

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO

IRENA KOLENC

**BARIERNE LASTNOSTI PEYERJEVIH PLOŠČ IN MUKUSA
TANKEGA ČREVESJA PODGANE ZA UČINKOVINE VGRAJENE V
MIKRODELCE**

BARRIER PROPERTIES OF PEYER'S PATCHES AND RAT SMALL
INTESTINAL MUCUS FOR DRUGS LOADED IN MICROPARTICLES

EMŠ FARMACIJA

Ljubljana, 2014

Magistrsko delo sem opravila v okviru Katedre za biofarmacijo in farmakokinetiko
Fakultete za farmacijo Univerze v Ljubljani.

Zahvaljujem se mentorju doc. dr. Simonu Žaklju za vso pomoč, vodenje, nasvete in
potrpežljivost pri eksperimentalnem delu ter pisanju magistrskega dela. Zahvaliti se želim
tudi dipl. ing. kem. tehn. Nevenki Lilik za vse drobne nasvete in pomoč v laboratoriju.
Posebej se želim zahvaliti staršem, prijateljem in fantu za vso podporo ter spodbudo v času
študija in opravljanja magistrskega dela.

Izjava:

Izjavljam, da sem magistrsko delo opravila samostojno pod mentorstvom doc. dr. Simona
Žaklja.

Ljubljana, 2014

Predsednik komisije: prof. dr. Borut Štrukelj

Član komisije: doc. dr. Žiga Jakopin

KAZALO

1	POVZETEK	1
2	SEZNAM OKRAJŠAV	3
3	UVOD.....	4
3.1	Prebavni trakt.....	4
3.1.1	<i>Resice</i>	4
3.1.2	<i>Kripte</i>	5
3.1.3	<i>Mukozni imunski sistem</i>	6
3.2	Peyerjeve plošče	6
3.3	Mikrodelci	7
3.3.1	<i>Furosemid</i>	8
3.3.2	<i>Termično karbonizirani silicijevi mikrodelci, polnjeni s furosemidom (TCPSi)</i> ..	8
3.4	Izbira živalskega modela	10
3.5	Transport delcev skozi epitelij prebavil	11
3.5.1	<i>Paracelularni prehod delcev in makromolekul</i>	11
3.5.2	<i>Transcelularni prehod delcev in makromolekul</i>	12
3.5.3	<i>Limfatični privzem delcev preko M-celic</i>	12
3.6	Modeli.....	13
3.6.1	<i>Ex vivo modeli</i>	13
3.6.2	<i>Celice Sweetana-Grass</i>	13
4	NAMEN DELA	16
5	MATERIALI IN METODE	17
5.1	Materiali	17
5.2	Raztopine	18
5.3	Aparature in pribor	20
5.4	Metode	20
5.4.1	<i>Določanje koncentracij učinkovin</i>	20

5.4.2 Difuzijske celice Sweetana-Grass.....	20
5.5 Izvedba poskusa.....	22
5.5.1 Priprava difuzijskih celic in aparature za poskus	22
5.5.2 Izvedba poskusa z mešanico učinkovin brez cisteina in ob predhodni uporabi cisteina.....	22
5.5.3 Izvedba poskusa z mikrodenci	23
5.5.4 Pregled tkiva pod stereolupo	25
5.6 Elektrofiziološki parametri	25
5.6.1 Preizkušeni postopki za oceno vitalnosti in integritete tkiva.....	25
5.7 Izračun permeabilnostnega koeficienta	27
5.8 Analizne metode	29
5.9. Statistični testi	31
6 REZULTATI IN RAZPRAVA	34
6.1 Vzpostavitev modela	34
6.1.1 Ocena vitalnosti in integritete	35
6.1.2 Vpliv cisteina na permeabilnost	37
6.1.3 Vpliv manjše površine tkiva na permeabilnost	38
6.2 Vloga mukusa.....	40
6.2.1 Vpliv mukusa in manjših vstavkov na jejunumu	41
6.2.2 Vpliv mukusa in manjših vstavkov na Peyerjeve plošče	42
6.2.3 Vpliv mukusa pri mikrodencih.....	43
6.3 Jejunum ali Peyerjeve plošče.....	45
6.3.1 Absorpcija iz raztopine učinkovin brez prisotnosti cisteina	45
6.3.2 Absorpcija iz raztopine učinkovin ob predhodni prisotnosti cisteina na mukozni strani.....	46
7 ZAKLJUČKI	53
8 LITERATURA	54

1 POVZETEK

Za velik delež tako novih kot že poznanih učinkovin je značilna slaba topnost, za nekatere pa tudi slaba permeabilnost. V želji, da bi dosegli ustrezno biološko uporabnost teh učinkovin, so raziskovalci našli različne rešitve. Mnogo raziskav je usmerjenih tudi v možnost uporabe nano- in mikrodolcev kot dostavnih sistemov.

V magistrski nalogi smo postavili nov model. Na modificiranem modelu Sweetana-Grass difuzijskih celic, dodatno prirejenem za delo s suspenzijo mikrodolcev, smo opazovali razlike v permeabilnosti modelnih učinkovin skozi običajno sluznico tankega črevesa in skozi Peyerjeve plošče tankega črevesa podgane. Za furosemid, učinkovino iz četrtega razreda po biofarmaceutskem klasifikacijskem sistemu, torej slabo topno in slabo permeabilno učinkovino, smo želeli preveriti, ali na njeno navidezno permeabilnost skozi tanko črevo in skozi Peyerjeve plošče lahko vpliva vgradnja v termično karbonizirane mikrodolce iz mezoporoznega silicija.

V oceni vitalnosti in integritete smo prišli do zanimivih razlik. Prilagoditve v modelu so se izkazale za uspešne, a so imele vpliv na rezultate. Kot smo pričakovali, je bila v primeru raztopin permeabilnost skozi jejunum višja. Mukoliza je imela nekoliko večji vpliv na prehod slabo permeabilnih učinkovin, pri čemer je bilo opaziti splošno večji vpliv pri jejunumu. Značilnih razlik v difuziji furosemida iz raztopine in iz TCPSi mikrodolcev nismo potrdili, a smo s slikami pod stereolupo dokazali adhezijo delcev na sluznico, pri čemer je mukus le eden od dejavnikov, ki vpliva nanjo.

ABSTRACT

A large proportion of both new as well as already known substances is characterized by poor solubility, and some also by poor permeability. In an effort to achieve adequate bioavailability of these substances, researchers have come up with different solutions. Among other things, a number of researches is focused also on the possibility of using nano-and microparticles as delivery systems.

In this master thesis we set up a new model. In a modified model of a Sweetana-Grass diffusion cells, further rearranged to work with a suspension of microparticles, we observed differences in the permeability of model substances through the mucosa of the small intestine and through Peyer's patches of the small intestine of the rat. For furosemide - the active ingredient of the fourth class of the Biopharmaceutics Classification System, that is poorly soluble and poorly permeable, we wanted to find out whether its apparent permeability through the small intestine and through Peyer's patches may be affected by its loading in thermally carbonized mesoporous silicon microparticles.

We have come to some interesting differences in the assessment of the vitality and integrity. Adjustments of the model proved to be successful, but they have their influence on the results. As expected, in the case of solutions higher permeability was observed through the jejunum. Mucolysis had a somewhat greater influence on the passage of poorly permeable substances, whereby we observed generally greater influence in the jejunum. No significant differences in the diffusion of furosemide from the solution and from TCPSi microparticles were confirmed. With help of images that we took under stereo-magnifying glass we demonstrated adhesion of the particles on the membrane, wherein mucus is only one of the factors that influence it.

2 SEZNAM OKRAJŠAV

GALT – ang.: gut associated lymphoid tissue

FAE – ang.: follicle associated epithelium

GIT – gastrointestinalni trakt

PP – Peyerjeve plošče

M-celice – membranske epiteljske celice nad Peyerjevimi ploščami

NAC – N-acetilcistein

CYS – cistein

GC – ang.: germinal center

BCS – ang.: Biopharmaceutics Classification System

KV – koeficient variacije

MD – mikrodelci

ND – nanodelci

TCPSi – termično karbonizirani silicijevi mikrodelci

Caco-2 – heterogene kolonorektalne epiteljske celice humanega adenokarcinoma

HPMC – hidroksipropilmetil celuloza

P_{app} – navidezni permeabilnostni koeficient

TEP – transepiteljska napetost

TEU – transepiteljska upornost

I_{sc} – kratkostični tok

VCC MC8 – ang.: Multichannel voltage/current clamp, 8-kanalni potenciometer

HPLC – tekočinska kromatografija visoke ločljivosti

TG – termogravimetrija

DSC – differential scanning calorimetry

P1, P2 in P3 – poskus 1, 2 in 3 na vstavkih z manjšo površino ($0,1 \text{ cm}^2$) brez dodatka cisteina

P4, P5 – poskus 4 in 5 na vstavkih z manjšo površino ($0,1 \text{ cm}^2$) z dodatkom cisteina

S-S vezi – disulfidne vezi

celice SG – celice Sweetana-Grass

EF parametri – elektrofiziološki parametri

3 UVOD

3.1 Prebavni trakt

Sluznica prebavil je organizirana v tri osnovne strukture: resice, kripte in limfatično tkivo prebavil (GALT – ang. gut associated lymphoid tissue). Prebavni epitelij sestavlja le ena plast celic, ki nadzira prehajanje makromolekul in patogenov, hkrati pa omogoča absorpcijo hranil (2).

3.1.1 Resice

Resice so usmerjene v lumen črevesja. Pretežno jih prekrivajo zreli absorptivni enterociti, med katerimi se nahajajo nekatere čašaste celice in endokrine celice. Funkcija enterocitov je privzem hranil in njihov transport v kri. Apikalna stran enterocitov je pokrita z rigidnimi mikroviliji, ki se tesno stikajo. Vrhovi mikrovilijev vsebujejo mucinu podobne membranske glikoproteine, ki tvorijo glikokaliks. Slednji ima zaščitno funkcijo, saj preprečuje privzem antigenov in patogenov, hkrati pa nudi mikrookolje, ki omogoča prebavo in absorpcijo hranil. Čašaste celice izločajo plast sluzi, mukus, ki ima številne vloge. Odgovoren je za zaščito pred fizikalnimi in kemičnimi poškodbami ter za zajetje in odstranjevanje delcev ter mikroorganizmov (2).

3.1.1.1 Mukus

Mukus je adhezivna plast, ki prekriva sluznico prebavil. Debelina se lokalno spreminja. Meri od 50 μm pa vse tja do 500 μm (2). Gre za močno viskoelastično mrežo, ki lahko ovira transport učinkovin, makromolekul, nanodelcev in virusov (12). Delce ujame, kar povzroči nastanek skupkov, s tem pa se poveča končna velikost delcev. Vse skupaj se odraža v zmanjšanem koeficientu difuzije skozi mukus. Na ta način je difuzija v sluznico prebavil omejena (2).

Ima zgoščeno mikrostrukturo. Glavna komponenta, ki je odgovorna za viskozne in elastične, gelu podobne, lastnosti, je glikoprotein mucin. Molekule mucina so velike (0,5–20 MDa) in so močno glikozilirane (12). Zaradi prisotnosti sulfatnih skupin in sialične kisline so negativno nabite (2). Njihova zgradba mu daje videz metlice za čiščenje steklenic (ang. bottle brush). Kemijska sestava omogoča, da prihaja do elektrostatskih in hidrofobnih interakcij ter vodikovih vezi. Posledica so številne interakcije med snovmi iz okolja in adhezivnim mukusom, kar lahko značilno vpliva na prehod topljencev (12).

In vivo študija vpliva mukusa na prehod nano- in mikrodelcev iz lateksa je pokazala, da mukus ne deluje kot absolutna prepreka za difuzijo delcev, a močno ovira njihov prehod. Da bi podrobneje preverili vpliv mukusa na difuzijo delcev, so v eni od *in vivo* študij na podganah dodali N-acetilcistein (NAC), ki deluje kot mukolitik. V primerjavi s kontrolno skupino so opazili povečan prehod delcev, kar nakazuje na to, da mukus igra pomembno vlogo pri privzemu delcev (2). Dokazano je bilo tudi, da delci lahko vzajemno delujejo na mukus. To se lahko odrazi v slabši barierni funkciji slednjega, kar vodi do spremenjenih poti prehoda. Snovem iz okolja se na ta način omogoča veliko hitrejši transport (12).

3.1.1.2 Cistein

Nekateri raziskovalci so predvidevali, da mucin ni edina molekula, ki je odgovorna za barierno funkcijo, zato so se odločili raziskati še ostale možnosti. Poskuse so opravili na nativnem prašičjem mukusu in ugotovili, da vsebuje tudi veliko količino lipidov in proteinov. Ravno lipidne komponente naj bi imele največji vpliv na difuzijo različnih učinkovin (7). Kljub temu se večina poskusov, s katerimi avtorji želijo oceniti vpliv mukusa na prehajanje učinkovin, opravlja ob prisotnosti mukolitika, ki deluje na mucin.

NAC je derivat aminokislina cistein. Mukolitični učinek je posledica sulfhidrilne skupine, ki cepi disulfidne vezi. NAC naj bi tako prekinil S-S vezi mucina ter S-S vezi v stranskih verigah proteina. Adhezivni mukus se spremeni v vodotopnega in posledično naj bi delci lažje prehajali do M-celic Peyerjevih plošč (6).

Znano je, da uničenje ali solubilizacija mukusa z reducenti disulfidne vezi, kot so na primer 1,4-ditio-DL-treitol, L-cistein (CYS) in NAC, vpliva tudi na pH mikroklima, kar bi lahko posledično vplivalo na koncentracijski gradient protonov preko apikalne membrane enterocitov. Gradient predstavlja gonilno silo za prehod nekaterih učinkovin, vendar so raziskovalci ugotovili, da kljub značilnemu zvišanju lokalnega pH ne pride do spremenjenega transporta. V primeru L-cisteina lahko to pojasnimo z njegovimi ostalimi učinki na mukus. Prekinitev disulfidne vezi med podenotami glikoproteina vodi namreč tudi do zmanjšane viskoznosti in elastičnosti mukusa (5).

3.1.2 Kripte

Kripte so cevaste ugreznine črevesnega epitelija med črevesnimi resicami, pokrite z enoskladnim visokoprizmatskim epitelijem (enterociti, čašice, Panethove celice,

enterokromafine celice, nediferencirane celice). Izločajo nekatere prebavne encime, baktericidne encime in gastrointestinalne hormone (22).

3.1.3 Mukozni imunski sistem

Mukozni imunski sistem je razdeljen na dve področji, in sicer induktivno področje, kjer se po privzemu antigena sproži imunski odgovor, ter področje delovanja, kjer se imunski odziv izrazi. Induktivno področje prepoznamo po limfatičnem tkivu, ki je navadno sestavljeno iz limfoidnih foliklov. Folikle tvorijo nezrele B-celice in sosednja področja s T-celicami. Folikli so združeni v večje tvorbe, Peyerjeve plošče, ki jih lahko vidimo s prostim očesom. FAE (folicle associated epithelium) prekriva vsak folikel in ima značilne biokemične lastnosti, ki so ključ do privzema nespremenjenih makromolekul in mikroorganizmov v črevesje (2).

3.2 Peyerjeve plošče

Prebavni trakt je za razliko od večine ostalih organov redno izpostavljen ogromnemu številu makromolekul, ki predstavljajo različne antigene. Te makromolekule so izredno raznolike in izhajajo iz različnih virov, med drugim iz zaužite hrane, lokalne črevesne flore in virusov. Za gostiteljsko celico so škodljivi le nekateri antigeni in celice črevesja morajo biti sposobne obvladovati to raznolikost. Ravno zaradi tega obstaja poseben imunski sistem na površini sluznice črevesja (1).

V prebavilih imamo komenzalne in patogene bakterije. Ravnovesje med njimi se ohranja tudi zaradi interakcije epitelijske prebavil z limfatičnim tkivom. GALT je največji limfatični organ, saj vsebuje tudi do 70 % imunocitov, prisotnih v telesu. Sestavljajo ga tako posamezni kot skupki limfatičnih foliklov. Slednje je prvi opisal Marco Aurelio Severino leta 1645. Kasneje so jih poimenovali Peyerjeve plošče, saj jih je bolj podrobno opisal švicarski patolog Johann Condar Peyer leta 1677 (4).

Peyerjeve plošče so torej del limfatičnega tkiva črevesja in so primarno mesto interakcij med mukoznimi imunskimi strukturami ter antigeni v lumnu črevesja. Pomembne vloge ne igrajo le v lokalnem imunskem odzivu, pač pa tudi v sistemski imunosti, saj prenašajo različne mikrodelce ter makromolekule iz lumna prebavil v sistemski krvni obtok in druge organe (1).

Gre za skupke subepitelijskih limfoidnih foliklov, ki se tvorijo med viliji in so razporejeni vzdolž tankega črevesa, predvsem po mezenterični strani od pilorusa do ileocekalnih zaklopk. Najdemo jih pri večini živalskih vrst, vse od ptičev do sesalcev (2).

Morfološko so PP razdeljene na tri področja:

- folikularno področje,
- intrafolikularno področje,
- folikularni epitelij (FAE – ang. follicle associated epithelium) (4).

Folikularno in intrafolikularno področje sestavljajo limfatični folikli Peyerjevih plošč. Vsebujejo kalitveni center (ang. germinal center) s proliferativnimi celicami B, folikularnimi dendritičnimi celicami in makrofagi. Prav zaradi kalitvenega centra ima PP izbočen videz. Folikel obdaja obroč oz. subepitelne kupole (ang. subepithelial dome) in tu najdemo različne celice: limfocite B, limfocite T, makrofage in dendritične celice. PP so s telesom povezane preko venul in limfatičnih žil (4).

PP od lumna črevesja loči specializiran epitelij FAE, ki prekriva kupolo (2). FAE je sestavljen iz absorptivnih celic, interepitelijskih limfocitov in diferenciranih M-celic. Slednje naj bi delovale kot antigen predstavitvene celice, saj selektivno privzamejo antigen iz lumna črevesja in posredujejo ustrezno informacijo limfocitom in makrofagom (1).

3.3 Mikrodelci

Peroralna pot lahko predstavlja precejšnje izziv za dostavo varnih in učinkovitih zdravil. Privzem nano- ali mikrodelcev (ND in MD) vzdolž GIT po peroralni aplikaciji je zadnje čase deležen velike pozornosti, saj obstaja možnost uporabe teh poti za dostavo makromolekul. Vendar pa moramo, da bi dosegli učinkovito absorpcijo, zagotoviti privzem iz GIT hitro in v zadostnem obsegu (2).

MD in ND lahko prehajajo v epitelij prebavil v različnem obsegu. Pot, mehanizem in sam obseg prehoda še niso popolnoma jasni. Obstajata dve teoriji privzema delcev: prva trdi, da se ti absorbirajo preko M-celic PP, druga pa, da prehod poteka paracelularno z rahljanjem tesnih stikov med celicami (13). Od leta 1980 se predpostavlja, da so PP primarno mesto privzema delcev, saj vsebujejo FAE. Značilnost FAE je prisotnost M-celic, za katere je bilo dokazano, da omogočajo transcitozo delcev. Kljub velikemu obsegu literature o privzemu delcev preko PP, še vedno niso definirani najbolj optimalni fizikalno-kemijski

parametri delcev (velikost, zeta potencial, hidrofobnost, obloge z adhezijskimi faktorji), ki bi omogočali čim boljši privzem prek PP. Še več, številna neskladja v literaturi so privedla do nekoherentnih in nasprotujočih si podatkov o obsegu privzema delcev skozi PP (2). Različne raziskave poročajo o širokem razponu privzema delcev, vse od 0,01 % pa do 3,6 %. Za variabilnost v rezultatih so odgovorni postopki določitve, ki so bili uporabljeni, razlike med vrstami testnih živali, metodami aplikacije delcev, različnimi časovnimi meritvenimi točkami in metodami poskusov (13). Poleg tega je zaradi uporabe širokega spektra polimerov, različnih velikosti in sestave delcev, različnih analitskih metod ter eksperimentalnih modelov težko podati natančne zaključke (2).

3.3.1 Furosemid

Raztapljanje in topnost furosemida pri nizkem pH sta slaba, a se zelo povečata z višanjem pH, zaradi česar furosemid uvrščamo v IV. oziroma III. BCS razred. Slabo in variabilno absorpcijo furosemida v zgornjem delu tankega črevesa pripisujejo slabemu raztapljanju zaradi nizkega pH ter proteinom, ki ga črpajo iz celic (10).

V primeru raztopine furosemida je permeabilnost najboljša pri pH 5,5 in se zmanjšuje z višanjem pH. Furosemid je blago lipofilna učinkovina, a je njegova lipofilnost zaradi močne kislinske narave ($pK_{a1} = 3,70 \pm 0,07$; $pK_{a2} = 9,93 \pm 0,09$) občutno zmanjšana v pH območju tankega črevesa ($\log D_{pH5,5} = 0,54$, $\log D_{pH7,4} = 0,03$). Poleg močne ionizacije k počasnemu pasivnemu transcelularnemu transportu pri nevtralnem pH pripomore tudi velika polarna površina. Zato ocenjujejo, da pri pH 7,4 pomemben del furosemida prehaja paracelularno (10).

3.3.2 Termično karbonizirani silicijevi mikrodenci, polnjeni s furosemidom (TCPSi)

Številne nove in že obstoječe učinkovine imajo neugodne farmakokinetične lastnosti, torej nizko biološko uporabnost ob peroralni aplikaciji. K temu lahko prispevajo slaba topnost in počasno raztapljanje v lumnu prebavil, slabe permeabilnostne lastnosti v GIT ter metabolizem prvega prehoda. Ena od možnosti, kako zaobiti težave s slabim raztapljanjem, so porozni materiali mikro- oz. nanodimenzij. Mikrodenci so stabilni pod ostrimi pogoji, ki vladajo vzdolž prebavnega trakta. Njihove fizikalno-kemijske lastnosti se ohranijo. Delujejo kot neerozivni nosilci učinkovin (10).

Porozni materiali potencialno izboljšajo raztapljanje slabo topnih učinkovin, saj vplivajo na njihovo obliko. Tvorbo urejene kristalne oblike onemogočajo pore. Če so te le nekoliko večje od molekul (govorimo o nanoporoznih mikrodelcih), se je učinkovina prisiljena organizirati v amorfnu obliko, za katero pa je znano, da ima boljše topne lastnosti, še posebej kadar ima kristalna oblika učinkovine visoko mrežno energijo (11).

Porozni silicijevi MD so termično karbonizirani, da pridobijo primerno površino za aplikacijo učinkovin. Izkazalo se je, da površinske lastnosti delcev vplivajo na afiniteto učinkovine do delca. Polnjenje TCPSi mikrodelcev je odvisno od kemijske narave učinkovine in od raztopine učinkovine oz. uporabljenega topila. Vpliv vgradnje v MD na sproščanje je odvisen od raztapljanja učinkovine. Ko je hitrost raztapljanja proste učinkovine visoka, MD povzročijo zakasnjeno sproščanje, medtem ko pri učinkovinah s počasnim raztapljanjem vgradnja v MD izboljša raztapljanje. Pri učinkovinah, kjer je raztapljanje odvisno od pH, pa se ta odvisnost zmanjša, če se učinkovino vgradi v MD (11).

TCPSi mikrodelci so primerni za vezavo učinkovin, saj predstavljajo inerten in stabilen matriks z veliko specifično površino ($248 \text{ m}^2/\text{g}$) in dobro močljivostjo. Velikost por onemogoča tvorbo kristalinične oblike furosemida v njihovi notranjosti. Napolnjenost delcev so ocenili s HPLC (39,1 %), TG (43 %), He piknometrom (39,6 %) in dušikom (41,2 %), DSC pa je pokazal, da na površini delcev ni furosemida. Med furosemidom in delci ne prihaja do interakcij, učinkovina se v delce ne veže s kemijskimi vezmi (10).

Permeabilnost furosemida v TCPSi mikrodelcih so proučevali na Caco-2 celicah. Za kontrolno skupino so uporabili raztopino furosemida. Poskusi so potekali v smeri absorpcije, torej v apikalni-bazolateralni smeri, in pri različnih vrednostih pH, kar je simuliralo pogoje vzdolž GIT (10).

Raztapljanje furosemida je zaradi njegove kisle narave boljše pri višjem pH. Ko so furosemid naložili v delce, so pri pH 5,5 opazili izboljšanje. Raztapljanje nevezanega furosemida pri tem pH je izredno majhno. V primeru na TCPSi mikrodelce vezanega furosemida, se je v 60 minutah raztopilo 75 % vezane učinkovine, medtem ko je v enakem času prišlo do 5 % raztapljanja nevezane oblike. Pri pH 6,8 in 7,4 sta si profila raztapljanja za vezano in prosto obliko učinkovine precej podobna (11).

Permeabilnost furosemida iz TCPSi delcev je bila boljša kot pri raztopini furosemida, ne glede na izbran pH. Izračunane vrednosti P_{app} so bile višje, čeprav so jih izračunali ob predpostavki, da je prišlo do 100 % sproščanja furosemida iz delcev. Permeabilnost furosemida iz TCPSi mikrodcelcev je bila pri pH 5,5 1,5-krat višja, pri pH 7,4 pa kar 4,7-krat višja kot permeabilnost raztopine furosemida (10).

Dodatno so opravili tudi poskuse z raztopino furosemida ob prisotnosti TCPSi mikrodcelcev, ki pa niso vsebovali učinkovine. Dokazali so rahlo povečanje permeabilnosti v primerjavi s kontrolno skupino, kar pomeni, da na permeabilnost delno vplivajo tudi delci sami. Rezultat nakazuje, da povečan paracelularni transport ne odigra pomembne vloge v izboljšanju permeabilnosti furosemida pri pH 7,4 (10).

Dokazano je, da ob aplikaciji delcev zaradi topikalnega stika pride do značilne spremembe v mukusu. Pojav so proučevali na ustaljenih modelih z uporabo sferičnih nanodcelcev, enotnih velikosti 200 nm, in sferičnih mikrodcelcev, velikosti 1 μm . Ob aplikaciji polistirenskih delcev s fluoresceinom na model mukusa je pri ND prišlo do 2,4-krat, pri MD pa do 1,6-krat višje permeabilnosti v primerjavi s kontrolno skupino. Boljšo permeabilnost so dokazali tudi, ko so kot označevalec uporabili rodamin B (12).

Ugotovili so, da tako ND kot MD vplivajo na povečan prehod učinkovin v primerjavi s kontrolno skupino, vendar pa je bil vpliv ND večji. Vzrok za razliko bi lahko bila večja specifična površina manjših delcev, kar pomeni več interakcij z mukusom. Postavili so hipotezo, da se delci ujamejo v mrežo mukusa, kar povzroči, da se lokalna struktura mukusa nekoliko spremeni, kasneje poruši in se nato tvorijo dodatne pore. Shayna L. McGill in Hugh D. C. Smyth pojav razlagata s primerjavo, da naj bi vse skupaj potekalo podobno kot v pajkovi mreži, ko se vanjo nekaj ujame. Sčasoma se mreža začne trgati in dlje, kot je stvar ujeta v mrežo, večje luknje se pojavijo (12).

3.4 Izbira živalskega modela

Pri ljudeh se PP razvijejo še pred rojstvom. Precejšnje število jih najdemo že v 24. tednu nosečnosti (2). Tanko črevo človeškega zarodka pri 30 tednih nosečnosti vsebuje približno 60 PP (4). Število se konstantno povečuje in maksimum doseže v puberteti, ko je tako v ileumu kot v duodenumu in jejunumu skupaj več kot 200 PP, nato pa se število s starostjo zmanjšuje, saj pri 90 letih najdemo le še približno 50 PP (2, 4). Pri nekaterih živalskih vrstah se število in velikost PP s starostjo spreminja. Tako pri starejših živalih načeloma

najdemo večje PP, zato lahko sklepamo, da bo tudi obseg privzema delcev večji. Nekateri raziskovalci predvidevajo, da do povečanega privzema pride tudi zaradi počasnejšega prehoda delcev skozi črevo, kar omogoči daljši stik s površino limfatičnega tkiva (2).

Tanko črevo človeka ima ovalne in nepravilno razporejene PP vzdolž antimezenterične strani črevesja. Po drugi strani pa imamo v distalnem ileumu številne PP, ki tvorijo limfoidni obroč. Kar 45 % PP najdemo na 25 cm distalnega ileuma. Opozoriti je treba, da se PP med ljudmi močno razlikujejo po velikosti, obliki in distribuciji. Vpliv teh razlik na posameznikovo fiziološko ali patološko stanje pa je treba še raziskati (4). Obseg privzema delcev skozi PP je odvisen od števila in pogostosti M-celic v FAE. Število M-celic človeka predstavlja manj kot 10 % vseh epitelnih celic v kupolastem predelu PP. Podoben odstotek so določili tudi pri podganah in miših, večji odstotek pa najdemo pri zajcih in prašičih (2).

Poleg vsega naštetega lahko na barierno funkcijo FAE in posledično na sposobnost prehoda makromolekul ter delcev, vplivajo tudi patofiziološki in imunološki dejavniki, kot so mikrobna sestava, akutni in kronični stres ter diabetes. Zaradi vseh teh razlik je treba poudariti, da moramo ugotovitve na osnovi privzema delcev skozi PP, pridobljene na določeni živalski vrsti, obravnavati previdno (2).

3.5 Transport delcev skozi epitelij prebavil

V osnovi obstajata dve poti prehoda makromolekul ali delcev skozi epitelij prebavil. Prva pot poteka med dvema celicama, gre za tako imenovani paracelularni transport, druga pa poteka skozi celico, kar imenujemo transcelularni transport (2).

3.5.1 Paracelularni prehod delcev in makromolekul

Raziskovati so ga začeli, da bi pojasnili hiter pojav peroralno apliciranih delcev v krvnem obtoku. Ugotovili so, da naj bi bil prehod med enterociti pomemben mehanizem privzema večjih delcev ($> 1 \mu\text{m}$), kar naj bi omogočalo razrahljanje tesnih stikov v neposredni bližini čašastih celic sluznice prebavil. Vendar pa takšni prehodi predstavljajo manj kot 1 % površine sluznice. Prehodnost delcev lahko izboljšamo s pomočjo spodbujevalcev prehoda, kot so na primer hitosan in nekateri poliakrilati, po mnenju nekaterih avtorjev pa celo škrob idr. Do teh zaključkov so prišli s pomočjo celičnih modelov, na katerih so opazovali prehod makromolekul. Kakšen je pomen teh rezultatov v *in vivo* situaciji, pa še ni znano (2).

Paracelularni prehod je pri FAE drugače uravnan. V primerjavi s sluznico prebavil ima FAE bolj izražena proteina tesnih stikov kladin-3 in okcludin, za katera je znano, da otežujeta odprtje tesnih stikov, ter slabše izražen kladin-2, ki pa ima ravno obraten učinek (4).

3.5.2. Transcelularni prehod delcev in makromolekul

Gre za proces, v katerem makromolekule ali delci z endocitozo vstopijo v enterocite na apikalni strani. Sledi vezikularni transport skozi celico in nato eksocitoza na bazolateralni strani enterocita (2).

3.5.3. Limfatični privzem delcev preko M-celic

Čeprav se v literaturi pojavljajo polemike o obsegu privzema delcev skozi PP, obstajajo dokazi, da lahko pride do translokacije delcev. Predvideva se, da pri endocitozi ND in MD pomembno vlogo igrajo M-celice, ki so del FAE, vendar pa točen mehanizem procesa ni znan. Zaenkrat velja, da se inertni delci lahko vežejo na površino M-celic z nespecifičnim (adsorptivna endocitoza) ali specifičnim (aktivna endocitoza) mehanizmom. Sledi endocitoza delcev, kar pomeni, da se ti prenesejo na bazolateralno stran in izločijo v votel prostor M-celic, ki je v stiku z antigen predstavitevni celicami. Delce nato prevzamejo makrofagi ali dendritične celice prebavil (2).

3.5.3.1 Dejavniki, ki vplivajo na privzem preko M-celic in Peyerjevih plošč

Številne študije so dokazale sposobnost privzema delcev iz lumna prebavil in transporta v subepitelijske plasti, vendar je obseg takšnega transporta preko M-celic še vedno predmet razhajanj. Številni dejavniki lahko vplivajo na privzem ND in MD preko PP. Ti dejavniki so relativno dobro znani in jih lahko razdelimo v tri kategorije:

- Dejavniki, povezani s fizikalnokemijskimi lastnostmi delcev:
 - velikost delcev,
 - hidrofilno/hidrofobno ravnotežje,
 - zeta potencial,
 - prisotnost liganda na površini delca ...
- Dejavniki, povezani s fiziologijo GIT:
 - plast sluzi,
 - glikokaliks

...

- Dejavniki, povezani z izbiro modela za opravljanje raziskave:
 - vrsta živali,
 - starost živali,
 - imunološko stanje živali,
 - patofiziološko stanje živali ...

3.6 Modeli

Za proučevanje interakcij med delci in epitelijem GIT ter privzema skozi PP se uporabljajo različni modeli. Razlike med modeli so verjetno razlog za nasprotujoče si podatke o obsegu in učinkovitosti privzema delcev iz GIT. Ločimo *in vivo* ter *ex vivo* modele (2).

3.6.1 Ex vivo modeli

Uspešnost modela za oceno absorpcije učinkovine v prebavilih je odvisna od stopnje, do katere model posnema *in vivo* biološke razmere. Poustvarjanje bioloških razmer je težavno, zato so se razvili različni sistemi, ki do različnih stopenj posnemajo naravno stanje (2).

Na eni strani imamo možnost uporabe *in vitro* modela s Caco-2 celičnimi linijami, na drugi strani pa lahko uporabimo model, kjer ciljno tkivo izrežemo iz trupla poskusne živali (2). Odločili smo se za slednjega, saj so ga že uporabili za proučevanje absorpcije in oceno vezave hranil, učinkovin ter delcev na sluznico prebavil. Poleg tega s celičnimi modeli še ni možno posnemati delovanja kompleksnih tvorb, kot so PP. Obseg absorpcije praviloma določimo z merjenjem koncentracije učinkovine/delcev na serozni strani tkiva. Model ima dve pomembni prednosti, in sicer da absorpcijo lahko merimo na različnih predelih GIT, hkrati pa se ohrani arhitekturna integriteta tkiva. Splošna pomanjkljivost je omejena vitalnost pripravljenega tkiva (2). Ta model lahko uporabimo pri različnih metodah. Za opazovanje permeabilnosti delcev in raztopine mešanice učinkovin smo izbrali difuzijske celice tipa Sweetana-Grass.

3.6.2 Celice Sweetana-Grass

Iz enostavnih fizikalno-kemijskih parametrov, kot so pK_a , velikost molekule (ali teža), porazdelitveni koeficient, je težko napovedati, kakšna je sposobnost molekule za prehod epitelija, saj se dejavniki, ki vplivajo na transport, preveč poenostavijo. Neposredno merjenje permeabilnosti tkiva je omogočilo raziskovanje vzrokov za slabo absorpcijo učinkovin (23).

V zgodnjih 50. letih prejšnjega stoletja se je začela uporaba dvopredelnih difuzijskih celic za oceno transporta ionov skozi živo tkivo (3). Ussing in Zerahn sta uporabila kožo žabe. Predstavila sta uporabo *in vitro* tehnike kratkostičnega toka oz. vpenjanja napetosti, kar je omogočilo razlikovanje med aktivnim in pasivnim transportom ionov. Od takrat so bile Ussingove celice in sama tehnika modificirane za preučevanje prehoda ionov v različnih tkivih. Dandanes za meritve permeabilnosti v farmaciji uporabljamo celice Sweetana-Grass (celice SG), v katerih je razmerje med volumnom medija in površino membrane bistveno manjše kot v Ussingovih celicah, kar omogoča doseganje višjih koncentracij preiskovanih spojin na akceptorski strani (23).

Celice SG so narejene iz akrila, tok v njih teče vzporedno na tkivo, kar simulira *in vivo* pogoje, velikost mehurčkov karbogena, s katerim prepihujemo celice, je manjša, kar omogoča ponovljive meritve permeabilnosti učinkovin. Manjši je tudi volumen celic, kar omogoča meritve manjših koncentracij učinkovin. Odprtina za tkivo se je povečala, njeno velikost pa lahko prilagajamo z izbiro ustreznega vstavka. Tako vpenjamo tkiva s površino vse od 0,5 cm² do 4 cm². Še ena od pomembnih izboljšav je ogrevanje 6 ali 8 celic skupaj (odvisno od sistema), za razliko od Ussingovih celic, kjer so bili ogrevani le rezervoarji, ne pa tudi celotne celice (23).

Različni raziskovalci ugotavljajo, da se modificirane Ussingove celice, torej tudi celice SG, lahko uporabljajo pri poskusih permeabilnosti. Kljub temu da tkivo lahko preživi 2–3 ure, pa naj metoda ne bi bila primerna za oceno privzema delcev v GIT (2, 3).

Pri poskusih permeabilnosti se računa permeabilnostni koeficient, ki je v primeru pasivne difuzije neodvisen od koncentracije (16). Za izračun potrebujemo množino učinkovine, ki je prešla skozi tkivo, v odvisnosti od časa (23). To prikazuje *enačba (1)*.

$$P_{app} = \frac{J * V_d}{A * C_d} \quad (1)$$

P_{app} (navidezni) permeabilnostni koeficient [cm/s]

J pretok učinkovine (fluks) [mol/h*cm²]

V_d volumen na donorski strani [mol/L]

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

A površina tkiva, skozi katero snov prehaja [cm²]

Pogoj za izračun permeabilnostnega koeficienta je linearnost odnosa med množino učinkovine na akceptorski strani in časom. Linearnost je možna le ob ustrezni vitalnosti in integriteti uporabljenega tkiva (23). Za oceno vitalnosti in integritete si pomagamo tudi z drugimi parametri.

Integriteta tkiva se navadno meri z oceno transporta tako imenovanih označevalcev, kot so manitol, PEG-4000, inulin in $^{51}\text{Cr-EDTA}$, s sproščanjem LDH (laktat dehidrogenaza), transportom D-glukoze, z glukozo spodbujenim nastankom kratkostičnega toka in električnimi parametri, kot so napetost, kratkostični tok (I_{sc}) in upornost. Slednji so poleg permeabilnosti glavni parametri, ki jih uporabljamo za oceno vitalnosti in bariernih sposobnosti izrezanega segmenta črevesja. Celice SG in tehnika, ki sta jo predstavila Ussing in Zerahn, nam omogočata spremljanje teh elektrofizioloških parametrov (24).

Elektrofiziološki parametri so splošno sprejeti za spremljanje vitalnosti in integritete tkiva v modificiranih Ussingovih celicah. Razlika potencialov odraža gradient napetosti, ki ga proizvaja tkivo, upornost, integriteto in I_{sc} tok ionov preko epitelija (24). Dosedanje izkušnje s tovrstnimi poskusi so nam dale znanje, da smo predpostavili ustreznost tkiva, če je bil celokupni TEP po dodatku glukoze vsaj -1 mV ali če je po dodatku glukoze na mukozno stran prišlo do spremembe v potencialu za vsaj $0,3$ mV in če je bil povprečen upor od 50. minute dalje vsaj $18 \Omega\text{cm}^2$ (16).

4 NAMEN DELA

V magistrski nalogi bomo postavili nov model za opazovanje permeabilnosti učinkovin skozi lokalne Peyerjeve plošče podgan. Modificirali bomo standardne poskuse na celicah Sweetana-Grass (celice SG). Uporabili bomo vstavke z manjšo površino. Preverili bomo, ali stari kriteriji za ocenjevanje vitalnosti in integritete (linearnost, elektrofiziološki parametri, označevalci prehoda) ob uvedbah sprememb še vedno veljajo. Ocenili bomo ustreznost modela in ga aplicirali na poskuse, kjer bomo opazovali interakcije med delci in sluznico. Pričakujemo, da bo model ustrezal in bomo z njim lahko opazovali obseg prehoda učinkovin skozi izbrano tkivo.

S postavljenim modelom bomo preverili, kakšen je vpliv mukusa na permeabilnost raztopin učinkovin ter na učinkovine, polnjene v TCPSi mikrodolge. Predvidevamo, da bo odsotnost mukusa olajšala prehod učinkovin skozi izbrano tkivo. Razlika bo nekoliko bolj opazna pri jejunumu, saj je proizvodnja mukusa pri Peyerjevih ploščah manjša.

Zanimale nas bodo razlike v permeabilnosti med jejunumom in Peyerjevimi ploščami. Primerjali bomo obseg prehoda raztopine šestih modelnih učinkovin preko izbranega tkiva. Glavni namen magistrske naloge je primerjava permeabilnosti raztopljenih učinkovin in furosemida, vgrajenega v TCPSi mikrodolge, skozi Peyerjeve plošče in skozi sluznico jejunuma podgane. Za opazovanje prehoda učinkovine, polnjene v mikrodolge, bomo delo z našim modelom še dodatno prilagodili. S povečanjem viskoznosti donorskega medija (Ringerjevega pufra) s HPMC in nagibom sistema pod kotom 30° bomo preprečili posedanje delcev. Pričakujemo, da bodo raztopljene učinkovine lažje prehajale skozi jejunum, medtem ko bodo PP olajšale prehod učinkovini iz TCPSi mikrodolcev.

S pomočjo stereolupe bomo po koncu poskusov opravili histološki pregled tkiva. Na ta način bomo opazovali, v kolikšni meri so se delci iz suspenzije zadržali na mukusu. Pogledali bomo, ali mukus stik delcev s sluznico preprečuje, jih odbija, ali se delci lahko posedejo na površino izbranega tkiva ali dejansko lahko pride tudi do morebitne vezave na mukus sluznice.

..

5 MATERIALI IN METODE

5.1 Materiali

Učinkovine za določanje permeabilnosti:

- ranitidin hidroklorid **(1)**, Sigma Aldrich, Nemčija, 350,86 g/mol;
- kofein **(2)**, Sigma Aldrich, Nemčija, 194,19 g/mol;
- norfloksacin **(3)**, Sigma Aldrich, Nemčija, 319,33 g/mol;
- metoprolol tartrat **(4)**, Sigma Aldrich, Nemčija, 684,81 g/mol;
- furosemid **(5)**, Aldrich, Nemčija, 330,74 g/mol;
- karbamazepin **(6)**, Sigma Aldrich, Nemčija, 236,27 g/mol;
- TCPSi mikrodenci 7 % naloženi s furosemidom.

Spojine za pripravo raztopin za poskuse:

- natrijev hidrogenkarbonat, p.a., Merck KGaA, Nemčija, 84,01 g/mol;
- natrijev dihidrogenfosfat monohidrat, p.a., Alkaloid, Makedonija, 137,99 g/mol;
- natrijev klorid, p.a., Merck KGaA, Nemčija, 58,44 g/mol;
- kalijev klorid, p.a., Merck KGaA, Nemčija, 74,55 g/mol;
- kalcijev klorid dihidrat, p.a., Merck KGaA, Nemčija, 147,02 g/mol;
- magnezijev klorid heksahidrat, p.a., Riedel-de Haën, Nemčija, 203,30 g/mol;
- dinatrijev hidrogenfosfat dihidrat, p.a., Merck KGaA, Nemčija, 177,99 g/mol;
- glukoza, p.a., Sigma Aldrich, Nemčija, 180,18 g/mol;
- manitol, p.a., Sigma Aldrich, Nemčija, 182,18 g/mol;
- L-cistein, p.a., Sigma Aldrich, Nemčija, 121,16 g/mol;
- Metalose 60SH-50 (hidroksipropilmetil celuloza), ShinEtsu Chemical Co., Ltd., Japonska;
- agar-agar v granulah, p.a., Merck.

Topila in plini:

- etanol 96 %, p.a., Merck KGaA, Nemčija, 1 L = 0,790–0793 kg;
- klorovodikova kislina, p.a., Sigma Aldrich, Nemčija, 1 L = 1,19 kg;
- dimetilsulfoksid, p.a., Merck KGaA, Nemčija, 1 L = 1,10 kg;
- acetonitril, p.a., Merck KGaA, Nemčija, 1L = 0,786 kg;
- orto-fosforna kislina, 85 % stopnja čistosti, Merck KGaA, Nemčija, 1 L= 1,71 kg;
- bidestilirana voda, Fakulteta za farmacijo, Ljubljana, Slovenija;
- karbogen (95 % kisika in 5 % ogljikovega dioksida), Messer, Ruše, Slovenija.

5.2 Raztopine

Ringerjev pufer, pH = 7,4

Sestava: 4,2 g NaHCO_3 , 0,11 g $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \times \text{H}_2\text{O}$, 13,082 g NaCl , 0,746 g KCl , 0,352 g $\text{CaCl}_2 \times 2\text{H}_2\text{O}$, 0,488 g $\text{MgCl}_2 \times 6\text{H}_2\text{O}$, 0,569 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$.

Priprava: 2-litrsko bučo napolnimo z bidestilirano vodo do približno treh četrtin oznake, jo opremimo z magnetnim mešalom in postavimo na mešalo. Nato postopoma po predpisanem zaporedju dodajamo navedene soli. Pozorni smo, da vsako naslednjo dodamo šele, ko se predhodna popolnoma raztopi. Raztopina se tekom priprave neprestano meša. Na koncu dopolnimo z bidestilirano vodo do 2 L.

625 mM glukoza – 2,815 g glukoze raztopimo v 25 mL bidestilirane vode.

625 mM manitol – 2,850 g glukoze raztopimo v 25 mL bidestilirane vode.

10 mM raztopina glukoze/manitola v Ringerjevem pufu – 1600 μL 625 mM raztopine glukoze/manitola damo v 100 mL bučko in dopolnimo z Ringerjevim pufrom do oznake.

10 mM glukoza v Ringerjevem pufu za prenos tkiva – 0,901 g glukoze raztopimo v 500 mL Ringerjevega pufra.

1 % w/v raztopina cisteina – 1 g L-cisteina raztopimo v 100 mL Ringerjevega pufra.

0,2 % oz. 0,5 % (w/v) raztopina HPMC – 0,4 g oz. 1 g Mmetalose 60SH-50 raztopimo v 200 mL Ringerjevega pufra.

3 M raztopina KCl – 55,9 g KCl raztopimo v 250 mL bidestilirane vode.

3–4 % raztopina agarja v 3 M KCl

V čaši nad vodno kopeljo segrevamo 3 M KCl in med počasnim mešanjem dodamo 3,5 g agarja. Mešamo toliko časa, da nastane gel, pri tem pa pazimo, da ne vsebuje zračnih mehurčkov.

Topilo za učinkovine DMSO : EtOH (1 : 1) – v erlenmajerico odpipetiramo 50 mL DMSO in 50 mL etanola.

250 μM raztopina HCl – v 50 mL bučko nalijemo nekaj destilirane vode, ki ji dodamo 25 μL 0,5 M HCl . Dopolnimo do oznake z destilirano vodo.

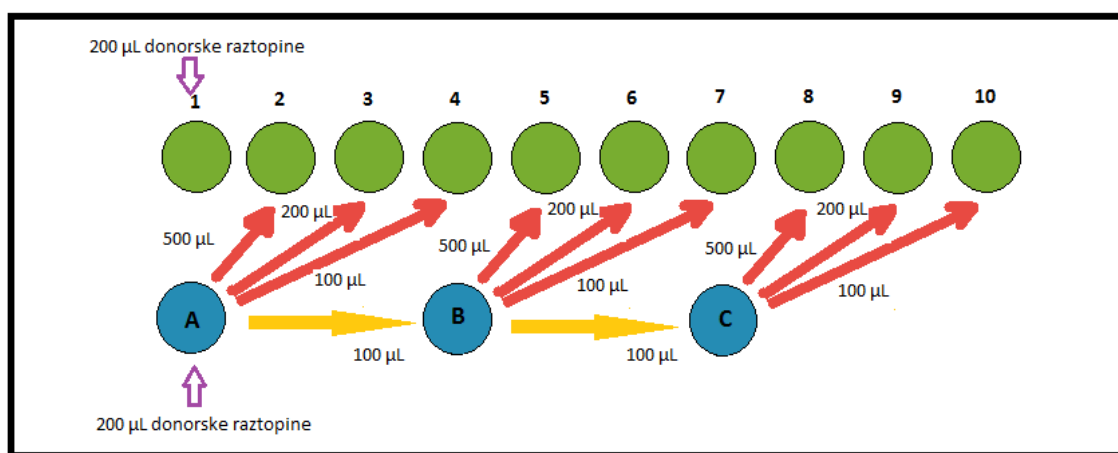
Pufurna raztopina za mobilno fazo (amonijev fosfat s pH = 3,0) – v steklenico nalijemo nekaj bidestilirane vode, dodamo 10 mL ortofosforne kisline in dopolnimo z bidestilirano vodo do oznake za 2 L. Nato s 25 % raztopino amonijaka uravnamo pH na 3,0.

Raztopina učinkovin

V 1,5 mL epico natehtamo 17,54 mg ranitidina in dodamo 1 mL zmesi DMSO : EtOH (1 : 1) kot topilo ($c_{\text{ranitidina}} = 55 \text{ mM}$) ter s pomočjo ultrazvoka raztopimo. Nato s pipeto prenesemo celotno raztopino v naslednjo epico, v katero smo natehtali 16,54 mg furosevida in ponovno raztopimo s pomočjo ultrazvoka ($c_{\text{furosevida}} = 50 \text{ mM}$). Postopek ponavljamo po vrsti še za kofein ($m = 4,86 \text{ mg}$; $c_{\text{kofeina}} = 25 \text{ mM}$), karbamazepin ($m = 5,90 \text{ mg}$; $c_{\text{karbamazepina}} = 25 \text{ mM}$) in metoprolol ($m = 8,12 \text{ mg}$; $c_{\text{metoprolola}} = 30 \text{ mM}$). Raztopino norfloksacina zaradi njegove slabe topnosti v DMSO/EtOH pripravimo posebej, tako da 7,98 mg norfloksacina natehtamo v 1,5 mL epico in dodamo 1 mL 250 μM HCl ter raztopimo s pomočjo ultrazvoka ($c_{\text{norfloksacina}} = 25 \text{ mM}$).

Standardne raztopine učinkovin za umeritveno premico

Donorsko raztopino smo pripravili tako, da smo v 10 mL bučko odpipetirali 250 μL raztopino petih učinkovin v zmesi DMSO : EtOH (1 : 1) in 250 μL raztopine norfloksacina v 250 μM HCl ter redčili z Ringerjevim pufrom do 2,5 mL. Nato smo redčitve izvedli po spodaj pripravljeni shemi (Slika 1 in Preglednica I) ter do skupnega volumna 1 mL redčili z Ringerjevim pufrom.



Slika 1: Shematski prikaz postopka priprave raztopin za umeritveno premico. Krožci predstavljajo 1,5 mL epice. V epico 1 in A damo 200 μL donorske raztopine in dopolnimo do 1 mL z Ringerjevim pufrom. Nato raztopino A odpipetiramo v epico 2 (500 μL), v epico 3 (200 μL), v epico 4 (100 μL) in v epico B (100 μL). Vse dopolnimo z Ringerjevim pufrom do 1 mL. Postopek ponovimo pri raztopini B in C.

Preglednica I: Primer redčitve za ranitidin, kjer ima osnovna donorska raztopina koncentracijo 550 μM

Št. epice	1inA	2	3	4inB	5	6	7inC	8	9	10
redčitev	0x	2x	5x	10x	20x	50x	100x	200x	500x	1000x
končna konc. [μM]	5500	2750	1100	550	275	110	55	27,5	11	5,5

5.3 Aparature in pribor

- EasyMount difuzijske celice z napetostnimi in tokovnimi elektrodami ter s 6- ali 8-kanalnim potenciometrom z možnostjo vpenjanja napetosti ter toka (Multichannel voltage-current clamp (VCC MC6 in VCC MC8), Physiologic Instruments, Inc.);
- vstavki P2303A in vstavki P2252;
- termostatirana vodna kopel M3 LAUDA, LAUDA, Lauda-Königshofen, Nemčija;
- digitalni termometer Testo 926, Testo GmbH & Co., Lenzkirch, Nemčija;
- analitska tehtnica Mettler toledo XP105, Mettler Toledo, Schwarzenbach, Švica;
- tehtnica Exacta 300 EB, Tehtnica, Železniki, Slovenija;
- pH meter 330i, WTW, Weilheim, Nemčija;
- polavtomatske pipete 2–20 μL , 20–200 μL , 100–1000 μL , Eppendorf research, Hamburg, Nemčija;
- 2500 μL pipeta, Eppendorf research, Hamburg, Nemčija;
- zračna črpalka za akvarij, Rena alize, Francija;
- HPLC sistem Agilent 1100 Series (razplinjevalec, binarna črpalka, avtomatski vzorčevalnik za mikrotitrsko ploščo, termostat kolone, UV-DAD detektor), Agilent Technologies, Nemčija;
- centrifuga Eppendorf Centrifuge 5415 R, ZDA;
- stereolupa Olympus SZX12 ter kamera Olympus XC50 Highlight 3100, Japonska;
- steklovina: merilne bučke in buče, čaše, tehtiči;
- ostali inventar: spatule, žlice, nastavki za pipete, epruvete, mikrotitrsko ploščo, epice.

5.4 Metode

5.4.1 Določanje koncentracij učinkovin

Na dan poskusa smo pripravili standardne raztopine učinkovin v območju od 0,1 % do 10 % začetnih koncentracij donorske raztopine. Vzorce in standardne raztopine smo pipetirali na mikrotitrsko ploščico in jih analizirali s HPLC metodo. Če meritve nismo izvedli isti dan, smo vzorce hranili v hladilniku do analize. Koncentracijo učinkovin na akceptorski strani smo izračunali s pomočjo umeritvenih premic.

5.4.2 Difuzijske celice *Sweetana-Grass*

Za ugotavljanje permeabilnosti smo uporabili EasyMount® difuzijske celice. To so

modificirane difuzijske celice tipa Sweetana-Grass. Gre za dva ločena prostora, ki ju razmejuje vstavek, v katerega je vpeto tkivo. Ena polovica celice je namenjena donorski raztopini z učinkovinami, druga pa akceptorski raztopini, v katero prehajajo testirane učinkovine preko izpostavljene površine tkiva. Kolikšna je ta površina, je odvisno od izbranega vstavka. Uporabili smo dva različna tipa vstavkov, in sicer P2303A z odprtino $0,10 \text{ cm}^2$ in P2252, ki izpostavi $1,0 \text{ cm}^2$ tkiva.

Inkubacijski medij se ves čas poskusa preprihava s karbogenom (mešanica kisika, 95 %, in ogljikovega dioksida, 5 %), kar je pomembno za oksigenacijo tkiva, hkrati pa zagotavlja stalno kroženje medija v difuzijski celici. Mešanje prepreči nastanek koncentracijskega gradienta znotraj celice. Tako je edini koncentracijski gradient tisti preko membrane. V našem primeru je preprihovanje odigralo pomembno vlogo tudi pri poskusu z mikrodelci, saj je prispevalo k njihovem kroženju. Pomembno je, da ima inkubacijski medij ustrezen pH (med 6 in 8), osmolarnost in temperaturo, ki jo ves čas poskusa vzdržujemo med $36 \text{ }^\circ\text{C}$ in $37 \text{ }^\circ\text{C}$, da vsebuje fiziološke ione v ustreznih koncentracijah, ter hranilno snov (npr. glukozo). Na serozno stran smo zato dali glukozo, njen vpliv na osmolarnost pa smo na mukozni strani kompenzirali z manitolom oz. HPMC. Vsaka celica ima odprtine za dva para elektrod, zunanji tokovni in notranji napetostni par, ki nam omogočata spremljanje elektrofizioloških parametrov. Tako lahko tekom poskusa vrednotimo vitalnost tkiva. V določenem intervalu jemljemo majhen volumen raztopine in izračunamo količino preiskovane učinkovine, ki preide skozi tkivo v tem času.

5.4.2.1 Priprava elektrod

Pri poskusu smo za merjenje kratkostičnega toka in spremembe električnega potenciala uporabljali Ag/AgCl elektrode. Modificirane nastavke za $200 \text{ }\mu\text{L}$ pipete smo napolnili z 3–4 % raztopino agarja v 3 M KCl. Pred poskusom smo elektrode pregledali in jih testirali 3 ure, kolikor traja poskus.

5.4.2.2 Priprava tkiva

Črevesje je bilo pridobljeno iz podgan, ki so bile stradale 18 ur. Podgane so bile, v skladu z nacionalno in evropsko zakonodajo, žrtvovane s pretresom možganov in izkrvavitvijo. Črevesje, od želodca do cekuma, je bilo hitro odstranjeno in shranjeno v ledenomrzlo oksigenirano 10 mM raztopino glukoze za prenos tkiva.

Po prihodu v laboratorij za določanje permeabilnosti smo črevesje najprej sprali z 10 mM raztopino glukoze, da smo odstranili ostanke hrane. Črevesje smo razrezali na ustrezne

segmente, ki smo jih nato hranili v čaši z 10 mM raztopino glukoze. Raztopino smo preprihovali s karbogonom. Izrezane kratke segmente črevesja smo prerezali še po dolžini po mezenterični meji. Izmenično smo vpenjali Peyerjeve plošče in tkivo jejunuma. Vstavke smo takoj po vpenjanju vstavili v difuzijske celice tako, da je bila mukozna oz. apikalna stran črevesja obrnjena proti levi in serozna oz. bazolateralna stran proti desni strani. Difuzijske celice smo sproti polnili z inkubacijskim medijem. Opazovali smo transport z mukozne na serozno stran ($M \rightarrow S$).

5.5 Izvedba poskusa

5.5.1 Priprava difuzijskih celic in aparature za poskus

1. Potenciale uravnamo na 0,0. Na stojala pritrdimo prazne celice z nastavki.
2. Vključimo vodno kopel in aparaturo za merjenje elektrofizioloških parametrov ter počakamo 10 minut, da se segreje.
3. Elektrode speremo s prečiščeno vodo in jih vstavimo v celice. Celice napolnimo z 2–3 mL Ringerjevega pufra.
4. Celice termostatiramo, uravnamo tok in upor na 0,0 ter priključimo dotok karbogenicnega (95 % O_2 in 5 % CO_2).
5. Preverimo asimetrijo elektrod in jo po potrebi kompenziramo z upravljalci potenciometra.
6. Izmerimo tok, ki mora biti stabilen, njegova vrednost pa med 60 in 80 μA .
7. Upornost raztopine kompenziramo tako, da z upravljalci potenciometra nastavimo vrednost na 0,0.

5.5.2 Izvedba poskusa z mešanico učinkovin brez cisteina in ob predhodni uporabi cisteina

Poskus brez cisteina

1. Z injekcijsko brizgo odstranimo pufer iz difuzijskih celic.
2. Na nastavke tkivo namestimo tako, da je mukozna stran obrnjena proti iglicam. Nastavke vstavimo v celice.
3. V celice dodamo ustrezne raztopine:
 - i) Na donorsko stran celice dodamo 2,450 mL Ringerjevega pufra, ki vsebuje manitol in 25 μL raztopine učinkovin v DMSO : EtOH ter 25 μL raztopine norfloksacina.

- ii) Na akceptorsko stran celice dodamo 2,5 mL Ringerjevega pufra, ki vsebuje glukozo.
4. Odčitamo transepitelijski potencial (TEP) in kratkostični tok (I_{sc}).
 5. Na začetku in na koncu poskusa vzamemo 25 μ L vzorca z donorske strani.
 6. Vsakih 25 minut jemljemo vzorce (250 μ L) z akceptorske strani.
 7. Na donorsko stran ne vračamo raztopine, medtem ko na akceptorsko stran vračamo 250 μ L ustrezne raztopine in 10 mM raztopino glukoze. Pri vsakem vzorčenju odčitavamo tudi električne parametre.
 8. Ob koncu poskusa dodamo 100 μ L 625 mM raztopine glukoze na mukozno stran in nato še 10 minut spremljamo električne parametre. Zapišemo najvišjo absolutno vrednost TEP, ki jo v tem času doseže izolirano tkivo.
 9. S pipeto odstranimo pufer. Iz celic vzamemo elektrode in v Ringerjevem pufru izmerimo njihovo asimetrijo, ki je nastala med poskusom. Vrednost asimetrije odštejemo od TEP glukoze.
 10. Elektrode speremo s prečiščeno vodo in shranimo v 3 M raztopini KCl v hladilniku.
 11. Nastavke, s katerih odstranimo tkivo, in celice očistimo v ultrazvočni kadički. Spiramo jih s prečiščeno vodo in posušimo na sobni temperaturi.

Poskus s cisteinom

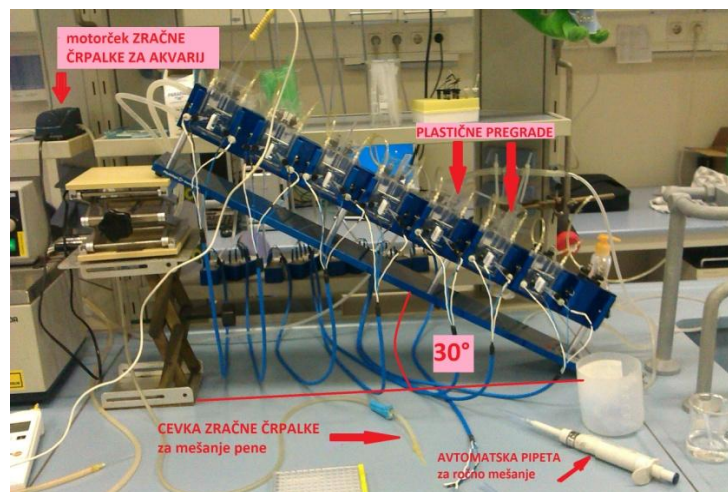
V primeru poskusa s cisteinom po tretjem koraku dodamo na donorsko stran 2,5 mL 1 % w/v raztopine cisteina v Ringerjevem pufru, na akceptorsko stran pa 2,5 mL Ringerjevega pufra. Po 15 minutah odčitamo elektrofiziološke parametre, nato iz celic posesamo raztopine in nadaljujemo s tretjim korakom.

5.5.3 Izvedba poskusa z mikrodelci

Ta poskus smo izvajali nekoliko drugače, saj smo morali rešiti problem posedanja mikrodelcev tekom poskusa. Raztopino manitola v Ringerjevem pufru smo zamenjali z 0,2 % oz. 0,5 % w/v raztopino HPMC v Ringerjevem pufru, ki imata večjo viskoznost. Na ta način smo upočasnili posedanje delcev. Delci so se v 10 mM raztopini manitola, kljub prepihanju s karbogenom, posedali na dno in jih ni bilo več mogoče pripraviti do kroženja. Kroženje delcev je nujno, če želimo proučevati permeabilnost učinkovine, sproščene iz mikrodelcev, ter njihov prehod skozi tkivo. Večja viskoznost medija je posedanje delcev le upočasnila, ne pa tudi preprečila, zato smo tekom poskusa posedle delce občasno ponovno dispergirali tudi ročno z avtomatsko pipeto. Ringerjev pufer s

HPMC se je med poskusi penil, zato smo morali biti pozorni na to, da se pena ni dvignila z donorske strani celice. Pomagali smo si s plastičnimi pregradami, ki bi ob morebitnem izhajanju pene preprečile prenos donorske raztopine na akceptorsko stran, in z zračno črpalko za akvarije, s katero smo peno rahlo spihali, da je razpadla, ter jo pomešali s tekočino.

Druga modifikacija izvedbe poskusa je bila potrebna zato, da smo omogočili stik mikrodelcev s tkivom. V kolikor uporabimo vertikalni položaj difuzijske celice, ki je primeren za povsem raztopljene učinkovine v donorski raztopini, delci sicer pravilno krožijo, a jih le manjši delež tudi pride v kontakt s tkivom, ker je to v vstavku nekoliko odmaknjeno od krožnega toka inkubacijskega medija v difuzijski celici. Večja verjetnost je, da se delci tkivu, nameščenem v odprtini vstavka, ne bodo mogli ustrezno približati. Če bi uporabili horizontalen sistem, ki je možen pri uporabi celičnih kultur, bi prišlo do nalaganja vseh delcev na membrani, kar bi povzročilo visoko lokalno koncentracijo na donorski strani in posledično verjetno nerealno povišano permeabilnost. Ko smo osemkanalni nosilec difuzijskih celic nagnili pod kotom 30° , smo omogočili tako stik mikrodelcev s sluznico kot ustrezno spiranje delcev s sluznice in njihovo kontinuirano kroženje (Slika 2).



Slika 2: Prilagojen sistem za opazovanje permeabilnosti učinkovine iz mikrodelcev

Poskus smo izvajali tako brez kot s predhodno uporabo mukolitika cisteina. Postopek je precej podoben že opisanim korakom pri poskusih z mešanico učinkovin. Razlike se pojavijo le v nekaj točkah. Zaradi nagiba sistema je volumen medijev v prekatih celic namesto 2,5 mL, 3,0 mL. Pred dodatkom raztopine HPMC in mikrodelcev smo za kratek

čas zaprli dotok karbogene, s čimer smo preprečili začetno penjenje in zadrževanje delcev na peni. Na koncu poskusa pa smo z donorske strani vzeli 1,0 mL vzorca za analizo.

5.5.4 Pregled tkiva pod stereolupo

Po končanem poskusu z mikrodenci smo preverili, kako so se mikrodenci razporedili po tkivu, ali so se na tkivo posedli zgolj zaradi gravitacije ali so se morda prilepili na mukus. Takoj po končanem poskusu smo vstavke s tkivi v petrijevki prenesli do stereolupe, da se ne bi preveč izsušili. Nato smo enega za drugim pregledali in slikali pod 40-kratno in 90-kratno povečavo.

5.6 Elektrofiziološki parametri

Elektrofiziološki parametri, ki smo jih spremljali s pomočjo osemkanalnega potenciometra (VCC MC8), so:

- transepitelijska napetost (TEP) – razlika v električnem potencialu med mukozno in serozno stranjo;
- transepitelijska upornost (TEU) – skupen električni upor tkiva, na katerega vplivata skupna površina epitelija ter upor posameznih celic in tesnih stikov;
- kratkostični tok (I_{SC}) – tok, potreben za spremembo transepitelijskega potenciala tkiva z dano površino, iz prvotne vrednosti na vrednost nič.

TEP (v mV) in I_{SC} (v μA) smo spremljali pred začetkom in tekom poskusa, pred vsakim vzorčenjem. Iz zbranih podatkov smo na podlagi Ohmovega zakona po enačbi 2 izračunali transepitelijski električni upor (TEU v $\Omega \times cm^2$), ki je merilo integritete tkiva.

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

kjer je :

R transepitelijska upornost [$m\Omega cm^2$]

ΔU razlika potencialov na mukozni in serozni strani [mV]

I izmerjeni tok, ko vpnemo napetost na 0 mV (5 mV) [μA]

A površina tkiva v difuzijski celici ($1 cm^2$)

5.6.1 Preizkušeni postopki za oceno vitalnosti in integritete tkiva

S pomočjo elektrofizioloških parametrov ocenjujemo vitalnost in integriteto tkiva izoliranega segmenta črevesja podgane. Vitalnost je pomembna, saj je od nje odvisna

hitrost pasivnega prehoda spojin skozi tkivo. Manjša kot je vitalnost, večja je hitrost, saj je zmanjšana tudi integriteta tkiva, ki je drug pomemben parameter. Slaba integriteta je lahko posledica poškodbe tkiva, do katere je prišlo nekje med prenosom in vstavitvijo v difuzijske celice. Vrednosti TEP in I_{SC} smo začeli spremljati že pred začetkom poskusa, da smo lahko ocenili, ali je tkivo preživelo postopek priprave na poskus.

Vitalnost tkiva ocenimo s pomočjo TEU, ki bi morala po izkušnjah, pridobljenih v istem laboratoriju pri delu s podganjim tkivom v vstavkih z 1 cm^2 površine, do konca poskusa z jejunumom znašati najmanj $18 \Omega\text{cm}^2$, ter s pomočjo TEP. Nizke vrednosti I_{SC} , ki je pretežno odvisen od delovanja Na^+/K^+ -ATP, pomenijo tudi nizko vitalnost tkiva. I_{SC} močno poraste, če na mukozno stran dodamo substrate za koprenašalec za natrij in glukozo (SGLT1), kot je glukoza. Zato smo na koncu poskusa vitalnost tkiva preverili z dodatkom glukoze. Če I_{SC} poraste, je to znak dobrega delovanja kotransporta glukoze z natrijem in Na^+/K^+ -ATP ter s tem dobre vitalnosti. Hkrati s porastom I_{SC} pa naj bi pri sprejemljivi vitalnosti in integriteti tkiva prišlo tudi do znižanja TEP za vsaj 0,3 mV in ravno to spremembo smo opazovali. Kot izhodišče smo tudi v primeru TEP uporabili izkušnje s tkivom, vpetim v večje vstavke, v preteklih poskusih, opravljenih v istem laboratoriju.

S trajanjem poskusa se celotna epiteljska površina zmanjšuje, tesni stiki pa se rahljajo. Posledica obeh pojavov je sprememba integritete tkiva, ki smo jo preverjali s spremljanjem TEU. Za slabo integriteto tkiva je značilna nizka vrednost TEU.

Linearnost smo ocenjevali s pomočjo metode linearne regresije in koeficienta korelacije po Pearsonu. Enačbo premice smo dobili z računanjem enačbe regresijske premice (3) z metodo najmanjših kvadratov.

$$y = a + bx = \bar{y} + b(x - \bar{x}) \quad (3)$$

x, y koordinati posamezne točke na premici

\bar{x} , \bar{y} povprečje vsake od spremenljivk (čas, mol učinkovine na akceptorski strani)

a odsek na ordinati

b regresijski koeficient (naklon premice)

Za analizo povezanosti smo uporabili metodo korelacije. Korelacija sama še ne pomeni, da sta spremenljivki med seboj povezani kot vzrok in posledica, saj sta pogosto odvisni od

tretjega, neznanega dejavnika. Ločimo pozitivno korelacijo, kadar vrednost ene spremenljivke narašča z drugo, in negativno korelacijo, kadar vrednost ene spremenljivke pada z naraščanjem druge. Ocenimo jo s Pearsonovim korelacijskim koeficientom R (4), ki je enak razmerju med kovarianco C_{xy} in zmnožkom standardnih deviacij (s_x , s_y) za obe spremenljivki x in y , torej:

$$R = \frac{C_{xy}}{s_x * s_y} \quad (4)$$

Kovarianca (5) je povprečen produkt odklonov dveh naključnih spremenljivk od njihovih povprečij in predstavlja varianco podatkov zaradi korelacije.

$$C_{xy} = \frac{\sum xy - \frac{\sum x * \sum y}{n}}{n-1} \quad (5)$$

Koeficient korelacije po Pearsonu ima lahko vse vrednosti med -1 in +1. Če je enak 0, pomeni, da med obema spremenljivkama ni nobene povezanosti. Vrednosti -1 oz. +1 pa pomenita, da gre za maksimalno negativno oz. pozitivno korelacijo. Pearsonov koeficient je zgolj merilo za stopnjo povezanosti in pove le, kako velika je korelacija, ne pa, ali je povezanost statistično značilna ali ne.

5.7 Izračun permeabilnostnega koeficienta

Za določitev permeabilnostnega koeficienta (P_{app}) neke spojine moramo sprva izračunati pretok (J) te spojine skozi sluznico črevesja. Za spojine, ki pasivno difundirajo skozi tkivo, velja, da je P_{app} neodvisen od koncentracije te spojine na donorski strani, medtem ko je za spojine, ki aktivno prehajajo skozi tkivo, P_{app} lahko odvisen od koncentracije te spojine na donorski strani. P_{app} izračunamo po enačbi (6):

$$P_{app} = \frac{J}{C_d} \quad (6)$$

P_{app} (navidezni) permeabilnostni koeficient [cm/s]

J pretok učinkovine (fluks) [mol/h cm²]

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

Pretok je definiran kot množina snovi, ki difundira skozi 0,1 cm² oz. 1 cm² membrane (odvisno od vstavka) v eni uri in ga izračunamo po enačbi (7):

$$J = \frac{k_d}{A} \quad (7)$$

k_d konstanta difuzije [mol/h]

A površina tkiva, skozi katero snov prehaja [cm²]

Hitrost difuzije opisuje enačba (8):

$$\frac{dQ}{dt} = k(C_d - C_a) \quad (8)$$

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

k hitrost difuzije na enoto koncentracije [L/h]

C_a koncentracija spojine na akceptorski strani [mol/L]

Člen $(C_d - C_a)$ se med poskusom zanemarljivo malo spreminja, saj velja $C_d > C_a$, zato privzamemo, da ves čas poskusa velja:

$$k_d = k * C_d \quad (9)$$

Tako za konstanto difuzije k_d velja enačba (10), iz katere lahko preko enačbe (11) izpeljemo enačbo premice (12):

$$\frac{dQ}{dt} = k_d \quad (10)$$

$$\int_0^{Q(t)} dQ = k_d \int_0^t dt \quad (11)$$

$$Q(t) = k_d t + n \quad (12)$$

$Q(t)$ množina spojine, ki je difundirala v času t [mol]

Množino spojine, ki je v času t difundirala skozi tkivo oziroma membrano, izračunamo s pomočjo enačbe (13):

$$Q(t) = \left(\sum_{i=1}^{N-1} V_v C_i \right) + V_t C_c \quad (13)$$

V_v volumen vzorca [L]

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

C_t koncentracija spojine na akceptorski strani v času t , ko vzamemo vzorec [mol/L]

V_c volumen tekočine na akceptorski strani celice [L]

Konstanto difuzije k_d izračunamo s pomočjo linearne regresije po enačbi (12). Ko poznamo konstanto difuzije, lahko sprva izračunamo pretok snovi skozi tkivo, nato pa permeabilnostni koeficient.

5.8 Analizne metode

5.8.1 HPLC

Koncentracije učinkovin v odvzetih vzorcih smo določili s pomočjo tekočinske kromatografije visoke ločljivosti (HPLC). Uporabili smo kolono Phenomenex Kinetex C18 XB $50 \times 2,1$ mm pri temperaturi 50°C . Pretok mobilne faze je znašal 1 mL/min, volumen injiciranja pa $80\ \mu\text{L}$. Mobilna faza je bila sestavljena iz komponente A (amonijev fosfat s pH 3,0) in komponente B (acetonitril). Preglednica II prikazuje delež komponente B v odvisnosti od časa analize, Preglednica III pa prikazuje valovne dolžine za detekcijo modelnih učinkovin in njihove retencijske čase.

Preglednica II: Odvisnost deleža komponente B od časa analize

Čas [min]	% komponente B
0	3
0,5	3
2,5	60
3,5	60

Preglednica III: Valovne dolžine za detekcijo modelnih učinkovin in retencijski časi

učinkovina	λ signala [nm]	retencijski čas [min]
ranitidin	316	1,0
kofein	274	1,86
norfloksacin	274	2,13
metoprolol	222	2,31
furosemid	274	2,68
naproksen	285	2,75

5.8.2 Določevanje učinkovin

Vzorci

Na začetku in na koncu poskusa z mešanico učinkovin smo vzorčili donorske raztopine (25 μL), ki smo jih nanесли na mikrotitrsko ploščico in redčili tako, da smo dodali 225 μL Ringerjevega pufra. Tekom poskusa smo vsakih 25 minut vzorčili tudi akceptorske raztopine, ki smo jih shranili neposredno na mikrotitrsko ploščico s 96 vdolbinami. Vzorce donorskih raztopin pri poskusu z mikrodelci smo pripravili nekoliko drugače. Vzorčili smo jih le po koncu poskusa, ko smo iz donorske strani celice odvzeli 1 mL vzorca in ga prenesli v 1,5 mL epico. Epice smo nato centrifugirali pri 10.000 obratih 5 minut. Po koncu postopka smo odvzeli 500 μL supernatanta, ki smo ga nato desetkrat redčili. 250 μL tako pripravljenega vzorca smo zatem nanесли na mikrotitrsko ploščico.

Analiza

Vzorce smo analizirali s HPLC metodo še isti dan, kot smo izvajali poskus. Standardne raztopine učinkovin smo pripravili za vsak poskus znova, in sicer isti dan, kot smo izvajali poskus. Shranjevali smo jih skupaj z vzorci, da so bile vedno izpostavljene enakim pogojem. Koncentracijsko območje, ki so ga pokrivalo standardne raztopine učinkovin, je bilo v območju od 0,1 % do 10 % (ranitidin 5,5–5500 μM , furosemid 5–5000 μM , metoprolol 3–3000 μM , kofein, karbamazepin in norfloksacin 2,5–2500 μM) začetnih koncentracij vzorcev na donorski strani difuzijske celice. Koncentracijo učinkovin na akceptorski strani celic smo izračunali na podlagi umeritvene premice. Detektirali smo jih z UV-detektorjem.

Preglednica IV: Izračun koncentracij učinkovin iz umeritvenih krivulj

spojine	koncentracija [μM]	R^2
ranitidin	$(A+1,5)/4 \cdot 10^{+7}$	1
kofein	$(A+1,1)/3 \cdot 10^{+7}$	1
norfloksacin	$(A+51,0)/7 \cdot 10^{+7}$	0,9931
metoprolol	$(A+2,4)/2 \cdot 10^{+7}$	1
furosemid	$(A+75,7)/8 \cdot 10^{+7}$	0,9882
karbamazepin	$(A+1,3)/3 \cdot 10^{+7}$	1

5.9. Statistični testi

5.9.1. Studentov t test

Statistično obdelavo podatkov smo izvedli v programu Microsoft Excel s paketom Analiza podatkov. Uporabljen kriterij za značilnost razlike je bil $p < 0,05$ ($\alpha = 0,05$).

Za statistično vrednotenje smo postavili hipotezo o enakosti aritmetičnih sredin (\bar{x} in \bar{y}) permeabilnostnih koeficientov (P_{app}):

$$H_0 = \bar{x} = \bar{y}$$

$$H_1 = \bar{x} \neq \bar{y}$$

Najprej smo izvedli F-test, da smo ugotovili, ali sta varianci obeh vzorcev enaki ali različni. Postavili smo ničelno hipotezo, ki pravi, da se varianci dveh skupin vzorcev ne razlikujeta, in alternativno hipotezo, ki pravi, da se varianci razlikujeta. Variances so bile izračunane po enačbi (14), F-test pa je bil izveden po enačbi (15).

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

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

$$s^2 = \frac{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2}{n-1} \quad (14)$$

$$F = \frac{s_x^2}{s_y^2} \quad (15)$$

s^2 varianca

\bar{x} povprečna vrednost meritve v skupini primerjalnih meritev

x_i koncentracija posameznega izmerjenega P_{app}

n velikost vzorca

Če smo ugotovili, da je eksperimentalni F manjši od tabelaričnega ($F_{exp} < F_{tab}$) oz. je bila $p > \alpha$, ničelne hipoteze nismo zavrnili in smo privzeli, da sta varianci enaki. Za primerjavo aritmetičnih sredin vzorcev smo v tem primeru lahko uporabili Studentov t-test za enake variance (16).

$$t = \frac{\bar{x} - \bar{y}}{s} \sqrt{\frac{mn}{m+n}} \quad (16)$$

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

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

s skupna standardna deviacija

m število meritev v prvi skupini primerjalnih vzorcev

n število meritev v drugi skupini primerjalnih vzorcev

α stopnja tveganja

Če smo ugotovili, da je $F_{\text{exp}} > F_{\text{tab}}$ in je $p < \alpha$, smo ničelno hipotezo zavrnili in privzeli, da sta varianci različni. V tem primeru smo uporabili Studentov t-test za različne variance in računali po enačbi (17).

$$t = \frac{\bar{x} - \bar{y}}{\sqrt{\frac{s_x^2}{m} + \frac{s_y^2}{n}}} \quad (17)$$

s_x^2 standardna deviacija v eni skupini primerjalnih meritev

s_y^2 standardna deviacija v drugi skupini primerjalnih meritev

V primeru, da je bil $t_{\text{exp}} < t_{\text{tab}}$ in $p > \alpha$, smo ničelno hipotezo o enakosti aritmetičnih sredin sprejeli in s tem ugotovili, da se povprečja P_{app} ne razlikujejo značilno. Nasprotno smo razlike med P_{app} lahko potrdili, kadar je bila $p < \alpha$, kar pomeni da je bil $t_{\text{exp}} > t_{\text{tab}}$.

5.9.2. Grubbsov test ubežnikov

Test v setu podatkov zaznava vrednosti, ki značilno odstopajo od povprečja. Če imamo dva ubežnika, test, zaradi dviga standardne deviacije, ne zazna nobenega od njiju. Testa ne smemo uporabiti, kadar je velikost vzorca $n \leq 6$. Verjetnost, da bo test javil ubežnika, se v tem primeru poveča, čeprav vrednost morda ne bi značilno odstopala od skupine.

Postavili smo hipotezi:

H_0 : V setu podatkov ni nobenega ubežnika.

H_1 : V setu podatkov je vsaj en ubežnik.

$$G = \frac{\max_{i=1,\dots,N} |Y_i - \bar{Y}|}{s} \quad (18)$$

\bar{Y} povprečna vrednost vzorca

s standardna deviacija

Po enačbi (18) smo izračunali največje absolutno odstopanje vrednosti od povprečja vzorca. Hipotezo H_0 smo zavrnili z verjetnostjo α in privzeli, da imamo v setu podatkov ubežnika (19), ko je:

$$G > \frac{N-1}{\sqrt{N}} \sqrt{\frac{t_{\alpha/(2N), N-2}^2}{N-2+t_{\alpha/(2N), N-2}^2}} \quad (19)$$

$t_{\alpha/(2N), N-2}^2$ zgornja kritična meja t distribucije z $N - 2$ prostostnimi stopnjami in stopnjo signifikantnosti $\alpha/(2N)$

6 REZULTATI IN RAZPRAVA

6.1 Vzpostavitev modela

V magistrski nalogi smo želeli preučiti, kakšne so permeabilnostne oz. barierne lastnosti Peyerjevih plošč tankega črevesa podgane. Poskuse na PP smo na Fakulteti za farmacijo izvajali prvič. Do sedaj smo izvajali poskuse na tankem črevesu podgan v standardni obliki, ki smo jo za potrebe te raziskave modificirali (manjši vstavki, dodatek cisteina, povečanje viskoznosti donorskega medija in nagib sistema). Difuzijske celice P2250 na sistemu EasyMount® z vstavki s površino 1 cm^2 (P2252) so neprimerne, saj imajo Peyerjeve plošče tankega črevesa podgan premajhno površino, da bi jih lahko uporabili. Za preučevanje prehoda preko PP smo zato uporabili vstavke P2303A z ustrezno manjšo površino ($0,1 \text{ cm}^2$) in komplementarne difuzijske celice P2300. Na voljo smo imeli 8 kompletov novih celic s pripadajočimi vstavki. Izkazalo se je, da je imela ena od celic proizvodno napako. Posledično smo poskuse s P2303A vstavki izvajali na sedmih celicah. Poskuse smo izvedli na 6-kanalnem (VCC MC6) in/ali 8-kanalnem (VCC MC8) potenciometru skupno na 7 oz. v primeru standardnega poskusa na 14 celicah. Od tega smo imeli, v primeru modificiranih poskusov, v treh celicah vedno jejunum, v štirih pa PP podgane. V primeru standardnega poskusa smo imeli v vseh celicah jejunum.

Za poskuse smo pripravili mešanico raztopin različnih učinkovin. Pri izboru smo se naslonili na BCS klasifikacijo (Biopharmaceutics Classification System). BCS je znanstveni okvir za razvrščanje učinkovin glede na njihovo topnost in permeabilnost. Učinkovine so razvrščene v štiri razrede, pri čemer se upošteva topnost, raztapljanje in permeabilnost učinkovine (21). Kofein in metoprolol sodita v razred I (dobra topnost, dobra permeabilnost), karbamazepin v razred II (slaba topnost, dobra permeabilnost), ranitidin v razred III (dobra topnost, slaba permeabilnost), norfloksacin in furosemid pa sodita v razred IV (slaba topnost, slaba permeabilnost) (20, 21). Dostava učinkovin z mikrodenci naj bi bila še posebej primerna za učinkovine, ki so slabo topne in imajo slabo permeabilnost, zaradi česar smo za poskuse s TCPSi mikrodenci uporabili furosemid (10). Ostale učinkovine so nam služile za raziskavo vpliva mukusa na permeabilnost učinkovin in za ugotavljanje razlik v prehodu učinkovin skozi PP in jejunum.

6.1.1 Ocena vitalnosti in integritete

Predvidevali smo, da bi lahko nekatere spremembe, ki smo jih uvedli v nov model, predvsem dodatek cisteina in manjša površina tkiva, vplivale na elektrofiziološke (EF) parametre. Slednji ne morejo biti odvisni od nagiba sistema in povečane viskoznosti donorskega medija, zato njunega vpliva nismo podrobneje opazovali. Za oceno vitalnosti in integritete smo se naslonili na kriterije, ki so opisani v Uvodu.

6.1.1.1 Vpliv cisteina na elektrofiziološke parametre

Vpliv cisteina na EF parametre smo preverili na standardnem modelu. Naredili smo en poskus s 14 celicami, od tega je bil jejunum sedmih celic predhodno obdelan s cisteinom. V Preglednici V so predstavljeni primeri rezultatov izmerjenih parametrov. Celici C1/6 in C7/8 prikazujeta primer celic nativnega tkiva, kjer sta se vitalnost in integriteta ohranili, celici C3/6 in C5/6 pa primer, ko tega ne moremo trditi.

Preglednica V: Primeri elektrofizioloških parametrov standardnega poskusa v celicah brez in z dodatkom cisteina

Parameter	Čas	celice brez cisteina				celice s cisteinom			
		C1/6	C3/6	C5/6	C7/8	C2/6	C6/6	C4/8	C6/8
TEU [$\Omega \times \text{cm}^2$]	0	51	72	56	41	52	65	29	59
	15	41	63	42	36	45	63	26	46
	25	33	35	11	27	33	30	18	34
	50	27	26	4	27	24	24	15	36
	75	24	0	3	28	20	19	13	21
	100	31	0	4	26	16	20	11	36
	125	27	22	4	21	13	18	9	25
	150	28	27	4	21	15	15	7	31
	175	31	19	5	22	16	20	7	35
TEP [mV]	0	-3,5	-2,2	-4,7	-2,3	-1,9	-2,8	-0,7	-1,3
	15	-2,6	-1,8	-3,9	-1,9	-2,2	-2,7	-1	-1,1
	25	-0,5	-0,2	-1	-0,3	-0,6	-0,4	-0,6	-0,2
	50	-0,3	-0,1	-0,7	-0,3	-0,4	-0,2	-0,7	-0,2
	75	-0,2	0	-0,5	-0,4	-0,3	-0,1	-0,8	-0,1
	100	-0,3	0	-0,7	-0,5	-0,2	-0,2	-1	-0,2
	125	-0,4	-0,1	-0,7	-0,5	-0,2	-0,2	-1,1	-0,2
	150	-0,5	-0,2	-0,7	-0,6	-0,3	-0,2	-1,2	-0,3
	175	-0,6	-0,1	-0,9	-0,7	-0,4	-0,3	-1,3	-0,4
	GLU	-2,6	-0,4	-3	-1,8	-0,5	-0,7	-1,3	-0,7

V celicah, kjer smo tkivu odstranili mukus, smo imeli z oceno nekoliko več težav. Cistein s svojim delovanjem vpliva na integriteto tkiva ter na ionsko okolje enterocitov. pH se lokalno spremeni, kar očitno vpliva tudi na meritve EF parametrov. Stari kriteriji ne veljajo več, čeprav je še viden odziv na glukozo (torej imamo vitalno tkivo). Površina tkiva je tu še dovolj velika, da smo ob prilagajanju kriterijev rezultate lahko uporabili. Upoštevali smo meritve EF parametrov, ki so se ujemali s primarnim kriterijem, tj. z linearnostjo v grafih. Celici C6/6 in C6/8 prikazujeta primer, kjer smo vitalnost in integriteto ocenili brez težav, celica C4/8 prikazuje primer celice, katere rezultate smo zavrgli, celica C2/6 pa je primer celice, kjer smo rezultate upoštevali le do 100. minute. Za izračun P_{app} smo torej uporabili celice, pri katerih smo ocenili, da sta vitalnost in integriteta ustrezni: pet od sedmih celic z nespremenjenim tkivom ter štiri od sedmih s cisteinom, od tega dve v celotnem časovnem obdobju poskusa, dve pa do 100. minute.

6.1.1.2 Vpliv manjše površine na elektrofiziološke parametre

Pri poskusih s PP smo tkivo vpeli v manjše P2303A vstavke in uporabili komplementarne celice Sweetana-Grass. Da bi preverili vpliv te modifikacije modela na vrednotenje EF parametrov, smo izvedli tri poskuse. Pri vsakem poskusu smo imeli 7 celic, 3 z jejunumom in 4 s PP. Vrednosti EF parametrov so se spremenile tako pri PP kot pri jejunumu. Zaradi močnega variiranja so merjeni parametri postali nezanesljivi za nadaljnjo analizo, kar pripisujemo premajhni površini epitelija glede na občutljivost merilnih naprav napetostno-tokovnega izvira. Osnova vrednotenja ustreznosti meritev permeabilnosti sta tako postali linearnost in statistika.

6.1.1.3 Grubbsov test

V oceni vitalnosti in integritete tkiva smo se morali nasloniti na statistiko rezultatov permeabilnosti in na linearnost. Izločili smo vse celice, v katerih je do konca poskusa prišlo do pretrganja tkiva. Slednje se pri večjih površinah uporabljenega tkiva dogaja le redko, pri uporabi vstavkov z $0,1 \text{ cm}^2$ pa je zaplet dokaj pogost. Pri poskusih z mešanico učinkovin brez cisteina smo v primeru metoprolola naknadno izločili dve celici, v primeru norfloksacina pa eno, ker so bili permeabilnostni koeficienti prenizki za kvantitativno oceno.

S pomočjo Grubbsovega testa ubežnikov smo preverili, ali je med našimi rezultati kakšen, ki značilno odstopa od skupine. Test smo izvedli ločeno za celice, v katere je bil vpet jejunum, in celice, v katere so bile vpete Peyerjeve plošče. Pri poskusih z mešanico

učinkovin brez cisteina je test pokazal, da so si vrednosti znotraj posameznih učinkovin dovolj blizu, da lahko s 5 % ($\alpha = 0,05$) tveganjem trdimo, da vrednosti pripadajo isti populaciji, medtem ko je pri poskusih s cisteinom test pokazal, da izstopata dve celici, ena s PP in ena z jejunumom. Obe celici smo na podlagi pridobljenih rezultatov testa izločili. Za ostale celice smo privzeli, da so ohranile vitalnost in integriteto. S pomočjo grafov in izračunanih Pearsonovih koeficientov smo potrdili tudi linearno odvisnost množine učinkovine, ki je prešla tkivo v odvisnosti od časa. Izračunane P_{app} smo sprejeli in analizirali.

Grubbsov test ubežnikov pri poskusih z TCPSi mikrodenci v primeru poskusa z 0,5 % HPMC brez cisteina ni pokazal ubežnikov. Ob prisotnosti cisteina smo imeli pri celicah z jejunumom premalo meritev, da bi lahko izvedli test, med celicami s PP pa nismo našli ubežnikov. Tudi tu smo izračunane P_{app} na podlagi Grubbsovega testa in linearnosti sprejeli ter jih uporabili v nadaljnji analizi.

6.1.2 Vpliv cisteina na permeabilnost

Tako kot v primeru EF smo tudi v primeru permeabilnosti sklepali, da bodo nekatere modifikacije vplivale na rezultate. S standardnim poskusom v 14 celicah z jejunumom smo na vstavkih s površino 1 cm² pridobili referenčne vrednosti permeabilnostnih koeficientov modelnih spojin. V polovici celic smo tkivo pred dodatkom donorskih raztopin obdelali z mukolitikom L-cisteinom in tako odstranili mukus. Rezultate prikazuje Preglednica VI.

Preglednica VI: Primerjava celic brez in s cisteinom, rezultati (P_{app} [10^{-6} cm/s]) Studentovega t-testa za standardni poskus

	Norfloksacin		Ranitidin		Furosemid	
	brez cys	s cys	brez cys	s cys	brez cys	s cys
PV ± SD	5,1 ± 0,48	7,5 ± 1,38	6,0 ± 0,65	9,2 ± 1,32	6,6 ± 0,68	10,6 ± 1,45
$t_{exp} <, > t_{tab}$ ($p <, > \alpha$)	3,31 > 2,36 (0,03 < 0,05)		4,82 > 2,36 (0,002 < 0,05)		5,49 > 2,36 (0,001 < 0,05)	
	Metoprolol		Karbamazepin		Kofein	
	brez cys	s cys	brez cys	s cys	brez cys	s cys
PV ± SD	17,0 ± 1,07	17,0 ± 4,55	32,6 ± 2,46	33,4 ± 5,42	35,8 ± 2,72	37,1 ± 6,48
$t_{exp} <, > t_{tab}$ ($p <, > \alpha$)	0,003 < 2,36 (0,99 > 0,05)		0,31 < 2,36 (0,77 > 0,05)		0,4 < 2,36 (0,70 > 0,05)	

Pridobljeni referenčni rezultati so se ujemali z navedbami v literaturi. Opazen je trend slabše permeabilnosti slabo permeabilnih učinkovin in dobro prehajanje dobro permeabilnih učinkovin. Z uporabo Studentovega t-testa smo po predhodno opravljenem

F-testu o enakosti varianc ugotovili, da je cistein s svojim vplivom na tkivo in mikrookolje enterocitov povzročil povečano permeabilnost slabo permeabilnih učinkovin, medtem ko na permeabilnost visoko permeabilnih ni imel pomembnega vpliva. Omeniti je treba tudi, da sicer povečane vrednosti, opažene pri slabo permeabilnih učinkovinah po obdelavi s cisteinom, ne dosežejo tistih, ki so značilne za visoko permeabilne učinkovine, torej je bila barierna funkcija sluznice še vedno vsaj deloma ohranjena.

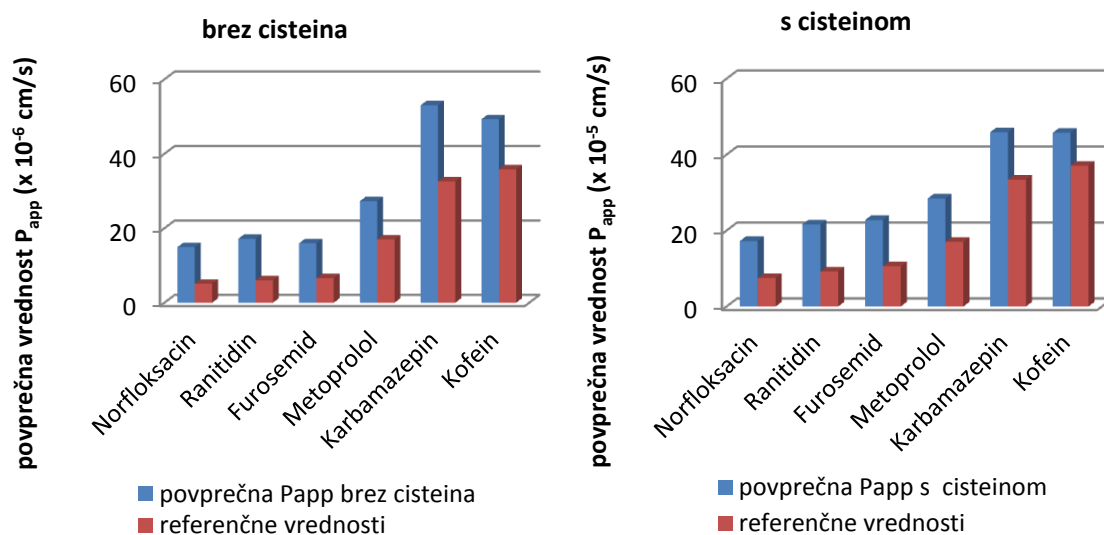
6.1.3 Vpliv manjše površine tkiva na permeabilnost

Opravili smo 3 poskuse z mešanico učinkovin brez predhodne obdelave tkiva s cisteinom, kjer smo imeli v vstavke vpet jejunum in PP.

6.1.3.1 Jejunum in vstavki P2303A

Vpliv menjave vstavkov smo preverili s tremi poskusi na jejunumu. Povprečne vrednosti P_{app} slabo permeabilnih učinkovin so bile pri vseh poskusih z vstavki P2303A s površino $0,1 \text{ cm}^2$ (Preglednica VII) precej višje v primerjavi z referenčnimi vrednostmi, pridobljenimi z vstavki s površino 1 cm^2 (Preglednica VI). Pri dobro permeabilnih učinkovinah so bile razlike manjše, vendar kljub temu opazne, kot prikazuje Graf 1, kjer je vidna tudi primerjava z referenčnimi vrednostmi iz Preglednice VI.

Graf 1: Primerjava povprečnih P_{app} ter referenčnih vrednosti za jejunum pri poskusih brez in s cisteinom



Povsem enakih vrednosti ob različnih dimenzijah sistema seveda nismo mogli pričakovati. Vzroka za toliko višje permeabilnosti pa ne moremo z gotovostjo identificirati. Na osnovi pogovora s proizvajalcem difuzijskih celic lahko predvidevamo, da je na rezultate precej vplivala tako imenovana robna škoda. Gre za pojav, ko nizko permeabilne spojine za svoje

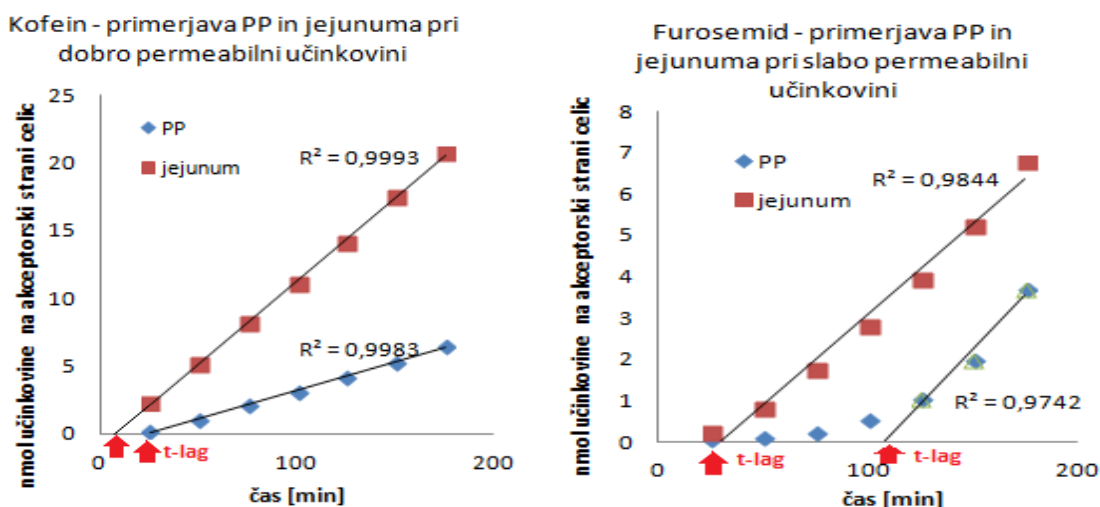
prehajanje skozi difuzijsko bariero izkoristijo tanek pas poškodovanega tkiva ob robu vstavka, kjer je tkivo stisnjeno zaradi vpenjanja. Pri manjših površinah tkiva je relativno gledano poškodovane površine več. Pri dobro permeabilnih učinkovinah je pojav manj izrazit, saj te že v osnovi dobro prehajajo skozi celotno površino tkiva.

Sprememba vstavkov v nobenem primeru ni imela vpliva na razvrstitev učinkovin glede na permeabilnost. Še vedno je razvidna nekoliko večja permeabilnost metoprolola ter občutno višja permeabilnost karbamazepina in kofeina v primerjavi s slabo permeabilnimi učinkovinami. To je za nas bistvenega pomena, saj lahko trdimo, da so, kljub težavnejši uporabi in potrebi po novih referenčnih vrednostih, rezultati, pridobljeni z manjšimi vstavki, zelo verjetno uporabni tudi za raziskave vplivov testiranega tkiva na permeabilnost modelnih učinkovin.

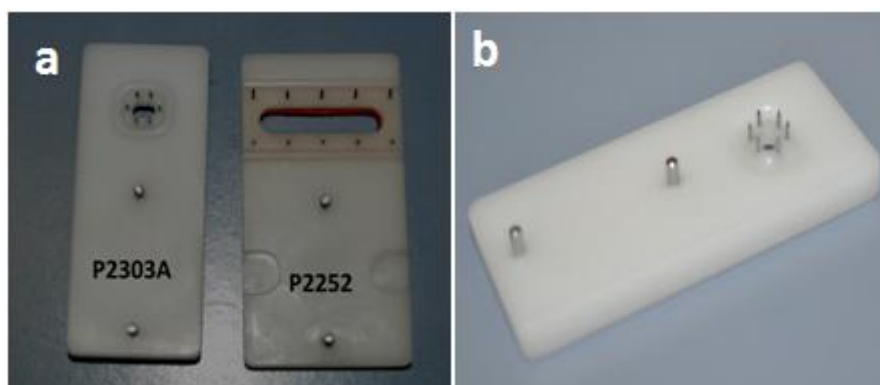
6.1.3.2 Peyerjeve plošče in vstavki P2303A

V primerjavi z jejunumom smo v celicah s PP opazili nekaj razlik. Učinkovine so skozi PP začele prehajati z daljšim zakasnitvenim časom. Ta je bil praktično neopazen pri raztopinah dobro permeabilnih učinkovin, tako pri poskusih brez cisteina kot pri poskusih, ko smo tkivo predhodno obdelali s cisteinom. Pri norfloksacinu, ranitidinu in furosemidu pa smo opazili očitno zakasnitev v prehodu učinkovin. Obseg zakasnitve je variiral. Pri izračunu P_{app} smo upoštevali tiste časovne točke, ki so tvorile jasno linearno odvisnost množine, ki je difundirala skozi tkivo, od časa. Pri tem smo si pomagali tudi z grafi in Pearsonovimi koeficienti korelacije (R^2), kar prikazuje Graf 2.

Graf 2: Primer grafa dobro (kofein) in slabo (furosemid) permeabilne učinkovine



Predvidevamo, da je na zakasnitveni čas močno vplivala debelina PP. Ko smo vpenjali tkivo v vstavke, smo sicer izbirali PP, ki so bile, vsaj na videz, podobnih velikosti, vendar se variiranju v debelini tkiva nismo mogli izogniti. Vsaka PP je sestavljena iz različnega števila foliklov, kar vpliva na njeno strukturo, torej tudi na debelino (1). Na razliko v zakasnitvenem času je poleg fizioloških razlik v velikosti/debelini PP vplivalo tudi vpenjanje tkiva. Postopek poteka ročno, zato ne smemo zanemariti človeškega faktorja. Do sedaj smo bili vajeni večjih vstavkov, tu pa je bila površina majhna. Igllice so bile bližje ena drugi, kar nam je še otežilo natikanje (Slika 3). Pri jejunumu smo imeli manj težav v primerjavi s PP, saj je tkivo tanjše. Trudili smo se, da bi tkivo dovolj in ponovno napeli, da bi pridobili čim bolj relevantne podatke.



Slika 3: a – primerjava vstavkov P2252 (1 cm²) in P2303A (0,1 cm²), b – prikaz iglic vstavka P2303A, na katere se natika tkivo

6.2 Vloga mukusa

Mukus lahko deluje kot ovira za absorpcijo delcev, saj jih »ujame«, kar povzroči nastanek skupkov, s tem pa se poveča končna velikost delcev. To se odraža v zmanjšanem koeficientu difuzije skozi mukus. Na ta način je difuzija v sluznico prebavil omejena (2). Eden od ciljev magistrske naloge je bil ugotoviti, kakšen vpliv ima mukus na permeabilnost učinkovin v obliki raztopin in kakšnega na permeabilnost furosevida, polnjenega v TCPSi mikrodolge.

Velikost delcev je ključen parameter za privzem preko PP. Trenutno velja, da proces poteka učinkovito, ko so delci v nanoobmočju (< 1 μm), medtem ko je pri mikrodolcih (> 1 μm) težje sklepati enako (2). Da je proces privzema delcev v PP odvisen od velikosti delca, so se strinjali tudi Lichen Yin in sodelavci. Kot optimalen premer so navedli 200 nm ali manjši. Manjši kot je premer, večji je privzem preko M-celic. Menijo, da se morajo delci pred translokacijo pritrditi na sluznico. Boljši kot je stik med sluznico in delci, večji

je privzem delcev (8). Zaradi tehnike pridobivanja delcev iz poroznega silicija so ti polidisperzni. Mikrodelci, uporabljeni v našem primeru, so manjši od 38 μm , kar je zagotovljeno s sejanjem, nekateri pa so tudi manjši od enega mikrometra. Tako ti delci niso primarno namenjeni prehodu skozi PP, ampak sproščanju slabo topne učinkovine v neposredni bližini sluznice, za kar bi bila potrebna interakcija z mukusom ali sluznico. Opravili smo dva poskusa z mešanico učinkovin ob predhodni mukolizi (jejunum, PP) ter dva poskusa s TCPSi mikrodelci (z/brez cisteina, na jejunumu in PP).

6.2.1 Vpliv mukusa in manjših vstavkov na jejunumu

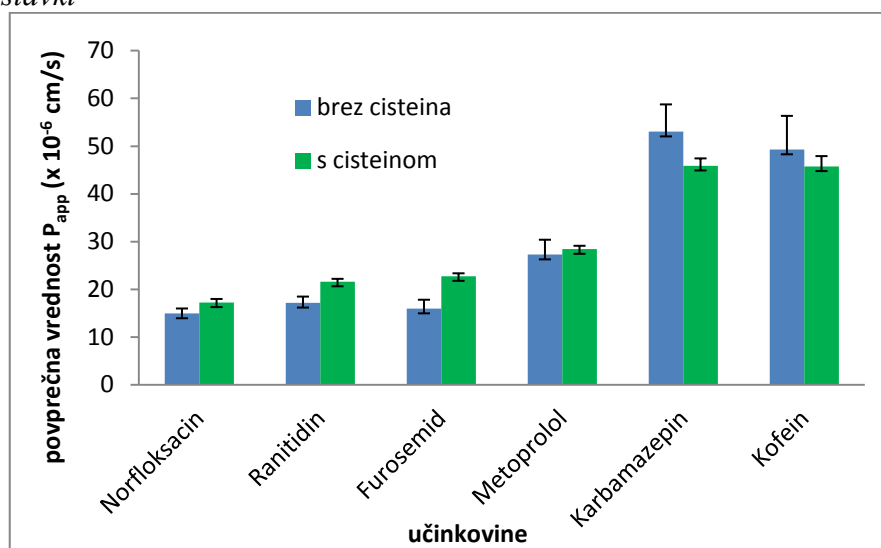
Jejunum smo vpeli v P2303A vstavke in polovico celic izpostavili mukolitiku L-cisteinu. Primerjava rezultatov je prikazana v Preglednici VII.

Preglednica VII: Primerjava celic brez in s cisteinom, rezultati (P_{app} [10^{-6}cm/s]) Studentovega t-testa za poskuse z jejunumom na manjših vstavkih

	Norfloksacin		Ranitidin		Furosemid	
	brez cys	s cys	brez cys	s cys	brez cys	s cys
PV \pm SD	14,9 \pm 4,20	17,3 \pm 1,40	17,2 \pm 5,35	21,6 \pm 1,21	16,0 \pm 5,56	22,8 \pm 1,30
KV	28,1 %	8,1 %	31,2 %	5,6 %	34,8 %	5,7 %
$t_{\text{exp}} <, > t_{\text{tab}}$ ($p <, > \alpha$)	1,52 < 2,18 (0,16 > 0,05)		2,39 > 2,18 (0,04 < 0,05)		3,50 > 2,18 (0,006 > 0,05)	
	Metoprolol		Karbamazepin		Kofein	
	brez cys	s cys	brez cys	s cys	brez cys	s cys
PV \pm SD	27,3 \pm 9,35	28,4 \pm 1,54	53,0 \pm 17,13	45,9 \pm 3,11	49,3 \pm 21,16	45,8 \pm 4,78
KV	34,3 %	5,4 %	32,3 %	6,8 %	42,9 %	10,4 %
$t_{\text{exp}} <, > t_{\text{tab}}$ ($p <, > \alpha$)	0,36 < 2,18 (0,72 > 0,05)		1,21 < 2,18 (0,26 > 0,05)		0,48 < 2,18 (0,64 > 0,05)	

S Studentovim t-testom smo ugotovili, da je prišlo do značilnega povečanja permeabilnosti po odstranitvi mukusa le v primeru ranitidina (za 26 %) in furosemida (za 43 %). Pri karbamazepinu in kofeinu je bil vpliv odstranjenega mukusa ravno obraten kot pri ostalih učinkovinah (Graf 3), a je bil neznačilen, tako kot za preostali učinkovini. Trend permeabilnosti se je ohranil ne glede na to, ali smo na jejunumu uporabili cistein ali ne. Norfloksacin, ranitidin in furosemid še vedno ostajajo slabše permeabilni od metoprolola, karbamazepina in kofeina.

Graf 3: Vpliv mukusa – prikaz razlik v permeabilnosti skozi jejunum pri poskusih z manjšimi vstavki



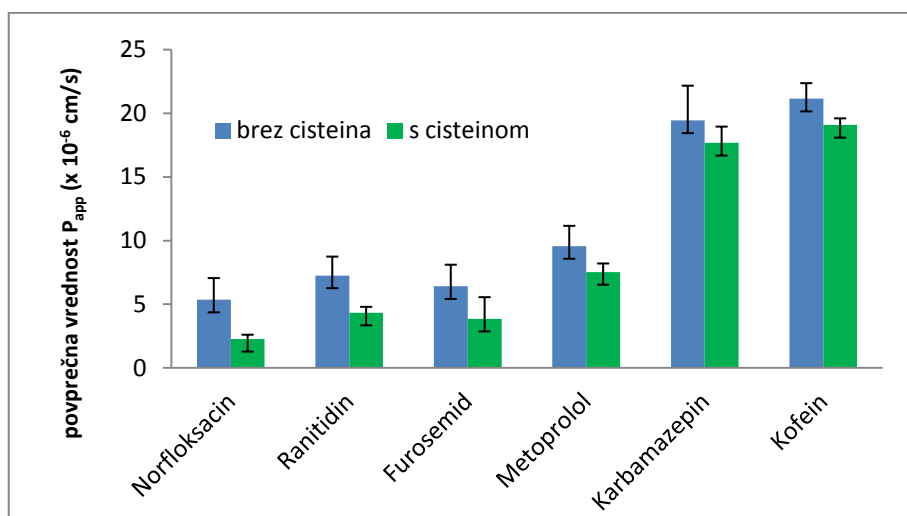
6.2.2 Vpliv mukusa in manjših vstavkov na Peyerjeve plošče

Poskuse na manjših P2303A vstavkih s površino $0,1 \text{ cm}^2$ smo izvedli tudi s Peyerjevimi ploščami (rezultati so prikazani v Preglednici VIII), zaradi česar smo ta model pravzaprav vpeljali. Pri vseh učinkovinah se je izkazalo, da so malenkost boljše, vendar statistično neznačilno, prehajale v primeru, ko PP niso bile izpostavljene mukolitiku, kar je razvidno tudi z Grafa 4. Razlog za takšne rezultate bi lahko bil, da se FAE, ki pokriva PP in jih ločuje od lumna črevesja, razlikuje od epitelija resic po manjši proizvodnji mukusa (4). Statistično nepomembne razlike (t-test) v permeabilnosti so potrdile predvidevanje, da ima L-cistein pri PP manjši vpliv na prehod učinkovin.

Preglednica VIII: Primerjava celic brez in s cisteinom, rezultati (P_{app} [10^{-6} cm/s]) Studentovega t-testa za poskuse s Peyerjevimi ploščami v manjših vstavkih

	Norfloksacin		Ranitidin		Furosemid	
	brez cys	s cys	brez cys	s cys	brez cys	s cys
PV \pm SD	5,4 \pm 5,06	2,3 \pm 0,80	7,3 \pm 4,68	4,3 \pm 1,11	6,4 \pm 5,35	3,9 \pm 1,14
KV	94,4 %	35,1 %	64,5 %	25,6 %	83,5 %	29,5 %
$t_{exp} <, > t_{tab}$ ($p <, > \alpha$)	1,79 < 2,16 (0,11 > 0,05)		1,88 < 2,14 (0,09 > 0,05)		1,46 < 2,14 (0,18 > 0,05)	
	Metoprolol		Karbamazepin		Kofein	
	brez cys	s cys	brez cys	s cys	brez cys	s cys
PV \pm SD	9,6 \pm 4,48	7,5 \pm 1,64	19,4 \pm 8,62	17,7 \pm 3,13	21,1 \pm 8,87	19,1 \pm 2,18
KV	46,8 %	21,8 %	44,4 %	17,7 %	42,0 %	11,4 %
$t_{exp} <, > t_{tab}$ ($p <, > \alpha$)	1,19 < 2,18 (0,26 > 0,05)		0,58 < 2,18 (0,57 > 0,05)		0,70 < 2,18 (0,50 > 0,05)	

Graf 4: Vpliv mukusa – prikaz razlik v permeabilnosti skozi PP pri poskusih z manjšimi vstavki



Mukus ni imel vpliva na razvrstitev permeabilnosti, saj je najboljše permeabilna učinkovina še vedno kofein, najslabše pa norfloksacin. Če primerjamo pridobljene rezultate, opazimo, da ima razgradnja mukusa morda drugačen vpliv na epitelij resic kot na Peyerjeve plošče, a statistično pomembnih razlik s poškodovanjem mukusa ne dosežemo, niti v primeru jejunuma niti v primeru Peyerjevih plošč, zaradi česar je takšen model primeren za raziskave vpliva in mehanizmov vgradnje učinkovine v mezoporozne mikro- in nanodelce. Ne glede na statistično značilnost rezultatov je treba poudariti, da ne bi mogli govoriti o vplivu na biološko uporabnost učinkovine. Sprememba v permeabilnosti namreč ne bi mogla biti tolikšna, da bi se lahko spremenil razred permeabilnosti učinkovine, torej je ne bi bilo mogoče »spremeniti« iz slabo permeabilne v dobro permeabilno.

6.2.3 Vpliv mukusa pri mikrodelcih

Tudi Khan in sodelavci so s poskusi poskušali ugotoviti, kakšna je vloga mukusa pri absorpciji učinkovin, vgrajenih v mikrodelce. Uporabili so lateks delce, ki so inertni, hidrofilni in pridejo v PP v procesu pinocitoze. V kontrolni skupini so lahko opazili enotno plast mukusa, ki je prekrivala PP. Znotraj kupole PP so lahko opazili nekaj delcev. V skupini, kjer pa so tkivo predhodno izpostavili NAC, mukusa praktično ni bilo več. Prisotnost adhezivnega mukusa je onemogočala prehod delcev. V kolikor ga ne bi bilo, ali bi se pretvoril v vodotopno obliko zaradi prisotnosti NAC, bi prišlo do prehoda delcev v submukozo in sistemsko cirkulacijo. V tej skupini so opazili značilno povečanje permeabilnosti tankega črevesa za lateks delce. Ravno tako so opazili korelacijo med povečano permeabilnostjo tankega črevesa in povečanim privzemom lateks delcev v PP. V

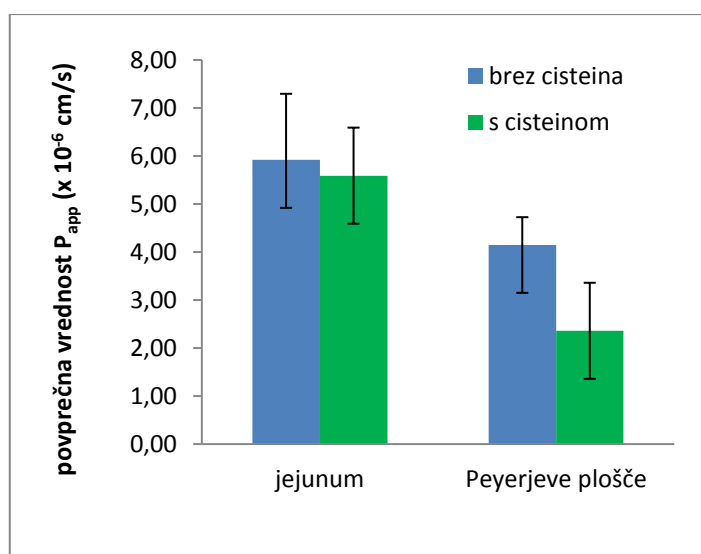
primerjavi s kontrolno skupino so opazili povečano število delcev v kupoli PP. Do sprememb v mukusu je prišlo tudi v tkivu, ki obdaja PP. Debelino tega mukusa je bilo komaj moč izmeriti. Torej v skupini, kjer je bilo tkivo izpostavljeno mukolitiku, so opazili značilno večjo permeabilnost za s fluoresceinom označene lateks delce (6). Za delce, kot so naši, ki so namenjeni sproščanju učinkovine v neposredni bližini enterocitov, so ti rezultati lahko dobri, če pomenijo, da mukusna plast delce ujame in slabi, ter če pomenijo, da delcem v celoti prepreči približevanje sluznici in ti ostanejo v suspenziji.

Naše rezultate vpliva mukusa na prehod furosevida iz MD skozi resice prebavil in skozi PP prikazuje Preglednica IX. Celice smo opazovali brez predhodnega dodatka cisteina ter ob dodatku cisteina. Dobljeni vrednosti P_{app} za jejunum sta praktično enaki. V primeru celic brez cisteina smo pridobili le dve ustrezni meritvi ($n = 2$), zato statistične primerjave nismo izvedli. Studentov t-test smo tako opravili le za meritve, ki smo jih pridobili v celicah s PP. Prehod učinkovine iz MD je bil neznačilno boljši, ko smo mukus pustili nepoškodovan. Rezultati, razvidno tudi z Grafa 5, se ujemajo z rezultati poskusov, ki smo jih opravili na PP z mešanico modelnih učinkovin.

Preglednica IX: Primerjava celic brez in s cisteinom, rezultati (P_{app} [10^{-6} cm/s]) Studentovega t-testa za poskuse s TCPSi

	TCPSi			
	jejunum		Peyerjeve plošče	
	brez cys	s cys	brez cys	s cys
PV \pm SD	5,9 \pm 2,38	5,6 \pm 1,03	4,2 \pm 1,00	2,4 \pm 1,15
$t_{exp} <, > t_{tab}$ ($p <, > \alpha$)	Izračun ni bil možen		2,15 < 2,57 (0,08 > 0,05)	

Graf 5: Vpliv mukusa – prikaz razlik v permeabilnosti skozi PP in jejunum pri poskusih s TCPSi mikrodelci



6.3 Jejunum ali Peyerjeve plošče

Magistrske naloge smo se lotili z namenom primerjave permeabilnost raztopljenih učinkovin in furosevida, vgrajenega v TCPSi mikrodolge, skozi PP in skozi ostalo (običajno) sluznico jejunuma podgane.

6.3.1 Absorpcija iz raztopine učinkovin brez prisotnosti cisteina

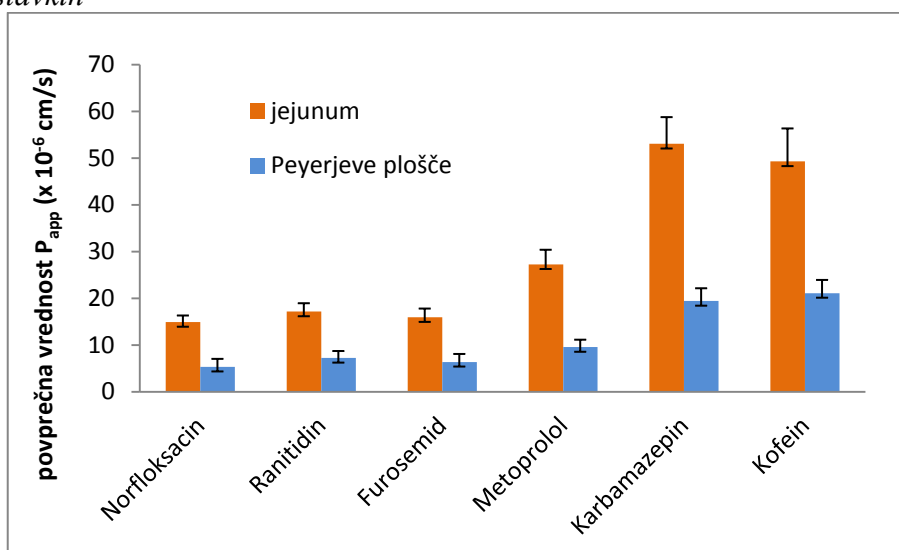
Primerjali smo rezultate P_{app} raztopin učinkovin, ki smo jih dobili pri poskusu na P2303A vstavkih brez uporabe cisteina (Preglednica X).

Preglednica X: Primerjava celic z jejunumom in s Peyerjevimi ploščami brez cisteina, rezultati (P_{app} [10^{-6} cm/s]) Studentovega t-testa na manjših vstavkih

	Norfloksacin		Ranitidin		Furosemid	
	jejunum	PP	jejunum	PP	jejunum	PP
PV ± SD	14,9 ± 4,20	5,4 ± 5,08	17,2 ± 5,35	7,3 ± 4,68	16,0 ± 5,56	6,4 ± 5,35
KV	28,10 %	94,4 %	31,2 %	64,5 %	34,8 %	83,5 %
$t_{exp} <, > t_{tab}$ ($p <, > \alpha$)	4,35 > 2,12 (0,005 < 0,05)		4,31 > 2,11 (0,005 < 0,05)		3,81 > 2,11 (0,001 < 0,05)	
	Metoprolol		Karbamazepin		Kofein	
	jejunum	PP	jejunum	PP	jejunum	PP
PV ± SD	27,3 ± 9,35	9,6 ± 4,47	53,0 ± 17,13	19,4 ± 8,62	49,3 ± 21,16	21,1 ± 8,87
KV	34,3 %	46,8 %	32,3 %	44,4 %	42,9 %	42,0 %
$t_{exp} <, > t_{tab}$ ($p <, > \alpha$)	5,07 > 2,13 (0,0003 < 0,05)		5,31 > 2,11 (0,002 < 0,05)		3,71 > 2,11 (0,004 < 0,05)	

Pri vseh učinkovinah je permeabilnost značilno višja v celicah z jejunumom. Lahko rečemo, da smo takšne rezultate pričakovali, saj naj bi absorpcija skozi PP potekala na osnovi privzema v M-celice (1, 2, 6), ki pa morajo zaznati nek določen antigen ali neznan delec, ki ga lahko predstavijo imunskemu sistemu (1). V primeru raztopin ti pogoji niso izpolnjeni in učinkovine navadno bolje prehajajo skozi enterocite sluznice prebavil. Z Grafa 6 je vidno splošno boljše prehajanje učinkovin skozi jejunum. P_{app} so pri vseh učinkovinah vsaj še enkrat višji kot P_{app} , ki smo jih izračunali pri celicah s PP. Ti rezultati tudi potrjujejo smiselnost običajnega postopka dela s celicami Sweetana-Grass, po katerem se permeabilnosti ne meri na segmentih tkiva, ki vključujejo PP.

Graf 6: Prikaz razlik v permeabilnosti skozi PP in jejunum pri poskusih brez cisteina na manjših vstavkih



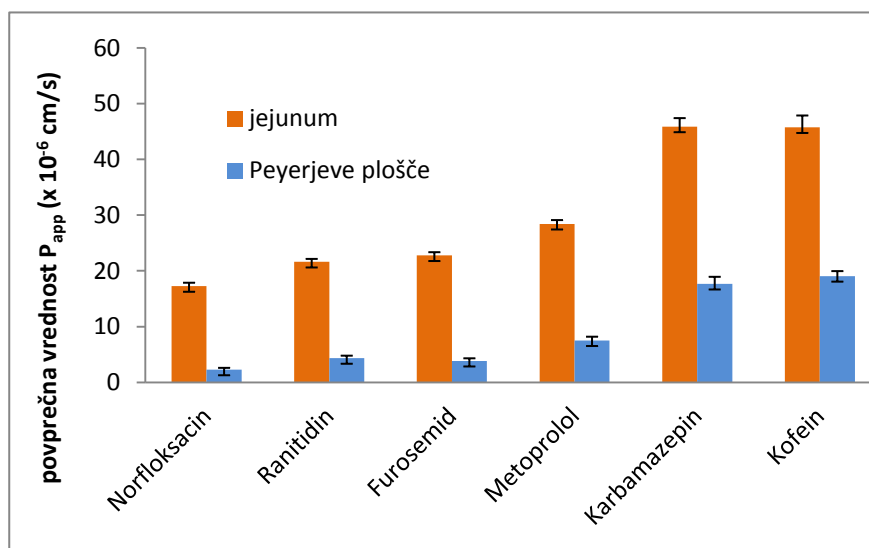
6.3.2 Absorpcija iz raztopine učinkovin ob predhodni prisotnosti cisteina na mukozni strani

Da bi ocenili še vpliv cisteina na absorpcijo raztopljenih učinkovin skozi PP, smo primerjali izračunane P_{app} celic, kjer smo tkivo predhodno obdelali z L-cisteinom. Tudi v tem primeru smo prišli do zaključka, da je permeabilnost vseh učinkovin značilno boljša v primeru prehoda skozi resice jejunuma. Rezultati so podani v Preglednici XI in na Grafu 7.

Preglednica XI: Primerjava celic z jejunumom in s Peyerjevimi ploščami s cisteinom, rezultati (P_{app} [10^{-6} cm/s]) Studentovega t-testa na manjših vstavkih

	Norfloksacin		Ranitidin		Furosemid	
	jejunum	PP	jejunum	PP	jejunum	PP
PV ± SD	17,3 ± 1,40	2,3 ± 0,80	21,6 ± 1,21	4,3 ± 1,11	22,8 ± 1,30	3,9 ± 1,14
KV	8,1 %	35,1 %	5,6 %	25,6 %	5,7 %	29,5 %
$t_{exp} <, > t_{tab}$ ($p <, > \alpha$)	22,40 > 2,26 ($3 \times 10^{-9} < 0,05$)		24,8 > 2,26 ($1 \times 10^{-9} < 0,05$)		25,70 > 2,26 ($1 \times 10^{-9} < 0,05$)	
	Metoprolol		Karbamazepin		Kofein	
	jejunum	PP	jejunum	PP	jejunum	PP
PV ± SD	28,4 ± 1,54	7,5 ± 1,64	45,9 ± 3,11	17,7 ± 3,13	45,8 ± 4,78	19,1 ± 2,18
KV	5,4 %	21,8 %	6,8 %	17,7 %	10,4 %	11,4 %
$t_{exp} <, > t_{tab}$ ($p <, > \alpha$)	21,68 > 2,26 ($4 \times 10^{-9} < 0,05$)		14,31 > 2,26 ($2 \times 10^{-7} < 0,05$)		12,33 > 2,26 ($6 \times 10^{-7} < 0,05$)	

Graf 7: Prikaz razlik v permeabilnosti skozi PP in jejunum pri poskusih s cisteinom na manjših vstavkih



Boljše prehajanje učinkovin skozi jejunum je tu še bolj očitno. Po naših podatkih je prišlo pri norfloksacinu do 6,5-krat, pri ranitidinu do 4-krat in pri furosemidu do približno 5-krat slabšega prehajanja skozi PP. Razlika je nekoliko manjša pri dobro permeabilnih učinkovinah, kjer je metoprolol približno 2,5-krat, karbamazepin in kofein pa približno 1,5-krat bolje prehajal skozi jejunum.

6.4 Mikrodelci ali raztopina učinkovine

Nazadnje smo preverili, ali je absorpcija učinkovine iz mikrodelcev res boljša kot v obliki raztopine, kar trdijo raziskovalci z Univerze vzhodne Finske, ki so izdelali naše mikrodelce. Stojalo za 8 difuzijskih celic smo nagnili pod kotom 30° (Slika 2) in na ta način omogočili stik mikrodelcev s tkivom. V primerjavi s horizontalnimi sistemi smo še vedno zagotovili ustrezno spiranje MD s površine sluznice.

Medij na donorski strani smo zamenjali z 0,3 % HPMC in z 0,5 % HPMC. Uporaba slednje je ob dodatnem blagem mešanem s 1000 µL pipeto zagotovila kroženje MD na donorski strani v celotnem trajanju poskusa. Prihajalo je do penjenja medija, kar smo reševali z uporabo zračne črpalke za akvarij, s katero smo peno »pihali«, da je razpadla, in plastičnih pregrad, ki so preprečevale morebiten prehod pene.

Pri obeh poskusih, tako brez kot s cisteinom, smo primerjali izračunane P_{app} celic z jejunumom in celic s PP, kar prikazuje Preglednica XII.

Preglednica XII: Rezultati (P_{app} [10^6 cm/s]) Studentovega t-testa primerjave celic z jejunumom in s Peyerjevimi ploščami pri poskusih z 0,5 % HPMC brez cisteina in s cisteinom

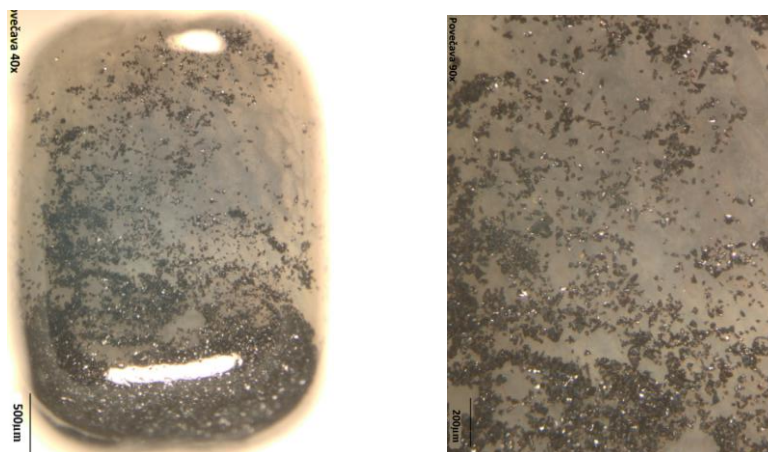
	poskus s TCPSi v 0,5 % HPMC			
	Jejunum		Peyerjeve plošče	
	raztopina	TCPSi	raztopina	TCPSi
PV ± SD	16,0 ± 5,56	5,9 ± 2,38	6,4 ± 5,35	4,2 ± 1,00
KV	34,8 %	40,2 %	83,5 %	24,1 %
$t_{exp} <, > t_{tab} (p <, > \alpha)$	16,36 > 2,57 (0,01 < 0,05)		1,26 < 2,20 (0,23 > 0,05)	
	poskus s TCPSi v 0,5 % HPMC s cisteinom			
	Jejunum		Peyerjeve plošče	
	raztopina	TCPSi	raztopina	TCPSi
PV ± SD	22,8 ± 1,30	5,6 ± 1,03	3,9 ± 1,14	2,4 ± 1,15
KV	izračun ni bil možen		29,5 %	48,7 %
$t_{exp} <, > t_{tab} (p <, > \alpha)$	izračun ni bil možen		2,03 < 2,31 (0,09 > 0,05)	

Rezultati kažejo, da je prišlo v celicah z jejunumom pri poskusu brez cisteina do značilne razlike v permeabilnosti. Permeabilnost furosemida iz raztopine je bila višja kot v primeru, ko je bil polnjen v termično karbonizirane porozne silicijeve mikrodolce. Pri poskusu s predhodno odstranjenim mukusom t-test ni bil možen zaradi premajhnega števila ustreznih meritev ($n = 2$), povprečni vrednosti pa kažeta, da bi bil zaključek podoben.

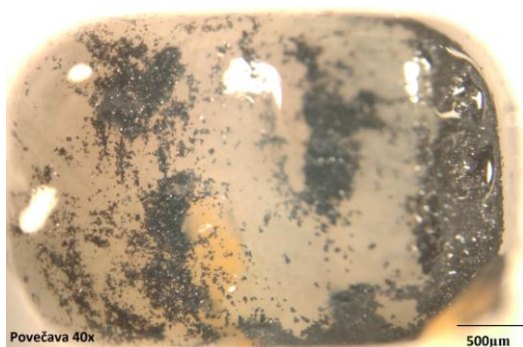
Kot smo že predhodno ugotovili so PP močnejša difuzijska bariera od jejunuma, kar se je pokazalo tudi pri primerjavi v Preglednici XII. Vgradnja furosemida v mikrodolce v nobenem primeru ni omogočila višje izmerjene permeabilnosti v primerjavi z raztopino, ne glede na prisotnost cisteina. V primeru MD smo permeabilnostne koeficiente izračunali s predpostavko, da je prišlo do 100 % sproščanja furosemida iz delcev. Z enako predpostavko so računali tudi Kankonen in sodelavci. Na modelu s Caco-2 celicami so pri pH 7,4 dokazali kar 4,7-krat višjo permeabilnost furosemida iz TCPSi kot iz raztopine furosemida (10). Njihovih izsledkov na našem modelu ne moremo potrditi. Najverjetnejši razlog je, da smo v celotnem poskusu zagotovili kroženje večine delcev v difuzijski celici, medtem ko so Kankonen in sodelavci uporabili horizontalni model, pri katerem se vsi delci prej kot v eni minuti po začetku poskusa usedejo na površino plasti Caco-2 celic, kjer sproščajo učinkovino in stalno zagotavljajo visoko lokalno koncentracijo. Možno je tudi, da je debela plast mikrodolcev na Caco-2 celicah vplivala na njihove barijerne lastnosti.

Po koncu poskusov s TCPSi smo tkivo shranili v petrijevke, da smo ga lahko prenesli do stereolupe. S tem smo zagotovili, da ni prišlo do izsušitve tkiva. Tkivo vsake celice smo

pregledali pod 40-kratno in 90-kratno povečavo. Primer slik je spodaj. Na Sliki 4 levo je jejunum pod 40-kratno, desno pa pod 90-kratno povečavo pri poskusu brez cisteina. Čeprav je na spodnjem robu prišlo do posedanja delcev, je razvidno, da smo z nagibom sistema dosegli, da so mikrodenci res prišli v stik z večjim delom površine tkiva. Razvidno je tudi, da so se delci zadržali na sluznici ali mukusu, saj v nasprotnem primeru na sredini površine, kjer je bilo zagotovljeno dobro spiranje, ne bi opazili toliko delcev. Zaradi težnosti in toka donorske raztopine bi se delci posedli le na spodnji rob tkiva.

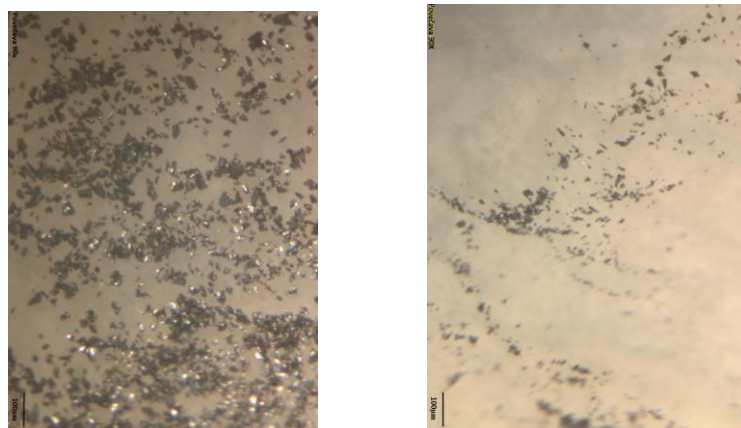


Slika 4: Primer slik s stereolupo. Jejunum pod 40-kratno in 90-kratno povečavo pri poskusu brez cisteina



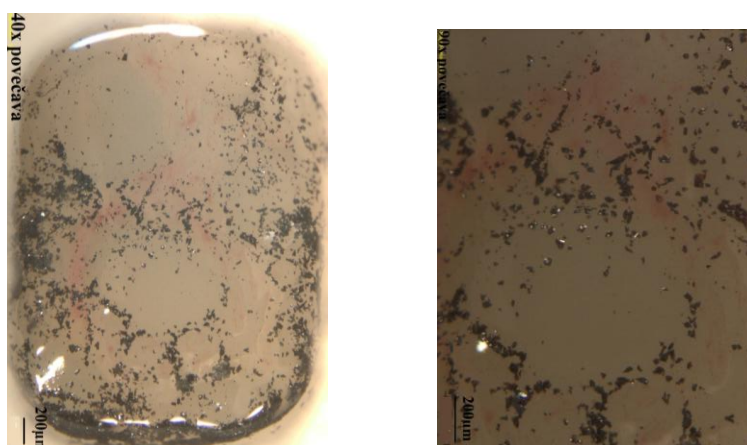
Slika 5: Primer slike s stereolupo. PP pod 40-kratno povečavo pri poskusu brez cisteina

Slika 5 prikazuje PP pod 40-kratno povečavo pri poskusu brez cisteina, kjer tudi lahko vidimo adhezijo delcev. Ugotovitev potrjuje Slika 6, kjer imamo na levi strani fotografijo PP druge celice pred spiranjem, na desni strani pa po spiranju tkiva, slikano pod 90-kratno povečavo. Po spiranju tkiva so se na površini ohranili manjši delci, večje pa je postopek spiranja odplaknil s površine. S pomočjo slik lahko potrdimo, da se delci niso le »polegli« na površino, ampak je dejansko prišlo do njihove adhezije na sluznico/mukus tkiva.



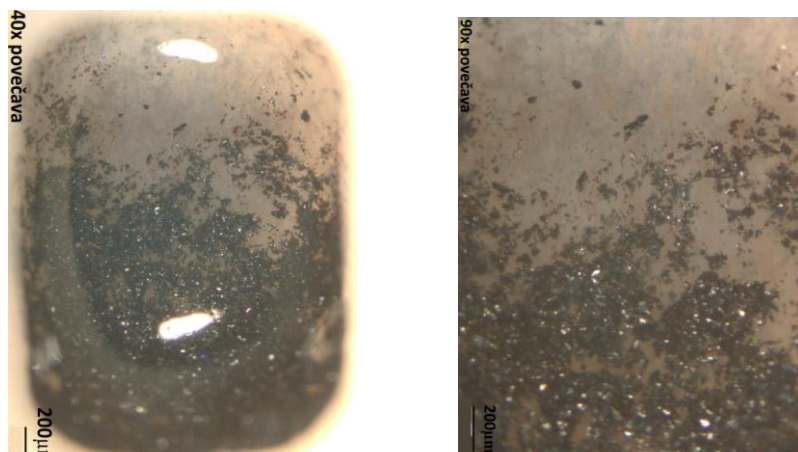
Slika 6: Primer slike s stereolupo. PP pred in po spiranju tkiva pod 90-kratno povečavo pri poskusu brez cisteina

Tudi po poskusu s TCPSi in cisteinom smo tkivo slikali pod mikroskopom. Želeli smo preveriti, ali so se delci adherirali na površino zaradi mukusa ali je prišlo do adhezije na sluznico ali pa celo absorpcije delcev v tkivo. Na Sliki 7 levo je primer Peyerjeve plošče celice pri poskusu s cisteinom pod 40-kratno povečavo, desno pa pod 90-kratno povečavo.



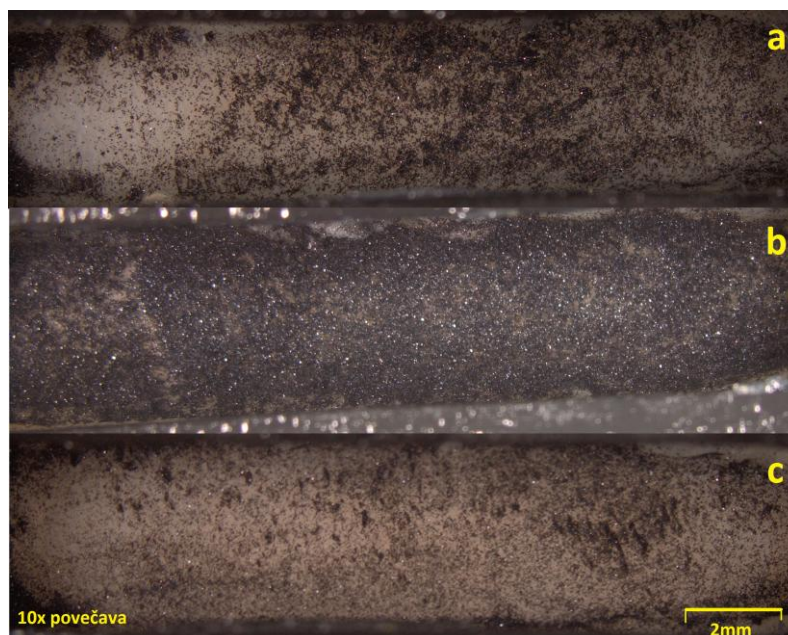
Slika 7: Primer slik s stereolupo. PP pod 40-kratno in 90-kratno povečavo pri poskusu s cistenom

Čeprav je delcev manj kot pri poskusih brez cisteina, vidimo, da so ti še vedno prisotni. Lahko trdimo, da mukus pripomore k adheziji delcev na sluznico, ni pa edini dejavnik, ki vpliva na to. Delci so razporejeni po celotni površini tkiva, kar pomeni, da je bilo tudi v tem primeru zagotovljeno ustrezno kroženje delcev. Slika 8 prikazuje jejunum, vpet v celico, ki smo ji predhodno dodali cistein. Količina delcev je na pogled približno enaka kot v primeru, ko smo mukus odstranili, vendar pa njihova razporeditev teži nekoliko bolj k spodnjemu robu tkiva. Kljub temu pa so delci prišli v stik s celotno površino tkiva, pri čemer je najpomembnejši srednji del tkiva glede na tok raztopine (od zgoraj navzdol).



Slika 8: Primer slik s stereolupo. Jejenum pod 40-kratno in 90-kratno povečavo

Sklepali smo, da pri poskusih s cisteinom zaradi odstranitve mukusa opazili manjši delež adherieranih delcev, vendar pa v primeru jejunuma vidimo, da to ne drži. Do enakih zaključkov je prišla tudi diplomantka, ki je na katedri preverjala mukoadhezivnost delcev. Pri poskusih s TCPSi mikrodenci in cisteinom je opazila, da ni prišlo do odstranitve mukusa. Še več, pod stereolupo je bilo moč opaziti, da se je količina mukusa in posledično delcev na površini močno povečala ter da so se delci ujeli v mukus. Na Sliki 9 vidimo primer jejunuma, slikanega pod 10-kratno povečavo. Pod oznako a je tkivo z delci, ki ni bilo izpostavljeno cisteinu, pod oznako b pa je jejenum predhodno obdelan s cisteinom in pod oznako c je prikazan ta isti jejenum po spiranju z Ringerjevim pufrom.



Slika 9: Jejenum pod 10-kratno povečavo: a – brez predhodne mukolize; b – ob predhodni mukolizi; c – ob predhodni mukolizi in spiranju z Ringerjevim pufrom po koncu poskusa

Količina delcev po spiranju jejunuma, predhodno obdelanega s cisteinom, je praktično enaka količini delcev na površini jejunuma pod oznako a, ki ni bil izpostavljen cisteinu. Slika 10 prikazuje stranski pogled na isti segment jejunuma, kjer je moč tudi razbrati, da so se delci ujeli v mukus. Seveda je to še bolj očitno pri uporabi stereomikroskopa, ki opazovalcu omogoča razločevanje globine opazovanih objektov, česar pa kamera žal ne more zajeti.



Slika 10: Prečno slikan jejunum pod 90-kratno povečavo

Sklepamo, da organizem na odstranitev mukusa v prvi fazi odreagira s povečanim izločanjem čašastih celic, ki poskušajo nadomestiti uničen mukus. Verjetno je dražljaj za izločanje še toliko močnejši, kadar je tkivo dodatno mehansko vzdraženo s prisotnostjo MD. Mogoče bi ob daljši izpostavljenosti mukolitiku prišlo do atrofije in uničenja mukusa, ki se ne bi mogel tako hitro povrniti v prvotno stanje. Nedvomno bo potrebno vpliv mukusa raziskovati z odstranitvijo, ki jo bo zagotavljala stalna prisotnost mukolitika in ne le kratkotrajna obdelava. To pa bo lahko vplivalo tudi na vitalnost uporabljenega tkiva.

7 ZAKLJUČKI

Uporaba manjših vstavkov je vplivala na meritve elektrofizioloških parametrov. Zanesljiva ocena vitalnosti s starimi kriteriji ni bila več možna, zato smo namesto njih upoštevali linearnost. Kljub težavnejši uporabi modela in potrebi po novih referenčnih vrednostih (višje povprečne vrednosti P_{app} na vstavkih P2303A), so rezultati, pridobljeni na manjših vstavkih, zelo verjetno uporabni za raziskave permeabilnosti testiranega tkiva.

Potrdili smo, da je bila pri vseh učinkovinah permeabilnost značilno višja v celicah z jejunumom. Ti rezultati tudi potrjujejo smiselnost običajnega postopka dela s celicami Sweetana-Grass, po katerem se permeabilnosti ne meri na segmentih tkiva, ki vključujejo PP. Mukoliza s cisteinom je po pričakovanjih nekoliko izboljšala prehajanje predvsem slabo permeabilnih učinkovin skozi jejunum. Potrdili smo, da je permeabilnost učinkovin skozi jejunum boljša, če so te že raztopljene, v primerjavi z učinkovino, ki se sproti sprošča iz suspendiranih mikrodelcev.

Potrdili smo tudi, da so Peyerjeve plošče močnejša difuzijska bariera kot ostala sluznica jejunuma. Značilnih razlik v difuziji furosemda iz raztopine in iz TCPSi mikrodelcev skozi Peyerjeve plošče nismo potrdili. Tako smo potrdili domnevo, da so predhodna opažanja povečane permeabilnosti učinkovin iz mikrodelcev posledica uporabe horizontalnih celičnih modelov in visoke lokalne koncentracije učinkovin iz usedline delcev na sloju celic.

S slikami tkiva pod stereolupo smo za naš model potrdili ustrezno kroženje in spiranje delcev s površine sluznice izbranega tkiva. Dokazali smo adhezijo delcev na sluznico in ugotovili, da mukus le pripomore k slednji, ni pa edini dejavnik, ki vpliva na to.

Peyerjeve plošče ostajajo zanimivo področje za raziskave, saj je o njih še mnogo neznanega. Na nas raziskovalcih je, da odkrijemo način in prilagodimo modele tako, da bomo lahko z dovolj veliko gotovostjo trdili, da so Peyerjeve plošče lahko pot za absorpcijo makromolekularnih in slabo permeabilnih učinkovin.

8 LITERATURA

- 1.) Khan J., Iiboshi Y., Nezu R., Chen K., Cui L., Yoshida H., Wasa M., Fukuzawa M., Kamata S., Takagi Y., Okada A.: Total parenteral nutrition increases uptake of Latex beads by Peyer's Patches. *Journal of Parenteral and Enteral Nutrition* 1997; vol 21, No 1: 31-35
- 2.) Shakweh M., Ponchel G., Fattal E.: Particle uptake by Peyer's patches: a pathway for drug and vaccine delivery. *Expert opinion Drug Delivery* 2004; 1(1): 141-16
- 3.) Dressman J.B., Lennernäs H.: *Oral drug absorption - prediction and assessment*, 2000, Marcel Dekker, New York, 2000; 61-63
- 4.) Jung C., Hugot J.P., Barreau F.: Peyer's Patches: The Immune Sensors of the intestine. *International Journal of Inflammation* Volume 2010, 1-12
- 5.) Legen I., Žakelj S., Kristl A.: Polarised transport of monocarboxylic acid type drugs across rat jejunum in vitro: the effect of mucolysis and ATP-depletion. *International Journal of Pharmaceutics* 2003; 256: 161–166
- 6.) Khan J., Iiboshi Y., Cui L., Wasa M., Okada A.: Role of intestinal Mucus on the uptake of latex beads by Peyer's patches and on their transport to mesenteric lymph nodes in rats. *Journal of Parenteral and Enteral Nutrition*; 1999; vol 23, No 1; 19-237.) Wikman Larhed A., Artursson P., Björk E.: The influence of intestinal mucus components on the diffusion of drugs. *Pharmaceutical Research*, 1998; vol 15, No 1: 66-71
- 8.) Yin L., Ding J., He C., Cui L., Tang C., Yin C.: Drug permeability and mucoadhesion properties of thiolated trimethyl chitosan nanoparticles in oral insulin delivery. *Biomaterials* 2009; 30: 5691-5700
- 9.) Lennernäs H., Nylander S., Ungell A.: Jejunal Permeability: A comparison between the ussing Chamber technique and teh Single Pass Perfusion in Humans. *Pharmaceutical Research*, 1997; vol 14, No 5: 667-670
- 10.) Kaukonen A.M., Laitinen L., Salonen J., Tuura J., Heikkilä T., Limnell T., Hirvonen J., Lehto V.-P.: Enhanced in vitro permeation of furosemide loaded into thermally carbonized mesoporous silicon (TCPSi) microparticles. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 2007; 66: 348-356
- 11.) Salonen J., Laitinen L., Kaukonen A.M., Tuura J., Björkqvist M., Heikkilä T., Vähä-Heikkilä K., Hirvonen J., Lehto V.-P.: Mesoporous silicon microparticles for oral drug delivery: loading and release of five model drugs. *Journal of controlled release*, 2005; 108: 362-374

- 12.) McGill S., Smith H.: Disruption of the mucus barrier by topically applied exogenous particles. *Molecular pharmaceutics*, 2010, vol 7, No. 6: 2280-2288
- 13.) McCullough M., Smith S.H., Moyes S.M., Carr K.E.: Factors influencing intestinal microparticle uptake in vivo. *International Journal of Pharmaceutics*, 2007; 335: 79-89
- 14.) Crater J.S., Carrier R.L.: Barrier properties of gastrointestinal mucus to nanoparticle transport. *Macromolecular Bioscience*, 2010; 10: 1473-1483
- 15.) <http://graphpad.com/support/faqid/1598/>, 23.3.2014
- 16.) Bojan Potrč: Primerjava različnih modelov za določanje permeabilnosti zdravilnih učinkovin, diplomsko delo, Ljubljana 2006, str. 37 ,
- 17.) Smetanova L., Stetinova V., Kholova D., Kvetina J., Smetana J, Svoboda Z.: Caco-2 cells and Biopharmaceutics Classification System (BCS) for prediction of transepithelial transport of xenobiotics (model drug: caffeine). *Neuroendocrinology Letters*, 2009; 30 suppl 1: 101-105
- 19.) Breda S.A., Jimenez-Kairuz A.F., Manzo R.H., Olivera M.E.: Solubility behavior and biopharmaceutical classification of novel high-solubility ciprofloxacin and norfloxacin pharmaceutical derivatives. *International Journal of Pharmaceutics*, 2009; 371(1-2): 106-113
- 20.) Helen O. Chan: *Biopharmaceutics Classification System: an industrial experience*; Parke-Davis Pharmaceutical Research, Ann Arbor, Michigan, ZDA, 1999
- 21.) U.S. Department of Health and Human Services, FDA: *Guidance for industry - Waiver of In Vivo Bioavailability and Bioequivalence Studies for Immediate-Release Solid Oral Dosage Forms Based on a Biopharmaceutics Classification System*, 2000
- 22.) Slovenski medicinski e slovar, Lek d.d. in Medicinska fakulteta Univerze v Ljubljani, leto 2006
- 23.) 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? *Current Drug Metabolism*, 2013, 14, 21-27