

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO

LUCIJA NOVAK
MAGISTRSKA NALOGA

ENOVITI MAGISTRSKI ŠTUDIJ FARMACIJE

Ljubljana, 2015

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO

LUCIJA NOVAK

FUNKCIONALNE IN KINETIČNE LASTNOSTI
PRIVZEMA FLAVONOIDA KVERCETINA V
ASTROCITE NOVOROJENE PODGANE

QUERCETIN UPTAKE INTO NEONATAL RAT
ASTROCYTES: FUNCTIONAL AND KINETIC
PROPERTIES

ENOVITI MAGISTRSKI ŠTUDIJ FARMACIJE

Ljubljana, 2015

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

Zahvala

Iskrena hvala prof. dr. Mojci Kržan, dr. med., ki ji zaradi njene strokovnosti, dostopnosti in srčnosti lahko rečem mentorica z velikim M.

Hvala doc. dr. Lovru Žiberni, mag. farm. za raziskovalne zamisli in strokovne nasvete. Hvala tudi tehnični sodelavki Jožici Košir za njeno prijaznost in potrpežljivost pri uvajanju v laboratorijsko delo. Hvala dr. Ilonki Ferjan, mag. farm. za vzorce antipsihotikov.

Posebna zahvala moji ožji in širši družini ter prijateljem, ki so mi vsa leta študija stali ob strani.

Izjava

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

Lucija Novak

Predsednica komisije: izr. prof. dr. Anamarija Zega, mag. farm.

Član komisije: izr. prof. dr. Robert Roškar, mag. farm.

Vsebina

Povzetek	iv
Abstract	v
Seznam okrajšav	vi
UVOD	1
1 BILIRUBIN	1
1.1 Gilbertov sindrom	3
1.2 Kernikterus	4
1.3 Shizofrenija	6
1.4 Alzheimerjeva bolezen	7
1.5 Biološki kazalec (biomarker) »zdravega življenjskega sloga«	8
2 VRSTE TRANSPORTA	8
2.1 Fizikalno kemijske lastnosti molekul za enostavno difuzijo	10
2.2 Prehajanje molekul s prenašalci	10
2.3 Prehajanje snovi skozi HEB	11
3 FLAVONOIDI	13
3.1 Kvercetin	14
NAMEN DELA IN DELOVNE HIPOTEZE	15
MATERIALI IN METODE	16
1 Kemikalije in oprema	16
2 Priprava celičnih kultur astrocitov	18
3 Privzem ^3H -kvercetina v celične kulture astrocitov	20
3.1 Časovna odvisnost	20
3.2 Koncentracijska odvisnost	20
3.3 Vpliv bilirubina na privzem ^3H -kvercetina	21
3.4 Vpliv antipsihotikov na privzem ^3H -kvercetina	22
4 Določanje privzetega ^3H -kvercetina	22
5 Določanje koncentracije proteinov	23
6 Analiza podatkov	24
REZULTATI	25
1 Kinetične lastnosti privzema ^3H -kvercetina	25
2 Funkcionalne lastnosti privzema ^3H kvercetina	27
2.1 Vpliv antipsihotikov na privzem ^3H -kvercetina	28
RAZPRAVA	31
SKLEP	36
LITERATURA	37

Kazalo slik

Slika 1: Strukturna formula bilirubina	1
Slika 2: Shematični pregled potovanja bilirubina po organizmu.....	2
Slika 3: Shematični pregled nastanka biliverdina iz hema ter oksidacijsko-reduksijski cikel bilirubina	3
Slika 4: Prikaz vpliva procesov, s katerimi bi večje vrednosti bilirubina lahko zmanjševale tveganje za trombozo in srčno-žilne zaplete	4
Slika 5: Fiziološka in patološka zlatenica	5
Slika 6: Glavne poti prenosa skozi celično membrano.....	9
Slika 7: (A) Shema HEB. (B) Povečava.....	12
Slika 8: Strukturna formula kvercetina.....	14
Slika 9: Shematski pregled scintilacijskega procesa.....	23
Slika 10: Časovna odvisnost privzema ^3H -kvercetina v astrocite novorojene podgane	25
Slika 11: Koncentracijska odvisnost privzema ^3H -kvercetina v astrocite novorojene podgane	26
Slika 12: Vpliv naračajočih koncentracij bilirubina na privzem ^3H -kvercetina v astrocite novorojene podgane	27
Slika 13: Vpliv različnih koncentracij antipsihotika klorpromazina na privzem ^3H -kvercetina v astrocite novorojene podgane	28
Slika 14: Vpliv različnih koncentracij antipsihotikov promazina, triflupromazina, flufenazina, tioridazina na privzem ^3H -kvercetina v astrocite novorojene podgane	29
Slika 15: Vpliv Klozapina na privzem ^3H -kvercetina v astrocite novorojene podgane	30

Kazalo preglednic

Preglednica I: Količina substanc, dodanih pri določanju koncentracijske odvisnosti privzema ^3H -kvercetin v astrocite novorojene podgane pri temperaturi 37 °C in 4 °C	20
Preglednica II: Količina substanc, dodanih pri določanju vpliva bilirubina na privzem ^3H -kvercetina v astrocite novorojene podgane pri temperaturi 37 °C	21
Preglednica III: Količina substanc, dodanih pri določanju vpliva več antipsihotikov na privzem ^3H -kvercetina v astrocite novorojene podgane pri temperaturi 37 °C.....	22
Preglednica IV: Afiniteta antipsihotikov do inhibicije privzema kvercetina v astrocite.....	30

Kazalo enačb

Enačba 1: Definicija porazdelitvenega koeficiente P	10
Enačba 2: Izračun koncentracije ^3H -kvercetina v vzorcu.....	23

Povzetek

Bilirubin je endogeni antioksidant z dokazanim protivnetnim učinkom. V blago povečanih vrednostih v krvi je odgovoren za protektivno delovanje. Študije so pokazale, da bilirubin zmanjšuje incidenco srčno-žilnih bolezni in nekaterih oblik raka. Preučevanje njegove vpleteneosti v etiopatogenezo drugih bolezni (Alzheimerjeva bolezen, shizofrenija, metabolni sindrom itd.) je v porastu. Paradoksalno pa zelo velike količine bilirubina v krvi delujejo nevrotoksično. Flavonoid kvercetin najdemo v raznovrstnem sadju in zelenjavni. Flavonoidi nasprotno pa so poznani tudi kot antioksidanti. Številne epidemiološke študije dokazujejo obratno sorazmerje med vnosom flavonoidov in kroničnimi degenerativnimi boleznimi.

Funkcionalne študije kažejo na njuno podobnost. Znano je, da prenos obeh molekul v jetrne in endotelijalne celice poteka z istim prenašalcem. V magistrskem delu smo želeli ugotoviti, ali njun prenos poteka z istim prenašalcem tudi v astrocitih. Preverili smo kinetične lastnosti privzema kvercetina v astrocite in vpliv bilirubina na njegov privzem. Zlatenica je eden od opisanih neželenih učinkov tipičnih antipsihotikov. Zato smo želeli preveriti tudi vpliv antipsihotikov na privzem kvercetina v astrocite.

Poskuse privzema in inhibicije privzema smo naredili na astrocitih, pridobljenih iz možganske skorje novorojenih podgan. Količino privzetega kvercetina v astrocite smo določali s tekočinskim scintilacijskim števcem (LSC).

Računalniška analiza eksperimentalnih rezultatov kinetike privzema je pokazala, da je privzem kvercetina potekal skladno z Michaelis-Mentenovo kinetiko, iz česar sklepamo na pasivni prenos z olajšano difuzijo. Rezultati so pokazali, da bilirubin kompetitivno inhibira kvercetin, kar kaže na to, da si obe molekuli tudi v astrocitih delita prenašalne proteine. Vsi preskušani antipsihotiki so inhibirali privzem kvercetina v astrocite. Njihova inhibicija bi lahko bila vzrok za zlatenico, ki se pojavlja kot neželeni učinek starejše generacije antipsihotikov.

Potrdili smo, da se kvercetin privzema v astrocite s facilitirano difuzijo, in sicer preko istega oz. istih prenašalcev kot bilirubin in nekateri antipsihotiki.

Ključne besede: kvercetin, bilirubin, antipsihotiki, astrociti, privzem

Abstract

Bilirubin is an endogenous antioxidant and it has a proven anti-inflammatory effect. Slightly increased serum bilirubin levels are responsible for its protective effects in cardiovascular and nervous system as well as cancer prevention. Bilirubin is involved in the ethiopathogenesis of diseases (Alzheimer's disease, schizophrenia, metabolic syndrome, etc.). Paradoxically, high levels of serum bilirubin have neurotoxic effect. Flavonoid quercetin is found in various fruits and vegetables. Flavonoids are also known as antioxidants. Numerous epidemiological studies have shown an inverse correlation between the intake of flavonoids and chronic degenerative disease incidence.

Quercetin and bilirubin share similar functional actions. In addition to that, it is also known that the transfer of bilirubin and quercetin in the hepatocytes and endothelial cells it is mediated by the same transporter(s). In order to confirm this thesis, we wanted to prove that this process occurs also in astrocytes. Therefore, we examined the kinetic characteristics of quercetin uptake into astrocytes and investigated the impact of bilirubin on quercetin uptake. Jaundice, a clinical sign of increased serum bilirubin levels is one of the described side effects of typical antipsychotics. In order to confirm this, we checked the impact of antipsychotics on the uptake of quercetin into astrocytes.

We used the astrocytes from cerebral cortex of neonatal rats in the uptake experiments. The quantity of quercetin uptake into astrocytes was determined by liquid scintillation counter (LSC).

Computer analysis of the experimental results of the uptake kinetics has shown that the uptake of quercetin is in accordance with the Michaelis-Menten kinetics. This indicates that the transfer is mediated by facilitated diffusion. The results also showed that bilirubin competitively inhibits quercetin transport, which suggests that both molecules use the same transporter for the uptake into astrocytes. All antipsychotics inhibited the uptake of quercetin in astrocytes in concentration-dependent manner. Their inhibition could be the cause for jaundice, which occurs as a side effect of traditional antipsychotics.

In conclusion, we can say that the uptake of quercetin into astrocytes is mediated by facilitated diffusion and shares the same transporter(s) as bilirubin and older antipsychotics.

Key words: quercetin, bilirubin, antipsychotics, astrocytes, uptake

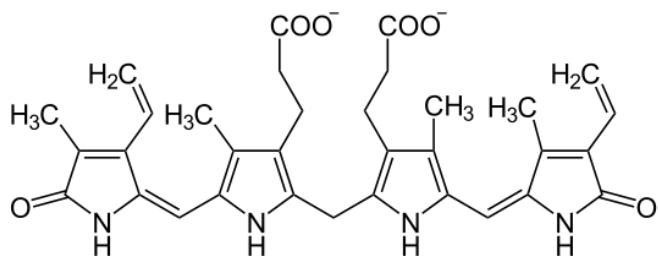
Seznam okrajšav

ABC	skupina prenašalcev <i>ATP-binding cassette transporters</i>
ATP	adenozin trifosfat
Bf	nevezan oz. prost bilirubin
BR	biliverdin-reduktaza
BCRP	protein dovzetnosti za raka dojke (angl. <i>breast cancer resistance protein</i>)
CRP	reaktivni protein C
CŽS	centralno živčni sistem
DMEM	medij <i>Dulbecco's Modified Eagle's Medium</i>
eNOS	endotelijska NO-sintaza
HDL	lipoproteini visoke gostote
HEB	krvno-možganska pregrada (<i>hemato-encefalna bariera</i>)
BCRP	<i>breast cancer resistance protein</i>
HO	hem-oksigenaza
HO-1/BVR-A	encimski sistem hem-oksigenaza 1 / biliverdin-reduktaza A
IC ₅₀	polovična inhibitorna koncentracija oz. koncentracija inhibitorja, ki zmanjša prenos za 50 % (angl. <i>half maximal inhibitory concentration</i>)
IL-2	interlevkin 2
IL-6	interlevkin 6
INF γ	interferon γ
LDL	lipoproteini nizke gostote
MRP	transporter, odgovoren za neučinkovanje zdravil (angl. <i>multidrug resistance protein</i>)
OAT	družina organskih anionskih prenašalcev
OATP	družina organskih anionskih prenašalcev za polipeptide
P	porazdelitveni koeficient
PKC	protein-kinaza C
SEM	standardna napaka aritmetične sredine (angl. <i>standard error of the mean</i>)
SLC	skupina prenašalcev <i>solute carrier transporter</i>
TBARS	kazalec lipidne peroksidacije (<i>thiobarbituric acid reactive substance</i>)
TNF α	dejavnik tumorske nekroze α
UGT1A1	uridindifosfat-glukuroniltransferaza 1A1

UVOD

1 BILIRUBIN

Bilirubin je produkt katabolizma porfirinskega obroča hema, ki je sestavni del nekaterih hemoproteinov. Največ, kar 80 %, ga nastane iz hemoglobina po razpadu eritrocitov, preostanek pa iz mioglobin, citokromov, katalaz in iz peroksidaz (1). Oksidativni razpad hema katalizira encim hem-oksigenaza (HO), ki se v telesu pojavlja v dveh oblikah – kot inducibilni encim HO-1, čigar indukcijo sprožijo spremembe v okolju (npr. temperaturni šok, oksidativni stres) ali kot konstitutivni encim HO-2. Pri tem razpadu se sprosti ogljikov monoksid (CO), železo (Fe^{2+}) in biliverdin. Slednji se nato z encimom biliverdin-reduktaza (BR) takoj pretvori v bilirubin (2).

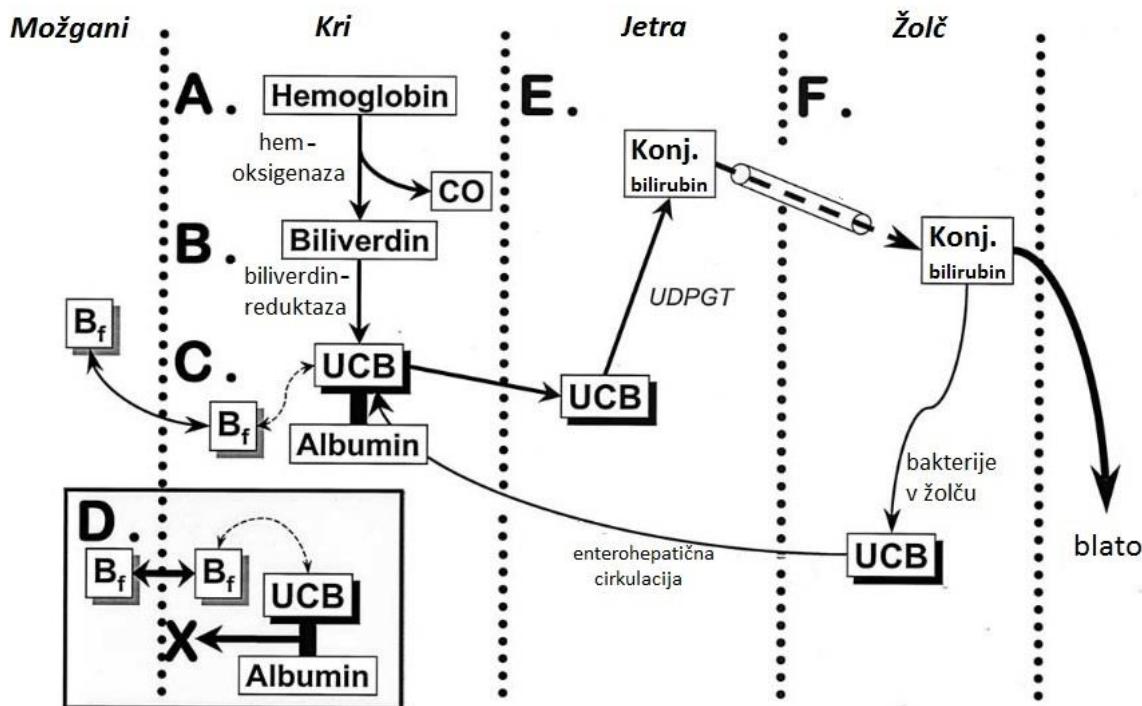


Slika 1: Strukturna formula bilirubina. S kemijskega vidika je bilirubin tetrapirol dikarboksilna kislina, saj je sestavljen iz dveh dipirolnih enot s propionsko kislino, ki sta povezani s tetraedrskim atomom ogljika.

Bilirubin je lipofilna molekula, v fizioloških razmerah zatorej slabo topna v vodi, rumeno oranžne barve z molekulsko maso 584,66 g/mol. Pri zdravih odraslih ljudeh so njegove povprečne vrednosti v krvi med 5,0 in 17,0 μM , kar ustreza 0,3 oz. 1,0 mg/dl. Ob prihodu v kri se nekovalentno veže na protein albumin; tako nastane vodotopen kompleks albumin-bilirubin, ki lahko potuje po krvi. Tej obliki bilirubina pravimo tudi *nekonjugirani bilirubin* ali *indirektni bilirubin*. Nevezanega oz. prostega bilirubina je v krvi zelo malo, pri zdravih odraslih ljudeh okoli 10 nM (3), vendar je v ravnotežju z bilirubinom, vezanim na albumin.

Da se lahko izloči iz telesa, mora bilirubin preiti v jetra. V jetrne celice vstopa skozi sinusoidalno membrano, najverjetneje s pomočjo prenašalnih proteinov – bilitranslokaze (4), drugih predstavnikov organskih anionskih prenašalcev (OAT) ter s pomočjo organskih anionskih prenašalcev za polipeptide (OATP) (5). Iz citosola hepatocita bilirubin preide v gladki endoplazemski retikulum, kjer poteka glukuronidacija s pomočjo encima uridindifosfat-glukuroniltransferaza 1A1 (UGT1A1). Z vezavo glukuronske kisline na bilirubin nastane vodotopen kompleks, v tem primeru bilirubinglukuronid (v obliki mono- in diglukuronida) (6), ki se imenuje tudi *konjugirani bilirubin* ali *direktni bilirubin*. Konjugirani bilirubin je primeren substrat za prenos

z aktivnim transportom preko primarnega aktivnega prenašalca – transporterja, odgovornega za neučinkovanje zdravil (angl. *multidrug resistance protein-2* (MRP2)) v žolčna izvodila (7). Z žolčem se izloči v dvanajstnik, kjer se s pomočjo črevesnih bakterij presnovi do urobilinogena, ki se nato iz telesa izloči z urinom in z blatom.

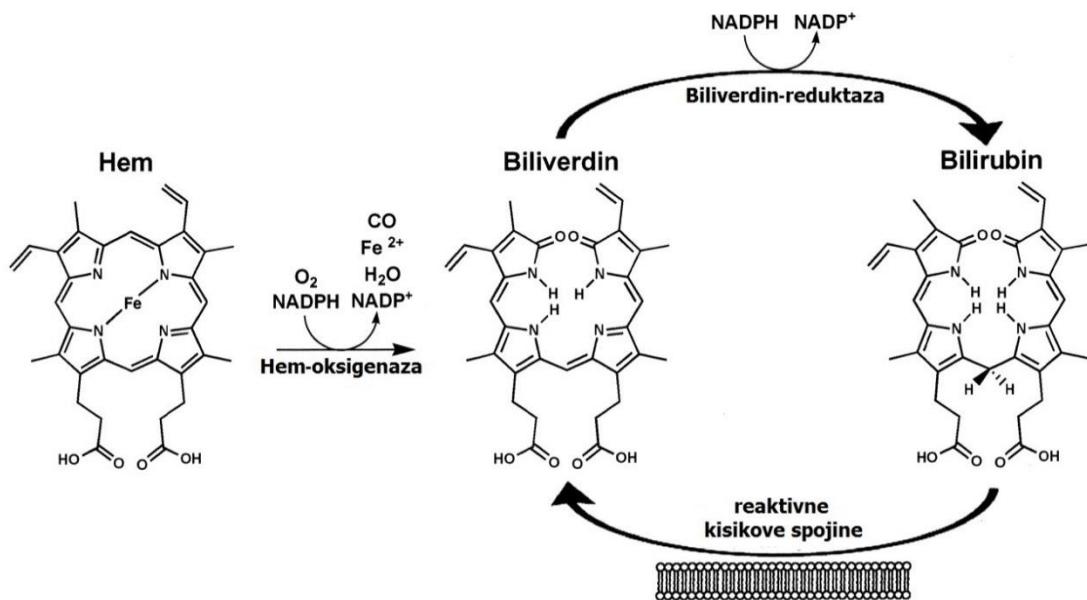


Slika 2: Shematični pregled potovanja bilirubina po organizmu. Biliverdin-reduktaza katalizira pretvorbo netoksičnega biliverdina v nekonjugiran bilirubin (B). Nekonjugiran bilirubin (C) je nepolaren in netopen v vodi, zato se reverzibilno veže na serumski albumin; nekaj malega nekonjugiranega bilirubina pa obstaja v nevezani oz. prosti obliki (Bf). Prav ta Bf lahko prosto prehaja biološke membrane in tako vstopi v možgane, interstrialno tekočino ali v cerebrospinalno tekočino in je lahko nevrotoksičen. Bilirubin, ki je vezan na albumin, v fizioloških razmerah ne more prehajati HEB; to se lahko zgodi le v primeru, ko je HEB poškodovana (D).
Prirejeno po (8).

V telesu je bilirubin zelo pomemben kot antioksidant v procesu lipidne peroksidacije. Bilirubin nastane iz biliverdina, ki je prav tako razpadni produkt hema, s pomočjo biliverdin-reduktaze. Ob neutralizaciji reaktivnih kisikovih zvrsti ali drugih radikalov v manj nevarne kemijske zvrsti se bilirubin vrne v obliko biliverdina. Ta cikel je pripeljal do hipoteze, da je glavna fiziološka vloga bilirubina, da učinkuje kot antioksidant (9–11).

Bilirubin ima tudi protivnetno delovanje. Dokazano je, da so pri bolnikih s stabilno koronarno srčno boleznjijo serumske koncentracije celokupnega bilirubina obratno sorazmerne od resnosti koronarne ateroskleroze. Koncentracija bilirubina v serumu je prav tako obratno sorazmerna od koncentracije reaktivnega proteina C (CRP), razmerja med nevtrofilci in limfociti ter širino

porazdelitve eritrocitov in s tem od napredovanja bolezni. Večje vrednosti celokupnega bilirubina v krvi imajo v nastanku koronarne ateroskleroze protivnetno delovanje (12).



Slika 3: Shematični pregled nastanka biliverdina iz hema ter oksidacijsko-reduksijski cikel bilirubina. Prirejeno po (13).

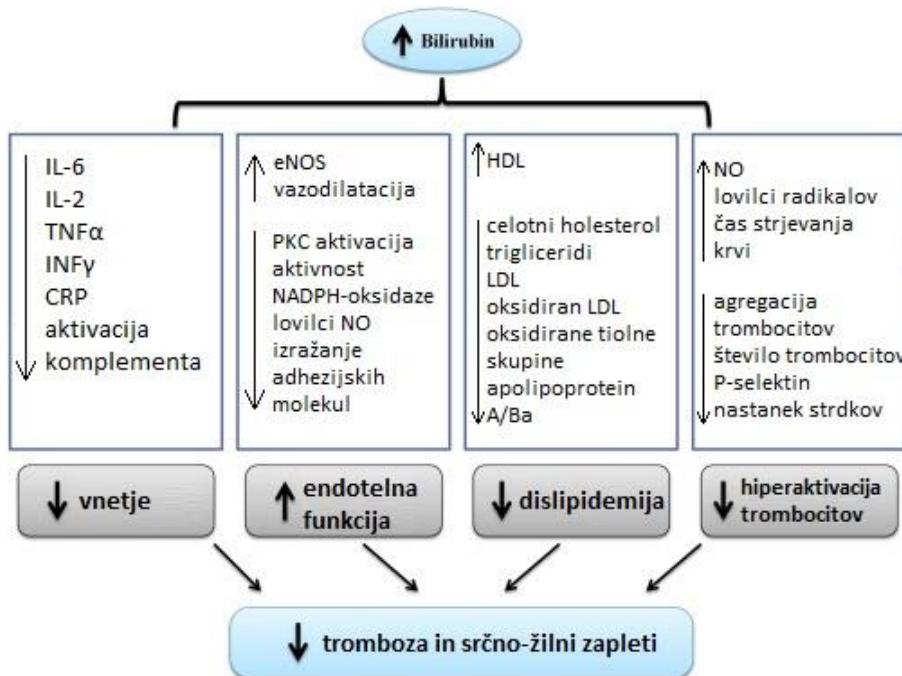
Zaradi njegovega antioksidativnega in protivnetnega delovanja imajo povečane vrednosti bilirubina v krvi zaščitno delovanje (3). Pri posameznikih, ki imajo blago povišane koncentracije bilirubina v krvi, je dokazana manjša incidenca srčno-žilnih bolezni (14, 15) in nekaterih oblik raka (16). Paradoksalno pa zelo velike količine bilirubina v krvi ($> 17 \text{ mg/dl}$ oz. $291 \mu\text{mol/l}$) delujejo nevrotoksično (17), še zlasti pri novorojenčkih, kjer lahko pride do kernikterusa (18), oziroma pri bolnikih z jetrno odpovedjo, kjer lahko pride do hepatične encefalopatije (19).

Glede na dosedanja odkritja o pozitivnih lastnostih bilirubina, je njegov potencial iz vidika razvoja novih zdravilnih učinkov in medicinske diagnostike slabo izkoriščen. V diagnostiki pri odraslih se trenutno uporablja le kot del baterije jetrnih testov za odkrivanje bolezni jeter, žolčnih vodov in anemij. Njegov vpliv na etiopatogenezo drugih bolezni se še raziskuje.

1.1 Gilbertov sindrom

Gilbertov sindrom je nenevarno stanje nehemolitične, nekonjugirane hiperbilirubinemije. Gre za deden, dokaj pogost sindrom, ki se pojavi pri do 5 % celotne populacije, pri katerem je zaradi mutacije v promotorju gena, ki kodira encim UGT1A1, motena konjugacija bilirubina v jetrnih celicah (20). Ljudje s tem sindromom imajo rahlo povečane vrednosti nekonjugiranega bilirubina v krvi; serumske koncentracije celotnega bilirubina so po navadi med 20 in 50 μM , redko pa so višje od 85 μM (21).

Zmerno povišane koncentracije nekonjugiranega bilirubina pri zdravih odraslih ljudeh delujejo protektivno. Dokazano je, da je pri ljudeh z Gilbertovim sindromom bistveno zmanjšano tveganje za srčno-žilne zaplete, še posebej za bolezen koronarnih arterij (22–24). Večina študij dokazuje, da imajo ljudje z večjo količino bilirubina v krvi tudi nižje koncentracije lipidov v krvi (20). Trenutno najbolj splošno sprejet razlog za zaščitno delovanje bilirubina v tej skupini ljudi je, da nekonjugiran bilirubin deluje kot antioksidant; nase lahko veže radikale in s tem ščiti lipide, proteine in druge makromolekule pred oksidacijo (25). Hkrati bilirubin deluje tudi protivnetno in zato upočasnuje nastanek ateroskleroze (12). Spodnja slika prikazuje medsebojno vplivanje mehanizmov, ki pri tem sodelujejo.



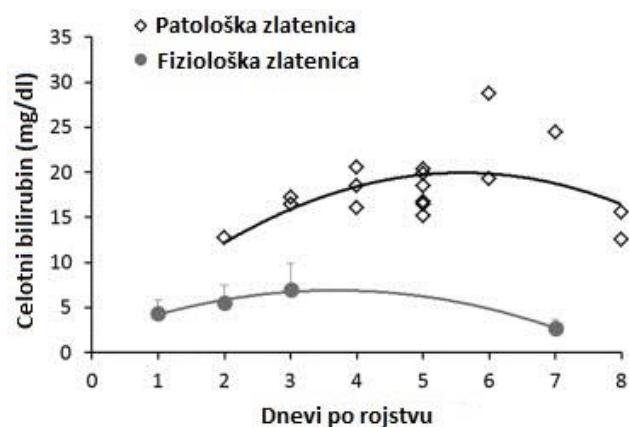
Slika 4: Prikaz vpliva procesov, s katerimi bi večje vrednosti bilirubina lahko zmanjševale tveganje za trombozo in srčno-žilne zaplete; reaktivni protein C (CRP); endotelijska NO-sintaza (eNOS); lipoproteini visoke gostote (HDL); interlevkin 2 (IL-2); interlevkina 6 (IL-6); interferon-γ (INFγ); lipoproteini nizke gostote (LDL); dušikov oksid (NO); protein-kinaza C (PKC); dejavnik tumorske nekroze-α (TNFα). Prirejeno po (20).

1.2 Kernikterus

Zlatenica (lat. *ikterus*) je klinični znak, ki se kaže z rumenkasto obarvanostjo kože, beločnic in vidnih sluznic, kadar se v njih prekomerno nalaga bilirubin (1). Pri novorojenčkih, kot najranljivejši skupini ljudi, zlatenica najpogosteje nastane zaradi povečane količine nekonjugiranega bilirubina v krvi. Poznamo dve stopnji: o prvi, *fiziološki zlatenici*, govorimo, kadar bilirubin v krvi dosega vrednosti do 220 μmol/L. Kadar pa je koncentracija bilirubina v krvi višja od 220 μmol/L in so izključeni vsi drugi vzroki za dvig koncentracije bilirubina (prirojena hemolitična anemija, okužbe), govorimo o *patološki zlatenici*. Slednja lahko pušča hude posledice (26). Zlatenica nastopi

predvsem zaradi povečanega razpada eritrocitov, zaradi neujemanju v Rh faktorju matere in otroka, ali zaradi nezrelega encima UGT1A1 (1). Slednji razlog se pogosteje pojavi pri nedonošenčkih. Na večjo količino nekonjugiranega bilirubina v krvi novorojenčkov vpliva tudi nižja koncentracija albumina v krvi in manjša vezavna kapaciteta za bilirubin pri novorojenčkih v primerjavi z albuminom pri odraslih (27).

Zaradi visoke koncentracije nekonjugiranega bilirubina v krvi ta začne z difuzijo prehajati krvno-možgansko pregrado v obliki prostega bilirubina. Novorojenčki imajo tudi bolj prepustno krvno-možgansko pregrado (8). Zato se bilirubin začne prekomerno kopiti v beli možganovini v področju bazalnih ganglijev, kar lahko povzroči trajne okvare možganov (1). Te se kažejo kot različni nevrološki izpadi, krči, nenormalni refleksi. Novorojenčki postanejo letargični, slabo sesajo, prekomerno jokajo in bruhajo (8). Nezdravljeni hiperbilirubinemiji lahko vodi do akutne bilirubinske encefalopatije (toksično delovanje bilirubina v prvih tednih življenja) in do *kernikterusa*, to je značilna kronična in trajna možganska poškodba, ki nastane zaradi toksičnega delovanja prostega bilirubina (28).



Slika 5: Fizioška in patološka zlatenica. Kljub obarvanosti kože in beločnic novorojenčka (fizioška zlatenica), do patološke zlatenice (ki pušča hude posledice na možganih) pride ob mnogo večjih vrednostih bilirubina. Prijeljeno po (17).

Razlog za prehajanje bilirubina v osrednji živčni sistem je lahko tudi nezrelost krvno-možganske pregrade, ki omogoča prosto prehajanje bilirubina v možgane. Prav to pa je tudi razlog, zakaj so zdrave odrasle osebe s povečanimi vrednostmi bilirubina v krvi zaščitene pred možganskimi okvarami in tako pri njih bilirubin deluje samo protektivno (8).

1.3 Shizofrenija

Shizofrenija je duševna bolezen, ki prizadene približno 1 % populacije (29). Domnevno je eden izmed dejavnikov, ki vplivajo na njen razvoj, oksidativni stres oz. oksidativne poškodbe živčnih celic (30). Glede na dejstvo, da bilirubin deluje antioksidativno, so raziskovalci začeli iskati povezave med količino bilirubina v telesu ter med patofiziologijo shizofrenije. Dokazov, da je shizofrenija povezana z nepravilnostmi v antioksidativnem obrambnem sistemu, je vedno več.

Večina raziskav, ki preučujejo vpliv bilirubina v krvi z etiopatogenezo shizofrenije, potrjuje, da so nihanja v serumskih vrednostih bilirubina povezana s pojavom in resnostjo psihiatričnih simptomov. Vendar pa si raziskovalci med seboj še niso popolnoma enotni, ali imajo osebe s shizofrenijo manjše ali večje vrednosti serumskega bilirubina v primerjavi z zdravimi preiskovanci (31–37).

V svetovni znanstveni literaturi prevladujejo študije, v katerih so raziskovalci našli nižje koncentracije celokupnega serumskega bilirubina pri osebah s shizofrenijo v primerjavi z zdravimi preiskovanci. Rezultati teh študij so v skladu s hipotezo o pomanjkanju antioksidantov pri shizofreniji, kar vodi do oksidativnih poškodb (30–33). Prav tako so pri bolnikih s shizofrenijo v primerjavi z zdravimi preiskovanci izmerili večje vrednosti oksidiranih presnovkov bilirubina, in sicer biopirina v urinu. To potrjuje, da je presnova bilirubina pospešena pri bolnikih s shizofrenijo (34).

V študijah, v katerih so pri bolnikih s shizofrenijo izmerili višje koncentracije serumskega bilirubina, pa le-teh niso primerjali z zdravimi osebami, temveč s preiskovanci, ki so imeli druge duševne bolezni npr. bipolarno motnjo (35, 36).

Najnovejša študija, ki jo je naredil Mabrouk s sodelavci, je preučevala povezavo med prisotnostjo različnih antioksidantov v krvi (bilirubin, albumin in urična kislina) in kazalcem lipidne peroksidacije (TBARS) ter s kliničnimi značilnostmi bolnikov s shizofrenijo pri 121 pacientih in uspešnostjo zdravljenja s tipičnimi in atipičnimi antipsihotiki. Kontrolna skupina je obsegala 88 ljudi. Vsi preiskovanci so bili 12 ur tešči, nato pa so jim odvzeli vzorce venske krvi. Skupina preiskovancev s shizofrenijo je imela signifikantno manjše vrednostni celotnega bilirubina v serumu v primerjavi s kontrolno skupino zdravih posameznikov (37). Zdravljenje z različnimi antipsihotiki ni bistveno vplivalo na koncentracijo bilirubina v krvi (37).

Večina raziskav ni preverjala vpliva antipsihotičnih zdravil na raven antioksidantov v telesnih tekočinah. Vseeno je bilo izvedenih nekaj drugih študij, ki so pokazale, da znižanje parametrov

oksidativnega stresa sovpada s kroničnim jemanjem antipsihotičnih zdravil (38, 39). Vprašanje ostaja, ali je to posledica farmakološkega zdravljenja ali posledica izboljšane klinične slike.

Starejša antipsihotična zdravila, predvsem klorpromazin in njegovi derivati ter haloperidol, so lahko povzročila blažjo, prehodno okvaro jetrne funkcije, ki je nastopila v prvih štirih tednih zdravljenja pri 1-2 % bolnikov. Bolniki so opisovali vročino, bolečino v trebuhu, tresavico. Bolnikom so izmerili povečane vrednosti jetrnih encimov in bilirubina v serumu (40). Vzrok za nastanek zlatenice naj bi bila preobčutljivostna reakcija na antipsihotike, ker je ob zlatenici prišlo tudi do eozinofilije in infiltracije jeter z eozinofilci (41).

1.4 Alzheimerjeva bolezen

Alzheimerjeva bolezen je najbolj pogosta oblika demence pri starejših, ki se kaže kot napredujoča izguba spomina in mišljenja. Te klinične značilnosti so delno posledica povečanja reaktivnih kisikovih in dušikovih zvrsti v osrednjem živčevju, ki delujejo nevrotoksično (29). Regulatorno povečanje aktivnosti encimskega sistema hem-oksiogenaza 1/biliverdin-reduktaza A (HO-1/BVR-A) je eden izmed prvih dogodkov v kaskadi nespecifičnega obrambnega odziva organizma na stres (42).

Tudi tukaj imamo dve hipotezi vključenosti encimskega sistema HO-1/BVR-A v etiopatogenezo Alzheimerjeve bolezni. Ena pravi, da omenjeni encimski sistem deluje nevrotoksično, njej nasprotna pa predvideva, da ta deluje nevroprotективno (42). Raziskovalci so si enotni v razmišljaju o možnosti, da bi bilirubin in njegove derivate ali encimski sistem HO-1/BVR-A lahko uporabili kot diagnostični kazalec za zgodnje odkrivanje te bolezni (43).

Zdravila, ki so trenutno odobrena za zdravljenje Alzheimerjeve bolezni, se pogosto začnejo uporabljati šele v trenutku, ko demenco prepoznajo svojci, to pa je pogosto šele v srednje do pozno napredovani fazi bolezni. Takrat že pride do nepopravljivih možganskih poškodb, zato imajo zdravila manjšo terapevtsko učinkovitost. Prav zato predstavlja diagnoza Alzheimerjeve bolezni v začetnih fazah bolezni ključni korak za pravočasno uporabo preventivnih zdravil, ki bi lahko spremenila ali vsaj upočasnila potek bolezni in ščitila možgane pred nevrodegeneracijskimi poškodbami (42).

Nadaljnje raziskave derivatov bilirubina v cerebrospinalni tekočini bi lahko razjasnile vlogo presnove bilirubina v poškodovanih možganih in tako zagotovile edinstveno orodje za spremljanje stopnje oksidativnega stresa, ki mu je izpostavljeno osrednje živčevje v razmerah *in vivo* (44).

1.5 Biološki kazalec (biomarker) »zdravega življenjskega sloga«

Glede na vse študije, narejene z bilirubinom, lahko rečemo, da je bilirubin oz. njegove serumske vrednosti zelo nespecifičen kazalec. Zaradi svojega antioksidativnega in protivnetnega delovanja je vključen v patofiziologijo vseh bolezni, sindromov in stanj, ki nastanejo zaradi oksidativnega stresa ali vnetnega delovanja.

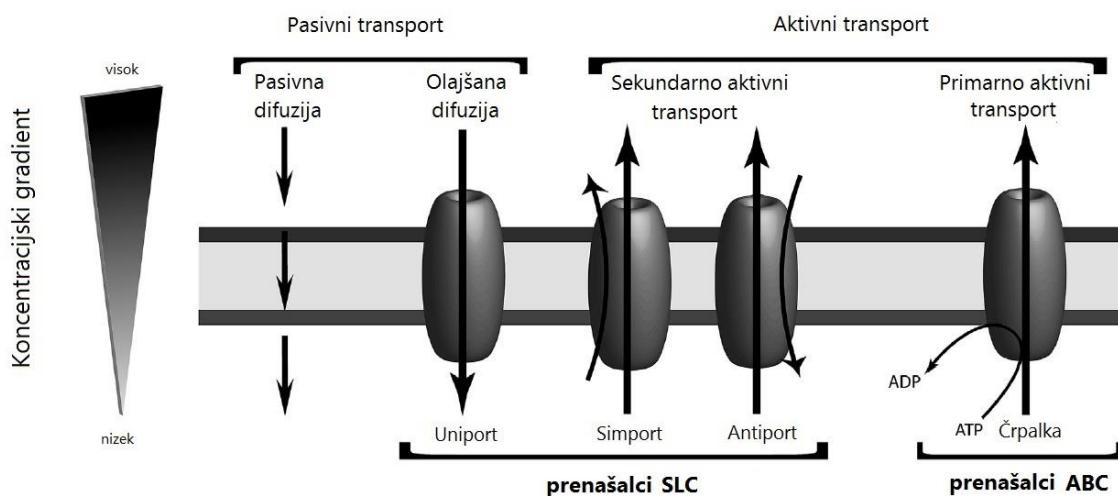
Če pogledamo na njegovo nespecifičnost s pozitivnega vidika, ga lahko predstavimo kot biološki kazalec »zdravega življenjskega sloga«. Znano je, da so manjše vrednosti bilirubina v krvi povezane z debelostjo, s slatkorno boleznijo in z metabolnim sindromom (45). Narejena je bila študija, v kateri so pri asimptomatskih posameznikih v srednjih letih in s prekomerno težo ugotavljalci, ali serumske vrednosti bilirubina padejo že pred začetkom metabolnega sindroma. Skupino preiskovancev z normalno težo so primerjali s skupino s prekomerno težo po koncentraciji bilirubina glede na različne dejavnike tveganja za pojav metabolnega sindroma (inzulinska rezistenca, reaktivni protein C, folna kislina, vitamin C, holesterol, LDL holesterol, trigliceridi, glukoza na tešče, inzulin na tešče, maščobne zaloge) (46). Rezultati študije so pokazali bistveno manjše vrednostni bilirubina v serumu pri prekomerno težkih preiskovancih; ugotovili so celo, da vrednosti bilirubina padajo z večanjem števila dejavnikov tveganja in tako nakazali, da bi serumski bilirubin lahko predstavljal zgodnji kazalec (biomarker) za ugotavljanje zdravstvenega stanja ljudi s povečanim tveganjem za razvoj metabolnega sindroma (46).

2 VRSTE TRANSPORTA

Osnovna struktura biološke membrane je lipidni dvosloj, ki je debel od 5 do 8 nm (50 do 80 Å). Bistvene lastnosti, ki pojasnjujejo funkcijo in delovanje biološke membrane, so fluidnost, asimetričnost, dinamična aktivnost ter selektivna prepustnost. Slednja je ključnega pomena pri prenosu snovi skozi membrano. Biološke membrane (oz. lipidi v njih) so namreč neprepustne za večino polarnih ali ioniziranih molekul, prepustne pa so za majhne, nepolarne spojine. Pravimo, da nepolarne molekule difundirajo skozi membrano, saj se prenašajo s pomočjo enostavne (pasivne) difuzije; transport vseh drugih molekul pa je odvisen od transmembranskih prenašalnih proteinov. Prenašalni proteini ali krajše prenašalci so pravzaprav vratarji celic in organelov, ki nadzirajo privzem in izločanje ključnih spojin, kot so sladkorji, aminokisline, nukleotidi, ioni in zdravila. Prav vsi so integrirani v membrano, zato jim pravimo tudi transmembranski transportni proteini (47).

Transport lahko razdelimo na več načinov. Zagotovo je najbolj splošna delitev na pasivni in aktivni transport. Pod pasivnega uvrščamo vse prehode molekul, kjer se energija ne porablja. Poleg zgoraj omenjene enostavne difuzije, ki poteka samo vzdolž koncentracijskega gradiента in s katero potujejo majhne, nenabite in nepolarne molekule, v to kategorijo uvrščamo tudi akvaporine, ki omogočajo difuzijo molekul vode skozi vodne pore, ter olajšano difuzijo. Za prenos z olajšano (facilitirano) difuzijo celica potrebuje membranske proteine, ki se oblikujejo v transmembranske kanale, ali ionske kanalčke, prenos po prenašalcu pa poteka vzdolž koncentracijskega gradiента (48). Olajšana difuzija je najpogosteji transport za vstop celičnih gradnikov, hrani in zdravil v celico (47).

Molekule lahko s pomočjo aktivnega transporta potujejo tudi proti koncentracijskemu gradiantu, s področja z manjšo koncentracijo na področje z večjo, zaradi tega je to energetsko potraten proces. Transporterji, ki posredujejo aktivni transport, so lahko neposredno sklopljeni s hidrolizo ATP (primarni aktivni transport); lahko pa kot gonilno silo uporabljajo koncentracijski gradient drugih topljencev (določenih ionov; t. i. sekundarni aktivni transport). Ta način prenosa celice izkoriščajo za izločanje njej tujih snovi (npr. zdravilnih učinkovin) (48).



Slika 6: Glavne poti prenosa skozi celično membrano. (1) Pasivna difuzija. Ta način je možen le, če so spojine majhne, lipidotopne, neionizirane in če med obema stranema membrane obstaja koncentracijski gradiant; pri tem se energija ne porablja. (2) Prenos s prenašalnimi proteinimi. Prenos, v katerega je lahko vključen eden ali več prenašalcev, poteka kot privzem (prenašalni proteini SLC) ali kot izločanje (prenašalni proteini ABC) molekul. Ta način je nasitljiv in za ligande specifičen. Lahko poteka pasivno ali primarno/sekundarno aktivno. (i) Prenašalci SLC so glede na smer prenosa lahko: (a) dvosmerni (smer je odvisna od trenutnega gradienta) ali (b) enosmerni (prenos vedno poteka ali v ali iz celice). Poganja jih lahko: (a) zamenjava ene molekule za druge ali (b) ionski gradient (tudi tukaj je smer odvisna od trenutnega gradienta). Razdelimo jih lahko tudi kot: (a) uniporterji (prenos ene molekule); (b) simporterji (prenos dveh ali več različnih molekul/ionov hkrati v isto smer); ali (c) antiporterji (prenos dveh ali več različnih molekul/ionov hkrati v nasprotni smeri). (ii) Prenašalci ABC delujejo kot črpalke, ki iz celic ali organelov v nasprotni smeri koncentracijskega gradienta odstranjujejo molekule, ki so v celico vstopile pasivno. Prirejeno po (49).

2.1 Fizikalno kemijske lastnosti molekul za enostavno difuzijo

Kot rečeno, enostavno difuzijo uporabljajo predvsem lipofilne (nepolarne) molekule. Porazdelitveni koeficient (P), ki mu pravimo tudi koeficient permeabilnosti, opredeljuje, če je molekula dovolj nepolarna (topna v lipidih). Za primerjavo med spojinami vedno uporabljam njegov logaritem (logP).

$$P = \frac{\text{topnost v lipidih}}{\text{topnost v vodi}}$$

Enačba 1: Definicija porazdelitvenega koeficiente P.

Zdravila so večinoma šibke baze ali šibke kisline. Pri tej vrsti molekul je za prenos z enostavno difuzijo pomembna še ena lastnost spojine – stopnja ionizacija (α_i). Lipofilnost je namreč odvisna od stopnje ionizacije molekule. Neioniziran del je tisti, ki je topen v lipidih in tako lažje prehaja skozi membrano.

Na prenos molekule v manjši meri vplivata tudi njena velikost oz. molekulska masa in sposobnost tvorjenja vodikovih vezi (50).

2.2 Prehajanje molekul s prenašalci

Prehajanje molekul s prenašalci je v telesu najbolj pomemben oz. najbolj pogost prenos, saj se z njim prenašajo fiziološko pomembne molekule. To dejstvo s pridom izrabljajo tudi načrtovalci zdravil, saj prenos s prenašalci uporabljajo tudi zdravila, ki so kemijsko podobna endogenim snovem. Drug način kot delitev prenosa na pasivni (olajšana difuzija) in aktivni (primarni, sekundarni) je delitev prenosa glede na prenašalce, ki pri tem procesu sodelujejo. Pri evkariontih prenos poteka preko prenašalcev SLC in ABC.

Prenašalci SLC (angl. *solute carrier transporter* (SLC)) so skupina skoraj 400 prenašalnih proteinov, ki se večinoma nahajajo v celični membrani. Topljenci, ki uporabljajo prenašalne proteine SLC, so izredno raznoliki – vključujejo tako nabite kot nenabite organske molekule, anorganske ione in amoniak. Razdelimo jih lahko v 52 družin; znotraj posamezne družine imajo prenašalci 20-25 % skupne strukture, med družinami pa strukturne podobnosti ni (48). V to skupino so prenašalci uvrščeni glede na njihovo funkcijo in niso evolucijsko povezani. Vsem je skupno, da so integrirani membranski proteini, ki »prevažajo topljenca«. Veljajo za privzemne prenašalce. Za svoje delovanje ne porabljajo energije; snov črpajo v smeri osmotskega gradienta. V skupino prenašalcev SLC tako uvrščamo prenos z olajšano difuzijo ter sekundarni aktivni transport (48). Za

nas najbolj pomembne so naslednje družine prenašalcev: organski anionski prenašalci za polipeptide (OATP, SLCO), organski anionski ali kationski prenašalci (OAT, OCT, SLC22A) in prenašalci za monokarboksilate (MCT, SLC16A).

Prenašalci ABC (angl. *ATP-binding cassette transporters* (ABC)) so transmembranski proteini, ki za svoje delovanje porabljajo energijo, sproščeno pri hidrolizi ATP; substrate črpajo v nasprotni smeri elektrokemijskega gradienta. Skozi zunaj- in znotrajcelične membrane prenašajo širok nabor substratov, kot so presnovni produkti, lipidi, steroli in zdravilne učinkovine. Predstavniki prenašalcev ABC skrbijo za iztok (efluks), kar pomeni, da delujejo kot črpalke, ki toksine in zdravila izločajo iz celice. S farmacevtskega stališča so prenašalci ABC v CŽS pomembni predvsem zato, ker iz osrednjega živčevja izločajo toksine, razgradne produkte in ksenobiotike ter tako vplivajo na koncentracijo učinkovin. V skupino prenašalcev ABC spadajo transporterji, ki posredujejo primarni aktivni transport in ionske črpalke (ATP-aze) (51). Najbolj poznani prenašalci so glikoprotein-P (angl. *P-glycoprotein* (P-gp)), transporterji, odgovorni za neučinkovanje zdravil (MRP, ABCC) in protein dovzetnosti za raka dojke (angl. *breast cancer resistance protein* (BCRP), ABCG2).

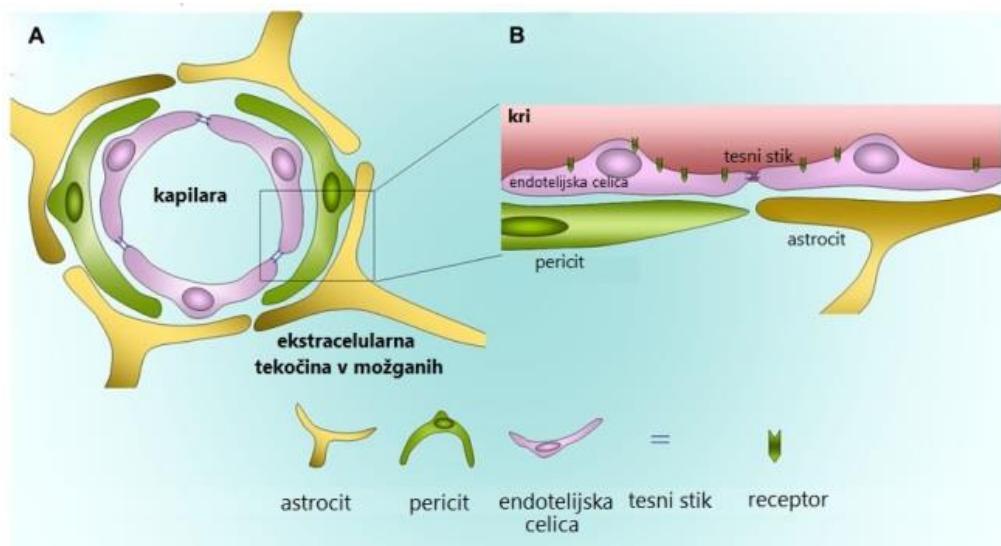
Bilitranslokaza

Bilitranslokaza (TC#2.A.65.1.1) je prenašalni protein, čigar gen v človeškem genomu še ni bil identificiran (4). Spada v skupino prenašalnih proteinov SLC, natančneje v družino organskih anionskih prenašalcev OAT. Je specifični prenašalec za vodotopne organske anione in edini znani prenašalec nukleotidov in nukleotidom podobnih spojin. Vpletena je v prenos bilirubina, soli žolčnih kislin in nekaterih flavonoidov. Ko se je izkazalo, da se bilitranslokaza ne pojavlja samo v jetrnih, pač pa tudi v endotelijskih celicah, je postala zelo zanimiva za nadaljnje raziskave (4).

Najnovejše raziskave so tako pokazale, da sta relativna planarnost in visok potencial za nastanek vodikovih vezi strukturni lastnosti, značilni za vse poznane substrate bilitranslokaze (52).

2.3 Prehajanje snovi skozi HEB

Krvno-možganska pregrada (hemato-encefalna bariera, HEB) je ena izmed treh glavnih pregrad, ki v našem telesu ločuje centralni živčni sistem (CŽS) od drugih organskih sistemov. Poglavitna naloga teh pregrad je omogočanje homeostatskim mehanizmom, da lahko zagotavljajo stalno ionsko sestavo zunajcelične tekočine, ki obdaja nevrone, to pa je pomembno za normalne električne signale. Hkrati so pregrade pomembni členi, ki nadzorujejo prehajanje drugih snovi (npr. zdravil). HEB je med vsemi pregradami največja in zato tudi najbolj raziskana (53).



Slika 7: HEB sestavljajo endotelijske celice, astrociti in periciti. Zanje so značilni tesni stiki, ki predstavljajo bistveno večjo oviro za paracelularni transport molekul kot pri drugih celicah. Tesni stiki so razlog, da glavni prenos snovi poteka transcelularno – najpogosteje to pomeni s pomočjo prenašalnih proteinov (54). Osnovna naloga astrocitov, najštevilčnejših celic v možganih sesalcev, je vzdrževanje primerrega okolja za delovanje nevronov. Zaradi tega astrociti privzemajo kalijeve ione, nevrotransmitorje in druge molekule, kot npr. glukozo in druga hranila. (A) Shema HEB. (B) Povečava. Prirejeno po (55).

Zanimiv je podatek iz baze Comprehensive Medicinal Chemistry (CMS), da med več kot 7000 poznanimi (zabeleženimi) zdravilnimi učinkovinami, le približno 5 % od njih deluje v CŽS.

Lipofilne snovi, kot so npr. plini (kisik, CO_2) ali barbiturati, v možgane prehajajo s transcelularno pasivno difuzijo ali s paracelularno difuzijo. Z vsemi do sedaj znanimi podatki o privzemu snovi v CŽS so naredili študijo, ki opisuje odnos med strukturo in delovanjem. Raziskovalci so prišli do okvirnega zaključka, da HEB najlažje prehajajo učinkovine, ki imajo molekulsko maso ≤ 400 Da; porazdelitveni koeficient, ki opredeljuje lipofilnost, $\log P \leq 5$; število donorjev vodikove vezi ≤ 3 in število akceptorjev vodikove vezi ≤ 7 (56).

Molekule, ki tem pogojem ne ustrezajo, imajo na voljo alternativni prenos – prenos s prenašalci. V HEB se nahajajo prenašalni proteini SLC in ABC. Slednji skrbijo predvsem za izločanje »nepotrebnih« snovi iz možganov, prav tako pa zmanjšujejo tudi vstop snovi, npr. zdravilnih učinkovin. Prenašalni proteini SLC so se najverjetneje razvili z namenom, da HEB lahko privzema hranila in predstojne v sintezi nevrotransmitorjev.

3 FLAVONOIDI

Flavonoidi so razred polifenolnih spojin, ki so pogosto prisotne v sadju, zelenjavi, zeliščih in pijačah rastlinskega izvora. V rastlinah predstavljajo največjo skupino sekundarnih metabolitov; v literaturi je bilo do sedaj opisanih več kot 6000 različnih molekul flavonoidov (57). So poliaromatske molekule, ki nastajajo samo v rastlinah. Glede na strukturo jih delimo na antocianidine, flavanole, flavanone, flavone, flavonole, halkone in izoflavone (58). V naravi jih najpogosteje najdemo v obliki glikozidov, kjer sladkorni del predstavljajo različne molekule sladkorja – glukoza, galaktoza, ramnoza, arabinosa, apioza itd.

So najbolj barvita skupina rastlinskih pigmentov, njihove vloge pa so, da privabljajo oprševalce, uravnavajo rast, zavirajo bakterijske in virusne encime in poleg tega tudi ščitijo rastline pred poškodbami celic in tkiv z UV(B) žarki. Rastline so namreč negibljive, zato nujno potrebujejo UV zaščito.

Flavonoidi se že dolgo časa uporabljajo v ljudski medicini; so namreč sestavni del zdravil z rastlinskimi izvlečki ali produkti žuželk (npr. propolisa, medu) (57).

Številne epidemološke študije kažejo obratno sorazmerje med vnosom flavonoidov (s hrano) in kroničnimi degenerativnimi boleznimi. V ospredju je učinek flavonoidov na zmanjšano tveganje za nastanek bolezni srca in ožilja (59). Dokazana je tudi klinična učinkovitost flavonoidov ob njihovem rednem uživanju – zmanjšujejojo pojavnost nevrodegenerativnih bolezni, sladkorne bolezni, hiperholesterolemije (59) in raka (60, 61). Poleg tega so flavonoidi poznani kot učinkoviti antioksidanti (57).

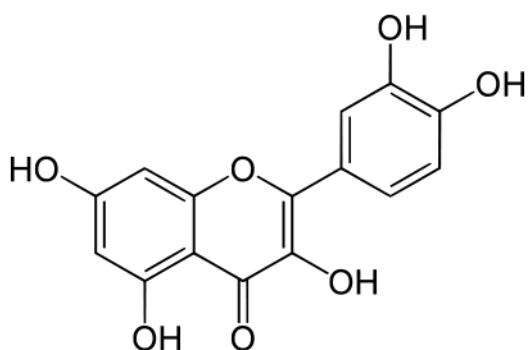
Flavonoidi so hidrofilne spojine (imajo nizek logP) z nizko molekulsko maso, zato je moč predvidevati, da je njihov transport v celice oz. čez lipidno celično membrano omejen na prenašalne proteine (49). O konkretnih prenašalnih proteinih pa vemo bolj malo. Raziskave o prenašalcih otežuje dejstvo, da večina flavonoidov prek membran lahko potuje z različnimi prenašalci. Poročali so, da se flavonoidi iz celic izločajo s predstavniki prenašalnih proteinov ABC (P-gp, MRP1 in BCRP) (49). Prenašanih proteinov, ki posredujejo pri privzemu flavonoidov v celice, pa še ne poznamo. Študije nakazujejo, da bi flavonoidi lahko bili modulatorji organskih anionskih prenašalcev za polipeptide (predvsem OATP1B1) (62), vendar je to področje še neraziskano.

Poznavanje točno določenih prenašalnih proteinov za privzem flavonoidov v celico bi zelo pripomoglo k razumevanju več farmakokinetičnih parametrov. Transmembranski prenašalci namreč vplivajo na absorpcijo, distribucijo in izločanje flavonoidov.

3.1 Kvercetin

Kvercetin je najbolj razširjen predstavnik flavonolov v naši prehrani. Najdemo ga v raznovrstnem sadju, zelenjavi in pijačah rastlinskega izvora; daleč največ ga je v čebuli. Veliko ga je tudi v črnem čaju, zeleni solati (63), kaprah, luštreku, kislici in v redkvicah (64). Njegovo ime izhaja iz latinske besede *quercetum* (hrastov gozd) oz. *quercus* (hrast), saj je bil prvič izoliran prav iz hrasta (65).

Kot drugi flavonoidi se tudi kvercetin v rastlinah nahaja v obliki glikozidov; hiperozid (navadni, enovratni glog), izokvercitrin (lipa, črni bezeg), rutin (črni bezeg, šentjanževka) (58). Čisti kvercetin (aglikonski del) tako ni komponenta hrane, zanimivo pa je, da se skozi črevesje absorbira samo aglikonski del (49).



Slika 8: Strukturna formula kvercetina.

Za privzem kvercetina v hepatocite in endotelijске celice je že dokazano, da se med drugim prenašajo s prenašalnim proteinom bilitranslokazo, ki spada v skupino OAT (66, 67). Najnovejše študije pa nakazujejo, da se kvercetin tudi v možgane privzema s pomočjo prenašalnih proteinov. Obstajajo domneve, da bi to lahko bil kakšen izmed predstavnikov OAT, morda celo bilitranslokaza (49).

NAMEN DELA IN DELOVNE HIPOTEZE

Bilirubin je telesu lastna snov, ki nastaja pri razgradnji eritrocitov. Z namenom, da bi odkrili kakšno posebno vlogo tega razpadnega produkta v človeškem telesu, je bilo narejenih že ogromno raziskav. Do sedaj znani podatki kažejo, da gre za molekulo, ki predvsem s svojim antioksidativnim delovanjem sodeluje v različnih procesih. Med drugim naj bi bilirubin sodeloval v etiopatogenezi več bolezni, prav tako pa rezultati nakazujejo, da bi ga lahko uporabili kot diagnostični kazalec. Pri večini bolezni sicer še vedno ni jasno, ali je njegova spremembra v serumski koncentraciji vzrok ali posledica le-te.

Med neželene učinke starejših antipsihotikov spada tudi zlatenica (40). Zlatenica (rumeno obarvanje kože in beločnic) je simptom, ki nastane zaradi povečanih vrednosti bilirubina v krvi, in je eden od opisanih neželenih učinkov tipičnih antipsihotikov. Želeli smo preveriti, če so povečane vrednosti bilirubina v krvi lahko posledica tekmovanja antipsihotikov za prenos bilirubina prek celične membrane.

Molekula bilirubina je zelo nestabilna molekula, občutljiva na svetlobo, hidrofobna in nagnjena k vezavi na proteine oz. membrane (nespecifična vezava) (68). Preko membran prehaja s pomočjo več prenašalcev, ki še niso popolnoma opredeljeni, in se v jetrnih celicah konjugira z encimom UGT1A1. Izotopa bilirubina, s katerim bi lahko preučevali prehajanje bilirubina skozi membrane, ni na voljo, zato smo pri naših poskusih kot testno substanco uporabili flavonoid kvercetin, ki je bolj stabilen in je na voljo v radioaktivno označeni obliki ^3H -kvercetin. Po znanstveni literaturi sodeč pa naj bi za prehod prek membran uporabljal iste prenašalne proteine kot bilirubin (67).

V magistrskem delu smo želeli preučiti funkcionalne in kinetične lastnosti privzema kvercetina v astrocite novorojene podgane. Preverili smo naslednje delovne hipoteze.

1. Privzem kvercetina je koncentracijsko in temperaturno odvisen proces, ki poteka prek prenašalca.
2. Privzem bilirubina poteka podobno kot privzem kvercetina, zato tudi v astrocitih med seboj tekmujeta za prenašalec.
3. Antipsihotiki vplivajo na privzem kvercetina v astrocite novorojene podgane.

MATERIALI IN METODE

Vsi poskusi so bili izvedeni v laboratoriju Inštituta za farmakologijo in eksperimentalno toksikologijo Medicinske fakultete v Ljubljani.

1 Kemikalije in oprema

Pri delu smo uporabili kemikalije (navedene po abecednem vrstnem redu):

Bilirubin (Sigma, ZDA)

Bio-Rad Protein Assay (Bio-Rad Laboratories GmbH, Nemčija)

CaCl₂ (Sigma, ZDA)

DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium), ki vsebuje aminokisline, soli, glukozo, vitamine, železove ione in pH indikator fenol rdeče (Gibco, ZDA)

DMSO (Merck, Nemčija)

Fetalni goveji serum (FBS) (Lonza, Belgija)

Flufenazin (Sigma, ZDA)

Gentamicin (Gibco, ZDA)

Glukoza (Merck, Nemčija)

Goveji γ -globulin (IgG) (Bio-Rad Laboratories GmbH, Nemčija)

Goveji serumski albumin (BSA) (Sigma, ZDA)

HEPES (Sigma, ZDA)

KCl (Merck, Nemčija)

KH₂PO₄ (Merck, Nemčija)

Klorpromazin (Galenica, Švica)

Klozapin (Sandoz, Nemčija)

[³H]-kvercetin s specifično aktivnostjo 10 Ci/mmol (American Radiolabeled Chemicals, ZDA)

Kvercetin (Sigma, ZDA)

Leibovitz L-15 medij (Sigma, ZDA)

L-glutamin (Gibco, ZDA)

MgSO₄·7H₂O (Sigma, ZDA)

NaCl (Merck, Nemčija)

NaOH (Alkaloid, Makedonija)

Natrijev piruvat (Gibco, ZDA)

Promazin (Sigma, ZDA)

Scintilacijska tekočina Aquasol (Biotechnology systemy NENO Research Products, ZDA)
Tioridazin (Sigma, ZDA)
Triflorpromazin (Sigma, ZDA)
Tripsin EDTA, 0,05 % raztopina (Gibco, ZDA)

Pri delu smo uporabili materiale in opremo (navedeni po abecednem vrstnem redu):

analitska tehtnica (Sartorius, Nemčija)
elektronska pipeta HandyStep® (BrandTech® Scientific, Inc., ZDA)
epruvete in viale (Eppendorf, Avstrija)
hladilnik in zamrzovalnik (Gorenje, Slovenija)
namizna centrifugirka (Sigma 3K18, ZDA)
inkubator (New Brunswick Scientific, ZDA; Binder, Nemčija)
laboratorijske igle (TIK d. o. o., Slovenija)
mikrotitrskie plošče s 96 razdelki (TPP, Švica)
mikrotitrskie plošče z 12 razdelki (TPP, Švica)
nastavki za pipete (Eppendorf, Avstrija)
niteks membrana (ZBF, Švica)
pH meter MA 5735 (Iskra, Slovenija)
plastične posode za gojenje celic s perforiranim zamaškom (TPP, Švica)
polavtomatska pipeta (Eppendorf, Avstrija)
polavtomatska pipeta (Gilson Inc., ZDA)
scintilacijski števec MicroBeta® TriLux (Perkin Elmer, ZDA)
spektrofotometer (Tecan Group Ltd., Švica)
stresalnik Vibromix 10 (Tehnica®, Slovenija)
stresalnik Vibromix 314 (Tehnica®, Slovenija)
svetlobni mikroskop Nikon eclipse TS100 (Nikon®, ZDA)
zaščitna komora z laminarnim pretokom zraka LFVP 12 (Iskra Pio d. o. o., Slovenija)

Sestava preparacijskega medija:

50 ml Leibovitz L-15 medij (osnova)
50 µl gentamicin
50 mg BSA

Sestava medija za gojenje astrocitov (v nadaljevanju hranični medij):

50 ml DMEM (osnova)

50 µl gentamicin

500 µl piruvata

500 µl L-glutamina

5 ml FBS

Sestava pufrja za privzem kvercetina:

25 mM HEPES

125 mM NaCl

4,8 mM KCl

1,2 mM KH₂PO₄

1,2 mM MgSO₄

5,6 mM glukoza

+ 1,7 mM CaCl₂

pH uravnamo z 10 M NaOH do pH 7,4

2 Priprava celičnih kultur astrocitov

Za pripravo celičnih kultur astrocitov smo se zgledovali po metodi Schwartzove in Wilsonove (69).

Celične kulture astrocitov smo pripravili iz možganske skorje novorojenih podgan seva Wistar, vzgojenih v hlevčku Inštituta za farmakologijo in eksperimentalno toksikologijo Medicinske fakultete v Ljubljani. Mladiči so bili obeh spolov, ob začetku priprave kultur so bili stari do 3 dni.

Vse postopke na živalih smo izvedli skladno z dovoljenjem Veterinarske uprave Republike Slovenije za izvajanje poskusov na živalih (številka dovoljenja U34401-4/2014/4) in s smernicami za delo s poskusnimi živalmi, ki jih je izdal Komite za zaščito živali (National Institutes of Health, Bethesda, ZDA). Dekapitacijo poskusnih živali in pripravo primarnih celičnih kultur je izvedel ustrezno usposobljen laboratorijski tehnik.

Po dekapitaciji podgan smo iz lobanje vzeli možgane in jih potopili v medij Leibovitz L-15. Sprva smo jim odstranili možganske ovojnice, nato pa od drugih delov možganov izolirali možgansko skorjo. To smo mehansko zdrobili v 4 ml preparacijskega medija s pomočjo centrifuge (4 minute, 1200 obratov/min, sobna temperatura), nato pa še homogenizirali s pomočjo pipet in injekcijskih igel padajočih premerov (G 20, 22, 25). Homogenizat tkiva smo preko najlonske mrežice (s

premerom por 0,75 µm) prenesli v posodo za centrifugiranje in ga še enkrat izpostavili centrifugi (pod enakimi pogoji kot prvič), da je mehko možgansko tkivo popolnoma razpadlo. Supernatant smo zavrgli, sediment pa prenesli v gojilno posodo, kamor smo dodali tudi hranilni medij. Z mikroskopom smo preverili, če smo celice dobro suspendirali. Gojilno posodo s celicami smo nato prenesli v inkubator (temperatura 37 °C, 95 % zraka iz prostora, 5 % CO₂).

Po 5 dneh smo celicam v gojilni posodi zamenjali hranilni medij in jih pod enakimi pogoji v inkubatorju gojili do konfluence. Po doseženi konfluenci smo celicam najprej zamenjali hranilni medij, nato pa jih 20 ur stresali na sobni temperaturi s hitrostjo 150 obratov/minuto. Sledila je menjava hranilnega medija in ponovno stresanje. Postopek smo ponovili trikrat. S stresanjem smo dosegli ločitev astrocitov od celic mikroglije, ki se na steno posod pritrdijo manj učinkovito kot astrociti.

Tudi po zadnjem, tretjem stresanju celic smo astrocite sprali s hranilnim medijem in tako odstranili preostanek celic mikroglije. V gojilno posodo smo dodali 0,05 % raztopino tripsin-EDTA, ki tudi astrocite odlepi od sten gojilne posode, in jo 20 minut inkubirali (temperatura 37 °C, 95 % zraka iz prostora, 5 % CO₂). Ko smo gojilne posode vzeli iz inkubatorja, smo jih močno pretresli. Pod mikroskopom smo preverili, če so se vsi astrociti odcepili od sten posode.

Celice smo nato razdelili v dve gojilni posodi in jim tako omogočili nadaljnjo rast. Dodali smo jim hranilni medij in jih ponovno postavili v inkubator (temperatura 37 °C, 95 % zraka iz prostora, 5 % CO₂). Po 24 urah smo zamenjali hranilni medij in tako odstranili tripsin, ki bi preprečeval pritrjevanje celic na posodo. Gojilni posodi smo postavili nazaj v inkubator in celice gojili do ponovne konfluence.

Ko so celice drugič postale konfluentne, smo jih nasadili na mikrotitrskie plošče z 12 ločenimi vdolbinami. Iz sten gojilnih posod smo jih odlepili z enakim postopkom kot ob prvi konfluenci, s pomočjo 0,05 % raztopine tripsin-EDTA, nato pa jih prenesli na 8 mikrotitrskih plošč. Plošče s celicami smo postavili v inkubator (temperatura 37 °C, 95 % zraka iz prostora, 5 % CO₂).

Po 24 urah smo astrocitom zamenjali hranilni medij, nato pa jih inkubirali do konfluence. Takrat so celice postale pripravljene za izvajanje poskusov.

3 Privzem ^3H -kvercetina v celične kulture astrocitov

3.1 Časovna odvisnost

Mikrotitrskim ploščam (z 12 ločenimi vdolbinami) s celičnimi kulturami astrocitov smo odlili hranilni medij. Vsako vdolbino smo dvakrat sprali z 1 ml pufra za privzem, ki je vseboval tudi CaCl_2 . Nato smo v vsako vdolbinico dodali 540 μl pufra za privzem s CaCl_2 ustrezne temperature (37°C ali 4°C) in 60 μl 10 nM radioaktivno označenega ^3H -kvercetina.

Po dodatku ^3H -kvercetina smo testne plošče inkubirali pri ustreznih temperaturah (37°C in 4°C) v časovnih intervalih od 2 do 30 minut. V tem času je potekal privzem kvercetina. Potem smo mikrotitrskie plošče postavili na led in vsako vdolbino štirikrat sprali z 1 ml hladnega pufra za privzem brez CaCl_2 . S tem smo ustavili reakcijo. Nato smo celice lizirali s 300 μl 0,5 M NaOH in 10 minutnim stresanjem na stresalniku s hitrostjo 200 obratov/min.

Po stresanju na stresalniku smo iz vsake vdolbinice mikrotitrskie plošče odpipetirali 250 μl lizata, ki smo ga uporabili za določitev privzema ^3H -kvercetina, preostanek lizata iz plošč pa smo shranili pri temperaturi -20°C in ga kasneje uporabili za določitev koncentracije proteinov.

3.2 Koncentracijska odvisnost

Mikrotitrskim ploščam z astrociti smo odlili hranilni medij in vsako vdolbinico dvakrat sprali z 1 ml pufra za privzem, ki je vseboval tudi CaCl_2 . Nato smo v vsako vdolbinico dodali pufer za privzem s CaCl_2 ustrezne temperature (37°C in 4°C) in naraščajoče koncentracije kvercetina, kot je prikazano v preglednici I.

Preglednica I: Količina substanc, dodanih pri določanju koncentracijske odvisnosti privzema ^3H -kvercetin v astrocite novorojene podgane pri temperaturah 37°C in 4°C .

koncentracija kvercetina v vzorcu (nM)	pufer za privzem s CaCl_2 (μl)	^3H -kvercetin	neoznačen kvercetin
10	540	60 μl 10^{-7} M	-
20	480	60 μl 10^{-7} M	60 μl 10^{-7} M
50	516	60 μl 10^{-7} M	24 μl 10^{-6} M
100	486	60 μl 10^{-7} M	54 μl 10^{-6} M
200	426	60 μl 10^{-7} M	114 μl 10^{-6} M
300	366	60 μl 10^{-7} M	174 μl 10^{-6} M
500	410	60 μl 10^{-7} M	30 μl 10^{-5} M
750	495	60 μl 10^{-7} M	45 μl 10^{-5} M
1000	480	60 μl 10^{-7} M	60 μl 10^{-5} M

1500	450	$60 \mu\text{l } 10^{-7} \text{ M}$	$90 \mu\text{l } 10^{-5} \text{ M}$
2000	420	$60 \mu\text{l } 10^{-7} \text{ M}$	$120 \mu\text{l } 10^{-5} \text{ M}$

Po dodatku kvercetina smo testne plošče 2 minuti inkubirali pri temperaturi 37°C oz. 4°C . V tem času je potekal privzem kvercetina. Po preteklem času smo mikrotitrskie plošče postavili na led. Sledilo je štirikratno spiranje celic z 1 ml hladnega pufra za privzem brez CaCl_2 in liziranje celic s $300 \mu\text{l } 0,5 \text{ M NaOH}$ ter 10 minutno stresanje na stresalniku s hitrostjo 200 obratov/min. Postopek je bil v nadaljevanju enak prejšnjemu.

3.3 Vpliv bilirubina na privzem ^3H -kvercetina

Mikrotitrskim ploščam z astrociti smo, kot vedno, najprej odlili hranični medij in vsako vdolbinico dvakrat sprali z 1 ml pufra za privzem s CaCl_2 . Nato smo v vsako vdolbinico odpipetirali $480 \mu\text{l}$ pufra za privzem s CaCl_2 ter naraščajoče koncentracije bilirubina, kot je prikazano v preglednici II. Plošče smo inkubirali 2 minuti, nato pa v vsako vdolbinico dodali še $60 \mu\text{l } 10^{-7} \text{ M}$ radioaktivno označenega ^3H -kvercetina.

Preglednica II: Količina substanc, dodanih pri določanju vpliva bilirubina na privzem ^3H -kvercetina v astrocite novorojene podgane pri temperaturi 37°C .

koncentracija izotopa v vzorcu (nM)	pufer za privzem s CaCl_2 (μl)	bilirubin (pripravljena koncentracija)	^3H -kvercetin
- (slepi vzorec)	600	-	-
10 (kontrola)	540	-	$60 \mu\text{l } 10^{-7} \text{ M}$
10	480	$60 \mu\text{l } 10^{-10} \text{ M}$	$60 \mu\text{l } 10^{-7} \text{ M}$
10	480	$60 \mu\text{l } 10^{-9} \text{ M}$	$60 \mu\text{l } 10^{-7} \text{ M}$
10	480	$60 \mu\text{l } 10^{-8} \text{ M}$	$60 \mu\text{l } 10^{-7} \text{ M}$
10	480	$60 \mu\text{l } 10^{-7} \text{ M}$	$60 \mu\text{l } 10^{-7} \text{ M}$
10	480	$60 \mu\text{l } 10^{-6} \text{ M}$	$60 \mu\text{l } 10^{-7} \text{ M}$
10	480	$60 \mu\text{l } 10^{-5} \text{ M}$	$60 \mu\text{l } 10^{-7} \text{ M}$

Poskus je potekal pri temperaturi 37°C , v popolni temi, saj je bilirubin zelo občutljiv na svetlobo (fotosenzibilen).

Po dodatku kvercetina smo testne plošče inkubirali še 2 minuti. Po preteklem času smo mikrotitrskie plošče postavili na led. Sledilo je štirikratno spiranje celic z 1 ml hladnega pufra za privzem brez CaCl_2 in liziranje celic s $300 \mu\text{l } 0,5 \text{ M NaOH}$ ter 10 minutno stresanje na stresalniku s hitrostjo 200 obratov/min. Postopek je bil v nadaljevanju enak prejšnjemu.

3.4 Vpliv antipsihotikov na privzem ^3H -kvercetina

Mikrotitrskim ploščam smo tudi tokrat odlili hranilni medij in vsako vdolbinico dvakrat sprali z 1 ml pufra za privzem s CaCl_2 . Nato smo v vsako vdolbinico odpipetirali 480 μl pufra za privzem s CaCl_2 ter naraščajoče koncentracije antipsihotika (klorpromazina, klozapina, flufenazina, promazina, tioridazina ali triflupromazina). Plošče smo inkubirali 2 minuti, nato pa v vsako vdolbinico dodali še 60 μl 10^{-7} M radioaktivno označenega ^3H -kvercetina.

Preglednica III: Količina substanc, dodanih pri določanju vpliva več antipsihotikov na privzem ^3H -kvercetina v astrocite novorojene podgane pri temperaturi 37 °C.

koncentracija izotopa v vzorcu (nM)	pufer za privzem s CaCl_2 (μl)	antipsihotik (pripravljena koncentracija)	^3H -kvercetin
- (slepi vzorec)	600	-	-
10 (kontrola)	540	-	60 μl 10^{-7} M
10	480	60 μl 10^{-9} M	60 μl 10^{-7} M
10	480	60 μl 10^{-8} M	60 μl 10^{-7} M
10	480	60 μl 10^{-7} M	60 μl 10^{-7} M
10	480	60 μl 10^{-6} M	60 μl 10^{-7} M
10	480	60 μl 10^{-5} M	60 μl 10^{-7} M
10	480	60 μl 10^{-4} M	60 μl 10^{-7} M

Po dodatku kvercetina smo testne plošče inkubirali še 2 minuti. Reakcijo smo ustavili s postavitvijo plošč na led. Sledilo je štirikratno spiranje celic z 1 ml hladnega pufra za privzem brez CaCl_2 in iziranje celic s 300 μl 0,5 M NaOH ter 10 minutno stresanje na stresalniku s hitrostjo 200 obratov/min. Postopek je bil v nadaljevanju enak prejšnjemu.

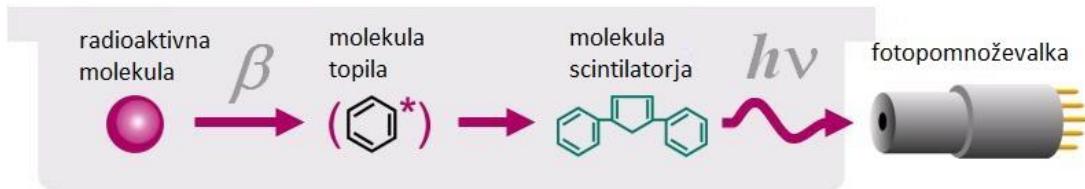
Vsi poskusi so bili narejeni v treh paralelah in v najmanj dveh ponovitvah.

4 Določanje privzetega ^3H -kvercetina

Količino privzetega kvercetina v astrocite smo določali s tekočinskim scintilacijskim števcem (LSC) MicroBeta Trilux (Perkin Elmer, ZDA), aparatom za ugotavljanje količine radioizotopov. Za pravilen potek merjenja je bilo treba vsakemu vzorcu dodati scintilacijsko tekočino, ki jo sestavljajo aromatska topila in scintilatorji.

Metoda LSC temelji na razpadu radioaktivno označene molekule, v našem primeru ^3H -kvercetina. Ob radioaktivnem razpadu se sprosti energija, ki se preko vzbujenega stanja molekul aromatskih topil prenese na drugo komponento scintilacijske tekočine – scintilatorje, ki prav tako preidejo v

vzbujeno stanje. Scintilatorji ob vračanju v osnovno stanje oddajajo energijo v obliki svetlobnega impulza. Svetlubo zazna fotopomnoževalka, ki jo spremeni v električni impulz, ga ojača in nato usmeri v števec. Števec nam kot rezultat poda število razpadov na minuto (*decays per minute, DPM*) (70).



Slika 9: Shematski pregled scintilacijskega procesa. Pritejeno po (70).

Tudi naše meritve so potekale na podoben način. 250 µl vsakega vzorca smo odpipetirali v Eppendorfove epruvete, namenjene testiranju na aparatu MicroBeta Trilux. V epruvete smo dodali 1,5 ml scintilacijske tekočine Aquasol in jih zelo dobro premešali s stresalnikom Vibromix. Meritve je aparat opravil pri sobni temperaturi in atmosferskem tlaku.

Koncentracijo ${}^3\text{H}$ -kvercetina v 250 µl vzorca smo izračunali po enačbi 2; specifična aktivnost ${}^3\text{H}$ -kvercetina je 10 Ci/mmol, 1 Ci pa predstavlja $2,22 \times 10^{12}$ DPM.

$$c \text{ (nmol)} = \frac{DPM}{\text{specifična aktivnost izotopa} \left(\frac{\text{Ci}}{\text{nmol}} \right)}$$

Enačba 2: Izračun koncentracije ${}^3\text{H}$ -kvercetina v vzorcu.

5 Določanje koncentracije proteinov

Tekočinski scintilacijski števec nam pove število privzetega kvercetina. Za realne vrednosti privzema in natančnejšo ocenitev vpliva inhibitorjev na privzem kvercetina pa potrebujemo še podatek o količini proteinov, ki je merilo za število celic, prisotnih v posameznem vzorcu. Med posameznimi vzorci se število astrocitov lahko zelo razlikuje. Podatek najelegantneje dobimo z določitvijo koncentracije proteinov z metodo po Bradfordu.

Najprej smo pripravili vzorce za določitev umeritvene krivulje – slepi vzorec ter raztopine liofiliziranega govejega plazemskega γ -globulina (Bio-Rad Protein Standard I) v koncentracijah 0,5 µg/ml; 1,0 µg/ml; 1,6 µg/ml; 2,0 µg/ml; 4,0 µg/ml; 10,0 µg/ml. Vsem smo dodali obarvani

reagent Bio-Rad Protein Assay (raztopina fosforne kisline in metanola) in jih pustili stati 30 minut, nato pa smo s spektrometrijo zmerili absorbanco pri valovni dolžini 595 nm.

Hkrati smo pripravili tudi naše vzorce – vsak je vseboval 8 µl lizata, 152 µl vode in 40 µl obarvanega reagenta. Dobro smo jih zmešali in prav tako pustili 30 minut, nato pa s spektrometrijo zmerili absorbanco pri valovni dolžini 595 nm.

Določitev koncentracije proteinov v vzorcih in umeritveni krivulji smo naredili v dveh paralelah.

6 Analiza podatkov

Podatke smo analizirali in jih podali v obliki grafov s pomočjo računalniškega programa GraphPad Prism, verzija 6.0 (GraphPad Software Inc., ZDA). Vsi rezultati privzema ^3H -kvercetina so prikazani kot vsebnost privzetega ^3H -kvercetina (pmol/mg proteinov). Pri poskusih s substancami, ki vplivajo na količino privzetega kvercetina (bilirubin, antipsihotiki), so rezultati prikazani kot odstotek privzema ^3H -kvercetina v prisotnosti testne substance v primerjavi s privzemom ^3H -kvercetina v istih pogojih, brez dodanih testnih substanc.

Vsi poskusi privzema ^3H -kvercetina so bili narejeni v treh paralelah in ponovljeni vsaj dvakrat. Rezultate smo podali kot aritmetično sredino \pm standardna napaka aritmetične sredine (angl. *standard error of the mean (SEM)*).

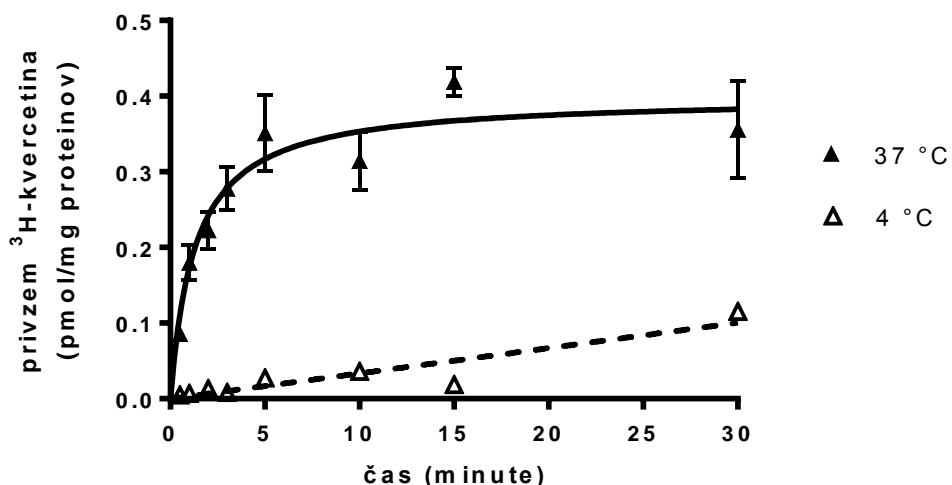
Stopnjo statistično pomembne razlike med vzorci je predstavljala vrednost p, ki je znašala $p \leq 0,05$. Zračunali smo jo s pomočjo Studentovega t-testa, če smo primerjali dva vzorca med seboj, ali z enosmerno analizo variance (angl. *one-way ANOVA*) z Dunnettovim post-hoc testom, če smo več vzorcev primerjali z isto kontrolno skupino.

REZULTATI

1 Kinetične lastnosti privzema ^3H -kvercetina

V prvem delu poskusov smo preučevali kinetične lastnosti privzema radioaktivno označenega ^3H -kvercetina v astrocite novorojene podgane. Opazovali smo vpliv časa, temperature in koncentracije kvercetina na njegov privzem.

Z merjenjem privzema kvercetina pri različnih časih inkubacije smo določili optimalne pogoje za izvajanje nadaljnjih poskusov. Poskus smo izvedli pri temperaturi $4\text{ }^\circ\text{C}$ in v fizioloških razmerah, pri temperaturi $37\text{ }^\circ\text{C}$. Inkubacija s kvercetinom je potekala v časovnih intervalih od 2 do 30 minut.



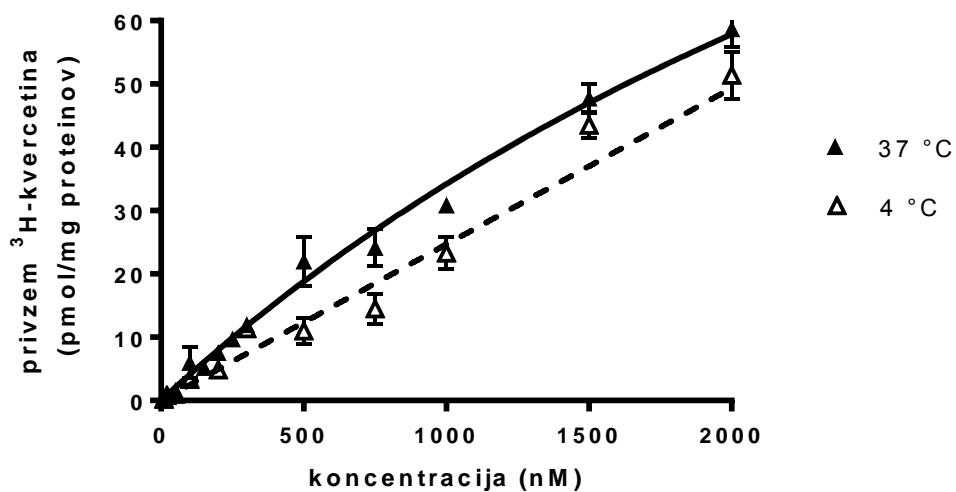
Slika 10: Časovna odvisnost privzema ^3H -kvercetina v astrocite novorojene podgane. Privzem je potekal v mediju s fiziološkim pH (7,4) pri temperaturah $37\text{ }^\circ\text{C}$ (polni simboli) in $4\text{ }^\circ\text{C}$ (prazni simboli), pred meritvijo pa smo 10 nM ^3H -kvercetin inkubirali v časovnih intervalih od 2 do 30 minut. Točke na grafu predstavljajo povprečno vrednost meritev \pm SEM ($n = 6$), krivulja ponazarja nelinearno regresijo.

Privzem kvercetina v celične kulture astrocitov je bil časovno odvisen proces pri obeh opazovanih temperaturah. Količina privzetega kvercetina pri temperaturi $37\text{ }^\circ\text{C}$ je s časom naraščala prvih 5 minut, nato pa je dosegl plato. Ugotovimo lahko, da je bil proces nasitljiv. Količina privzetega kvercetina po 5 minutah inkubacije je bila $0,323\text{ pmol/mg proteinov}$, po 15 minutah pa $0,368\text{ pmol/mg proteinov}$.

Zanemarljiv privzem pri temperaturi $4\text{ }^\circ\text{C}$ kaže na nespecifičen privzem kvercetina. Bil je linearen in ne glede na čas inkubiranja ni kazal nasitljivosti.

Tudi koncentracijsko odvisnost privzema kvercetina smo izvedli v fizioloških razmerah (pri temperaturi 37 °C) in v razmerah, nezdružljivih z življenjem (pri temperaturi 4 °C). Slednje so nas zanimali predvsem zato, ker pri temperaturi 4 °C procesi, odvisni od ATP, kamor sodi tudi aktivni transport, ne morejo potekati; poleg tega ne poznamo specifičnega inhibitorja privzema kvercetina.

Celične kulture astrocitov novorojene podgane smo 2 minuti inkubirali z različnimi koncentracijami kvercetina (10 nM – 2000 nM) pri dveh različnih temperaturah.



Slika 11: Koncentracijska odvisnost privzema ^3H -kvercetina v astrocite novorojene podgane. Privzem je potekal v mediju s fiziološkim pH pri temperaturi 37 °C (polni simboli) in 4 °C (prazni simboli). Točke na grafu predstavljajo povprečno vrednost meritev \pm SEM ($n = 6$), krivulja ponazarja nelinearno regresijo. Razlika med privzemoma ni statistično značilna.

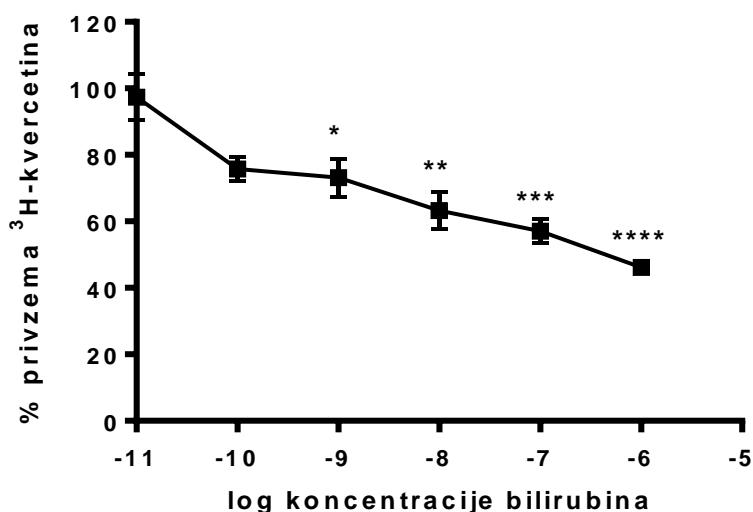
Iz slike 11 je razvidno, da je bil privzem kvercetina koncentracijsko odvisen pri obeh temperaturah. Pri temperaturi 4 °C je bila korelacija med količino privzete substance in koncentracijo linear. Proses je potekal z enostavno difuzijo. Zaradi manjše razpoložljivosti radioaktivno označenega reagenta smo poskuse naredili le do koncentracije 2 μM ; v tem koncentracijskem območju pa v nobenem primeru proces ni bil nasitljiv, saj nobena krivulja ni dosegla platoja, kar kaže na obstoj transporterja z veliko kapaciteto. Računalniška analiza eksperimentalnih rezultatov kinetike privzema je pokazala, da je privzem kvercetina pri temperaturi 37 °C potekal skladno z Michaelis-Mentenovo kinetiko. Michaelis-Mentenova konstanta privzema (K_M) je znašala $4,5 \pm 1,6 \mu\text{M}$; maksimalno kapaciteta privzema je bila 188 pmol/mg proteinov; maksimalna hitrost (V_{\max}) privzema pa je bila 94 pmol/mg proteinov/minuto.

Glede na to, da pri temperaturi 4 °C aktivni transport ne poteka in da med količino privzetega kvercetina v isti točki med obema temperaturama ni bilo statistično značilne razlike, lahko sklepamo, da se kvercetin v celične kulture astrocitov ne privzema s procesom, odvisnim od ATP.

2 Funkcionalne lastnosti privzema ^3H -kvercetina

Vse dosedanje funkcionalne študije kažejo na to, da naj bi se kvercetin in bilirubin v celice privzemala na isti način oz. celo s pomočjo istega prenašalnega proteina (67). Zanimalo nas je, če to velja tudi za privzem v astrocite, zato smo izvedli poskus na astrocitih, ki bi dokazal, da bilirubin inhibira privzem kvercetina.

Naredili smo poskus, kjer smo v fizioloških razmerah (pH 7,4; temperatura 37 °C) opazovali, kaj se dogaja s privzemom označenega kvercetina v prisotnosti različnih koncentracij bilirubina. Ker je molekula bilirubina zelo občutljiva na svetlobo, je poskus potekal v popolni temi.



Slika 12: Vpliv naraščajočih koncentracij bilirubina na privzem ^3H -kvercetina v astrocite novorojene podgane. Privzem je potekal v fizioloških razmerah (pH 7,4; temperatura 37 °C). Koncentracije bilirubina so podane z logaritmom koncentracije bilirubina v vzorcu. Točke na grafu predstavljajo povprečno vrednost meritev \pm SEM ($n = 9$), krivulja ponazarja nelinearno regresijo. Statistično pomembna razlika je bila izračunana z enosmerno analizo variance in z Dunnettovim post-hoc testom: * za $p = 0,0096$; ** za $p = 0,0031$; *** za $p = 0,0006$; **** za $p < 0,0001$.

Vpliv bilirubina na privzem kvercetina v astrocite smo na sliki 12 prikazali kot odstotek privzema kvercetina glede na vrednosti privzema kvercetina v kontrolnem vzorcu.

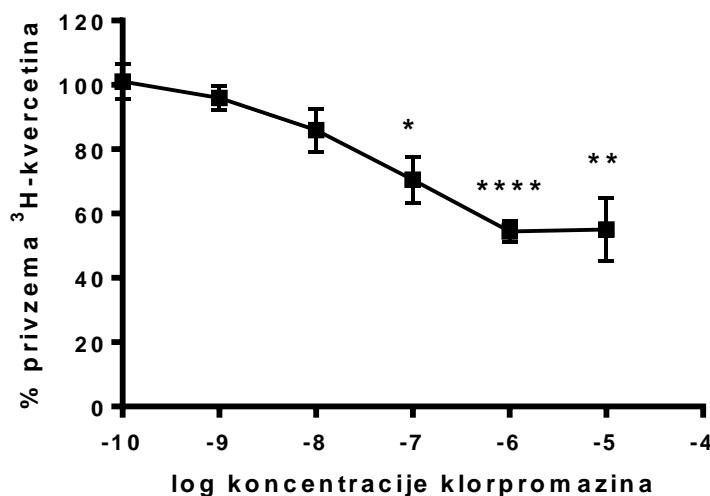
Iz grafa lahko razberemo, da odstotek privzema kvercetina pada sorazmerno z naraščajočimi koncentracijami dodanega bilirubina. Najmanjša koncentracija (10^{-11} M bilirubina v vzorcu) skorajda ni imela vpliva na privzem kvercetina – dodatek bilirubina je zmanjšal privzem kvercetina

za le 2,7 %. Ob naslednjih koncentracijah bilirubina pa je začel privzem sorazmerno padati, tako je znašal privzem kvercetina pri koncentraciji 10^{-8} M bilirubina v vzorcu 63,3 % v primerjavi s kontrolo, pri 10^{-7} M bilirubina v vzorcu (kar je ista koncentracija kot koncentracija ^3H -kvercetina) pa 57,0 %. Fiziološke koncentracije bilirubina v serumu (μM) so signifikantno ($p < 0,0001$) inhibirale privzem kvercetina v astrocite. Bilirubin je privzem kvercetina zavrl z $\text{IC}_{50} 1,24 \cdot 10^{-9}$ M.

2.1 Vpliv antipsihotikov na privzem ^3H -kvercetina

Zlatenica (rumeno obarvanje kože in beločnic) je simptom, ki nastane zaradi povečanih vrednosti bilirubina v krvi, in je eden od opisanih neželenih učinkov tipičnih antipsihotikov (40). Vzrok bi lahko bila poškodba jeter (hepatotoksičnost) zaradi antipsihotikov oz. njihove presnove ali pa kot posledica interakcije na nivoju membranskih prenašalcev na hepatocitih (41). Ker predpostavljamo, da se bilirubin in kvercetin v celice privzemata na isti način, smo pri naslednjem poskusu spremajali vpliv antipsihotikov na privzem kvercetina v astrocite. Preskusili smo 6 antipsihotikov, od tega 5 predstavnikov tipičnih antipsihotikov (klorpromazin, flufenazin, tioridazin, promazin in triflupromazin), ter klozapin, predstavnika atipičnih antipsihotikov.

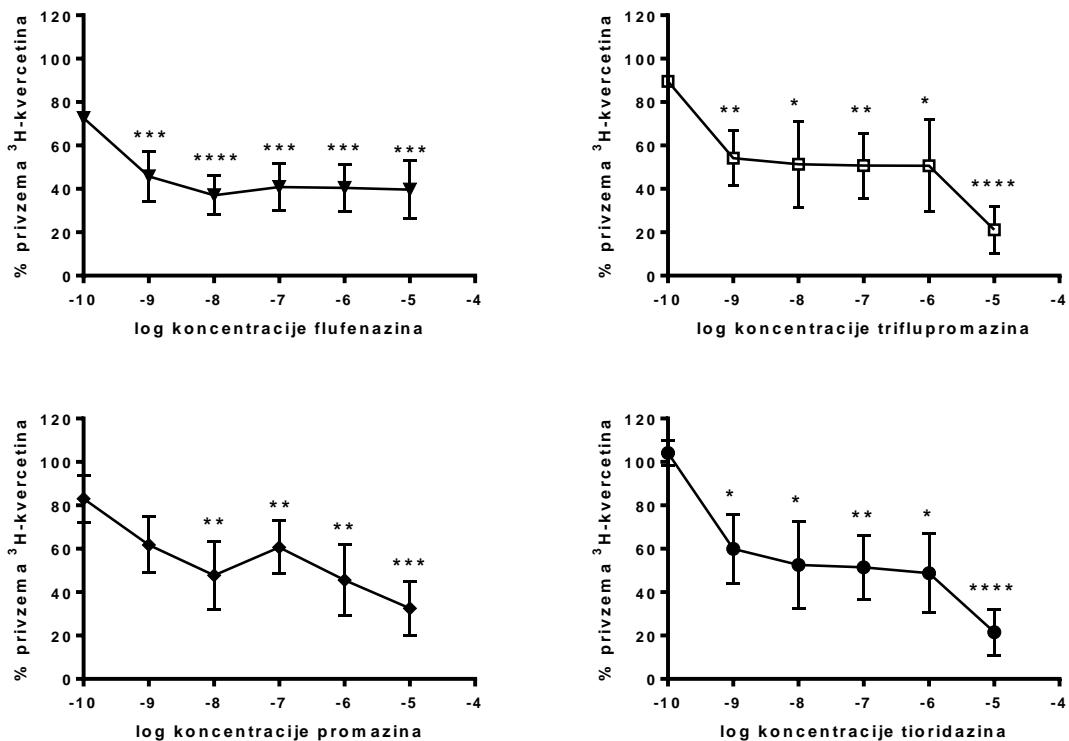
V poskusih z antipsihotiki smo v fizioloških razmerah (pH 7,4; temperatura 37°C) opazovali, kaj se dogaja s privzemom označenega kvercetina v prisotnosti različnih koncentracij posameznih antipsihotikov.



Slika 13: Vpliv različnih koncentracij antipsihotika klorpromazina na privzem ^3H -kvercetina v astrocite novorojene podgane. Privzem je potekal v fizioloških razmerah (pH 7,4; temperatura 37°C). Koncentracije klorpromazina so podane z logaritmom koncentracije antipsihotika v vzorcu. Vpliv klorpromazina na privzem kvercetina smo prikazali kot odstotek privzema kvercetina glede na vrednosti privzema v kontrolnem vzorcu. Točke na grafu predstavljajo povprečno vrednost meritev \pm SEM ($n = 6$), krivulja ponazarja nelinearno regresijo. Statistično

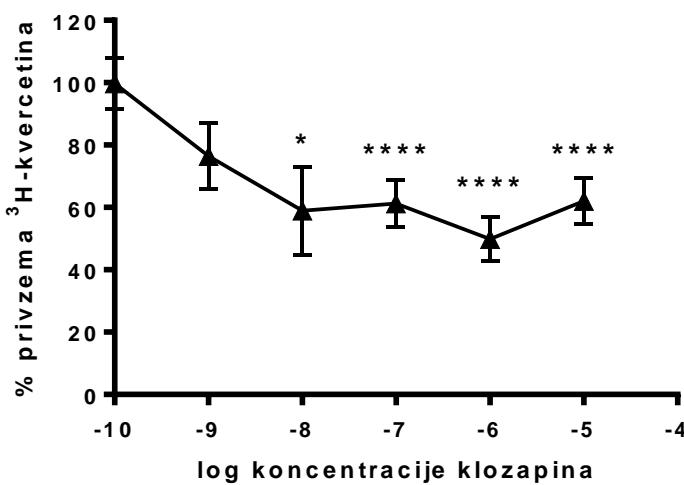
pomembna razlika je bila izračunana z enosmerno analizo variance in z Dunnettovim post-hoc testom: * za $p = 0,0024$; ** za $p = 0,0011$; **** za $p < 0,0001$.

Na grafu (slika 13) lahko vidimo, da je klorpromazin inhibiral privzem kvercetina – z višanjem koncentracije (do 10^{-6} M klorpromazina v vzorcu) klorpromazina se je količina privzetega kvercetina zniževala. Maksimalna inhibicija privzema je znašala 40 %.



Slika 14: Vpliv različnih koncentracij antipsihotikov promazina, triflupromazina, flufenazina in tioridazina na privzem ^3H -kvercetina v astrocite novorojene podgane. Privzem je potekal v fizioloških razmerah (pH 7,4; temperatura 37°C). Koncentracije antipsihotikov so podane z logaritmom koncentracije antipsihotika v vzorcu. Vpliv antipsihotikov na privzem kvercetina smo prikazali kot odstotek privzema kvercetina glede na vrednosti privzema v kontrolnem vzorcu. Točke na grafu predstavljajo povprečno vrednost meritev $\pm \text{SEM}$ ($n = 6$), krivulja ponazarja nelinearno regresijo. Statistično pomembna razlika je bila izračunana z enosmerno analizo variance in z Dunnettovim post-hoc testom: * za $p < 0,1$; ** za $p < 0,01$; *** za $p < 0,001$; **** za $p < 0,0001$.

Tudi drugi predstavniki fenotiazinskih nevroleptikov – promazin, triflupromazin, flufenazin in tioridazin so vplivali na privzem kvercetina, kar je razvidno iz slike 14. Kot prototip te skupine, klorpromazin, so tudi ti inhibirali privzem kvercetina, kar pa je bilo, glede na njihovo podobno strukturo, tudi pričakovati. Bistvena razlika med njimi, v primerjavi s klorpromazinom, je bila v tem, da so povzročili še večjo, 60 % inhibicijo (flufenazin, promazin), 10 μM koncentracije tioridazina in trifluropromazina pa celo 80 % inhibicijo privzema kvercetina v astrocite.



Slika 15: Vpliv klozapina na privzem ^3H -kvercetina v astrocyte novorojene podgane. Privzem je potekal v fizioloških razmerah (pH 7,4; temperatura 37 °C). Koncentracije klozapina so podane z logaritmom koncentracije antipsihotika v vzorcu. Vpliv klozapina na privzem kvercetina smo prikazali kot odstotek privzema kvercetina glede na vrednosti privzema v kontrolnem vzorcu. Točke na grafu predstavljajo povprečno vrednost meritev \pm SEM ($n = 6$), krivulja ponazarja nelinearno regresijo. Statistično pomembna razlika je bila izračunana z enosmerno analizo variance in z Dunnettovim post-hoc testom: * za $p = 0,0457$; *** za $p < 0,0001$.

Rezultati meritev o vplivu klozapina na privzem kvercetina so prikazani na sliki 15. Tudi klozapin, predstavnik atipičnih antipsihotikov, je na privzem kvercetina vplival kot predstavniki prve generacije teh zdravil. Vidimo lahko inhibicijo privzema, ki je prav tako končala pri približno 50 %.

Preglednica IV: Afiniteta antipsihotikov do inhibicije privzema kvercetina v astrocyte.

ANTIPSIHOTIK	$\log \text{IC}_{50} \pm \text{SEM}$
klorpromazin	$-7,289 \pm 0,340$
promazin	$-5,976 \pm 1,108$
flufenazin	$-10,010 \pm 2,083$
tioridazin	$-9,608 \pm 0,878$
triflupromazin	$-9,762 \pm 1,423$
klozapin	$-9,236 \pm 0,574$

RAZPRAVA

Bilirubin je endogena snov z antioksidativnim in protivnetnim delovanjem. Dokazano je, da je za patogenezo večine bolezni krivo neravnovesje med pro- in antioksidanti ali med pro- in protivnetnimi dejavniki. Rezultati dosedanjih raziskav nakazujejo, da naj bi imel bilirubin pomembno vlogo pri razvoju in pri prognozi shizofrenije, Alzheimerjeve bolezni in drugih nevrodegenerativnih boleznih. To pomeni, da bi nam razumevanje lastnosti bilirubina lahko pomagalo pri razvoju novih zdravilnih učinkovin za lajšanje in zdravljenje omenjenih bolezni; hkrati pa bi spremljanje koncentracij bilirubina v krvi lahko uporabili kot diagnostični kazalec stanja in napredovanja nekaterih nevrodegenerativnih bolezni.

Z raziskavami v razmerah *in vivo* in *in vitro* so že pojasnili večino farmakokinetičnih lastnosti bilirubina. Največja neznanka ostaja prehajanje bilirubina skozi celične membrane. Prehajanje bilirubina prek celičnih membran je reguliran proces, posredovan s transporterji. Pri privzemu bilirubina v jetrne in endotelijske celice sodeluje bilitranslokaza, planarni protein, katerega gen še ni poznan (71). Privzem bilirubina prek bilitranslokaze ni odvisen od ATP.

Glede na obetajočo veliko vlogo bilirubina v CŽS, je treba najprej raziskati način njegovega prehajanja v možgane in v možganske celice. Ker je bilirubin fotosenzibilen in njegove fizikalno-kemijske lastnosti otežujejo izvajanje poskusov, smo poskuse naredili s kvercetinom, saj vse funkcionalne študije kažejo na to, da naj bi bil njegov privzem analogen privzemu bilirubina (67).

Preučevanje kinetičnih lastnosti privzema radioaktivno označenega ^3H -kvercetina v astrocite novorojene podgane v našem laboratoriju je pokazalo, da je proces časovno in koncentračiško odvisen. Preučevali smo njegov privzem pri temperaturi 4 °C (nespecifični privzem) in temperaturi 37 °C (celokupni privzem). Nespecifični privzem bi lahko preučevali tudi v prisotnosti selektivnega inhibitorja določenega prenašalca, če bi ga poznali, ali pa bi funkcijo prenašalca zavrlji z vezavo selektivnega protitelesa. Žal tudi tega nismo imeli na razpolago. Privzem pri temperaturi 4 °C je linearen in ne kaže nasitljivosti, kar pomeni, da poteka z enostavno difuzijo in je odvisen predvsem od koncentračiškega gradiента; omejujoč dejavnik je debelina celične membrane. Pri zunanjji temperaturi, manjši od 20 °C, procesi, ki so odvisni od ATP, ne morejo potekati.

Na grafu koncentračiške odvisnosti (slika 11) je razvidno, da ni bilo bistvene razlike med privzemoma pri temperaturi 37 °C in 4 °C, zato lahko domnevamo, da se kvercetin v celične kulture astrocitov ne privzema s procesom, odvisnim od ATP. Za dokončno potrditev te domneve bi v nadaljevanju lahko naredili študijo z različnimi inhibitorji energijske presnove, ki bi zavrlji

nastajanje ATP v celicah, npr. s fluoridnimi ioni bi zavrlji glikolitične procese, s cianidnimi pa dihalno verigo.

V fizioloških razmerah je bil privzem kvercetina v astrocite nasitljiv, kar je še en dokaz, da proces poteka s pomočjo prenašalnih proteinov. Za prenos s prenašalnimi proteini sta namreč značilna specifičnost in nasitljivost, saj imamo končno število prenašalcev. Ker v preučevanem koncentracijskem območju do 2000 nM ni prišlo do nasitljivosti, je zelo verjetno, da obstaja prenašalec s primerno kapaciteto, kar je potrdila tudi računalniška analiza eksperimentalnih podatkov. Kvercetin se v astrocite privzema z afinitetno konstanto v μM območju in z maksimalno hitrostjo 94 pmol/mg proteinov/minuto. V prihodnje bi veljalo preučiti tudi kinetiko v višjih koncentracijskih območjih (μM), vsaj do vrednosti afinitetne konstante K_m . Kinetične lastnosti privzema kvercetina so podobne kinetičnim lastnostim privzema nekaterih nevrotransmiterjev v astrocite, npr. pri histaminu, ki nima lastnega selektivnega prenašalca kot drugi biogeni amini, in se v astrocite privzema z afinitetno konstanto $5,2 \pm 2,1 \mu\text{M}$, hitrost privzema pa je manjša in znaša 11 pmol/mg proteinov/minuto (72).

Vsi rezultati kažejo, da privzem ^3H -kvercetina poteka z olajšano difuzijo. Težko pa trdimo, da pasivna difuzija ni prisotna, saj je za nekatere flavonoide dokazano, da se čez membrano lahko prebijejo tudi s pasivno difuzijo (49). Glede na zelo nizko biološko uporabnost kvercetina pa domnevamo, da v fizioloških razmerah (plazemske koncentracije ob zaužitju flavonoidnega obroka) čez membrano potuje samo s pomočjo prenašalnega oz. prenašalnih proteinov.

Za molekulo kvercetina se domneva, da se skozi črevesni epitelij absorbira s prenašalci. Največji dokaz v prid tej trditvi je ugotovitev, da je ta prenos nasitljiv, saj višji peroralni odmerki kvercetina niso zvišali njegove biološke uporabnosti (49). Glede na to, da je krvno-možganska pregrada še težje prehodna kot črevesni epitelij, lahko sklepamo, da je tudi privzem v astrocite odvisen od prenašalcev.

Dokazano je, da se bilirubin v hepatocite privzema s prenašalnim proteinom iz skupine OAT, to je z bilitranslokazo (4). Privzem najverjetneje poteka tudi s prenašalcem OATP1A1 (66). Bilitranslokaza v jetra prenaša več flavonoidov, med drugim tudi kvercetin (66).

Danes vemo, da si bilitranslokazo kot prenašalca delita obe molekuli tudi v žilnem endoteliju. Raziskovalna skupina Passamontijeve je namreč kmalu zatem odkrila izražanje bilitranslokaze in njeno vlogo prenašalca pri prenosu kvercetina tudi v žilah, kjer je bilirubin inhibiral privzem kvercetina (67).

Pričakovati je bilo mogoče, da se podobno dogaja tudi pri prenosu skozi krvno-možgansko pregrado. Kar zadeva kvercetin smo korak bližje ugotoviti, da se tudi v astrocite privzema s pomočjo prenašalca. Preverili pa smo tudi, kako na ta prenos vpliva bilirubin. Rezultati kažejo, da tudi v astrocitih poteka kompetitivna inhibicija med obema molekulama, iz česar lahko sklepamo, da za vstop v možgane uporabljata iste prenašalne proteine.

Ker bilirubin inhibira privzem kvercetina v astrocite, je gotovo, da bilirubin v astrocite ne more prehajati s pasivno difuzijo, kar je dodaten dokaz v prid teoriji o prenosu s prenašalcem.

V nasprotju z rastlinami živalske celice ne morejo sintetizirati flavonoidov. Zato jih živalske celice prepoznaajo kot ksenobiotike, kar pomeni, da zanje nimajo specifičnih oz. selektivnih receptorjev ali prenašalcev. O konkretnem prenašальнem proteinu (npr. endogeni specifični prenašalec) zato ne moremo govoriti, saj flavonoidi, v nameri da bi prišli v celico, uporabljajo številne prenašalce. To jim uspeva tako, da izkoriščajo dobro znano promiskuiteto receptorjev oz. prenašalcev in potrebno stopnjo podobnosti endogenim substancam (49).

Ker tudi naši rezultati potrjujejo kompeticijo teh dveh molekul, smo nadaljevali s poskusi v tej smeri.

Zlatenica (rumeno obarvanje kože in beločnic) je simptom, ki nastane zaradi povečanih vrednosti bilirubina v krvi, in je eden od opisanih neželenih učinkov tipičnih antipsihotikov. Zanimalo nas je, če na povečane vrednosti bilirubina v krvi in s tem na razvoj zlatenice vplivajo antipsihotična zdravila. Domnevali smo, da antipsihotična zdravila tekmujejo z bilirubinom za vezavo na prenašalni protein.

V poskus smo zajeli 6 antipsihotičnih zdravil, od tega 5 zdravilnih učinkovin prve generacije antipsihotikov (t. i. tipični antipsihotiki; klorpromazin, flufenazin, tioridazin, promazin in triflupromazin), ter enega predstavnika druge generacije (t. i. atipični antipsihotiki; klozapin). Farmakološko so antipsihotiki antagonisti dopaminskih receptorjev, najverjetneje pa k učinku prispeva tudi delovanje na serotonininske in glutamatne receptorje. Atipična antipsihotična zdravila imajo izboljšan profil neželenih učinkov; predvsem povzročajo manj motoričnih motenj (sekundarnega parkinsonizma oz. tardivne diskinezije). Za razliko od tipičnih, ki delujejo le na pozitivne simptome (halucinacije, blodnje, agitacija, motnje gibanja), delujejo atipična antipsihotična zdravila tudi na negativne simptome (brezvoljnost, pomanjkanje zanimanja oz. apatija, čustvena otopelost) (29). Med antipsihotičnimi zdravili, ki smo jih uporabili pri naši raziskavi, so na slovenskem trgu prisotni klozapin, flufenazin, promazin.

Vseh 5 predstavnikov prve generacije spada v skupino fenotiazinskih nevroleptikov. Klorpromazin, zaradi učinkovanja na več podtipov različnih receptorjev posrečeno imenovan tudi »*polypharmacy in a single pill*«, predstavlja prototip antipsihotikov, saj je bil prva razvita učinkovina za zdravljenje shizofrenije. V praksi se za zdravljenje te bolezni ne uporablja več, uporablja pa se v paliativni medicini kot antiemetik in zdravilo proti kolcanju (29). Prednost flufenazina je njegovo široko terapevtsko okno. Razvit je bil tudi ester dekanojske kisline, flufenazinijev dekanoat, ki predstavlja depo obliko in omogoča manj pogosto jemanje zdravila (29). Promazin se danes uporablja predvsem za zdravljenje akutnega psihomotoričnega nemira pri shizofreniji in odtegnitvenem sindromu. Lajša vznemirjenost, napetost, tesnobo in bolečine pri bolnikih s kroničnimi boleznimi; uporabljamo pa ga tudi za pripravo bolnika na operacijo ter kot premedikacijo ob splošni in lokalni anesteziji (povečuje anestetični učinek in zmanjšuje pooperacijsko kolcanje, slabost in bruhanje) (73).

Dokazano je, da je Klozapin bolj učinkovit v zdravljenju shizofrenije kot so predstavniki prve generacije antipsihotikov. Njegova visoka učinkovitost pa ne odtehta resnega neželenega učinka hude agranulocitoze, ki se pojavi pri večini bolnikih, ki se zdravijo s Klozapinom. Zato je njegova uporaba rezervirana samo za bolnike, pri katerih je stanje neustrezno nadzorovano kljub prejšnji uporabi dveh ali več antipsihotikov, od katerih je vsaj eno atipično. Pri teh bolnikih je obvezno tedensko spremljanje krvne slike vsaj prvih 6 mesecev zdravljenja (74).

Vsi predstavniki fenotiazinskih nevroleptikov – klorpromazin, promazin, triflupromazin, flufenazin in tiroidazin – in tudi Klozapin inhibirajo privzem kvercetina v astrocite. Antipsihotiki klorpromazin, flufenazin in Klozapin statistično značilno inhibirajo privzem kvercetina v astrocite v terapevtskih koncentracijah. Za preostala tri zdravila tega ne moremo trditi, ker podatek o njihovih terapevtskih koncentracijah v plazmi ni na voljo. Bistvena razlika med preskušanimi zdravilnimi učinkovinami je v različni stopnji inhibicije privzema kvercetina v astrocite (razpon maksimalne inhibicije je med 40 % in 80 %). Te razlike bi lahko pripisali različnim jakostim delovanja in/ali afiniteti do membranskih prenašalcev.

Glede na to, da antipsihotična zdravila inhibirajo privzem kvercetina v astrocite, je zelo verjetna tudi inhibicija privzema kvercetina v jetrne celice. Vsi rezultati naših poskusov kažejo, da antipsihotična zdravila inhibirajo privzem bilirubina v jetrne celice. Ker je s tem onemogočeno izločanje bilirubina iz telesa, se lahko začnejo vrednosti bilirubina v krvi povečevati. Večje količine nekonjugiranega bilirubina v krvi pa lahko pripeljejo do zlatenice. To domnevo bi v nadaljevanju poskusov na našem inštitutu lahko potrdili še s poskusi inhibicije privzema kvercetina z

antipsihotičnimi zdravili v jetrne celice. Ker se zlatenica ne pojavi pri vsakem bolniku, ki jemlje tipične antipsihotike, je ta lahko tudi (farmako)genomsko pogojena. Izražanje posameznih podtipov prenašalcev za organske anione (OAT) je namreč gensko pogojeno; osebe z Dubin-Johnsonovim sindromom ne izražajo prenašalca, preko katerega se iz jetrnih celic izloča konjugirani bilirubin (75); osebe z Rotorjevim sindromom pa ne izražajo enega izmed podtipov OAT (OATP1B3).

Ker antipsihotična zdravila inhibirajo privzem bilirubina, se v zunajceličnem prostoru njegove vrednosti lahko povečajo. Zaradi antioksidativnega delovanja pa višje koncentracije bilirubina lahko znižujejo količino oksidativnega stresa. Ta ugotovitev je v skladu z nekaterimi študijami, ki so dokazale, da znižanje parametrov oksidativnega stresasov pada s kroničnim jemanjem antipsihotičnih zdravil (38, 39).

Dejstvo, da imajo (podoben) inhibitorni učinek na privzem kvercetina tako predstavniki tipičnih kot atipičnih antipsihotikov, niti ni presenetljivo. V študiji, ki jo je izvedel Mabrouk s sodelavci, so prišli do zaključka, da se raven kazalcev oksidativnega stresa (poleg celokupnega bilirubina so v krvi merili tudi raven albumina, urične kisline in TBARS) ni razlikovala med preiskovanci, ki so se zdravili z različnima skupinama zdravil (37).

Da bi zadnjo ugotovitev lahko dokončno potrdili, bi bilo koristno izvesti poskuse še z več predstavniki atipičnih antipsihotikov, npr. s kvetiapinom, z olanzapinom ali z risperidonom, ki so danes najpogosteje predpisani nevroleptiki v Sloveniji. Če imata oksidativni stres in bilirubin pomen pri razvoju in pri zdravljenju shizofrenije, bi bilo verjetno zanimivo preveriti tudi z aripiprazolom, predstavnikom tretje generacije zdravil, saj je njegov mehanizem delovanja drugačen od drugih zdravil z isto indikacijo.

SKLEP

S poskusi na astrocitih, pridobljenih iz možganske skorje novorojenih podgan, smo dokazali, da se kvercetin oz. bilirubin tudi v te celice privzema s pomočjo prenašalnih proteinov, in s tem naredili korak bliže v njihovem prepoznavanju.

Z našimi rezultati smo potrdili vse predvidene hipoteze.

1. Privzem kvercetina je koncentracijsko in temperaturno odvisen proces, ki poteka prek prenašalcev. Privzem je dejansko odvisen od časa, temperature in koncentracije; proces poteka pasivno z olajšano difuzijo. Najverjetneje je eden izmed prenašalcev bilitranslokaza.
2. Privzem bilirubina poteka podobno kot privzem kvercetina, zato tudi v astrocitih med seboj tekmujeta za prenašalec. Bilirubin kompetitivno inhibira privzem kvercetina, kar dodatno podpira verjetno vpletene vpletenosti bilitranslokaze v ta proces.
3. Antipsihotiki vplivajo na privzem kvercetina v astrocite novorojene podgane. Vseh 6 preskušanih antipsihotikov inhibira privzem kvercetina. Zlatenica, ki je lahko neželen učinek tipičnih antipsihotikov, lahko nastane tudi zaradi manjšega privzema bilirubina v žolčne vode in ne le zaradi njihove obstrukcije.

Ugotovljeno je, da kvercetin uporablja podobne prenašalce za privzem v celice kot molekula bilirubina. Ker je bilirubin izjemno pomemben endogeni antioksidant, bi lahko s povišanjem koncentracije v serumu dosegli zaščitno delovanje pred oksidativnimi poškodbami in vnetnimi boleznimi.

V prihodnosti bi zato lahko razmišljali o kvercetinski dieti, ki bi lahko pomagala v preventivi pred omenjenimi boleznimi. Kvercetin ima sam po sebi antioksidativno delovanje, prav tako pa bi lahko preko kompetitivne inhibicije z bilirubinom vodil do blage hiperbilirubinemije, ki predstavlja blagodejno stanje iz vidika antioksidativne in protivnetne zaščite.

LITERATURA

1. Živin M. Jetrni testi. *Seminarji iz patološke fiziologije. UL MF Inštitut za patološko fiziologijo. Ljubljana.* 2008; 175-82.
2. Shibahara S. Heme oxygenase - regulation of and physiological implication in heme catabolism. *Stem Cells.* 1994; 12(S1):103-116.
3. Martelanc M., Žiberna L., Passamonti S., Franko M. Direct determination of free bilirubin in serum at sub-nanomolar levels. *Analytica chimica acta.* 2014; 809:174-82.
4. Passamonti S., Terdoslavich M., Margon A., Cocolo A., Medic N., Micali F., Decorti G., Franko M. Uptake of bilirubin into HepG2 cells assayed by thermal lens spectroscopy: Function of bilitranslocase. *FEBS Journal.* 2005; 272(21):5522-35.
5. Cui Y., König J., Leier I., Buchholz U., Keppler D. Hepatic uptake of bilirubin and its conjugates by the human organic anion transporter SLC21A6. *The Journal of Biological Chemistry.* 2001; 276(13):9626-30.
6. Burchell B., Blanckaert N. Bilirubin mono- and di-glucuronide formation by purified rat liver microsomal bilirubin UDP-glucuronyltransferase. *Biochemical Journal.* 1984; 223(2):461-5.
7. Wang X., Chowdhury J.R., Chowdhury N.R. Bilirubin metabolism: Applied physiology. *Current Paediatrics.* 2006; 16(1):70-74.
8. Sapiro S.M. Bilirubin toxicity in the developing nervous system. *Pediatric neurology.* 2003; 29(5):410-21.
9. Stocker R., Yamamoto Y., McDonagh A.F., Glazer A.N., Ames B.N. Bilirubin is an antioxidant of possible physiological importance. *Science.* 1987; 235(4792):1043-6.
10. Baranano D.E., Rao M., Ferris C.D., Snyder S.H. Biliverdin reductase: a major physiologic cytoprotectant. *Proceedings of the national academy of sciences.* 2002; 99(25):16093-8.
11. Sedlak T.W., Saleh M., Higginson D.S., Paul B.D., Juluri K.R., Snyder S.H. Bilirubin and glutathione have complementary antioxidant and cytoprotective roles. *Proceedings of the national academy of sciences.* 2009; 106(13):5171-6.
12. Akboga M.K., Canpolat U., Sahinarslan A., Alsancak Y., Nurkoc S., Aras D., Aydogdu S., Abaci A. Association of serum total bilirubin level with severity of coronary atherosclerosis is linked to systemic inflammation. *Atherosclerosis.* 2015; 240(1):110-114.
13. Sedlak T.W., Snyder S.H. Bilirubin Benefits: Cellular Protection by a Biliverdin Reductase Antioxidant Cycle. *Pediatrics.* 2004; 113(6):1776-82.
14. Kang S.J., Kim D., Park H.E., Chung G.E., Choi S.H., Choi S.Y., Lee W., Kim J.S., Cho S.H. Elevated serum bilirubin levels are inversely associated with coronary artery atherosclerosis. *Atherosclerosis.* 2013; 230(2):242-8.
15. Kim K.M., Kim B.T., Park S.B., Cho D.Y., Je S.H., Kim K.N. Serum Total Bilirubin Concentration Is Inversely Correlated with Framingham Risk Score in Koreans. *Archives of Medical Research.* 2012; 43(4):288-93.
16. Temme E.H., Zhang J., Schouten E.G., Kesteloot H. Serum bilirubin and 10-year mortality risk in a Belgian population. *Cancer Causes and Control.* 2001; 12(10):887-94.
17. Brito M.A., Palmela I., Cardoso F.L., Sá-Pereira I., Brites D. Blood-brain barrier and bilirubin: clinical aspects and experimental data. *Archives of Medical Research.* 2014; 45(8):660-76.

18. Wallenstein M.B., Bhutani V.K. Jaundice and kernicterus in the moderately preterm infant. *Clinics in Perinatology*. 2013; 40(4):679-88.
19. Romero-Gómez M., Montagnese S., Jalan R. Hepatic encephalopathy in patients with acute decompensation of cirrhosis and acute-on-chronic liver failure. *Journal of Hepatology*. 2015; 62(2):437-47.
20. Kundur A.R., Singh I., Bulmer A.C. Bilirubin, platelet activation and heart disease: A missing link to cardiovascular protection in Gilbert's syndrome? *Atherosclerosis*. 2015; 239(1):73-84.
21. Ostanek B. Genetika in farmakogenetika Gilbertovega sindrom. *Farmacevtski vestnik*. 2009; 60:3-7.
22. Schwertner H.A., Vítek L. Gilbert syndrome, UGT1A1*28 allele, and cardiovascular disease risk: possible protective effects and therapeutic applications of bilirubin. *Atherosclerosis*. 2008; 198(1):1-11.
23. Vítek L, Jirsa M., Brodanová M., Kalab M., Marecek Z., Danzig V., Novotný L., Kotal P. Gilbert syndrome and ischemic heart disease: a protective effect of elevated bilirubin levels. *Atherosclerosis*. 2002; 160(2):449-56.
24. Novotný L., Vítek L. Inverse Relationship Between Serum Bilirubin and Atherosclerosis in Men: A Meta-Analysis of Published Studies. *Experimental Biology and Medicine*. 2003; 228(5):568-71.
25. Bulmer A.C., Verkade H.J., Wagner K.H. Bilirubin and beyond: A review of lipid status in Gilbert's syndrome and its relevance to cardiovascular disease protection. *Progress in Lipid Research*. 2013; 52(2):193-205.
26. Nuttall K.L., Klee G.G. Analytes of hemoglobin metabolism – porphyrins, iron and bilirubin. *Tietz fundamentals of clinical chemistry*. 5th ed. WB. Saunder Company Philadelphia. PA. 2001, 601-5.
27. Hulzebos C.V., Dijk P.H. Bilirubin-albumin binding, bilirubin/albumin ratios, and free bilirubin levels: where do we stand? *Seminars in Perinatology*. 2014; 38(7):412-21.
28. Furlan D., Trofenik A.I., Weber V., Felc Z., Bratanič B., Lukač-Bajalo J. Bilirubin v popkovnični krvi kot napovednik neonatalne hiperbilirubinemije. *Zdravniški vestnik*. 2010; 79:482-7.
29. Rang H.P., Dale M.M., Ritter J.M., Flower R.J., Henderson G. *Rang & Dale's Pharmacology*, 7th Ed. Elsevier. London. 2011.
30. Vítek L., Novotná M., Lenícek M., Novotný L., Eberová J., Petrásek J., Jirsa M. Serum bilirubin levels and UGT1A1 promoter variations in patients with schizophrenia. *Psychiatry Research*. 2010; 178(2):449-50.
31. Yao J.K., Reddy R., McElhinny L.G., Van Kammen D.P. Reduced status of plasma total antioxidant capacity in schizophrenia. *Schizophrenia Research*. 1998; 32(1):1-8.
32. Yao J.K., Reddy R., Van Kammen D.P. Abnormal age-related changes of plasma antioxidant proteins in schizophrenia. *Psychiatry Research*. 2000; 97(2-3):137-51.
33. Pae C.U., Paik I.H., Lee C., Lee S.J., Kim J.J., Lee C.U. Decreased plasma antioxidants in schizophrenia. *Neuropsychobiology*. 2004; 50(1):54-56.
34. Yasukawa R., Miyaoka T., Yasuda H., Hayashida M., Inagaki T., Horiguchi J. Increased urinary excretion of biopyrrins, oxidative metabolites of bilirubin, in patients with schizophrenia. *Psychiatry Research*. 2007; 153(2):203-7.
35. Miyaoka T., Seno H., Itoga M., Iijima M., Inagaki T., Horiguchi J. Schizophrenia-associated idiopathic unconjugated hyperbilirubinemia (Gilbert's syndrome). *The Journal of Clinical Psychiatry*. 2000; 61(11):868-71.
36. Müller N., Schiller P., Ackenheil M. Coincidence of schizophrenia and hyperbilirubinemia. *Pharmacopsychiatry*. 1991; 24(6):225-8.

37. Mabrouk H., Houas I., Mechria H., Mechri A., Douki W., Gaha L., Najjar M. F. Oxidative stress markers in schizophrenic patients. *Immuno-analyse & Biologie Spécialisée*. 2013; 28(1):51-56.
38. Arvindakshan M., Sitasawad S., Debsikdar V., Ghate M., Evans D., Horrobin D.F., Bennett C., Ranjekar P.K., Mahadik S.P. Essential polyunsaturated fatty acid and lipid peroxide levels in never-medicated and medicated schizophrenia patients. *Society of Biological Psychiatry*. 2003; 53(1):56-64.
39. Khan M.M., Evans D.R., Gunna V., Scheffer R.E., Parikh V.V., Mahadik S.P. Reduced erythrocyte membrane essential fatty acids and increased lipid peroxides in schizophrenia at the never-medicated first-episode of psychosis and after years of treatment with antipsychotics. *Schizophrenia Research*. 2002; 58(1):1-10.
40. Arana W.G. An overview of side effects caused by typical antipsychotics. *Journal of clinical psychiatry*. 2000; 61 (Suppl 8):5-11.
41. Hardman J., Limbird L.E. *Goodman and Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics*, 10th ed. McGraw-Hill Professional. New York. 2001.
42. Barone E., Di Domenico F., Mancuso C., Butterfield D.A. The Janus face of the heme oxygenase/biliverdin reductase system in Alzheimer disease: It's time for reconciliation. *Neurobiology of Disease*. 2014; 62:144-59.
43. Ahmed A.I., Driessen S., Van Schendel F.M. Role of plasma bilirubin as a biomarker for Alzheimer's disease: A retrospective cohort study. *Journal of the American Geriatrics Society*. 2014; 62(2):398-9.
44. Kimpara T., Takeda A., Yamaguchi T., Arai H., Okita N., Takase S., Sasaki H., Itoyama Y. Increased bilirubins and their derivatives in cerebrospinal fluid in Alzheimer's disease. *Neurobiology of Aging*. 2000; 21(4):551-4.
45. Vítek L. The Role of Bilirubin in Diabetes, Metabolic Syndrome, and Cardiovascular Diseases. *Frontiers in Pharmacology*. 2012; 3:3:55.
46. Jenko-Pražníkar Z., Petelin A., Jurdana M., Žiberna L. Serum bilirubin levels are lower in overweight asymptomatic middle-aged adults: An early indicator of metabolic syndrome? *Metabolism*. 2013; 62(7):976-85.
47. Lodish H., Berk A., Zipursky S.L., Matsudaira P., Baltimore D., Darnell J. *Molecular Cell Biology*, 5th ed. W.H. Freeman. New York. 2004.
48. Hediger M.A., Romero M.F., Peng J.B., Rolfs A., Takanaga H., Bruford E.A. The ABCs of solute carriers: physiological, pathological and therapeutic implications of human membrane transport proteins. *European Journal of Physiology*. 2004; 447(5):465-8.
49. Žiberna L., Fornasaro S., Cvorovic J., Federica T., Passamonti S. Bioavailability of Flavonoids: The Role of Cell Membrane Transporters. *Polyphenols in Human Health and Disease*. Elsevier. 2013: 489-511.
50. Lipinski C.A., Lombardo F., Dominy B.W., Feeney P.J. Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings. *Advanced Drug Delivery Reviews*. 2001; 46(1-3):3-26.
51. Davidson A.L., Dassa E., Orelle C., Chen J. Structure, function, and evolution of bacterial ATP-binding cassette systems. *Microbiology and molecular biology reviews*. 2008; 72(2):317-64.
52. Martinčič R., Venko K., Župerl Š., Novič M. Chemometrics approach for the prediction of structure-activity relationship for membrane transporter bilitranslocase. *SAR and QSAR in Environmental Research*. 2014; 25(11):853-7.
53. Anderluh M., Knez D. Prepustnost krvno-možganske pregrade pri razvoju učinkovin z delovanjem v osrednjem živčevju. *Farmacevtski vestnik*. 2014; 65(3):227-33.

54. Pardridge, W.M. CNS drug design based on principles of blood-brain barrier transport. *Journal of Neurochemistry*. 1998; 70(5):1781-92.
55. Xu G., Mahajan S., Roy I., Yong K.T. Theranostic quantum dots for crossing blood–brain barrier in vitro and providing therapy of HIV-associated encephalopathy. *Frontiers in Pharmacology*. 2013; (4):140.
56. Pardridge, W.M. Transport of small molecules through the blood-brain barrier: biology and methodology. *Advanced Drug Delivery Reviews*. 1995; 15(1): 5-36.
57. Havsteen B.H. The biochemistry and medical significance of the flavonoid. *Pharmacology & Therapeutics*. 2002; 96(2-3):67-202.
58. Kreft S., Glavač N.K. Antioksidanti. *Sodobna fitoterapija z dokazi podprta uporaba zdravilnih rastlin. SFD*. Ljubljana. 2013; 511-19.
59. Kishimoto Y., Tani M., Kondo K. Pleiotropic preventive effects of dietary polyphenols in cardiovascular diseases. *European Journal of Clinical Nutrition*. 2013; 67(5):532-5.
60. Cassidy A., Huang H., Rice M.S., Rimm E.B., Tworoger S.S. Intake of dietary flavonoids and risk of epithelial ovarian cancer. *The American Journal of Clinical Nutrition*. 2014; 100(5):1344-51.
61. Ravishankar D., Rajora A.K., Greco F., Osborn H.M. Flavonoids as prospective compounds for anti-cancer therapy. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*. 2013; 45(12):2821-31.
62. Wang X., Wolkoff A.W., Morris M.E. Flavonoids as a novel class of human organic anion-transporting polypeptide OATP1B1 (OATP-C) modulators. *Drug metabolism and disposition*. 2005; 33(11):1666-72.
63. Hertog M.G., Hollman P.C., Katan M.B., Kromhout D. Intake of potentially anticarcinogenic flavonoids and their determinants in adults in the Netherlands. *Nutrition and Cancer*. 1993; 20(1):21-9.
64. Bhagwat S., Haytowitz D.B., Holde J.M. *USDA Database for the Flavonoid Content, Release 3.1*. Beltsville : Nutrient Data Laboratory, Beltsville Human Nutrition Research Center, Agricultural Research Service, U.S. Department of Agriculture, 2014.
65. Quercitin. *Encyclopaedia Britannica*. [Navedeno: 5. 3. 2015]
<http://www.britannica.com/EBchecked/topic/487030/quercitin>.
66. Passamonti S., Terdoslavich M., Franca R., Vanzo A., Tramer F., Braidot E., Petruzza E., Vianello A. Bioavailability of flavonoids: a review of their membrane transport and the function of bilitranslocase in animal and plant organisms. *Current Drug Metabolism*. 2009; 10(4):369-94.
67. Maestro A., Terdoslavich M., Vanzo A., Kuku A., Tramer F., Nicolin V., Micali F., Decorti G., Passamonti S. Expression of bilitranslocase in the vascular endothelium and its function as a flavonoid transporter. *Cardiovascular Research*. 2010; 85(1):175-83.
68. McDonagh, A.F. Controversies in bilirubin biochemistry and their clinical relevance. *Seminars in Fetal and Neonatal Medicine*. 2010; 15(3):141-7.
69. Schwartz J.P., Wilson D.J. Preparation and characterization of type 1 astrocytes cultured from adult rat cortex, cerebellum, and striatum. *Glia*. 1992; 5(1): 75-80.
70. Liquid scintillation counting. *Perkin Elmer*. [Navedeno: 8. 3. 2015.]
http://www.perkinelmer.com/resources/technicalresources/applicationsupportknowledgebase/radiometri c/liquid_scint.xhtml#Liquidscintillationcounting-Liquidscintillationcountingtheory.
71. Terdoslavich M., de Graaf I.A., Proost J.H., Cocolo A., Passamonti S., Groothuis G.M. Bilitranslocase is involved in the uptake of bromosulfophthalein in rat and human liver. *Drug Metabolism Letters*. 2012; 6(3):165-73.

72. Perdan-Pirkmajer K, Mavri J, Krzan M. Histamine (re)uptake by astrocytes: an experimental and computational study. *Journal of Molecular Modeling*. 2010; 16(6):1151-8.
73. Prazine 100 mg filmsko obložene tablete (Pliva Ljubljana, d. o. o.). *Povzetek glavnih značilnosti zdravila*. 2012.
74. Leponex 100 mg tablete (Novartis Pharma GmbH). *Povzetek glavnih značilnosti zdravila*. 2014.
75. Ahn SY, Nigam SK. Toward a systems level understanding of organic anion and other multispecific drug transporters: a remote sensing and signaling hypothesis. *Molecular Pharmacology*. 2009; 76(3):481-90.