UNIVERZA V LJUBLJANI

FAKULTETA ZA FARMACIJO

ZALA GUČEK

MAGISTRSKA NALOGA

ENOVITI MAGISTRSKI ŠTUDIJ FARMACIJE

Ljubljana, 2015

UNIVERZA V LJUBLJANI

FAKULTETA ZA FARMACIJO

ZALA GUČEK

VPLIV ENERGIJSKE PRESNOVE NA PRIVZEM FLAVONOIDA KVERCETINA V ASTROCITE NOVOROJENE PODGANE

THE IMPACT OF ENERGY METABOLISM ON FLAVONOID QUERCETIN UPTAKE INTO NEONATAL RAT ASTROCYTES

ENOVITI MAGISTRSKI ŠTUDIJ FARMACIJE

Ljubljana, 2015

Magistrsko delo sem opravljala na Inštitutu za farmakologijo in eksperimentalno toksikologijo Medicinske fakultete Univerze v Ljubljani pod mentorstvom prof. dr. Mojce Kržan, dr. med in somentorstvom doc. dr. Lovra Žiberne, mag. farm.

Zahvala

Iskreno se zahvaljujem svoji mentorici, prof. dr. Mojci Kržan, dr. med., za strokovno vodenje in pomoč, pa tudi za izjemno prijaznost, dostopnost in toplino.

Hvala doc. dr. Lovru Žiberni, mag. farm., za usmerjanje pri raziskovanju in koristne nasvete. Zahvaljujem se tudi tehnični sodelavki Jožici Košir za prijazno pomoč pri uvajanju v laboratorijsko delo.

Posebej se zahvaljujem svoji družini za podporo in inspiracijo, Marku, ker mi lepša življenje, in prijateljem za prijetne spomine na študentsko življenje.

Izjava

Izjavljam, da sem magistrsko nalogo izdelala samostojno pod mentorstvom prof. dr. Mojce Kržan, dr. med in somentorstvom doc. dr. Lovra Žiberne, mag. farm.

Zala Guček

Predsednica komisije: prof. dr. Julijana Kristl, mag. farm.

Član komisije: doc. dr. Matej Sova, mag. farm.

POVZETEK

Kvercetin je flavonoid z močnim antioksidativnim delovanjem, ki je prisoten v večini sadja in zelenjave. Mehanizem njegovega privzema v celice še ni v celoti pojasnjen, kar zmanjšuje možnost izkoriščanja antikancerogenega, kardioprotektivnega in protivnetnega delovanja. V magistrskem delu smo na kulturi astrocitov, ki smo jih izolirali iz možganske skorje novorojenih podgan, raziskali prisotnost prenašalcev pri privzemu in vlogo celične energijske presnove. V drugem delu smo preverili, če se kvercetin privzema s prenašalci, ki so glede na literaturo najverjetnejši.

Ugotovili smo, da se kvercetin v astrocite privzema s pomočjo olajšane difuzije, torej s prenašalci. Verjetno je v privzem vključenih več različnih prenašalnih sistemov. Dokaze za pasivnost procesa smo dobili s primerjavo privzema pri temperaturi 37 °C in 4 °C, saj se privzem ni bistveno razlikoval, prisotnost prenašalcev pa smo potrdili s kinetiko privzema in z uporabo 0,1 mM benzilsulfonil fluorida (PMSF), ki je z ireverzibilno inhibicijo proteinov zmanjšal privzem v astrocite.

Zaviranje celičnega metabolizma ni povzročilo upada privzema kvercetina v astrocite, izvedli pa smo ga na dveh stopnjah: i) z 0,1 mM KCN, 1 mM NaN_3 ali 0,01 mM $NaVO_3$ smo inhibirali dihalno verigo; ii) z 1 mM NaF pa glikolizo. Na podlagi teh rezultatov lahko zaključimo, da zaviranje energijske proizvodnje v celici ne vpliva na privzem kvercetina in zato ne gre za aktivni transport, kar je skladno z zgornjimi ugotovitvami.

V zadnjem delu smo preverili vpletenost specifičnih prenašalcev. Z 0,01 mM estradiolom, 0,1 mM natrijevim glikoholatom ali 0,1 mM kortikosteronom smo inhibirali prenašalce OATP (polipeptidni prenašalci za organske anione) in zaznali velik upad v privzemu kvercetina. Zato lahko z veliko verjetnostjo potrdimo, da so prenašalci OATP vključeni v privzem kvercetina. Podobne rezultate smo dobili tudi po zaviranju delovanja receptorjev SGLT1 (od natrijevih ionov odvisni glukozni soprenašalec) z 30 mM glukozo in 1 mM floridzinom, kar kaže na vpletenost prenašalcev SGLT1 v privzem kvercetina. Zaključili smo s testiranjem kombinacij različnih inhibitorjev, ki so potrdile, da je v privzem kvercetina vključenih več različnih prenašalnih sistemov.

Ključne besede: privzem kvercetina, astrociti, energijska presnova, OATP, SGLT1

ABSTRACT

Quercetin is a flavonoid with strong antioxidant properties, which is present in most fruit and vegetables. The mechanism of its uptake into cells has not yet been fully elucidated, which reduces the possibility of using its anticancer, cardioprotective and anti-inflammatory benefits. In this thesis we used a culture of astrocytes, which were isolated from the cerebral cortex of newborn rats, to research the presence of transporters in the uptake and the role of cellular energy metabolism. In the second part we tested the involvement of quercetin uptake carriers, which could be involved in quercetin uptake according to the literature.

We have found that the mechanism for quercetin uptake in astrocytes is facilitated diffusion. It is likely that a variety of transport systems are involved. Evidence for the passivity of the process were obtained by comparing the uptake at 37 °C and 4 °C, since the uptake is not significantly different. The presence of transporters were confirmed by the kinetics of uptake and by the decrease in uptake after incubation with 0.1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF), which irreversibly inhibits proteins.

Inhibition of cell metabolism has not resulted in a decrease of uptake of quercetin in astrocytes. We used substances, that affect different levels of metabolism: i) 0.1 mM KCN, 1 mM NaN_3 or 0.01 mM $NaVO_3$ to inhibit respiratory chain; ii) 1 mM NaF to inhibit glycolysis. Based on these results, we can conclude that inhibition of energy production in the cell does not affect the uptake of quercetin and therefore there is no active transport.

In the last part we checked the involvement of specific transporters. 0.01 mM estradiol, 0.1 mM sodium glycocholate or 0.1 mM corticosterone were used to inhibit OATP transporter (polypeptide carriers for organic anions), and we noticed a large decline in the uptake of quercetin. It is therefore highly likely that the OATP transporters are involved in the uptake of quercetin. Similar results were obtained after inhibition of SGLT1 with 30 mM glucose and 1 mM phloridzin, suggesting the involvement of SGLT1 in the uptake of quercetin. Our study was concluded with experiments that included combinations of different inhibitors and the results have confirmed, that several transfer systems were involved in the uptake of quercetin.

Keywords: uptake of quercetin, astrocytes, energy metabolism, OATP, SGLT1

VSEBINA

UVOD 1

1. Načini transporta snovi v celico 1

1.1 Pasivni transport: enostavna in olajšana difuzija 2

1.2 Aktivni transport 3

2. Procesi pridobivanja ATP v celici 4

2.1 Proces pridobivanja ATP v astrocitih 5

3. Načini dostave zdravilnih učinkovin preko krvno-možganske pregrade 5

3.1 Večanje lipofilnosti majhnih zdravilnih učinkovin 6

3.2 Načrtovanje molekul za prenos z endogenimi možganskimi prenašalci 6

3.3 Koloidni dostavni sistemi – liposomi in nanodelci 7

4. Kvercetin 9

4.1 Kemijske in biološke značilnosti kvercetina 9

4.2 Kvercetin v osrednjem živčevju 10

5. Bilirubin 11

5.1 Hiperbilirubinemija kot zaščitni dejavnik 12

5.2 Načini za dvig koncentracije bilirubina v krvi 12

NAMEN DELA 14

MATERIALI IN METODE 15

1. Reagenti in oprema 15

2. Eksperimentalne metode 16

2.1 Izolacija in priprava kulture astrocitov 16

2.2 Privzem kvercetina v celične kulture astrocitov 17

2.3 Določanje količine privzetega kvercetina 19

2.4 Določanje celokupne količine proteinov 20

2.5 Analiza podatkov 20

REZULTATI 22

1. Časovna in koncentracijska odvisnost privzema kvercetina 22

2. Vpliv specifičnih ireverzibilnih inhibitorjev proteinov na privzem kvercetina 23

3. Vpliv motenj energijske presnove na privzem kvercetina 24

4. Vpliv kardiotoničnih glikozidov na privzem kvercetina 25

5. Vpliv zasedenosti prenašalcev OATP na privzem kvercetina 26

6. Vpliv delovanja od natrijevih ionov odvisnih glukoznih soprenašalcev tipa 1 (SGLT1) na privzem kvercetina 28

7. Prenos prek več prenašalcev 29

RAZPRAVA 33

1. Koncentracijska in časovna odvisnost privzema kvercetina 33

2. Vpliv specifičnih ireverzibilnih inhibitorjev proteinov na privzem kvercetina 34

3. Vpliv motenj energijske presnove na privzem kvercetina 34

4. Vpliv kardiotoničnih glikozidov na privzem kvercetina 35

5. Vpliv zasedenosti prenašalcev OATP na privzem kvercetina 35

6. Vpliv delovanja od natrijevih ionov odvisnih glukoznih soprenašalcev tipa 1 (SGLT1) na privzem kvercetina 36

7. Prenos prek več prenašalcev 37

SKLEP 38

VIRI 39

KAZALO SLIK

Slika 1: Celice osrednjega živčnega sistema 1

Slika 2: Načini prenosa snovi v celico 2

Slika 3: "Prostorsko pufranje kalija" 3

Slika 4: Uniport in kotransport 3

Slika 5:: Metabolni procesi v astrocitu 5

Slika 6: Prikaz prehoda HEB s pomočjo "trojanskega konja" 7

Slika 7: Struktura liposoma 8

Slika 8: Struktura nanosfere in nanokapsule 8

Slika 9: Struktura kvercetina 9

Slika 10: Nastanek kvercetin kinona 9

Slika 11: Časovna odvisnost privzema [^{3}H]-kvercetina v astrocite novorojenih podgan. 22

Slika 12: Koncentracijska odvisnost privzema [^{3}H]-kvercetina v astrocite novorojenih podgan. 23

Slika 13: Učinek inhibitorjev proteinov, 0,1 mM PMSF in 0,1 mM DTNB, na privzem [^{3}H]-kvercetina v astrocite novorojenih podgan 24

Slika 14: Učinek različnih inhibitorjev dihalne verige in inhibitorja glikolize na privzem [^{3}H]-kvercetina v astrocite novorojenih podgan. 25

Slika 15: Učinek ouabaina in digoksina, inhibitorjev NKA, na privzem [^{3}H]-kvercetina v astrocite novorojenih podgan.. 26

Slika 16: Učinek natrijevega glikoholata, estradiola in kortikosterona, substratov za receptorje OATP, na privzem [^{3}H]-kvercetina v astrocite novorojenih podgan. 27

Slika 17: Učinek glukoze in flordizina na privzem [^{3}H]-kvercetina v astrocite novorojenih podgan. 28

Slika 18: Primerjava učinka kombinacije bilirubina in natrijevega glikoholata na privzem [^{3}H]-kvercetina v astrocite novorojenih podgan.. 30

Slika 19: Primerjava učinka kombinacije bilirubina in floridzina na privzem [^{3}H]-kvercetina v astrocite novorojenih podgan. 31

Slika 20: Primerjava učinka predhodne inkubacije s PMSF na privzem [^{3}H]-kvercetina v astrocite novorojenih podgan.. 32

KAZALO PREGLEDNIC

Preglednica 1: Sestava pufrov, ki smo ju uporabili pri poskusih privzema kvercetina 18

KAZALO ENAČB

Enačba 1: Število razpadov radioaktivnega izotopa na minuto 19

Enačba 2: Izračun koncentracije privzetega ^{3}[H]-kvercetina v vzorcu 19

Enačba 3: Izračun velikosti vzorca 21

SEZNAM OKRAJŠAV

acetil-CoA – acetil-koencim A

ATP – adenozin trifosfat

DTNB – ditionitrobenzojska kislina

FAD – flavinadenindinukleotid (oksidirana oblika)

$FADH_2$ – flavinadenindinukleotid (reducirana oblika)

GTP – gvanozin trifosfat

HEB – hematoenfecalna bariera, oziroma krvno-možganska pregrada

NAD+ – nikotinamid dinukleotid (oksidirana oblika)

NADH – nikotinamid dinukleotid (reducirana oblika)

NKA – natrij-kalijeva črpalka

OATP – polipeptidni prenašalec za organske anione

PMSF – benzilsulfonil fluorid

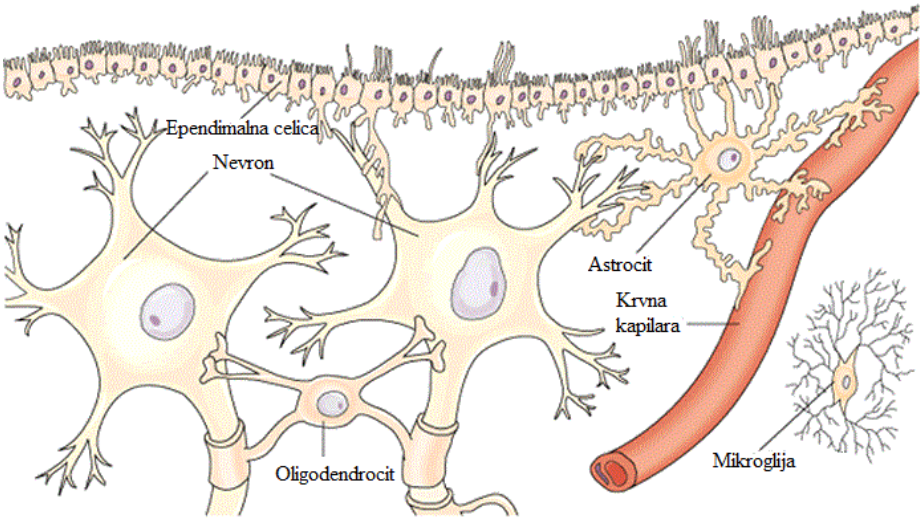
SGLT – od natrijevih ionov odvisni glukozni soprenašalec

UVOD

1. Načini transporta snovi v celico

Vsaka celica v telesu je samostojna enota, ki mora za svoje preživetje ohranjati primerne pogoje, ne glede na spremembe v okolju. Homeostaza vključuje procese termoregulacije, regulacije pH, uravnavanje koncentracije kisika in glukoze ter mnoge druge. Osnova za mnoge od teh procesov pa je natančno reguliran prehod snovi v celico, na katerega se bomo osredotočili v tem poglavju.

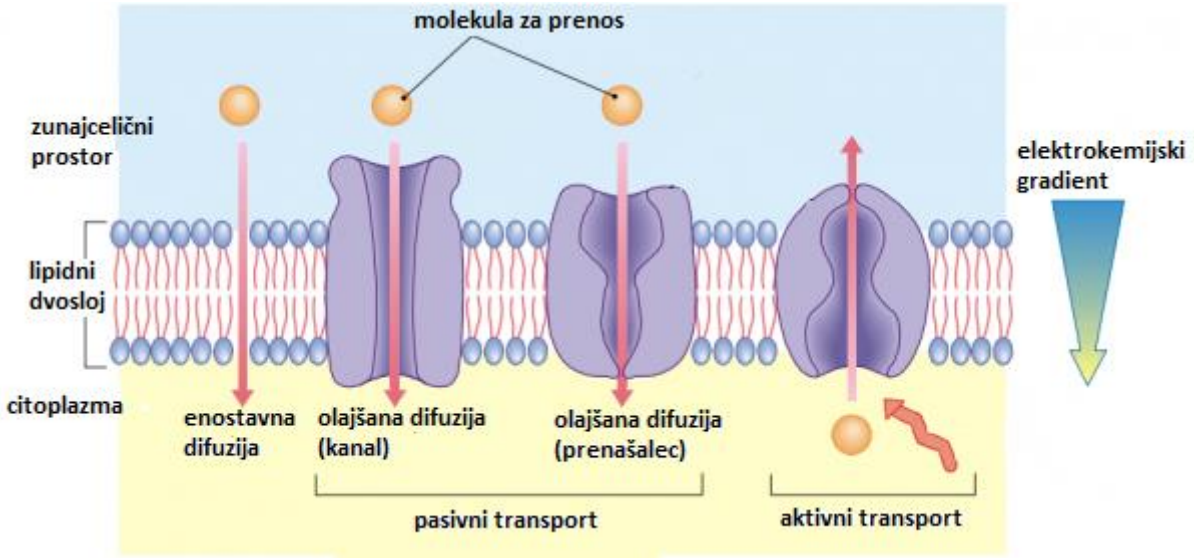
Kot primer celice, na kateri bomo prikazali poti transporta snovi, uporabimo astrocite. Te možganske celice niso sposobne proženja akcijskih potencialov zaradi pomanjkanja ionskih kanalov. Vseeno pa med seboj in z nevroni komunicirajo preko kalcijevih tokov, imenovanih gliotransmisija. Imajo mnogo pomembnih funkcij, kot je sestava hematoencefalne bariere, nadzor ionskega ravnotežja v možganih, kontrola pretoka skozi krvne kapilare ter vključenost v tridelno sinapso, kjer med drugim odstranjujejo presežke živčnih prenašalcev (1).



Slika 1: Celice osrednjega živčnega sistema (prirejeno po (2))

Način prehoda snovi v celico je odvisen predvsem od lastnosti snovi, ki se transportira. Največji vpliv imajo molekulska masa, lipofilnost, naboj molekule, logP in sposobnost tvorjenja vodikovih vezi (3). Prenos skozi membrano lahko glede na mehanizem transporta razdelimo na aktivni in pasivni transport. Bistvo prvega je, da gibanje molekul poteka v smeri koncentracijskega gradienta in da se za prenos ne porablja energija. Pri aktivnem transportu pa

gre za prenos molekul v nasprotju s koncentracijskim gradientom, zato je energijsko potraten proces (Slika 2) (4).



Slika 2: Načini prenosa snovi v celico (prirejeno po (5))

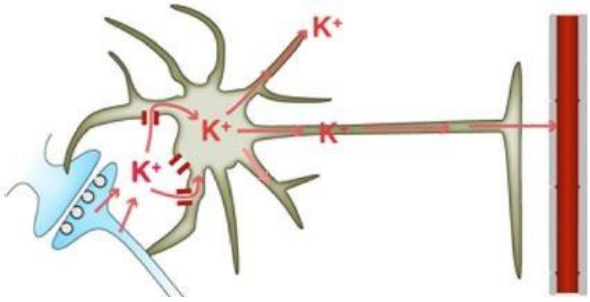
1.1 Pasivni transport: enostavna in olajšana difuzija

Pri enostavni difuziji se molekule premikajo skozi polprepustno membrano, žene pa jih razlika v koncentracijskem gradientu. Poteka torej do točke, ko se koncentraciji na obeh straneh membrane izenačita. To je energijsko ugoden proces, saj pri tem narašča entropija sistema, entalpija pa pada (4). Molekule, ki lahko iz astrocitov potujejo na ta način, so plini; npr. O_2.

Olajšana difuzija ravno tako poteka v smeri koncentracijskega gradienta in ne porablja energije, pomembna razlika pa je to, da gre za prenos večjih ali polarnih molekul, ki same ne morejo difundirati skozi lipidni dvosloj, ampak lahko prehajajo le s pomočjo kanalov ali prenašalcev (4).

Pri astrocitih ta način transporta predstavljajo akvaporini AQP4, kalijevi kanali idr. Akvaporini so kanali v membrani, po katerih potuje voda, ki je polarna in zato nima sposobnosti proste difuzije. S pomočjo akvaporinov astrociti nadzirajo transport vode v možganih, ki je ključnega pomena pri preprečevanju nastanka edemov (6). Kalij za svoje premikanje potrebuje kanale zaradi naboja, ki mu onemogoča prosto difuzijo. Naloga kalijevih kanalov v astrocitih je zagotavljanje konstantne koncentracije kalija v zunajcelični tekočini možganov in s tem

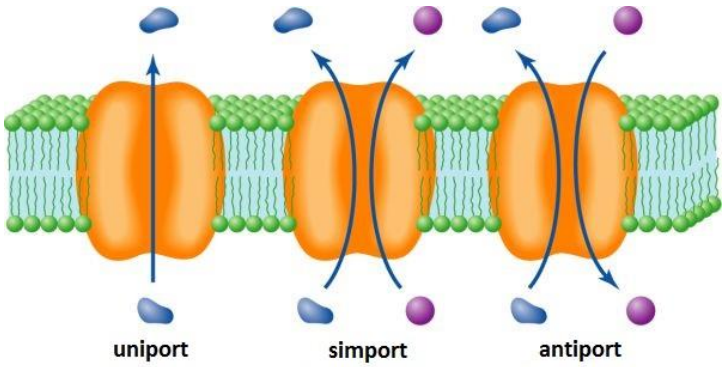
onemogočanje nekontroliranega proženja akcijskih potencialov v nevronih. Astrociti hitro in v velikih količinah privzamejo kalij in si ga nato predajajo med seboj skozi celične stike ter tako ponovno vzpostavijo fiziološke pogoje. (Slika 3) Ta pojav je znan tudi kot "prostorsko pufranje" (ang. spatial buffering) (7).



Slika 3: "Prostorsko pufranje kalija" (prirejeno po (8))

1.2 Aktivni transport

V primeru aktivnega transporta pa se energija porablja, saj se molekule s pomočjo prenašalcev premikajo v nasprotni smeri koncentracijskega gradienta, kar je posledično termodinamsko neugoden proces. Celicam omogoča kopičenje enakih molekul. Energija pogosto izvira iz ATP ali drugega vira, v tem primeru govorimo o primarnem aktivnem transportu, lahko pa tudi iz premika druge molekule v smeri koncentracijskega gradienta, kar imenujemo sekundarni aktivni transport, oziroma kotransport. Če se molekuli prenašata v isto smer, gre za simport, v nasprotnih smereh pa antiport (Slika 4) (4, 9).



Slika 4: Uniport in kotransport (prirejeno po (10))

Eden od primerov aktivnega transporta, ki najdemo v astrocitih, je Na^+/K^+ ATPaza. Gre za antiport, pri čemer se oba iona transportirata v nasprotju s koncentracijskim gradientom in je zato potrebna energija. Ena izmed najpomembnejših vlog astrocitov je odstranjevanje presežnega glutamata iz sinaps, ki v nasprotnem primeru lahko povzroči ekscitoksične poškodbe. Ob privzemu glutamata se v astrocit privzame tudi natrij, kar sproži aktivacijo Na^+/K^+ ATPaze. Njena aktivnost je nujna za ohranjanje optimalnih znotrajceličnih pogojev, pri tem pa porablja energijo (1).

2. Procesi pridobivanja ATP v celici

Možgani so izjemno velik porabnik energije v telesu. Porabijo kar petino celotnega vdihanega kisika in četrtino zaužite glukoze, čeprav tehtajo le 2 % telesne mase. Razlogi za tako veliko potrebo po energiji so stalno vzdrževanje ionskega ravnotežja v celicah, proženje in prevajanje akcijskih potencialov, ponovni privzem ter recikliranje nevrotransmiterjev (11).

Na splošno se v evkariontskih celicah ATP proizvaja po 3 glavnih poteh: glikolizi in oksidativni fosforilaciji, ki sta obe del celičnega dihanja, in beta-oksidaciji maščobnih kislin.

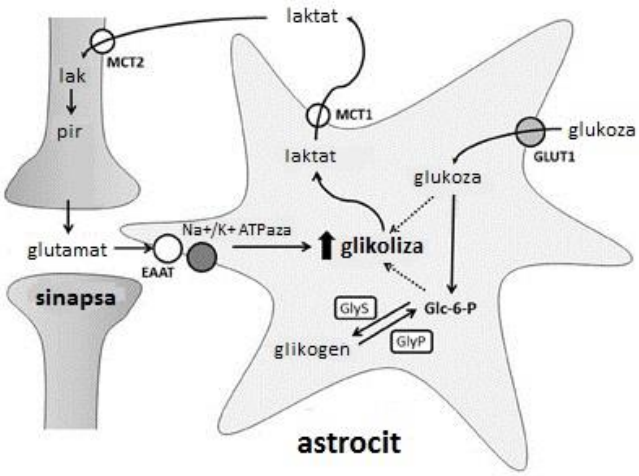
V procesu glikolize, ki poteka v citosolu celice, se glukoza in glicerol presnovita do piruvata, pri čemer se ustvarita dve molekuli ATP, ki sta posledica fosforilacije, njun nastanek pa katalizirata encima fosfoglicerat kinaza in piruvat kinaza. Nastaneta tudi dve molekuli NADH, ki po oksidaciji v verigi prenosa elektronov lahko proizvedeta še eno molekulo ATP (5, 12).

Naslednji korak je oksidacija piruvata v mitohondrijih do acetil-CoA, ki vstopa v Krebsov cikel. Energetsko bogati produkti vsakega zaključenega cikla v Krebsovem ciklu so: tri molekule NADH, ena molekula $FADH_2$ in ena molekula GTP. Nato v procesu oksidacije NADH in $FADH_2$ v NAD+ in FAD preko verige prenosa elektronov nastane dodatna molekula ATP v procesu oksidativne fosforilacije. Pri oksidaciji ene molekule NADH pride do sinteze 2 do 3 molekul ATP, pri oksidaciji ene molekule $FADH_2$ pa 1 do 2 molekul ATP (13).

Tretjo pot pa predstavlja beta oksidacija, torej proces, v katerem se maščobne kisline metabolizirajo do acetil-CoA. V vsakem ciklu se odcepita dva ogljikova atoma od acilne verige in nastaneta po ena molekula NADH in ena molekula $FADH_2$, ki po oksidativni fosforilaciji, kot je opisano zgoraj, privedeta do sinteze ATP (14).

2.1 Proces pridobivanja ATP v astrocitih

Astrociti so znani po velikem privzemu glukoze in intenzivni glikolizi, celo bolj intenzivni kot bi bilo nujno za njihove energijske potrebe. Ugotovili so, da astrociti velik delež glukoze presnavljajo do glukoza-6-fosfata in shranijo v obliki glikogena. V primeru visokih potreb nevronov, kar astrocitom sporoči glutamat, sproščen v sinaptično režo, se glikogen transformira nazaj v glukoza-6-fosfat, ki je na voljo za glikolizo. Astrociti proizvajajo predvsem laktat in ga nato izločijo v medcelični prostor. Od tam ga privzamejo nevroni, ki sami niso sposobni tako intenzivne glikolize, privzeti laktat pa metabolizirajo v piruvat in ga uporabijo kot substrat za oksidativno fosforilacijo (Slika 5) (15).



Slika 5:: Metabolni procesi v astrocitu (prirejeno po (15))

lak – laktat, pir – piruvat, EAAT – primarni ekscitatorni aminokislinski transporter, Glc-6-P – glukoza-6-fosfat, GlyS – glikogen sintaza, GlyP – glikogen fosforilaza, GLUT1 – glukozni transporter 1, MCT1 – s protoni povezan monokarboksilatni transporter 1, MCT2 – s protoni povezan monokarboksilatni transporter 2

3. Načini dostave zdravilnih učinkovin preko krvno-možganske pregrade

Vse učinkovine morajo za svoje delovanje v zadostnih koncentracijah doseči tarčne receptorje v tarčnih celicah. V primeru učinkovin, ki delujejo v možganih, je doseganje tarčnih celic še posebej kompleksno zaradi krvno-možganske bariere (HEB). Ta je sestavljena iz treh glavnih elementov: endotelnih celic, astrocitov in pericitov. Med celicami krvnih kapilar in endotelnimi celicami so tesni stiki veliko bolj neprehodni kot kjerkoli v telesu, poleg tega pa HEB vsebuje encime, ki metabolizirajo tuje snovi in prenašalce, ki izločajo tuje snovi na zunanjo stran HEB

(npr. glikoprotein P). Učinkovina, ki kroži po centralnem krvnem obtoku, lahko prečka HEB le na dva načina:

- s prosto transcelularno difuzijo, če gre za lipofilno molekulo, ki ima molekulsko maso manjšo od 400 Da
- s pomočjo endogenega prenašalca, ki omoči prehod skozi kapilarni endotelij (16)

Pri razvoju zdravilnih učinkovin za zdravljenje nevrodegenerativnih bolezni, okužbe z virusom imunske oslabljenosti (HIV), raka možganov idr. je ravno prehod skozi HEB najbolj zahtevna naloga (17). S časom so se zato začele razvijati tehnike dostave zdravilnih učinkovin, ki poskušajo preseči to oviro in po intravenski aplikaciji doseči učinek v možganskih celicah.

3.1 Večanje lipofilnosti majhnih zdravilnih učinkovin

Ta strategija temelji na farmacevtsko-kemijskem načinu večanja lipofilnosti zdravilnih učinkovin z majhno molekulsko maso (pod 400 Da). Načini za povečanje lipofilnosti so zmanjšanje sposobnosti tvorbe vodikovih vezi, adicija lipofilnih skupin (npr. metilacija) in uvedba halogenov v molekule (18).

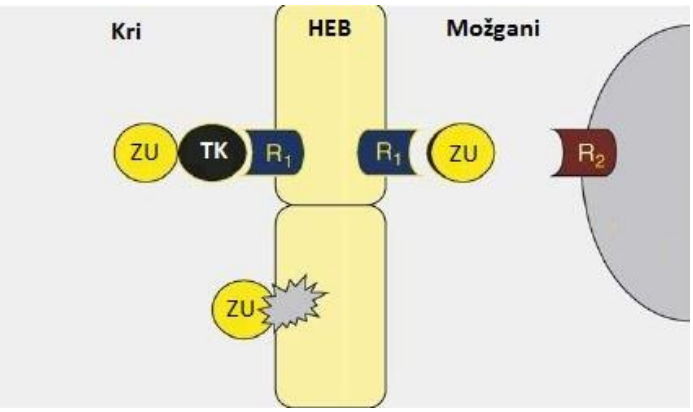
Kljub dobri teoretski osnovi so rezultati pogosto slabi, ker:

a) modificirana zdravilna učinkovina izgubi afiniteto do tarče
b) molekulska masa modificirane zdravilne učinkovine preseže 400 Da in s tem več ne izpolnjuje pogojev za prosti prehod skozi HEB
c) lipofilnost modificirane zdravilne učinkovine se tako poveča, da se privzema po celotnem telesu, kar poveča njen očistek in posledično le malo poveča privzem v možgane. (19)

3.2 Načrtovanje molekul za prenos z endogenimi možganskimi prenašalci

Rešitev za zgoraj opisane težave je lahko izkoriščanje endogenih prenašalcev v HEB. Če je zdravilna učinkovina precej podobna snovi, ki se sicer v možgane prenaša z endogenim prenašalcem, je pri načrtovanju strukture pomembno le, da značilnosti predelov molekule, ki se vežejo na receptor, ostanejo enake endogenemu substratu. Primer molekule, ki se prenaša na tak način je levodopa, ki je po kemijski strukturi aminokislina in se posledično veže na prenašalec za aminokisline tipa L (ang. L-type amino acid transporter 1) (20).

V primeru, da zdravilna učinkovina ne ustreza nobenemu izmed endogenih transporterjev, je rešitev lahko konstrukcija psevdosubstrata. Bistvo tega načina je, da biotehnološko združimo zdravilno učinkovino z molekulo, t.i. trojanski konj, za katero že obstaja endogeni prenašalec. Trojanski konji so na primer proteini ali protitelesa. Rezultat je psevdosubstrat, ki ga prenašalec prepozna kot običajen substrat in ga prenese skozi HEB. (Slika 6) Takšna zdravila so še v fazi razvoja (19).



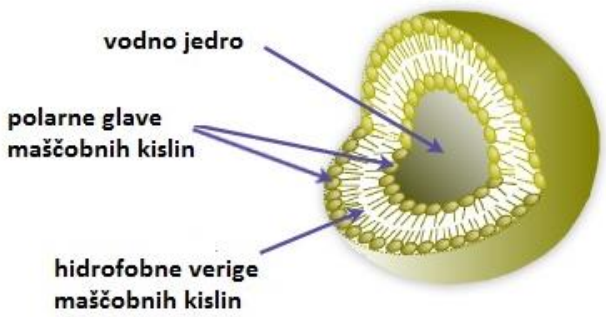
Slika 6: Prikaz prehoda HEB s pomočjo "trojanskega konja" (prirejeno po (19))

Zdravilna učinkovina (ZU), ki sama ne more preiti HEB, je združena s trojanskim konjem (TK), ki se veže na endogeni receptor (R_1) in omogoči prenos ZU. Le ta se nato v možganih lahko prosto veže na svoj tarčni receptor (R_2).

3.3 Koloidni dostavni sistemi – liposomi in nanodelci

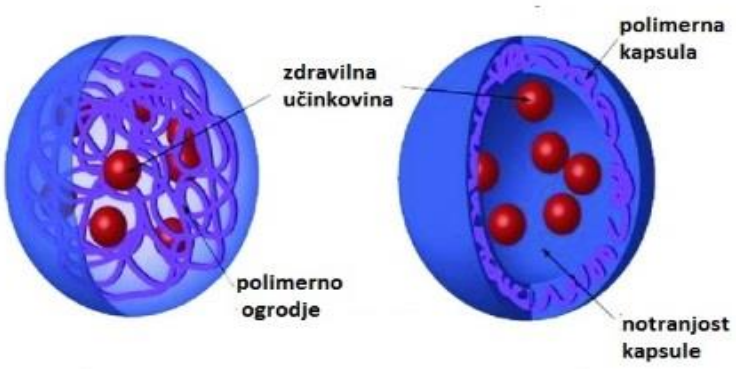
Liposomi in nanodelci predstavljajo perspektiven in drugačen način dostave v primerjavi s prejšnjimi, kemijskimi modifikacijami. Njihove najbolj obetavne lastnosti so sposobnost ciljane in nadzorovane dostave zdravilnih učinkovin, izboljšana biološka uporabnost zdravilnih učinkovin zaradi uspešnejšega prehoda HEB, zaščita pred encimsko razgradnjo zdravilne učinkovine in zmanjšanje pojava neželenih učinkov (18).

Liposomi so od 20 nm do 100 mm veliki vezikli, napolnjeni z vodno raztopino zdravilne učinkovine in obdani z membranskim lipidnim dvoslojem, ki je podoben biološkim membranam in je biorazgradljiv (slika 7). Fizikalno-kemijske lastnosti kot so velikost, naboj površine, sestava lipidne membrane idr. vplivajo na distribucijo in privzem liposomov. Za transport ZU do možganskih celic so najprimernejši manjši liposomi (do 100nm), ki so enako veliki kot endotelni vezikli, preko katerih najverjetneje poteče endocitoza (18).



Slika 7: Struktura liposoma (prirejeno po (21))

Nanodelci so polimerne kroglice, velike od 10 do 1000 nm. Poznamo nanosfere, kjer je zdravilna učinkovina homogeno dispergirana po trdnem polimernem jedru, in nanokapsule, pri katerih je iz polimera izdelana le kapsula, v notranjosti pa se nahaja zdravilna učinkovina, običajno v obliki raztopine (slika 8). Hitrost sproščanja učinkovine je v obeh primerih direktno povezana s hitrostjo razgradnje polimernega ogrodja. Površino nanosfer je mogoče obdati s površinsko aktivnimi snovmi, ki vplivajo na farmakokinetiko, in protitelesi, ki omogočijo zelo ciljano dostavo zdravilne učinkovine. Metoda prehoda skozi HEB je, tako kot pri liposomih, najverjetneje endocitoza. (18)

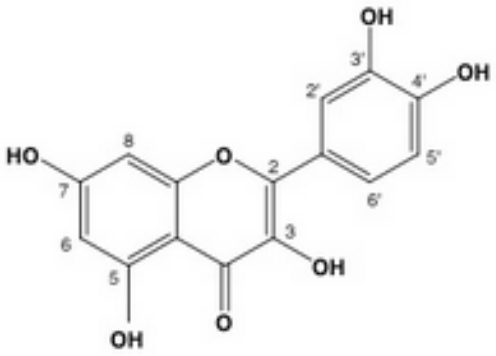


Slika 8: Struktura nanosfere (desno) in nanokapsule (levo) (prirejeno po (22))

4. Kvercetin

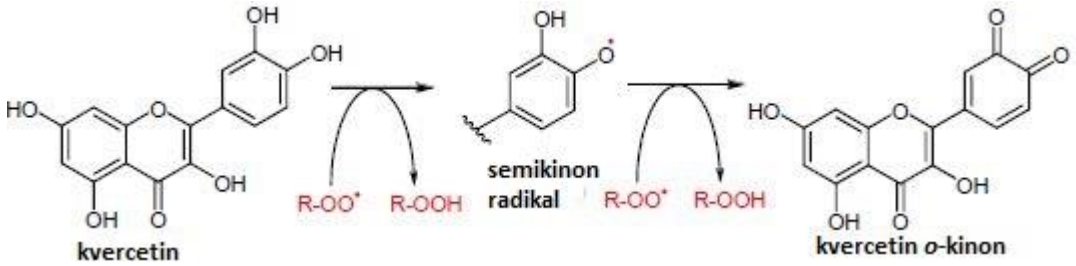
4.1 Kemijske in biološke značilnosti kvercetina

Kvercetin po svojih strukturnih lastnostih spada v skupino flavonoidov, saj ima značilno fenil-benzopironsko strukturo (slika 9). Bolj natančno lahko kvercetin uvrstimo v skupino flavonoidov z alkoholnimi skupinami, med flavonole.



Slika 9: Struktura kvercetina (prirejeno po (23))

Kvercetin zmanjša pojavnost rakavih, srčno-žilnih in nevrodegenerativnih bolezni (24). Ti zaščitni učinki so posledica antioksidativnih in protivnetnih lastnosti kvercetina (25, 26). Antioksidativno delovanje je mogoče specifične kemijske strukture kvercetina, ki omogoča tvorbo kinona (slika 10).



Slika 10: Nastanek kvercetin kinona (prirejeno po (27))

V naravi lahko kvercetin najdemo v jabolkih, brusnicah, borovnicah, rdeči čebuli, črnem čaju in rdečem vinu (28, 29). Kvercetin se v sadju in zelenjavi nahaja v obliki glikozidov, običajno na mestih 3 in 4', v črnem čaju pa je prisoten predvsem v obliki rutinozidov. Dokazano je, da imajo glikozidi kvercetina boljšo absorpcijo v primerjavi z aglikoni (30). Antioksidativni učinek glikozidov v telesu pa je v primerjavi z aglikoni za vsaj 50% slabši, sploh v primeru vezave sladkorja na mesto 4' (31). Na splošno velja, da je biološka uporabnost kvercetina po

peroralni aplikaciji izjemno nizka. Študije kažejo, da pride do približno 60% absorpcije v črevesu, nato pa ji sledi intenziven metabolizem, med katerim nastajajo glukoronidni in sulfatni metaboliti. Ta metabolizem omeji koncentracijo najbolj aktivnega nekonjugiranega aglikozida v plazmi na nekaj odstotkov (32).

4.2 Kvercetin v osrednjem živčevju

Kvercetin je lipofilna molekula (log P = 2) in njegova molekulska masa znaša 302 Da, tako da s tem izpolnjuje kriterije za prosto transcelularno difuzijo skozi HEB (33). Vseeno pa kvercetin prehaja HEB z enostavno difuzijo v zelo majhnem deležu zaradi dejstva, da se pri fiziološkem pH lahko deprotonira, saj njegov pK_{a1} znaša 5,87 (34). Enostavna difuzija pa lahko poteka le pri nenabitih molekulah.

4.2.1 Proteinski prenašalci

Proteinski prenašalci so prenašalni sistemi, ki transportirajo molekule, ki niso zmožne preiti membrane z enostavno difuzijo, celice pa jih vseeno potrebujejo, na primer glukoza, ioni itd. Prisotni so lahko tako pri pasivnem (olajšana difuzija) kot tudi pri aktivnem transportu. Izsledki raziskav o načinu prehajanja kvercetina v celice nakazujejo na vpletenost prenašalcev, ni pa še natančno znano za kateri prenašalec gre, morda je vključenih celo več različnih transporterjev.

Bilitranslokaza

Bilitranslokaza je prenašalec za anione in se večinoma nahaja na membranah hepatocitov, saj je njen endogeni substrat bilirubin. Zanimivo pa je, da se bilitranslokaza pojavlja tudi na membranah endotelnih celic v ožilju. Maestro in njena skupina so celo dokazali, da ima veliko afiniteto za vezavo flavonoidov in še več, da je udeležena pri prehodu kvercetina v endotelne celice ožilja. Astrociti so tesno povezani z žilnim endotelijem in na podlagi zgornje raziskave lahko sklepamo, da bi bilitranslokaza lahko sodelovala v prehodu kvercetina skozi HEB (35, 36).

Polipeptidni prenašalci za organske anione (OATP)

Prenašalci OATP skrbijo za transport najrazličnejših negativno nabitih snovi, ki so nujne za preživetje celic, na primer ionov, vitaminov in aminokislin. Zaradi neselektivnosti za substrat so prenašalci OATP vpleteni v transport mnogih ksenobiotikov, med drugim estradiol -17β-d-glukoronida, valsartana in digoksina. Gre za nizkoafinitetne prenašalce, kar pomeni, da privzem

poteka počasi, imajo veliko kapaciteto in za svoje delovanje ne potrebujejo vira energije, na primer ATP, niti niso odvisni od koncentracije Na^+ in Cl^- (37). Znanih je 11 prenašalcev OATP, trije izmed njih pa so prisotni tudi v možganih: OATP1A2, OATP1A4 in OATP1C1.

Od natrijevih ionov odvisni glukozni soprenašalec (SGLT1)

SGLT so prenašalci za glukozo v obliki simporta z natrijevimi ioni, tok privzema pa je usmerjen v notranjost celice. SGLT tipa 1 se nahajajo na apikalni strani enterocitov in privzemajo glukozo iz lumna črevesja, SGLT tipa 2 pa na apikalni strani proksimalnega dela renalnega tubula in skrbijo za resorpcijo glukoze iz primarnega urina. SGLT je mogoče najti tudi v drugih delih telesa, nekaj tipov so odkrili tudi v različnih delih možganov (38). Nekateri znanstveniki trdijo, da je absorpcija kvercetina iz črevesja v obliki glikozidov bolj učinkovita od aglikonov in rutinozidov ravno zato, ker poteka s pomočjo prenašalcev za glukozo (39). Predpostavljamo lahko, da bi lahko torej tudi SGLT, ki so prisotni v astrocitih, privzemali kvercetin.

5. Bilirubin

Bilirubin smo v našo raziskavo vključili zato, ker je po svojih fizikalno-kemijskih lastnostih zelo podoben kvercetinu. Poskusi s kvercetinom pomembni za razumevanje delovanja bilirubina.

Zaradi podobnosti med molekulama lahko sklepamo, da je privzem obeh snovi do neke mere podoben, kar so pokazali na celičnih kulturah endotelijskih celic ožilja (35). Bilirubin je na voljo le označen z radioaktivnim α-sevalcem, kar predstavlja večje tveganje za zdravje, zato smo ga nadomestili z kvercetinom, ki je označen s tritijem, β-sevalcem z nizko energijo in dometom sevanja 10 cm. Poleg tega nismo imeli na razpolago primerne opreme, s katero bi lahko merili α sevanje.

Bilirubin na splošno velja za toksičen stranski produkt razgradnje hema, ki ga je potrebno čimprej izločiti iz telesa. Že leta 1987 pa je Roland Stocker objavil članek, ki bilirubin postavlja med enega učinkovitih endogenih antioksidantov (40). Torej bilirubin ni le končni presnovi produkt, temveč endogena molekula z fiziološko funkcijo. Z leti se je ta trditev potrdila s številnimi kliničnimi dokazi.

5.1 Hiperbilirubinemija kot zaščitni dejavnik

Ugotovili so, da je zvišana koncentracija nekonjugiranega bilirubina statistično značilno povezana z koncentracijami LDL in trigliceridov (41). Še več, dokazano je, da so zvečane vrednosti nekonjugiranega bilirubina v krvi obratno sorazmerne s pojavom koronarne ateroskleroze in da je blago zvišana koncentracija bilirubina v krvi celo kardioprotektivna. (42). Mnogo študij je izpostavilo tudi nevroprotektivno vlogo bilirubina. Med drugim so dokazali, da imajo pacienti z amiotrofično lateralno sklerozo v pozni fazi bolezni statistično značilno nizke vrednosti bilirubina, kar bi bila lahko posledica propada endogenega antioksidativnega sistema in vzrok za oksidativno poškodbo motornih nevronov (43).

5.2 Načini za dvig koncentracije bilirubina v krvi

Pomembno se je zavedati, da se pozitivni učinki nekonjugiranega bilirubina kažejo le v primeru blago povišanih koncentracij v krvi, ki znašajo med 2 in 12 mg/dl pri odraslih. Koncentracije nad 15 mg/dl so lahko že citotoksične (44). Dolgoročen cilj za doseganje protektivnih učinkov bilirubina je torej blag, nameren in kontroliran dvig koncentracij bilirubina v krvi.

Med načini za blag dvig koncentracije bilirubina s pomočjo encimov sta potencialni tarči hem-oksigenaza (HO) in UDP glukoroniltransferaza 1.

Encim hem-oksigenaza katalizira prvo stopnjo razgradnje hema, ki razpade na železov ion, ogljikov monoksid in biliverdin. Hem-oksigenaza (HO) ima dve izoformi: HO tipa 1 je inducibilen encim, ki ga inducirajo različni dejavniki, predvsem oksidativen stres, in HO tipa 2, ki je konstitutivno aktiven encim v določenih celicah, tudi nevronih (45). Indukcija transkripcije HO tipa 1 je torej način za dvig koncentracije biliverdina in posledično tudi bilirubina. V praksi so takšna zdravila že prisotna, le da dvig HO-1 ni njihov primarni način delovanja. Primer je niacin, ki se uporablja za spremembo razmerja koncentracij lipidov v krvi in omogoča še dodatno kardioprotektivno delovanje zaradi dviga serumske koncentracije bilirubina (44).

Do zvišanih nivojev bilirubina bi nas pripeljala tudi inhibicija UDP glukoroniltransferaze 1 (UGT1A1), ki katalizira konjugacijo bilirubina z glukuronsko kislino in posledično deaktivacijo bilirubina. Na ta način bi lahko preprečili konjugacijo bilirubina in s tem povzročili iatorogen Gilbertov sindrom. Snovi, ki inhibirajo UGT1A1 so krisin, ki se nahaja v pasijonki, tangeretin iz citrusov in zdravilni učinkovini itrakonazol ter ketokonazol (44).

Oba zgornja načina lahko nivo bilirubina dvigneta le za 1.0–3.5 mg/dl (44).

Alternativna metoda za povišanje bilirubina v krvi bi bil lahko tudi vpliv na privzem bilirubina v celice, ki verjetno poteka s pomočjo bilitranslokaze. Torej bi lahko z inhibicijo delovanja bilitranslokaze upočasnili transport bilirubina v celice in s tem posledično tudi njegov metabolizem, ki poteka le znotraj celic. Če je kvercetin substrat za bilitranslokazo, potem lahko preko tega mehanizma zmanjša obseg celičnega privzema bilirubina.

NAMEN DELA

Kvercetin je flavonoid, ki se nahaja v večini sadja in zelenjave. Njegove lastnosti obsegajo antikancerogeno, protivnetno in kardioprotektivno delovanje, velja pa tudi za enega najbolj učinkovitih antioksidantov med flavonoidi. Problem pri izkoriščanju teh zdravilnih učinkov predstavlja nizka biološka uporabnost s slabo absorpcijo in močnim metabolizmom, poleg tega pa način privzemanja v celice še ni pojasnjen.

V našem delu se bomo osredotočili na privzem kvercetina v astrocite, saj študije kažejo, da lahko kvercetin v osrednjem živčnem sistemu predstavlja novo možnost za zdravljenje Alzheimerjeve bolezni, gliomov in depresije (46-48). Raziskave se bomo lotili s preverjanjem, če se kvercetin privzema v celice z olajšano in ne enostavno difuzijo, kot pravi tudi teorija. Preučili bomo morebiten vpliv inhibicije različnih stopenj celične presnove, tako celičnega dihanja kot tudi glikolize, in posledice neposrednega zaviranja Na^+/K^+ črpalke.

V drugem delu raziskave se bomo osredotočili na nekatere, glede na literaturo, najverjetnejše prenašalce, ki bi lahko skrbeli za privzem kvercetina v astrocite in na koncu še preverili, če se morda kvercetin privzema z več različnimi prenašalci, kot je znano za nekatere ksenobiotike.

V magistrski nalogi bomo preverili naslednje hipoteze:

1. Kvercetin se privzema v astrocite s prenašalci.
2. Privzem kvercetina je energijsko in ionsko odvisen proces, zato snovi, ki zavrejo celično presnovo, njegov privzem zmanjšajo.
3. Privzem kvercetina poteka preko prenašalcev OATP in prenašalcev za glukozo (SGLT1).

MATERIALI IN METODE

1. Reagenti in oprema

Uporabili smo naslednje reagente:

Leibovitz L-15 medij (Sigma, ZDA), Gentamicin (Gibco, ZDA), goveji serumski albumin (BSA) (Sigma, ZDA), natrijev piruvat (Gibco, ZDA), L-glutamin (Gibco, ZDA), fetalni goveji serum (FBS) (Lonza, Belgija), DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium) (Gibco, ZDA), Tripsin-EDTA (Gibco, ZDA), HEPES (Sigma, ZDA), NaCl (Merck, Nemčija), KCl (Merck, Nemčija), KH_2PO_4 (Merck, Nemčija), $MgSO_4 \times 7H_2O$ (Sigma, ZDA), glukoza (Merck, Nemčija), $CaCl_2$ (Sigma, ZDA), NaOH (Alkaloid, Makedonija), digoksin (Merck, Nemčija), KCN (Kemika, Hrvaška), NaF (Sigma, ZDA), NaN_3 (Sigma, ZDA), ouabain (Serva, Nemčija), natrijev glikoholat (Sigma, ZDA), floridzin (Sigma, ZDA), natrijev metavandat (Fluka, ZDA), estradiol (Sigma, ZDA), kortikosteron (Fluka, ZDA), benzilsulfonil fluorid – PMSF (Fluka, ZDA), ditionitrobenzojska kislina – DTNB (Sigma, ZDA), bilirubin (Sigma, ZDA), [^{3}H]-kvercetin, s specifično aktivnostjo 10 Ci/mmol (American Radiolabeled Chemicals inc., ZDA), neoznačen kvercetin (Sigma, ZDA), scintilacijska tekočina Aquasol (New England Nuclear, ZDA), Bio-Rad Protein Assay (Bio-Rad Laboratories, ZDA),

Uporabili smo spodnjo opremo:

analitska tehtnica (Satorious, Nemčija), inkubator (New Brunswick Scientific, ZDA), zaščitna komora z laminarnim pretokom zraka (Iskra Pio d.o.o, Slovenija), namizna centrifugirka (Sigma 3K18, ZDA), hladilnik in zamrzovalnik (Gorenje, Slovenija), pH meter MA5735 (Iskra, Slovenija), laboratorijski stresalnik Vibromix 10 (tehnica Železniki, Slovenija), plastične posode za gojenje celic s perforiranim zamaškom (TPP, Švica), mikrotitrske plošče z 12 razdelki (TPP, Švica), mikrotitrske plošče z 96 razdelki (TPP, Švica), laboratorijske igle (TIK d.o.o., Slovenija), nitreks membrane (ZBF, Švica), polavtomatske pipete (Eppendorf, Avstrija), nastavki za pipete (Eppendorf, Avstrija), epruvete in viale (Eppendorf, Avstrija), elektronska pipeta Handystep (BrandTech scintific, ZDA), scintilacijski števec MicroBeta Trilux (Perkin Elmer, ZDA), UV-VIS spektrofotometer Sunrise (Tecan Group Ltd., Avstralija)

2. Eksperimentalne metode

2.1 Izolacija in priprava kulture astrocitov

Primarne kulture živih celic smo pripravili iz možganske skorje novorojenih podgan (vrsta: Rattus norvegicus) seva Wister po metodi Schwartzove in Wilsonove (49). Vzgojene so bile na Inštitutu za patologijo Medicinske fakultete v Ljubljani. Za poskuse, ki vključujejo delo z laboratorijskimi živalmi, smo pridobili dovoljenje veterinarske uprave Republike Slovenije za izvajanje poskusov na živalih št. U 34401 – 4/2014/4. Poskrbeli smo, da smo z živalmi ravnali humano, v skladu s smernicami Komiteja za zaščito živali Narodnega inštituta zdravja, Bethseda, ZDA.

Medija , ki smo ju uporabili pri pripravi celičnih kultur:

- Medij za preparacijo astrocitov: 50 ml raztopine Leibovitz L-15, 0,05 g govejega serumskega albumina, 50 µg gentamicina.
- Medij za gojenje astrocitnih kultur: 50 µl gentamicina (antibiotik), 50 µl piruvata (dodaten vir energije), 500 µl L-glutamin (vir dušika), 5 ml govejega fetalnega seruma (vir proteinov) in 50 ml medija DMEM.

  Medij DMEM sestavljajo soli, železo, vitamini, aminokisline, glukoza in pH indikator fenol rdeče.

Celoten postopek priprave celičnih kultur poteka v aseptičnih pogojih. Po dekapitaciji, ki jo je izvedla za to usposobljena tehnična sodelavka, smo iz lobanje odvzeli in odstranili možganske ovojnice, možgansko deblo, hipokampus, hipotalamus, talamus, striatum, hipofizo in male možgane, ter tako izolirali možgansko skorjo. K tkivu smo dodali 4 ml medija za preparacijo in centrifugirali 4 minute pri 1200 obratih/min. S tem smo odstranili potencialne ostanke krvi. Sledila je menjava medija, suspendiranje tkiva s pomočjo pipete in ponovna centrifuga pod istimi pogoji. Po menjavi medija smo pripravek suspendirali s pipeto in preparat prenesli v petrijevko ter tkivo homogenizirali še s pomočjo injekcijskih igel različnih premerov (G 20, 22, 25). Na ta način smo preparat očistili morebitnih ostankov hematoencefalne bariere. V naslednjem koraku smo skozi najlonsko mrežico, z režami maksimalne velikosti 75 µm, pripravek prelili in centrifugirali pod istimi pogoji kot zgoraj, da se je tkivo usedlo in nam omogočilo odlitje supernatanta ter dodatek 14 ml hranilnega medija k sedimentu. Pred

prenosom v gojilne posode smo preparat še zadnjič suspendirali s pomočjo pipete, da je tkivo popolnoma razpadlo.

Celične kulture smo inkubirali v inkubatorju pri pogojih: temperatura 37 °C, 95 % zraka iz prostora in 5 % CO_2. Po petih dneh smo zamenjali hranilni medij in nadaljevali z inkubacijo. Ko so celice dosegle konfluenco, smo zamenjali hranilni medij in kulture stresali na stresalniku (150 obratov/min) 20 ur. Oboje smo še dvakrat ponovili in s tem dosegli odstranitev celic mikroglije, ki se sten gojilnih posod ne primejo tako učinkovito kot astrociti.

Po spiranju s hranilnim medijem, smo celicam dodali 0,05 % raztopino tripsin – EDTA in celice inkubirali še 20 minut pri istih pogojih. S tem smo dosegli, da so se od sten odlepili astrociti, kar smo opazili tudi pod mikroskopom. Celicam smo dodali hranilni medij, jih razdelili v dve gojilni posodi in postavili v inkubator. Po enem dnevu smo jim ponovno zamenjali medij, saj bi raztopina tripsin – EDTA preprečila pritrjevanje astrocitov in nadaljevali z inkubacijo.

Ko so celice postale konfluentne, smo ponovili postopek z raztopino tripsin – EDTA, da smo lahko celice presadili na testne plošče z 12 vdolbinicami in sicer po 1 ml hranilnega medija z našimi celicami v vsak razdelek. Po enem dnevu smo zamenjali medij, da smo odstranili tripsin in nadaljevali z inkubacijo do konfluence, kar smo spremljali pod mikroskopom.

2.2 Privzem kvercetina v celične kulture astrocitov

Celične kulture smo do izvedbe poskusa hranili v inkubatorju pod istimi pogoji kot med preparacijo. Najprej smo odlili hranilni medij in celice dvakrat sprali z 1 ml pufra za privzem (preglednica I).

Preglednica 1: Sestava pufrov, ki smo ju uporabili pri poskusih privzema kvercetina:

	Pufer za privzem s $CaCl_2$		Pufer za prekinitev privzema brez $CaCl_2$	
	Masa [g]	Koncentracija [mM]	Masa [g]	Koncentracija [mM]
HEPES	5,958	25	5,958	25
NaCl	7,306	125	7,306	125
KCl	0,358	4,8	0,358	4,8
KH_2PO_4	0,163	1,2	0,163	1,2
$MgSO_4 \times 7H_2O$	0,296	1,2	0,296	1,2
glukoza	1,009	5,6	1,009	5,6
$CaCl_2 \times 2H_2O$	0,25	1,7	/	/
bidestilirana H_2O	do 1000ml	do 1000ml	do 1000ml	do 1000ml

pH obeh pufrov smo uravnali z 0,1 N NaOH na 7,4.

Pri poskusih, kjer smo preučevali vpliv ouabaina, natrijevega fluorida, natrijevega azida, kalijevega cianida, benzilsulfonil fluorida in ditionitrobenzojske kisline, smo celice predhodno inkubirali s snovjo 30 min v inkubatorju pri 37 °C v 95 % zraku in 5 % CO_2.

V naslednjem koraku smo, ne glede na to, če smo izvedli predhodno inkubacijo, kulturam dodali radioaktivno označen ^{3}[H]-kvercetin in neoznačen kvercetin, v preračunanih količinah za posamezen poskus. Ta del poskusa smo izvedli v temi. Po dveh minutah inkubacije v inkubatorju po istimi pogoji kot zgoraj, smo plošče položili na led in jih štirikrat sprali z 1ml

mrzlega pufra za prekinitev reakcije (preglednica I). Celice smo nato lizirali s 300 µl 0,5 N NaOH in jih 10 minut stresali na stresalniku pri 200 obratih/min. Iz vsake vdolbinice smo odvzeli po 250 µl vzorca celic za določanje količine privzetega kvercetina, preostanek vzorca pa smo uporabili za merjenje količine proteinov v posamezni vdolbinici.

2.3 Določanje količine privzetega kvercetina

Količino privzetega kvercetina smo določili s tekočinskim scintilacijskim števcem (MicroBeta Trilux, Perkin Elmer, ZDA). Ta metoda omogoča meritev količine β-sevanja, ki se oddaja ob razpadu radioaktivnega izotopa ^{3}[H]-kvercetina.

Meritev smo izvedli tako, da smo 250 µl vzorca celic prenesli v Eppendorfove epruvete, jim dodali 1,5 ml scintilacijske tekočine Aquasol in močno premešali. Aquasol vsebuje scintilatorje, to so snovi, ki ob absorpciji energije ionizirajočega sevanja oddajo kratek svetlobni signal – scintilacijo. V idealnih pogojih vsakemu β-razpadu sledi svetlobni signal. Te svetlobne signale v števcu zaznavata dve fotopomnoževalni celici, aparat pa meritve poda kot število električnih signalov na minuto (CPM, *ang. count per minute*) in v številu β-razpadov na minuto (DPM, *ang. disintegation per minute*), učinkovitost štetja pa je razmerje med njima (EFF, *ang. efficacy*).

$$DPM = \frac{CPM}{EF}$$

Enačba 1: Število razpadov radioaktivnega izotopa na minuto

Detektor upošteva le svetlobne signale, ki jih zaznata obe fotopomnoževalki, ostali signali se obravnavajo kot šum ozadja. Vrednostim DPM smo zato odšteli srednjo vrednost DPM slepega vzorca. Vse meritve so potekale pri sobni temperaturi in atmosferskem tlaku. Koncentracijo privzetega ^{3}[H]-kvercetina smo določili z enačbo 2.

$$c(mmol) = \frac{DPM}{specifična\ aktivnost\ izotopa\ (\frac{Ci}{mmol})}$$

Enačba 2: Izračun koncentracije privzetega ^{3}[H]-kvercetina v vzorcu

Ci (specifična aktivnost izotopa) = $2{,}22 \times 10^{12}$

2.4 Določanje celokupne količine proteinov

Količino proteinov v posameznem razdelku na testni plošči smo določili zato, da smo dobili med seboj bolj primerljive rezultate o količini privzetega kvercetina v celice, saj število celic v posameznih razdelkih med seboj ni enako in posledično vpliva na količino privzetega kvercetina. Tudi rezultate smo podali v razmerju z maso proteinov.

Za merjenje celokupne količine proteinov smo uporabili metodo po Bradfordu, ki temelji na tvorbi kompleksa med barvilom Coomassie Brilliant Blue G-250 in v kislem okolju pozitivno nabitimi ionizirami funkcionalnimi skupinami proteinov. Barvilo preide iz kationske v anionsko obliko, pri tem pa spremeni barvo iz rdeče v modro, ki ima absorpcijski maksimum pri 595 nm. Količino nastalih kompleksov torej lahko določimo iz porasta absorbance vzorca pri omenjeni valovni dolžini.

Iz dobro premešanih vzorcev smo v vsak razdelek mikrotiterske plošče odpipetirali po 8 µl celičnega lizata, dodali 152 µl bidestilirane vode in 40 µl BioRad reagenta. Na isto ploščo smo nanesli tudi slepi vzorec in vzorce standardov: 0,5 µM, 1 µM, 1,6 µM, 2 µM, 4 µM, 6 µM, in 10 µM BSA v bidestilirani vodi in 40 µl Biorad reagenta. Po 30 minutah smo izmerili absorbanco pri 595 nm z UV-VIS spektrofotometrom (Sunrise, Tecan, Avstralija). Vrednostim smo odšteli srednjo vrednost slepega vzorca in jih prenesli v računalniški program GraphPad Prism 6.0. Z znanimi koncentracijami standardov smo narisali umeritveno krivuljo in s pomočjo linearne regresije določili koncentracijo v posameznih vzorcih. Meritve so potekale pri sobni temperaturi in atmosferskem tlaku. Iz posameznega vzorca smo pipetirali v dva razdelka mikrotiterske plošče, tako da smo dobili rezultate v dveh paralelkah. Za končni rezultat smo uporabili srednjo vrednost obeh.

2.5 Analiza podatkov

Rezultate poskusov smo prikazali kot vsebnost privzetega kvercetina v pmol/mg proteinov in jih statistično obdelali s programom GraphPad Prism 6.0. Poskuse smo izvedli v treh paralelkah z eno, dvema ali tremi ponovitvami. Posamezno število vzorcev je zapisano v besedilu pod grafi in je označeno s črko N. Za rezultate, kjer smo imeli na voljo le tri meritve, smo po spodnji enačbi izračunali število ponovitev, ki so potrebne za zaznavo statistično signifikantne razlike med povprečnima vrednostma privzema pri $\alpha = 0,05$ (obojestranski interval) in moči testa 80 % ($\beta = 0,20$). Dobljeni rezultati potrjujejo, da večje število ponovitev ni bilo potrebno.

$$\text{število potrebnih ponovitev} = 2 \times SD^2 \times (z(\alpha) + z(\beta))^2/\Delta^2$$

Enačba 3: Izračun velikosti vzorca

SD – skupni standardni odklon dveh vzorcev, $(z(\alpha)+z(\beta))^2$ – tabelna vrednost, odvisna od izbranih pogojev (v našem primeru 6,2), Δ- razlika povprečij dveh vzorcev. Povzeto po (50).

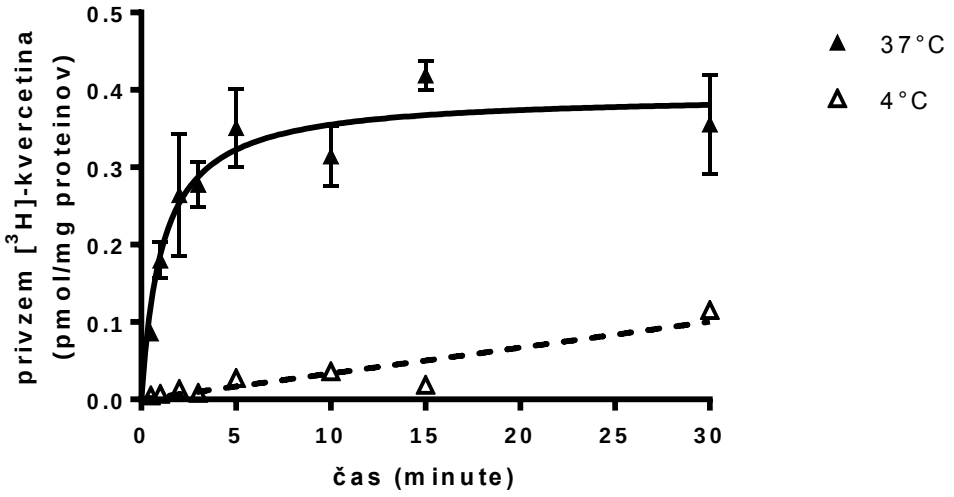
Pri medsebojni primerjavi skupin podatkov smo uporabili enosmerno analizo variance (ANOVA test) in post hoc teste: Dunnetov, Bonferronijev in Tukeyjev test. Stopnjo statistično pomembne razlike med vzorci predstavlja vrednost p, ki je označena: * za $p \leq 0{,}05$, ** za $p \leq 0{,}01$, *** za $p \leq 0{,}001$ in **** za $p \leq 0{,}0001$.

REZULTATI

Vsi poskusi so bili izvedeni na Medicinski fakulteti v Ljubljani, na Inštitutu za farmakologijo in eksperimentalno toksikologijo. Če ni posebej navedeno, so vse inkubacije potekale pri fiziološki temperaturi, 37 °C, fiziološkem pH, 7,4 in koncentraciji kvercetina 500 nM, saj smo se želeli osredotočiti na fiziološko relevantno koncentracijo kvercetina, ki jo posameznik lahko doseže z vnosom 150 mg kvercetina na dan. (51)

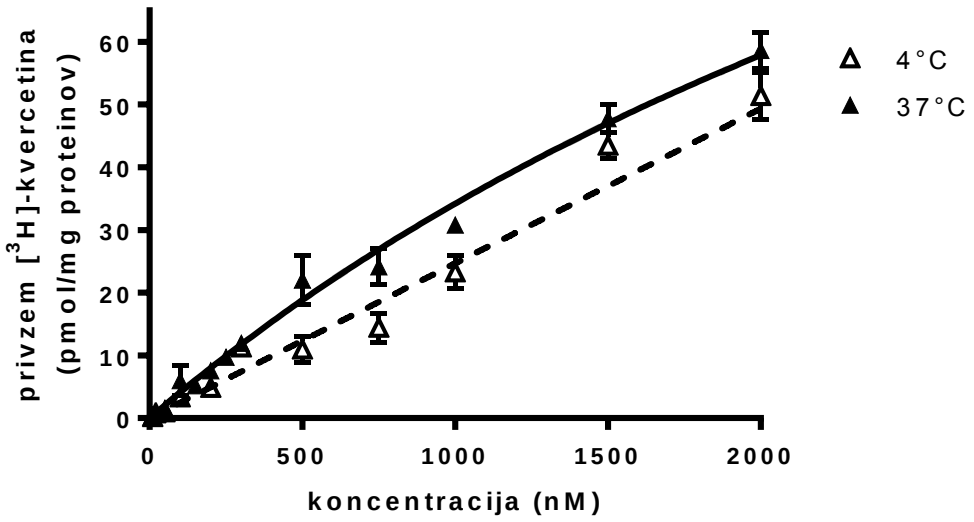
1. Časovna in koncentracijska odvisnost privzema kvercetina

Poskus določanja časovne in koncentracijske odvisnosti smo izvedli z namenom, da spoznamo osnovne lastnosti kinetike privzema kvercetina. Poleg tega smo želeli raziskati, ali gre za aktiven privzem, torej proces, ki porablja energijo. To smo storili tako, da smo oba poskusa izvedli pri fiziološki temperaturi, 37 °C, in pri 4 °C, temperaturi, pri kateri procesi, ki za svoje delovanje potrebujejo energijo, ne potekajo.



Slika 11: Časovna odvisnost privzema [^{3}H]-kvercetina v astrocite novorojenih podgan. Rezultati so prikazani kot aritmetična sredina ± standardna napaka. (N=9)

Na grafu (slika 11) lahko pri temperaturi 37 °C opazimo, da gre za nasitljiv proces, saj krivulja po strmem naraščanju že precej hitro, v petih minutah, doseže plato pri vrednosti privzetega kvercetina. Po petih minutah inkubacije je količina privzetega kvercetina 0,323 pmol/mg proteinov, po 15 minutah pa 0,368 pmol/mg proteinov. Privzem pri 4 °C pa poteka premo sorazmerno s časom, veliko bolj počasi kot pri fiziološki temperaturi in ne doseže nasičenja v 30 minutah.



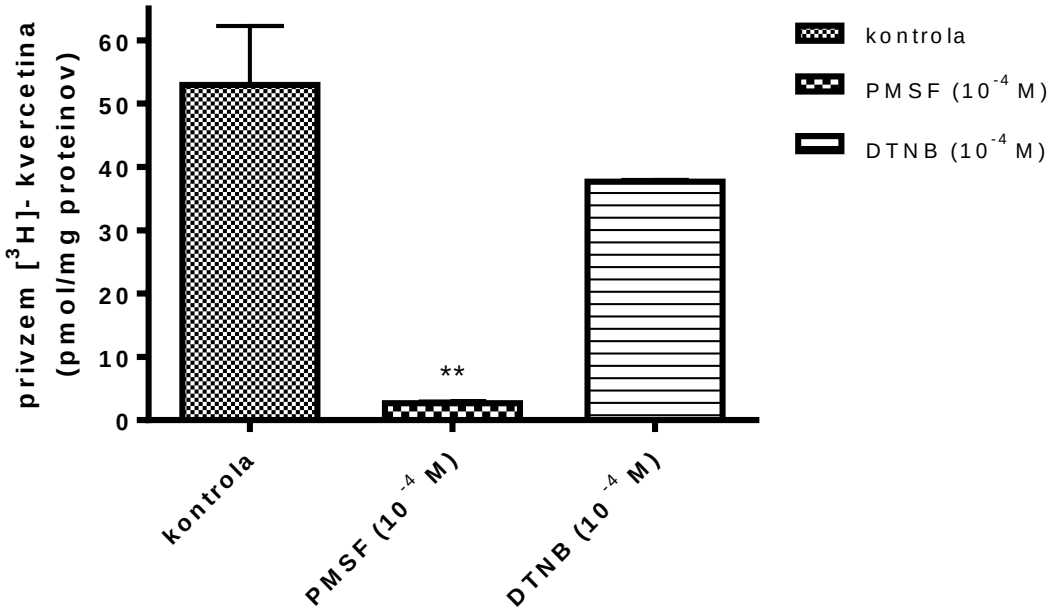
Slika 12: Koncentracijska odvisnost privzema [^{3}H]-kvercetina v astrocite novorojenih podgan. Rezultati so prikazani kot aritmetična sredina ± standardna napaka. (N=9)

Z grafa na sliki 12 lahko razberemo premo sorazmeren odnos med koncentracijo kvercetina in privzemom kvercetina tako pri 4 °C, kot tudi pri 37 °C. Med krivuljama ni statistično značilnih razlik. Privzem pri 37 °C je potekal skladno z Michaelis-Mentenovo kinetiko. Michaelis-Mentenova konstanta privzema (K_M) je znašala 4,5 ± 1,6 µM; največja hitrost privzema (V_{max}) je bila 94 pmol/mg proteinov/min; maksimalna kapaciteta privzema pa 188 pmol/mg proteinov. Do nasičenja pri višjih koncentracijah ni prišlo pri nobeni od temperatur.

2. Vpliv specifičnih ireverzibilnih inhibitorjev proteinov na privzem kvercetina

Benzilsulfonil fluorid (PMSF) in ditionitrobenzojsko kislino (DTNB) smo uporabili, da bi preverili, ali ireverzibilna inhibicija proteinov vpliva na privzem kvercetina v astrocite. S tem lahko neposredno dokažemo, da pri privzemu kvercetina sodelujejo proteini, torej prenašalci. PMSF ireverzibilno inhibira številne proteine, kot npr. serinske proteaze, acetilholinskoesterazo E, fosfolipazo C, ipd., preko kovalentne vezave na serin v aktivnem mestu proteina. Na podoben način DTNB ireverzibilno inhibira proteine s cisteini v aktivnem mestu.

Vse poskuse v tem delu smo opravili s 30 minutno predhodno inkubacijo s PMSF ali DTNB.



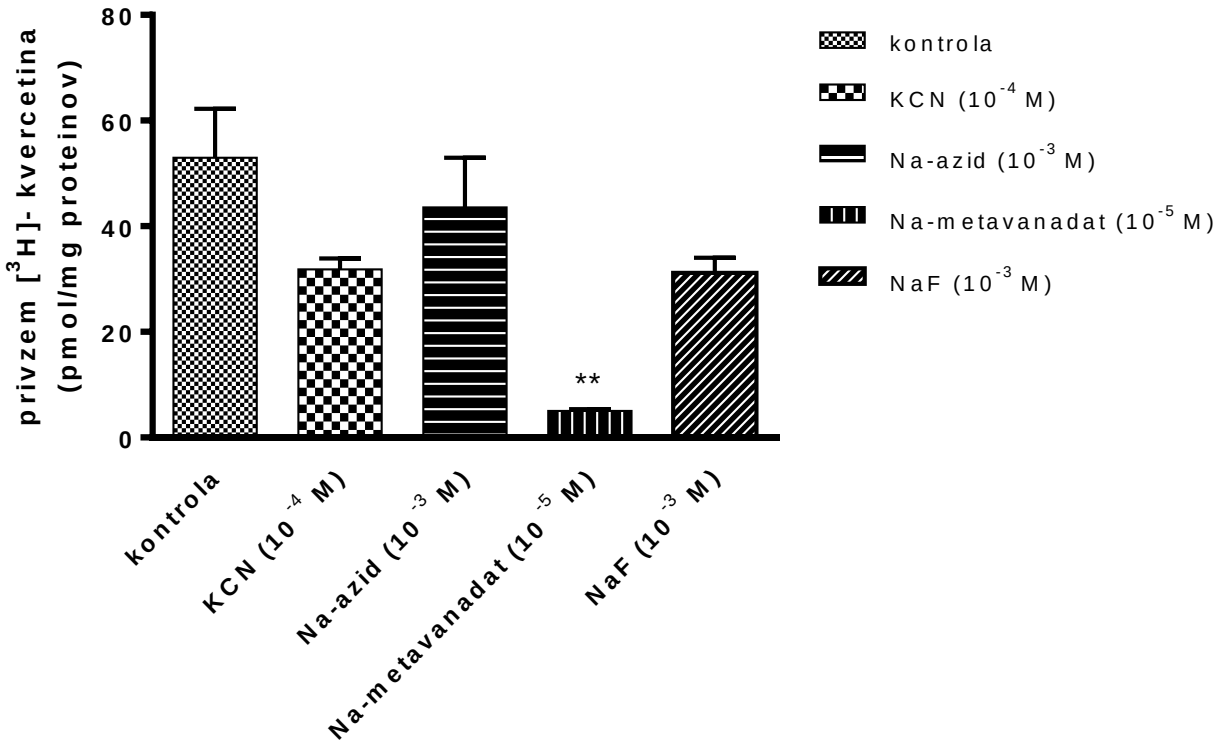
Slika 13: Učinek inhibitorjev proteinov, 0,1 mM PMSF in 0,1 mM DTNB, na privzem [^{3}H]-kvercetina v astrocite novorojenih podgan. Rezultati so prikazani kot aritmetična sredina ± standardna napaka (N(PMSF) = 9 in N(DTNB) = 3). Statistično pomembna razlika: ** za $p \leq 0,01$; enosmerna ANOVA s testom post-hoc Dunnett.

Graf na sliki 13 prikazuje, zmanjšanje privzema kvercetina v primeru deaktivacije specifičnih aminokislin. Inhibitor DTNB, povzroči manjši padec, le za 15,29 pmol/mg proteinov v primerjavi s kontrolo, PMSF pa močneje in statistično značilno zniža privzem, iz 52,95 pmol/mg proteinov pri kontroli na 2,68 pmol/mg proteinov.

3. Vpliv motenj energijske presnove na privzem kvercetina

V tem delu so predstavljeni rezultati poskusov, kjer smo preučevali, kako motnje z energijsko presnovo vplivajo na privzem kvercetina v astrocite. Nastanek ATP smo preprečili oz. zmanjšali na različnih stopnjah in sicer: i) z KCN in NaN_3 smo inhibirali encim citokrom-c-oksidazo in s tem prekinili dihalno verigo; ii) z $NaVO_3$ smo uničili zunanjo membrano mithondrijev, posledično porušili njihovo integriteto, citokrom c oksidaza je prešel v citoplazmo in na ta način prekinili dihalno verigo; iii) z NaF pa smo zavirali celično glikolizo.

Za vse poskuse sKCN, NaN_3 in NaF velja, da so bili astrociti 30 minut predhodno inkubirani z navedenimi snovmi, $NaVO_3$ pa smo dodali tik pred inkubacijo s kvercetinom. Nato so bili astrociti v vseh štirih primerih 2 minuti inkubirani s 500 nM koncentracijo kvercetina.



Slika 14: Učinek različnih inhibitorjev dihalne verige in inhibitorja glikolize na privzem [^{3}H]-kvercetina v astrocite novorojenih podgan Rezultati so prikazani kot aritmetična sredina ± standardna napaka (N=6). Statistično pomembna razlika: ** za $p \leq 0{,}01$; enosmerna ANOVA s testom post-hoc Dunnett.

Graf na sliki 14 prikazuje, da so vsi uporabljeni inhibitorji dihalne verige zmanjšali obseg privzema kvercetina v primerjavi s kontrolo. Najmanjši padec privzema opazimo pri NaN_3 – le za 9,3 pmol/mg proteinov, največjega in tudi statistično značilnega pa pri $NaVO_3$ – 47,9 pmol/mg proteinov, kar znaša kar 90% upad privzema v primerjavi s kontrolo.

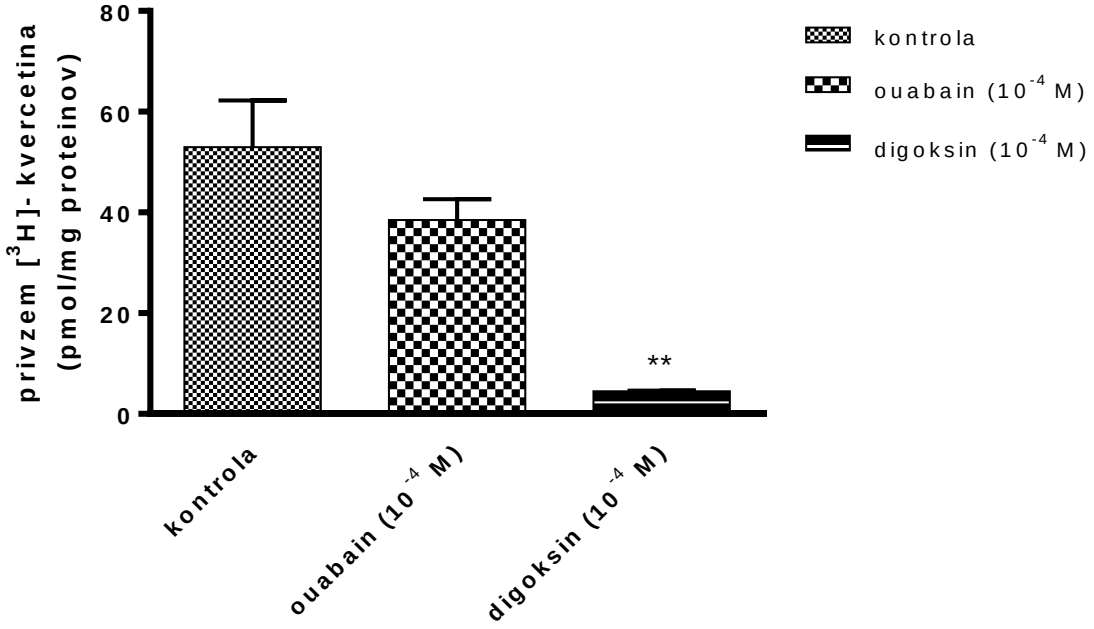
Privzem kvercetina je zmanjšal tudi inhibitor glikolize, 1 mM NaF, in sicer je bil privzem zmanjšan za 21,97 pmol/mg proteinov, vendar nismo opazili statistične razlike glede na kontrolo.

4. Vpliv kardiotoničnih glikozidov na privzem kvercetina

Odvisnost privzema kvercetina v astrocite od delovanja Na^+/K^+ ATP-aze (NKA) smo preverili z uporabo kardiotoničnih glikozidov. Gre za zdravilne učinkovine, ki inhibirajo NKA z vezavo na zunanjo stran njene α podenote. V poskusu smo uporabili endogeni kardiotonični glikozid,

ouabain, in kardiotonični glikozid, ki je izoliran iz rastline naprstec (lat. *Digitalis Lanata),* digoksin.

Pri poskusu z ouabainom smo astrocite 30 minut predhodno inkubirali, digoksin pa smo dodali neposredno predhodno inkubacijo s kvercetinom. Nato smo v obeh primerih izvedli dvominutno inkubacijo s 500 nM kvercetiom.



Slika 15: Učinek ouabaina in digoksina, inhibitorjev NKA, na privzem [^{3}H]-kvercetina v astrocite novorojenih podgan. Rezultati so prikazani kot aritmetična sredina ± standardna napaka (N(ouabain) = 6, N(digoksin) = 3). Statistično pomembna razlika: ** za p ≤ 0,01; enosmerna ANOVA s testom post-hoc Dunnett.

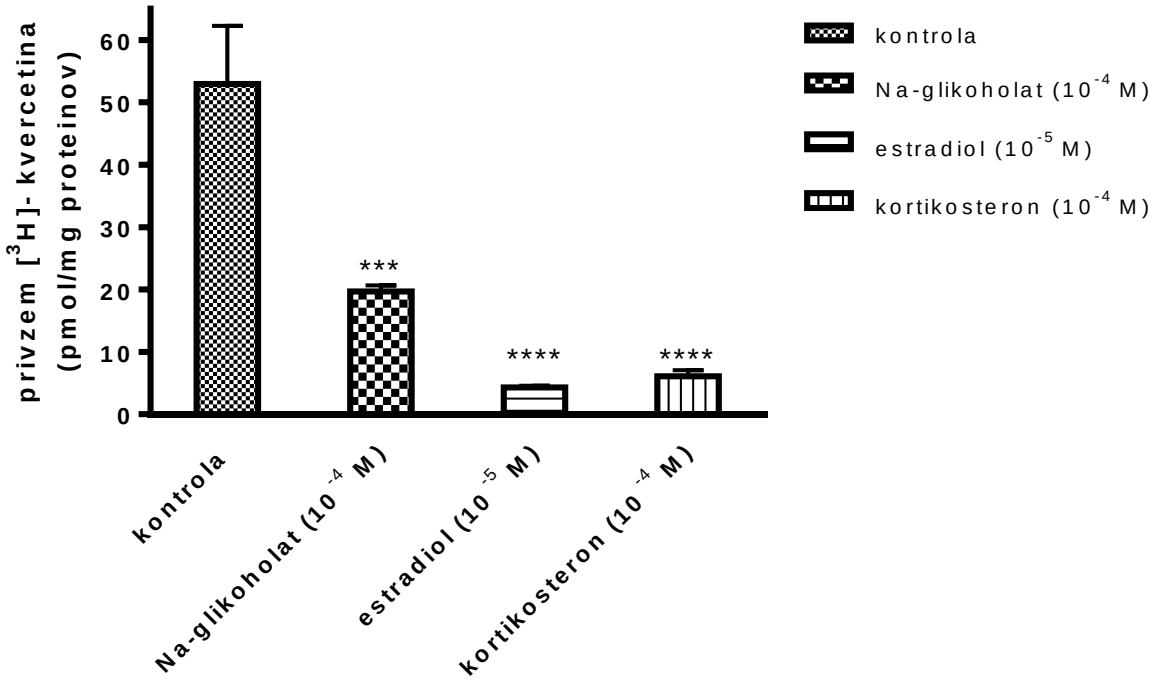
Z grafa na sliki 15 je razvidno, da karidotonični glikozidi zmanjšajo količino kvercetina, ki se privzame v astrocite. Digoksin je statistično značilno zmanjšal privzem. Ta je pri kontroli znašal 52,95 pmol/mg proteinov, pri celicah, izpostavljenih digosksinu, pa le 4,52 pmol/mg proteinov. Predhodna inkubacija z ouabainom privzema sicer ni zmanjšala statistično značilno, vseeno pa smo opazili zmanjšan privzem.

5. Vpliv zasedenosti prenašalcev OATP na privzem kvercetina

Hipotezo, da bi lahko privzem kvercetina v astrocite potekal preko prenašalcev OATP, smo raziskali z uporabo snovi, ki te prenašalce zasedajo. Uporabili smo natrijev glikoholat, ki se

prenaša z OATP 1B1, OATP 1B3 in OATP 2B1, estradiol, ki prehaja v celice z OATP 1B1 in kortikosteron, ki je substrat za OATP 1B1 in OATP 1B3.

Vse poskuse v tem delu smo opravili brez predhodne inkubacije in dodali substance tik pred dvominutno inkubacijo s kvercetinom.



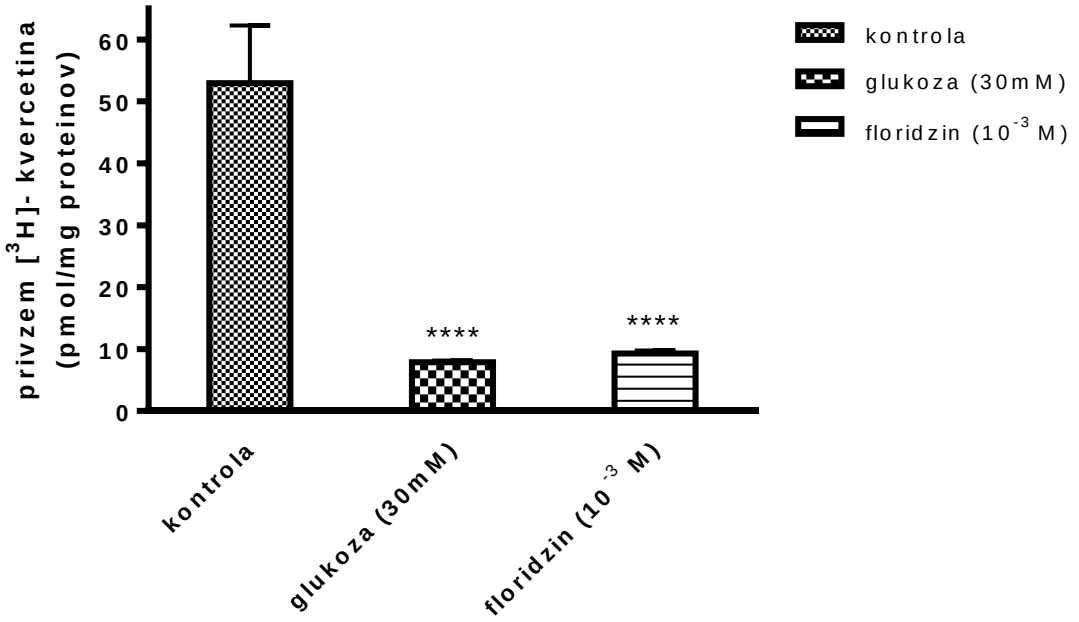
Slika 16: Učinek natrijevega glikoholata, estradiola in kortikosterona, substratov za receptorje OATP, na privzem [^{3}H]-kvercetina v astrocite novorojenih podgan. Rezultati so prikazani kot aritmetična sredina ± standardna napaka (N(estradiol in kortikosteron)=3, N(Na-gilikoholat)=9). Statistično pomembna razlika: * za p ≤ 0,001 in **** za p ≤ 0,0001; enosmerna ANOVA in testom post-hoc Dunnett**

Izpostavitev astrocitov substratom za OATP močno zmanjša privzem kvercetina, v vseh treh primerih gre za statistično signifikantne rezultate. Razlika v privzemu kvercetina med kontrolo in vzorcem z natrijevim glikoholatom znaša 33,26 pmol/mg proteinov, pri vzorcu z estradiolom 48,64 pmol/mg proteinov, pri kortikosteronu pa 46,84 pmol/mg proteinov.

6. Vpliv delovanja od natrijevih ionov odvisnih glukoznih soprenašalcev tipa 1 (SGLT1) na privzem kvercetina

Zanimalo nas je, ali je mogoče, da se kvercetin prenaša v celice tudi s prenašalci za glukozo, natančneje smo preučevali od natrijevih ionov odvisne glukozne soprenašalce tipa 1 (SGLT1). Povezavo med SGLT1 in kvercetinom smo preverili tako, da smo v kulture astrocitov tik pred dodatkom kvercetina dodali glukozo, ki je naravni substrat za SGLT1 in floridzin, flavonoid z močnimi antioksidativnimi sposobnostmi, ki reverzibilno kompetitivno inhibira SGLT 1.

Takoj po dodatku glukoze oz. floridzina, smo celicam dodali 500 nM kvercetin in jih 2 minuti inkubirali.



Slika 17: Učinek glukoze in flordizina na privzem [^{3}H]-kvercetina v astrocite novorojenih podgan. Rezultati so prikazani kot aritmetična sredina ± standardna napaka (N(glukoza) = 3, N(florizdin) = 12). Statistično pomembna razlika: ** za $p \leq 0{,}0001$; enosmerna ANOVA s testom post-hoc Dunnett.**

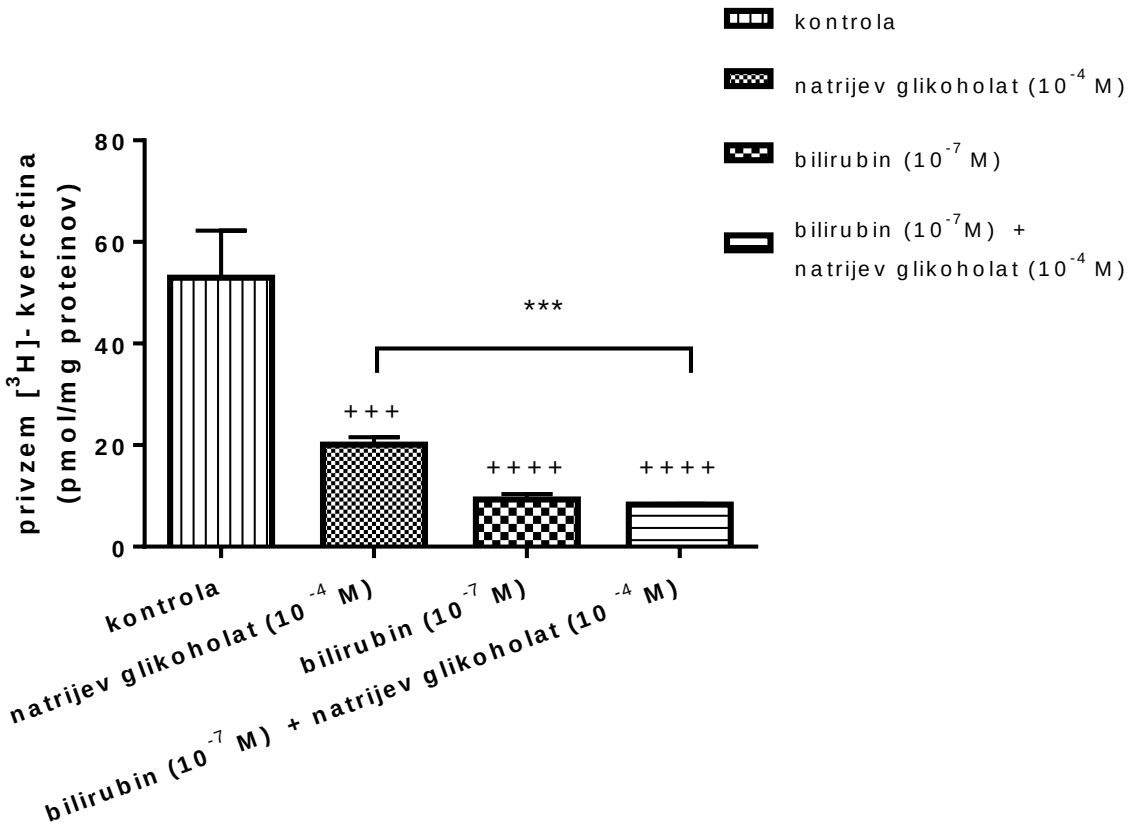
Iz grafa na sliki 17 lahko zaključimo, da kompeticija na prenašalcu SGLT1, v primeru glukoze in tudi florizdina močno in tudi statistično značilno z zelo veliko verjetnostjo zmanjša privzem kvercetina v astrocite. Padec privzema v obeh primerih v primerjavi s kontrolo znaša več kot 40 pmol/mg proteinov, kar je več kot 75 %.

7. Prenos prek več prenašalcev

Možnost, da se kvercetin v astrocite privzema preko različnih prenašalcev, smo raziskali tako, da smo kombinirali snovi z različnimi mehanizmi in opazovali, če pride do aditivnega oziroma povečanega učinka v primeru inhibicije različnih prenašalcev. Uporabili smo bilirubin, ki je substrat prenašalca bilitranslokaza, natrijev glikoholat, ki je inhibitor OATP 1B1, OATP 1B3 in OATP 2B1, floridzin, ki kompetitivno reverziblino inhibira SGLT1, in PMSF, ki ireverzibilno inhibira proteine preko kovalentne vezave na serin v aktivnem mestu proteina.

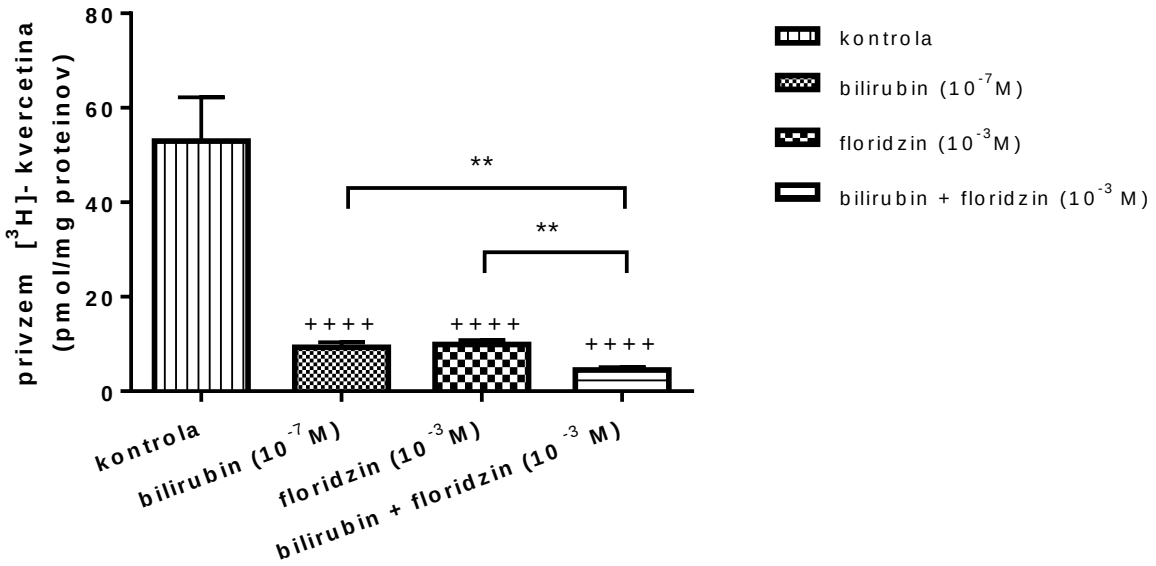
Poskuse v tem delu smo izvedli tako, da smo celičnim kulturam najprej dodali posamezno snov, nato pa smo izvedli še poskus s kombinacijo snovi in primerjali rezultat kombinacije s posameznima snovema.

Predhodno inkubacijo (30 minut) smo naredili le v primeru PMSF, ostale snovi pa smo dodali tik pred dodatkom 500 nM kvercetina.



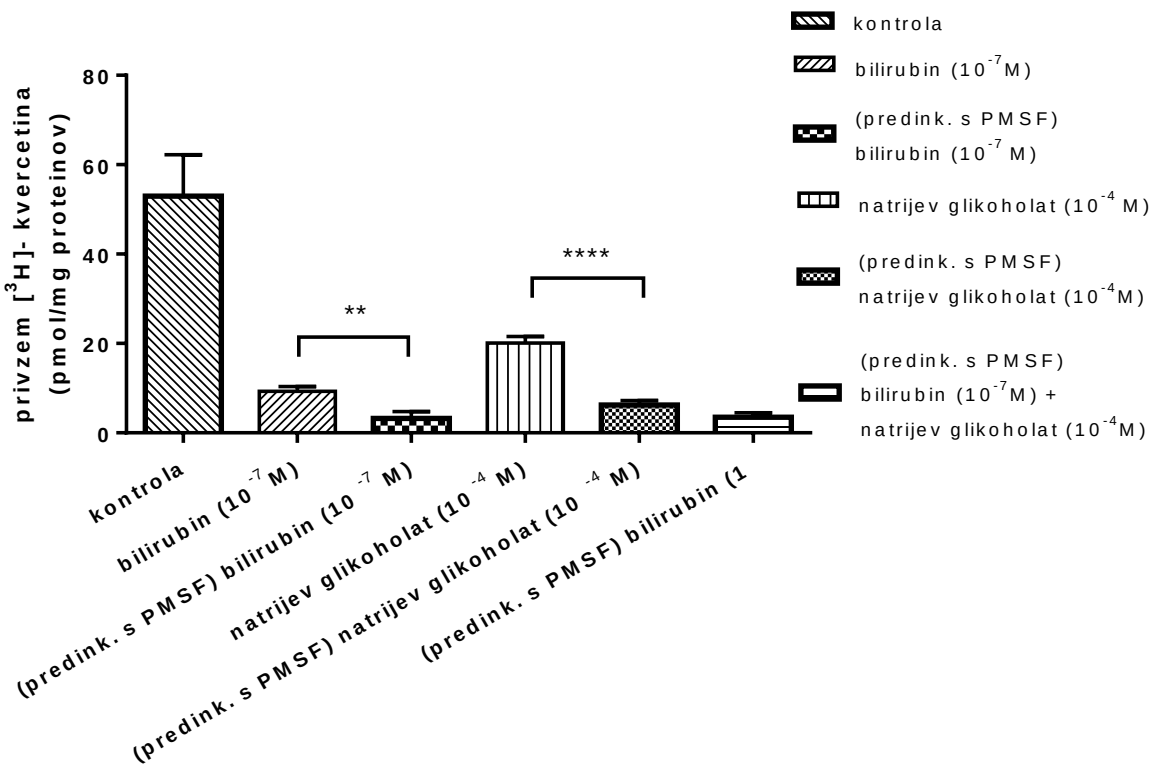
Slika 18: Primerjava učinka kombinacije bilirubina in natrijevega glikoholata na privzem [^{3}H]-kvercetina v astrocite novorojenih podgan. Rezultati so prikazani kot aritmetična sredina ± standardna napaka (N=9). Statistično pomembna razlika: * oz. +++ za p ≤ 0,001 in ++++ za p ≤ 0,0001; enosmerna ANOVA s testom post-hoc Bonferroni. * označujejo statistično razliko med vzorci, + pa med vzorci in kontrolo.**

Z grafa na sliki 18 je razvidno, da kombinacija bilirubina in glikoholata, bolj zmanjša privzem kvercetina kot vsaka posamezna snov posebej. Učinek obeh snovi hkrati je statistično značilno večji od inkubacije s samim natrijevim glikoholatom.



Slika 19: Primerjava učinka kombinacije bilirubina in floridzina na privzem [^{3}H]-kvercetina v astrocite novorojenih podgan. Rezultati so prikazani kot aritmetična sredina ± standardna napaka (N=9). Statistično pomembna razlika: ** za $p \leq 0{,}01$ in ++++ za $p \leq 0{,}0001$; enosmerna ANOVA s testom post-hoc Bonferroni. * označujejo statistično razliko med vzorci, + pa med vzorci in kontrolo.

Privzem kvercetina se v primeru dodatka kombinacije snovi statistično značilno zniža tako v primerjavi s samim bilirubinom kot tudi v primerjavi s floridzinom (slika 19). Vrednost privzema kvercetina po dodatku bilirubina je 9,31 pmol/mg proteinov, po dodatku floridzina 9,92 pmol/mg proteinov, po dodani kombinaciji obeh pa 4,51 pmol/mg proteinov.



Slika 20: Primerjava učinka predhodne inkubacije s PMSF na privzem [^{3}H]-kvercetina v astrocite novorojenih podgan. Rezultati so prikazani kot aritmetična sredina ± standardna napaka (N=6). Statistično pomembna razlika: ** za p ≤ 0,01 in ** za p ≤ 0,0001; enosmerna ANOVA s testom post-hoc Tukey.**

Graf na sliki 20 prikazuje, da predhodna inkubacija s PMSF statistično značilno zmanjša privzem kvercetina v astrocite, tudi v primeru kombinacij z drugimi snovmi. Vrednosti privzetega kvercatina padejo za skoraj 70 %, v primeru dodatka bilirubina in bilirubina + PMSF gre za upad privzema za 6,05 pmol/mg proteinov, v primeru natrijevega glikoholata in natrijevega glikoholata + PMSF pa 13,87 pmol/mg proteinov. Zanimivo je, da v primeru kombinacije treh snovi – blirubina, natrijevega glikoholata in PMSF ne pride do tako velikega upada v privzemu, kot pri kombinaciji dveh snovi, se pa privzem vseeno nekoliko zmanjša.

RAZPRAVA

1. Koncentracijska in časovna odvisnost privzema kvercetina

Kvercetin ima, glede na svoje fizikalno-kemijske lastnosti, zelo majhno možnost za prehod skozi membrano s pomočjo pasivne difuzije. Zato smo predvidevali, da so v privzem kvercetina udeleženi prenašalci. To tezo sta nam v veliki meri že potrdila poskusa, v katerih smo preučevali koncentracijsko in časovno odvisnost privzema kvercetina v astrocite. Dokaz za udeleženost transporterjev predstavljajo rezultati študije časovne odvisnosti. Rezultati kažejo, da privzem poteče izjemno hitro in nato doseže plato (slika 11). To je značilna kinetika za procese, kjer so udeleženi encimi ali prenašalci, ki so specifični in hitro izvedejo transport, nato pa pride do nasičenja, ko se zasedejo vsi prenašalci, ki so na voljo.

Na podlagi rezultatov preiskovanja koncentracijske odvisnosti (slika 12) pa lahko sklepamo, da privzem poteka pasivno. Če primerjamo krivulji pri 4 °C, ko so onemogočeni vsi aktivni procesi, in 37 °C, ko poteka celokupni transport-aktiven in pasiven, opazimo, da med njima ni bistvenih razlik. Iz tega lahko zaključimo, da privzem kvercetina ni odvisen od ATP, kar smo dodatno preverili v naslednjem poglavju z inhibicijo energijske presnove.

Preiskovanje časovne odvisnosti nam je pomagalo tudi pri določanju časa inkubacije. Dokazali smo, da privzem v astrocite poteče prej kot v petih minutah, kar je skladno z izsledki iz literature. Ugotovili so, da se kvercetin v endotelijske celice ožilja, privzame prej kot v eni minuti (35). Za nadaljnje poskuse smo nato uporabili inkubacijski čas dveh minut, ki se je pokazal za optimalnega že pri preteklih poskusih na našem inštitutu. Dolžina inkubacije mora omogočiti dovolj časa, da poteče čim večji delež privzema s specifičnimi prenašalci in ne sme trajati predolgo, ker s časom veča nespecifičnost privzema.

S poskusom koncentracijske odvisnosti smo ugotovili, da se privzem kvercetina v astrocite veča s poviševanjem koncentracije kverctina, ki ga dodamo kulturi pred inkubacijo. Proces privzema je torej odvisen od koncentracije. Kapaciteta prenašalca (ali večih) je večja od 2000 nM, saj do nasičenja v testiranem območju ni prišlo (slika 11). Za nadaljnje višanje koncentracije se nismo odločili, saj je dokazano, da kvercetin v visokih koncentracijah tvori agregate, ki onemogočajo natančnost merjenja (52). McGovern in sodelavci so na primer ugotovili, da 100 μM raztopina kvercetina vsebuje agregate s povprečnim premerom, ki je večji od 1000 nm (53).

Poskusi v tem poglavju so potrdili prisotnost prenašalcev, zato smo se odločili v naslednjih poskusih inhibirati oz. vplivati na različne procese, ki bi lahko vplivali na privzem kvercetina, in na ta način spoznati lastnosti neznanih prenašalcev.

2. Vpliv specifičnih ireverzibilnih inhibitorjev proteinov na privzem kvercetina

Dejstvo, da pri privzemu kvercetina veliko vlogo odigrajo prenašalci, smo preizkusili še na drugačen način in sicer s snovmi, ki se vežejo na določene aminokisline in posledično inhibirajo delovanje proteinov. V primeru, da bi se kvercetin privzemal v celice samo s pasivno difuzijo, inhibicija določenih proteinov ne bi vplivala na privzem, saj proteini pri pasivni difuziji nimajo vloge.

Uporabili smo dva različna ireverzibilna inhibitorja proteinov in sicer PMSF, ki ireverzibilno inhibira proteine preko kovalentne vezave na serin v aktivnem mestu proteina, in DTNB, ki ireverzibilno inhibira proteine s cisteini v aktivnem mestu. Rezultati so v obeh primerih pokazali zmanjšanje privzema kvercetina. V primeru DTNB upad ni bil statistično značilen, kar pomeni, da prenašalec za kvercetin v svojem aktivnem mestu verjetno nima prostih cisteinskih ostankov, oziroma ti ne igrajo velike vloge. Predhodna inkubacija s PMSF pa je povzročila močan in statistično značilen učinek, privzem je znašal le 5 % privzema kontrole. Tako močen upad privzema se ujema z rezultati iz literature, kjer so dokazali, da je predhodna inkubacija s PMSF zmanjšala privzem kvercetina v endotelijske celice v ožilju za več kot 80 % (35).

Do takšne razlike je prišlo najverjetneje zato, ker PMSF med vsemi proteini, ki jih inhibira, zajame tudi bilitranslokazo, ki je prenašalec, s katerim se v hepatocite privzema bilirubin in flavonoidi (vključujoč kvercetin). Njegova prisotnost je dokazana tudi v drugih tkivih, na primer v ledvicah in vaskularnem endoteliju (35, 54). Velika verjetnost je, da privzem kvercetina v astrocite poteka tudi z bilitranslokazo.

3. Vpliv motenj energijske presnove na privzem kvercetina

Že v uvodu smo se osredotočili na pomembnost tvorbe energijsko bogate molekule ATP, ki je potrebna za mnoge procese v celici, med drugim tudi za aktivni transport. Pri poskusih, predstavljenih v tem poglavju, smo preverili, kateri energetski proces zagotavlja energijo potrebno za prenos kvercetina v celico. Celice smo izpostavili različnim snovem, ki preprečujejo, oziroma zmanjšujejo nastanek ATP, delujejo pa po različnih mehanizmih. V

primeru KCN in NaN_3 gre za inhibicijo encima citokrom c oksidaze, NaF pa povzroči inhibicijo glikolize.

Ugotovili smo, da motnje nastanka ATP ne povzročijo statistično značilnega zmanjšanja privzema kvercetina, kar je dodaten dokaz, da se kvercetin ne privzema z aktivnim transportom. Rezultati tako podpirajo predvidevanje iz prejšnjega poglavja, da privzem poteka s pomočjo olajšane difuzije.

Edini statistično značilen rezultat, ki smo ga dobili v tem poglavju, je posledica predhodne inkubacije z natrijevim metavanadatom in znaša kar 90 % v primerjavi s kontrolo. Najverjetnejši razlog za takšno razliko je drugačen mehanizem delovanja, saj natrijev metavanadat deluje na več tarč. Ne inhibira le citokrom c oksidaze, ampak povzroči tudi okvaro citoplazemske membrane in posledično uniči astrocit ter tako onemogoči privzem kvercetina.

Na podlagi rezultatov lahko zaključimo, da prekinitev energetske presnove astrocitov na katerikoli stopnji ne zmanjša privzema kvercetina v astrocite.

4. Vpliv kardiotoničnih glikozidov na privzem kvercetina

Ko smo ugotovili, da prisotnost ATP molekul ni pomembna za privzem kvercetina v astrocite, nas je zanimalo, če tudi inhibicija NKA nima vpliva na privzem. Celice smo izpostavili kardiotoničnima glikozidoma, ki inhibirata NKA. Rezultati so pokazali, da ouabain povzroči manjši upad, ki ni bil statistično značilen, digoksin pa kar 91 % padec privzema, ki je bil tudi statistično značilen. Ta razlika med kardiotoničnima glikozidoma ni bila pričakovana, saj obe snovi delujeta po enakem mehanizmu, torej povzročita inhibicijo NKA in posledično porušita ionsko ravnotežje v celici. S pomočjo literature smo ugotovili, da digoksin deluje tudi kot inhibitor prenašalcev OATP, kar bi lahko povzročilo tako velik učinek (55). Vlogo prenašalcev OATP smo preučili v naslednjem poglavju.

S pomočjo zgornjih rezultatov lahko sklepamo, da inhibicija NKA ne vpliva na privzem kvercetina v astrocite.

5. Vpliv zasedenosti prenašalcev OATP na privzem kvercetina

S prejšnjimi poskusi smo na različne načine ugotovili, da so pri privzemu kvercetina najverjetneje udeleženi prenašalci. V nadaljnjih poskusih pa smo preverjali, ali bi lahko privzem

potekal preko prenašalcev, za katere v literaturi obstajajo podatki, da bi lahko skrbeli za transport kvercetina v različnih celicah.

Kvercetin bi se, glede na svoje fizikalno-kemijske lastnosti, lahko v astrocite privzemal tudi s pomočjo nespecifičnih prenašalcev OATP. Deloma se je to potrdilo že v prejšnjem poglavju pri digoksinu, zato smo se odločili bolj raziskati vpliv teh prenašalcev. Uporabili smo tri substrate za prenašalce OATP: natrijev glikoholat, estradiol in kortikosteron.

Pri vseh treh testiranih snoveh je prišlo do velikega, statistično značilnega zmanjšanja privzema. Natrijev glikoholat je povzročil 63 % upad privzema, kortikosteron 89 % in estradiol 92 %. Glede na rezultate lahko torej zaključimo, da zasedanje prenašalcev OATP z njihovimi substrati zmanjša privzem kvercetina, torej bi se kvercetin lahko privzemal v astrocite z njihovo pomočjo. Ti rezultati so skladni s preteklimi študijami na našem inštitutu in tudi z izsledki iz literature, in sicer je Wongova skupina raziskovala transport kvercetina v hepatocite in ugotovila, da so glavni prenašalci verjetno OATP (56).

6. Vpliv delovanja od natrijevih ionov odvisnih glukoznih soprenašalcev tipa 1 (SGLT1) na privzem kvercetina

Znano je, da se kvercetin v obliki glikozidov v črevesju veliko bolj učinkovito absorbira kot njegovi aglikoni. Še posebej zanimivo je, da na absorpcijo vpliva tudi vrsta sladkorja, ki je vezana na kvercetin. V primeru glukoze, ki je vezana bodisi na mestu 3 ali 4', je po podatkih iz Hollmanove študije absorpcija 52 % in v primeru le ramnoze 17 % (30). Iz teh dejstev je moč sklepati, da so pri prehodu kvercetina v mukozne celice črevesja vpleteni prenašalci za glukozo.

Za naše poskuse smo izbrali nespecifični naravni substrat glukozo in floridzin, reverzibilni kompetitivni inhibitor prenašalcev SGLT1. Izmed vseh prenašalcev za glukozo smo se na prenašalce SGLT1 osredotočili zato, ker so prisotni tudi v astrocitih (57). Obe substanci sta statistično značilno znižali privzem kvercetina, ki je ob hkratni inkubaciji z floridzinom padel za 82 %, ob hkratni inkubaciji z glukozo pa za 85 %.

Rezultati potrjujejo vpletenost prenašalcev SGLT1 pri privzemu kvercetina. Podobne rezultate je mogoče najti tudi v literaturi, kjer so dokazali povezanost v obratni smeri, in sicer vpliv glikozidov kvercetina na *in vitro* absorpcijo analoga glukoze (metil-D-glukopiranozid) v črevesne celice (39).

7. Prenos prek več prenašalcev

Rezultati poskusov v prejšnjih poglavjih kažejo, da bi se kvercetin lahko privzemal s pomočjo različnih prenašalcev, saj na privzem vpliva tako zasedenost OATP kot tudi transporterjev SGLT1. V naslednjem koraku smo uporabili kombinacije snovi, ki delujejo po različnih mehanizmih, in ugotovili, da je učinek več snovi hkrati večji od učinka posameznih.

V prvem delu poskusa smo primerjali inhibicijo natrijevega glikoholata, ki je substrat za prenašalce OATP, s kombinacijo natrijevega glikoholata in bilirubina, ki je endogeni substrat za bilitranslokazo. Privzem po dodatku kombinacije se več kot razpolovi v primerjavi z uporabo natrijevega glikoholata. Razlika med padcema privzema je statistično značilna in znaša 11,8 pmol/mg proteinov.

Statistično značilen upad privzema smo opazili tudi pri kombinaciji bilirubina in floridzina, ki kompetitivno inhibira transporterje SGLT1 in tudi v primerih, ko smo predhodno inkubirali s PMSF.

Na podlagi teh rezultatov lahko potrdimo naše predvidevanje, da so v privzem kvercetina vpleteni različni prenašalci – OATP, SGLT1 in bilitranslokaza, saj hkratna inhibicija več prenašalcev povzroči večji padec privzema kot inhibicija posameznega prenašalca. S tem smo dokazali, da gre po vsej verjetnosti za zanimiv pojav tako imenovane promiskuitetnosti spojin in tudi proteinov. O tem fenomenu piše tudi Kell s sodelavci in razlaga, da telesu tuje snovi nimajo svojih endogenih prenašalcev, ampak se vežejo na mnoge različne, s katerimi slučajno interagirajo (58). Podobno se obnašajo tudi prenašalci, saj se poleg endogenih molekul lahko povežejo še z mnogimi drugimi ksenobiotiki. Od 3673 proteinskih vezavnih mest jih ima le 400 samo en ligand, vsa ostala pa več; npr. na dopaminski receptor se lahko veže kar 7317 molekul (58).

SKLEP

1. Ugotovili smo, da se kvercetin v astrocite privzema s pomočjo prenašalcev in ne s prosto difuzijo. Obstoj prenašalcev smo dokazali s kinetiko privzema, ki je dokazala, da je transport hiter in nasitljiv, enostavna difuzija pa poteka le v manjšem obsegu.

2. Ireverzibilna inhibicija proteinov z aminokislino serin v aktivnem mestu je povzročila upad privzema kvercetina, kar je dodaten dokaz, da je so v privzem vpleteni proteinski prenašalci.

3. Ovrgli smo hipotezo, da je privzem kvercetina energijsko odvisen proces, saj uporaba snovi, ki so zavrle celično dihanje ali glikolizo in s tem ustavile nastanek ATP, ni zmanjšala privzema kvercetina.

4. Ovrgli smo hipotezo, da je privzem kvercetina ionsko odvisen proces, saj inhibicija Na^+/K^+ ATPaze ni vplivala na privzem kvercetina.

5. Potrdili smo hipotezo, da privzem poteka preko prenašalcev OATP, ker inhibitorji teh prenašalcev zmanjšajo privzem kvercetina.

6. Potrdili smo hipotezo, da se kvercetin privzema preko SGLT1 prinašalcev, saj je uporaba snovi, ki te prenašalce zasedajo, zmanjšala privzem kvercetina,

VIRI

1. Chaboub L, Deneen B: Astrocyte Form and Function in the Developing Central Nervous System. Seminars in Pediatric Neurology 2013; 20: 230-235.
2. The central nervous sistem [http://pixgood.com/neurilemma.html]. Dostop: 20.2.2015
3. Lipinski C, Lombardo F, Dominy B, Feeney P: Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings. Advanced Drug Delivery Reviews 2001;46:3-26.
4. Boyer R: Temelji biokemije, Študentska založba, Ljubljana, 2005, 229-231.
5. Nutrient Transportation [http://www.turfnet.com/blog/5/entry-381-nutrient-transportation-sodium-pump-style/]. Dostop: 15.3.2015
6. Kimelberg HK: Water homeostasis in the brain: basic concepts. Neuroscience 2004; 129: 851– 860.
7. Holthoff K, Witte OW: Directed spatial potassium redistribution in rat neocortex. Glia 2000; 29: 288-292.
8. Kimelberg HK, Nedergaard M: Functions of Astrocytes and their Potential As Therapeutic Targets. Neurotherapeutics 2010; 7: 338-353.
9. Lehninger AL, Nelson DL, Cox MM: Lehninger Principles of Biochemistry, 5th edition, W. H. Freeman, New York, 2008: 389-393
10. Active Transport [http://www.perkepi.com/active-transport/] Dostop: 15.3.2015
11. Attwell D, Laughlin, SB: An energy budget for signaling in the grey matter of the brain. Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism; 21: 1133–1145.
12. Voet D, Voet JG: Biochemistry 1, 3rd edition, Wiley & sons, Hoboken, 2004: 593-598.
13. Rich PR: The molecular machinery of Keilin's respiratory chain. Biochemical Society Transactions 2003; 31: 1095–1105.
14. Ronnett G, Kim E, Landree L, Tu Y: Fatty acid metabolism as a target for obesity treatment. Physiology & Behavior 2005; 85: 25–35.
15. Stobart JL, Anderson CM: Multifunctional role of astrocytes as gatekeepers of neuronal energy supply. Frontiers In Cellular Neuroscience 2013: 738.
16. Ballabh P, Braun A, Nedergaard M: The blood-brain barrier: an overview: structure, regulation, and clinical implications. Neurobiology Of Disease 2004; 16: 1-13.
17. Pardridge WM: The blood–brain barrier: bottleneck in brain drug development. Journal of the American Society for Experimental NeuroTherapeutics 2005; 2: 3-14.

18. Brasnjevic I, Steinbusch HM, Schmitz C, Martinez-Martinez P: Delivery of peptide and protein drugs over the blood-brain barrier. Progress In Neurobiology 2009; 87: 212-251.
19. Pardridge WM: Molecular Trojan horses for blood–brain barrier drug delivery. Current Opinion in Pharmacology 2006; 6: 494-500.
20. Ohtsuki S, Yamaguchi H, Kang Y, Hori S, Terasaki T: Reduction of L-type amino acid transporter 1 mRNA expression in brain capillaries in a mouse model of Parkinson's disease. Biological & Pharmaceutical Bulletin 2010; 33: 1250-1252.
21. Proprietary Liposomal Technology [http://www.insmed.com/product-candidates/proprietary-liposomal-technology]. Dostop: 15.3.2015
22. Nanoparticles [http://www.hindawi.com/journals/mi/2012/126463/fig3/]. Dostop: 15.3.2015
23. Quercetine [http://www.intechopen.com/source/html/40984/media/image3.png] Dostop: 16.3.2015
24. Middleton Jr E, Kandaswami, C, Theoharides TC: The effects of plant flavonoids on mammalian cells: implications for inflammation, heart disease and cancer. Pharmacological Reviews 2000; 42: 673–751.
25. Sampson L, Rimm E, Hollman PC, de Vries, JH, Katan MB: Flavonol and flavone intakes in US health professionals. The Journal of the American Dietetic Association 2002; 102: 1414–1420.
26. Kleemann R, Verschuren L, Kooistra T, et al: Anti-inflammatory, anti-proliferative and anti-atherosclerotic effects of quercetin in human in vitro and in vivo models. Atherosclerosis 2011; 218: 44-52.
27. Radikali [http://www.ffa.uni-lj.si/fileadmin/datoteke/FK/Gradiva_FK/2011-12/Predavanja/Radikali_18102011__Združ_način_.pdf]. Dostop: 16.3.2015
28. Morand C, Crespy V, Manach C, Besson, C, Demigne C, Remesy, C: Plasma metabolites of quercetin and their antioxidant properties. American journal of physiology. Regulatory, integrative and comparative physiology. 1998; 275: 212–219.
29. Fahlman B, Krol E: UVA and UVB radiation-induced oxidation products of quercetin. Journal Of Photochemistry And Photobiology 2009; 97: 123-131
30. Hollman PC, de Vries JH, van Leeuwen SD, Mengelers MJ, Katan MB: Absorption of dietary quercetin glycosides and quercetin in healthy ileostomy volunteers. The American Journal Of Clinical Nutrition 1995; 62: 1276-1282.

31. Williamson, G, Plumb GW, Uda Y, Price, KR, Rhodes MJ: Dietary quercetin glycosides: antioxidant activity and induction of the anticarcinogenic phase II marker enzyme quinone reductase in Hepalclc7 cells. Carcinogenesis 1996; 17: 2385-2387.
32. Harnly JM, Doherty RF, Beecher GR, Holden, JM, Haytowitz DB, Bhagwat, S, Gebhardt, S: Flavonoid content of US fruits, vegetables, and nuts. Journal of Agricultural and Food Chemistry 2006; 54: 9966–9977.
33. Rothwell J, Day A, Morgan M: Experimental determination of octanol-water partition coefficients of quercetin and related flavonoids. Journal Of Agricultural And Food Chemistry 2005; 53: 4355-4360.
34. Ramešová S, Sokolová R, Degano I, Bulíčková J, Zabka J, Gál M: On the stability of the bioactive flavonoids quercetin and luteolin under oxygen-free conditions. Analytical And Bioanalytical Chemistry 2012; 402: 975-982.
35. Maestro A, Terdoslavich M, Passamonti S, et al: Expression of bilitranslocase in the vascular endothelium and its function as a flavonoid transporter. Cardiovascular Research 2010; 85: 175-183.
36. Žiberna L, Lunder M, Tramer F, Drevenšek G, Passamonti S: The endothelial plasma membrane transporter bilitranslocase mediates rat aortic vasodilation induced by anthocyanins. Nutrition, Metabolism and Cardiovascular Diseases 2013; 23: 68-74.
37. Roth M, Obaidat A, Hagenbuch B: OATPs, OATs and OCTs: the organic anion and cation transporters of the SLCO and SLC22A gene superfamilies. British Journal of Pharmacology 2012; 165: 1260-1287.
38. O'Malley D, Reimann F, Simpson A, Gribble F: Sodium-coupled glucose cotransporters contribute to hypothalamic glucose sensing. Diabetes 2006; 55:3381-3386.
39. Ader P, Blöck M, Pietzsch S, Wolffram S: Interaction of quercetin glucosides with the intestinal sodium/glucose co-transporter (SGLT-1). Cancer Letters 2001; 162: 175-180.
40. Stocker R, Yamamoto Y, McDonagh A, Glazer A, Ames B: Bilirubin is an antioxidant of possible physiological importance. Science 1987; 235: 1043-1046.
41. Očadlík I, Hlinštáková S, Oravec S: Relationship between unconjugated hyperbilirubinemia and lipoprotein spectrum. Neuroendocrinology Letters 2011; 32: 360-364.
42. Kang SJ, Kim D, Park HE, Chung GE, Choi SH, Choi S, Cho S: Elevated serum bilirubin levels are inversely associated with coronary artery atherosclerosis. Atherosclerosis 2013; 230: 242-248.

43. Iłzecka J, Stelmasiak Z: Serum bilirubin concentration in patients with amyotrophic lateral sclerosis. Clinical Neurology And Neurosurgery 2003; 105: 237-240.
44. Jangi S, Otterbein L, Robson S: The molecular basis for the immunomodulatory activities of unconjugated bilirubin. The International Journal Of Biochemistry & Cell Biology 2013; 45: 2843-2851.
45. Maines MD: The heme oxygenase system: a regulator of second messenger gases. Annual Review of Pharmacology and Toxicology 1997; 37: 517–54.
46. Sabogal-Guáqueta A, Muñoz-Manco J, Ramírez-Pineda J, Lamprea-Rodriguez M, Osorio E, Cardona-Gómez G. The flavonoid quercetin ameliorates Alzheimer's disease pathology and protects cognitive and emotional function in aged triple transgenic Alzheimer´s disease model mice. Neuropharmacology 2015; 93: 134-145.
47. Pan H, Jiang Q, Yu Y, Mei J, Cui Y, Zhao W. Quercetin promotes cell apoptosis and inhibits the expression of MMP-9 and fibronectin via the AKT and ERK signalling pathways in human glioma cells. Neurochemistry International 2015; 80: 60-71.
48. Bankaruk Y, Mukai R, Terao J: Cellular uptake of quercetin and luteolin and their effectson monoamine oxidase-A in human neuroblastoma SH-SY5Y cells. Toxicology Reports 2014; 1: 639-649.
49. Schwarz JP, Wilson DJ: Preparation and charatcterisation of type 1 astrocytes cultured from adult rat cortex, cerebellum, and striatum. Glia 1992; 5: 75-80.
50. Motulsky H: Intuitive Biostatistics. New York: Oxfors iniversity Press, Inc.; 1995.
51. Egert S, Wolffram S, Bosy-Westphal A, Boesch-Saadatmandi C, Wagner AE, Frank J, Mueller MJ: Daily quercetin supplementation dose-dependently increases plasma quercetin concentrations in healthy humans. The Journal Of Nutrition 2008; 138: 161-162.
52. Pohjala L, Tammela P: Aggregating behavior of phenolic compounds--a source of false bioassay results? Molecules 2012; 17: 10774-10790
53. McGovern SL, Helfand BT, Feng, B, Shoichet BK: A specific mechanism of nonspecific inhibition. Journal of Medicinal Chemistry 2003; 46: 4265–4272.
54. Trebucobich M S, Hazelhoff MH, Chevalier AA, Passamonti S, Brandoni A, Torres AM: Protein expression of kidney and liver bilitranslocase in rats exposed to mercuric chloride--a potential tissular biomarker of toxicity. Toxicology Letters, 2014; 225: 305-310.
55. Kalliokoski A, Niemi M: Impact of OATP transporters on pharmacokinetics. British Journal of Pharmacology 2009; 158: 693-705.

56. Wong C, Akiyama Y, Abe T, Lippiat J, Orfila C, Williamson G: Carrier-mediated transport of quercetin conjugates: Involvement of organic anion transporters and organic anion transporting polypeptides. Biochemical Pharmacology 2012; 84: 564-570.
57. Véga C, Sachleben L, Gozal D, Gozal E: Differential metabolic adaptation to acute and long-term hypoxia in rat primary cortical astrocytes. Journal Of Neurochemistry 2006; 97: 872-883.
58. Kell DB, Dobson PD, Bilsland E, Oliver SG: The promiscuous binding of pharmaceutical drugs and their transporter-mediated uptake into cells: what we (need to) know and how we can do so. Drug Discovery Today 2013; 18: 218-239.