landowski CP, Sun D, Foster DR, Menon SS, Barnett JL, Welage LS, Ramachandran C, Amidon GL: Gene Expression in the Human Intestine and Correlation with Oral Valacyclovir Pharmacokinetics Parameters. *J Pharmacol Exp Ther* 2003; 306(2): 778-786.
44. De Vruet RL, Smith PL, Lee CP: Transport of L-Valine-Acyclovir Via the Oligopeptide Transporter In The Human Intestinal Cell Line, Caco2. *J Pharmacol Exp Ther* 1998; 286(3): 1166-1170.
45. Ponce YM, Pérez MAC, Zaldivar VR, Diaz HG, Torrens F: A new topological descriptors based model for predicting intestinal epithelial transport of drugs in caco-2 cell culture. *J Pharm Pharmaceut Sci* 2004; 7(2): 186-199.
46. Shah P, Jogani V, Mishra P, Mishra AK, Bagchi T, Misra A: In Vitro Assessment of Acyclovir Permeation Across Cell Monolayers in the Presence of Absorption Enhancers. *Drug Dev Ind Pharm* 2008; 34(3): 279-288.
47. Sun H, Chow EC, Liu S, Du Y, Pang KS: The Caco-2 cell monolayer: usefulness and limitations. *Expert Opin Drug Metab Toxicol* 2008; 4: 395-411.
48. Tanaka Y, Taki Y, Sakane T, Nadai T, Sezaki H, Yamashita S: Characterization of Drug Transport Through Tight-Junctional Pathway in Caco-2 Monolayer: Comparison with Isolated Rat Jejunum and Colon. *Pharm Res* 1995; 12(4): 523-528.

49. Artursson P, Palm K, Luthman K: Caco-2 monolayers in experimental and theoretical predictions of drug transport. *Adv Drug Deliv Rev* 2001; 46(1-3): 27-43.
50. Han H, de Vrueh RLA, Rhie JK, Covitz KMY, Smith PL, Lee CP, Oh DM, Sadee W, Amidon GL: 5'-Amino Acid Esters of Antiviral Nucleosides, Acyclovir, and AZT Are Absorbed by the Intestinal PEPT1 Peptide Transporter. *Pharm Res* 1988; 8(15): 1154-1159.
51. Anand BS, Katragadda S, Mitra KA: Pharmacokinetics of Novel Dipeptide Ester Prodrugs of Acyclovir after Oral Administration: Intestinal Absorption and Liver Metabolism. *J Pharmacol Exp Ther* 2004; 311(2): 659-667.
52. Shimizu R, Sukegawa T, Tsuda Y, Itoh T: Quantitative prediction of oral absorption of PEPT1 substrates based on in vitro uptake into Caco-2 cells. *Int J Pharm* 2008; 354(1-2): 104-110.
53. Kim HR, Park SW, Cho HJ, Chae KA, Sung JM, Kim JS, Landowski CP, Sun D, Abd Et-Aty AM, Amidon GL, Shin HC: Comparative gene expression profiles of intestinal transporters in mice, rats and humans. *Pharm Res* 2007; 56(3): 224-236.
54. Englund G, Rorsman F, Rönnblom A, Karlstrom U, Lazarova L, Gråsjö J, Kindmark A, Artursson P: Regional levels of drug transporters along the human intestinal tract: Co-expression of ABC and SLC transporters and comparison with Caco-2 cells. *Eur J Pharm Sci* 2006; 29(3-4): 269-277.
55. Ogihara H, Saito H, Shin BC, Terada T, Takenoshita S, Nagamachi Y, Inui K, Takata K: Immuno-Localization of H<sup>+</sup>/Peptide Cotransporter in Rat Digestive Tract. *Biochem Biophys Res Commun* 1996; 220: 848-852.
56. Lu Hong, Klaassen C: Tissue distribution and thyroid hormone regulation of Pept1 and Pept2 mRNA in rodents. *Peptides* 2006; 27(4): 850-857.
57. Meier Y, Eloranta JJ, Darimont J, Ismair MG, Hiller C, Fried M, Kullak-Ublick GA, Vavricka SR: Regional Distribution of Solute Carrier mRNA Expression Along the Human Intestinal Tract. *Drug Metab Dispos* 2007; 35(4): 590-594.
58. Herrera-Ruiz D, Wang Q, Cook JT, Knipp GT: Spatial Expression Patterns of Peptide Transporters in the Human and Rat Gastrointestinal Tracts, Caco-2 In Vitro Cell Culture Model, and Multiple Human Tissues. *AAPS Pharmsci* 2001; 3(1): E9.
59. Wuensch T, Schulz S, Ullrich S, Lill N, Stelzl T, Rudio-Aliaga I, Loh G, Chamaillard M, Haller D, Daniel H: The peptide transporter PEPT1 is expressed in distal colon in

- rodents and humans and contributes to water absorption. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol 2013; 305(1): 66-73.
60. RxList. The Internet Drug Index. 2014. Pridobljeno 22.1.2014 s <http://www.rxlist.com/zovirax-drug.htm>.
61. Katja Kristan, osebna komunikacija. Neobjavljeni podatki za interno uporabo.
62. Chu XY, Sanchez-Castaño GP, Higaki K, Oh DM, Hsu CP, Amidon GL: Correlation between Epithelial Cell Permeability of Cephalexin and Expression of Intestinal Oligopeptide Transporter. J Pharmacol Exp Ther 2001; 299(2): 575-582.
63. Naruhashi K, Sai Y, Tamai I, Suzuki N, Tsuji A: PepT1 mRNA Expression is Induced by Starvation and Its Level Correlates with Absorptive Transport of Cefadroxil Longitudinally in the Rat Intestine. Pharm Res 2002; 19(10): 1417-1423.
64. Kerns H, Di L: Drug-like Properties: Concepts, Structure Design and Methods, 1st Edition. Elsevier Inc., ZDA, 2008. 426-438.