

# IZOLACIJA I KARAKTERIZACIJA DIVLJEGA TIPRA STANICA MDCK S NISKOM IZRAŽENOŠĆU GENA *mdr1* I NJIHOVA PRIMJENA U ISTRAŽIVANJU MEMBRANSKE PROPUSNOSTI

---

**Bokulić, Ana**

**Doctoral thesis / Disertacija**

**2022**

*Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj:* **University of Zagreb, Faculty of Science / Sveučilište u Zagrebu, Prirodoslovno-matematički fakultet**

*Permanent link / Trajna poveznica:* <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:217:213679>

*Rights / Prava:* [In copyright](#)/[Zaštićeno autorskim pravom.](#)

*Download date / Datum preuzimanja:* **2024-08-07**



*Repository / Repozitorij:*

[Repository of the Faculty of Science - University of Zagreb](#)





Sveučilište u Zagrebu

PRIRODOSLOVNO-MATEMATIČKI FAKULTET  
BIOLOŠKI ODSJEK

Ana Bokulić

**IZOLACIJA I KARAKTERIZACIJA  
DIVLJEGA TIPRA STANICA MDCK S  
NISKOM IZRAŽENOŠĆU GENA *mdr1* I  
NJIHOVA PRIMJENA U ISTRAŽIVANJU  
MEMBRANSKE PROPUSNOSTI**

DOKTORSKI RAD

Mentor:  
Dr.sc. Astrid Milić

Zagreb, 2022.



University of Zagreb

FACULTY OF SCIENCE  
DEPARTMENT OF BIOLOGY

Ana Bokulić

**ISOLATION AND CHARACTERISATION  
OF MDCK CELLS WITH LOW  
EXPRESSION OF *mdr1* GENE AND  
THEIR USE IN MEMBRANE  
PERMEABILITY SCREENING**

DOCTORAL DISSERTATION

Supervisor:  
Astrid Milić, PhD

Zagreb, 2022.

Ovaj je doktorski rad izrađen u Fidelta d.o.o., pod vodstvom dr. sc. Astrid Milić, znanstvene suradnice, u sklopu Sveučilišnog poslijediplomskog doktorskog studija Biologije pri Biološkom odsjeku Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu.

*Za početak zahvaljujem mentorici Astrid Milić i Jasni Padovan kao voditeljici odjela DMPK na uvijek pružanoj pomoći i podršci pri izradi i pisanju ovog rada.*

*Zahvaljujem kompaniji Fidelta d.o.o. što mi je omogućila izradu doktorskog rada.*

*Sanji Koštrun veliko hvala na poticajnim diskusijama, statističkim analizama te savjetima tijekom pisanja rada.*

*Nadalje, Martini Bosnar zahvaljujem na detaljnom čitanju i korisnim savjetima vezanim uz ovaj rad.*

*Zahvaljujem kolegama iz odjela Biologije što su me velikodušno podržali u radu, a posebno zahvaljujem Dariji Stupin-Polančec na podršci u izvođenju PCR analiza i njenom sveukupnom angažmanu.*

*Krunoslavu Nujić hvala na Western analizama, a Matei Cedilak hvala na pokusima nakupljanja u stanicama.*

*Jednako tako, Adamu Cvrtila zahvaljujem na određivanju metaboličke stabilnosti i permeabilnosti na Caco-2 modelu.*

*Svojim bivšim kolegama iz odjela DMPK od srca hvala na pomoći, ugodnom radnom okruženju i prijateljskim savjetima, a posebno hvala užem timu Miri Šelendić, Ivani Pavlovski i Adamu Cvrtila na pomoći sa staničnim uzgojem i odličnoj radnoj atmosferi.*

*Na kraju, hvala mojoj obitelji na neizmjernom strpljenju i podršci na ovom dugom i izazovnom, ali zanimljivom putu.*

*Ana Bokulić*

## SAŽETAK

Sveučilište u Zagrebu  
Prirodoslovno-matematički fakultet  
Biološki odsjek

Doktorski rad

### IZOLACIJA I KARAKTERIZACIJA DIVLJEGA TIPRA STANICA MDCK S NISKOM IZRAŽENOŠĆU GENA *mdr1* I NJIHOVA PRIMJENA U ISTRAŽIVANJU MEMBRANSKE PROPUSNOSTI

ANA BOKULIĆ

U ovoj disertaciji je opisana izolacija klona divljega tipa stanica MDCK s niskom izraženosti gena *mdr1* koji kodira P-glikoprotein. Klonovi su izolirani metodom velikog razrjeđivanja, te uspoređeni mjerenjem dvosmjernog transporta prema razini efluksa amprenavira. Klon 79, koji je pokazao najmanji omjer efluksa amprenavira, kao i tri puta manju izraženost mRNA za *mdr1* u odnosu na divlji tip (MDCK-WT), odabran je kao klon MDCK s niskim efluksom za daljnje istraživanje. Na standardnom setu spojeva klon 79 pokazao je znatno manji efluks od MDCK-WT, iako je kod nekih spojeva i dalje detektirana ostatna aktivnost P-glikoproteina.

Transport 12 makrocikličkih spojeva ispitan je na klonu 79 i nekoliko dodatnih staničnih linija, Caco-2, MDCK-MDR1, MDCK-WT, te MDCK bez ekspresije P-glikoproteina. Nije uočeno značajno poboljšanje permeabilnosti makrolida u staničnim modelima s niskom ili bez izraženosti P-glikoproteina u odnosu na MDCK-MDR1 i MDCK-WT stanični model. Proučen je utjecaj vremenske komponente na permeabilnost makrocikličkih spojeva u staničnom modelu dvosmjernog transporta. Dobiveni rezultati analizirani su multivarijantnim statističkim metodama, te su uspješno razvijeni modeli permeabilnosti i bioraspodjelivosti.

(113 stranica, 29 slika, 20 tablica, 166 literaturnih navoda, jezik izvornika: hrvatski)

Ključne riječi: permeabilnost, MDCK, makrolid, izolacija klona, P-glikoprotein

Mentor:

Dr. sc. Astrid Milić, znanstvena suradnica, Fidelta d.o.o., Zagreb

Ocjenjivači:

Prof. dr. sc. Domagoj Đikić, Prirodoslovno-matematički fakultet, Zagreb

Izv. prof. dr. sc. Donatella Verbanac, Farmaceutsko-biokemijski fakultet, Zagreb

Dr. sc. Marina Bosnar, viša znanstvena suradnica, Fidelta, Zagreb

## SUMMARY

University of Zagreb  
Faculty of Science  
Department of Biology

Doctoral Thesis

### **ISOLATION AND CHARACTERISATION OF MDCK CELLS WITH LOW EXPRESSION OF *mdr1* GENE AND THEIR USE IN MEMBRANE PERMEABILITY SCREENING**

ANA BOKULIĆ

In this thesis, a clone of wild type MDCK cells with low expression of the *mdr1* gene that encodes the efflux pump P-glycoprotein, was isolated using the limiting dilution method. The clones were ranked based on amprenavir efflux level in a bidirectional transport assay. Clone 79 was selected as a low efflux MDCK clone for further investigation since it had the lowest efflux ratio of amprenavir and three fold lower *mdr1* mRNA expression in comparison to MDCK wild type. When profiled using standard compounds, clone 79 had substantially reduced efflux compared to the wild type, although residual P-glycoprotein activity was still observed with some compounds.

The transport of 12 macrocycles was tested using clone 79 and several additional cell lines, including Caco-2, MDCK-MDR1, MDCK-WT, and MDCK with no P-glycoprotein expression. No significant improvement in macrolide permeability was observed in cell models with low or no P-glycoprotein expression in comparison to the MDCK-MDR1 and MDCK-WT cells. The influence of the time component on the permeability of macrocyclic compounds in the cellular transport model was further investigated. The obtained results were analyzed by multivariate statistical methods and models of permeability and bioavailability were successfully developed.

(113 pages, 29 figures, 20 tables, 166 references, original in Croatian)

Keywords: permeability, MDCK, macrolide, clone isolation, P-glycoprotein

Supervisor:

Astrid Milić, PhD, Scientific fellow, Fidelta d.o.o., Zagreb

Reviewers:

Prof. Domagoj Đikić, PhD, Faculty of Science, Zagreb

Prof. Donatella Verbanac, PhD, Faculty of Pharmacy and Biochemistry, Zagreb

Marina Bosnar, PhD, Senior scientific fellow, Fidelta, Zagreb

# SADRŽAJ

<b>1. UVOD</b> .....	<b>1</b>
<b>1.1 Cilj istraživanja</b> .....	<b>3</b>
<b>2. LITERATURNI PREGLED</b> .....	<b>4</b>
<b>2.1 ADME u istraživanju i razvoju lijekova</b> .....	<b>4</b>
<b>2.2 Intestinalna apsorpcija lijeka</b> .....	<b>6</b>
<b>2.3 Metabolizam lijekova</b> .....	<b>8</b>
<b>2.4 Membranska permeabilnost i transport lijekova</b> .....	<b>9</b>
2.4.1 Jednostavna ili pasivna transcelularna difuzija.....	10
2.4.2 Paracelularna difuzija .....	10
2.4.3 Membranski transport posredovanjem transportera.....	11
<b>2.5 P-glikoprotein (P-gp, MDR1, ABCB1)</b> .....	<b>12</b>
<b>2.6 Stanični model permeabilnosti i transporta</b> .....	<b>15</b>
<b>2.7 Stanične linije u pokusima permeabilnosti i transporta</b> .....	<b>17</b>
2.7.1 Caco-2 stanična linija.....	17
2.7.2 MDCK stanična linija.....	19
2.7.3 MDCK-MDR1 stanična linija .....	20
2.7.4 Subpopulacije MDCK stanične linije .....	21
2.7.5 „Knock-out“ MDCK linije.....	21
<b>2.8 Matematički izvod formule za permeabilnost</b> .....	<b>22</b>
<b>2.9 Omjer efluksa</b> .....	<b>24</b>
<b>2.10 Makrociklički lijekovi</b> .....	<b>25</b>
2.10.1 Makrolidni antibiotici.....	25
2.10.2 Makrolidi imunosupresivi.....	30
<b>2.11 Ostali pristupi u predviđanju permeabilnosti velikih molekula</b> .....	<b>31</b>
<b>3. MATERIJALI I METODE</b> .....	<b>33</b>
<b>3.1 Ispitivani spojevi</b> .....	<b>33</b>
<b>3.2 Kemikalije</b> .....	<b>34</b>
<b>3.3 Oprema</b> .....	<b>35</b>
<b>3.4 Priprema otopina, pufera i medija</b> .....	<b>36</b>
<b>3.5 Biološki materijal</b> .....	<b>36</b>



<b>3.6</b>	<b>Stanična kultura.....</b>	<b>37</b>
<b>3.7</b>	<b>Izolacija MDCK klona .....</b>	<b>37</b>
<b>3.8</b>	<b>Metoda dvosmjernog transporta .....</b>	<b>39</b>
3.8.1	Izračun koeficijenta permeabilnosti i parametara kontrole kvalitete .....	39
<b>3.9</b>	<b>LC-MS/MS analiza uzoraka .....</b>	<b>40</b>
3.9.1	Kromatografski uvjeti LC metoda.....	41
<b>3.10</b>	<b>Analiza genske izraženosti kvantitativnim PCR-om.....</b>	<b>43</b>
3.10.1	Izolacija i pročišćavanje ukupne RNA.....	43
3.10.2	Sinteza cDNA.....	44
3.10.3	PCR u stvarnom vremenu.....	44
<b>3.11</b>	<b>Western blot analiza .....</b>	<b>46</b>
3.11.1	Izolacija membrana.....	46
3.11.2	Određivanje koncentracije proteina u lizatima stanica.....	46
3.11.3	Kapilarna Western analiza.....	46
<b>3.12</b>	<b>Metabolička stabilnost u jetrenim mikrosomima .....</b>	<b>47</b>
<b>3.13</b>	<b>Pokus nakupljanja i zadržavanja u stanicama.....</b>	<b>48</b>
<b>3.14</b>	<b>Pokus permeabilnosti pri dužem vremenu inkubacije.....</b>	<b>49</b>
<b>3.15</b>	<b>Analiza podataka i statistika.....</b>	<b>49</b>
3.15.1	Analiza krivulja osjetljivosti.....	49
3.15.2	Toplinske mape matrica korelacije .....	49
3.15.3	Izgradnja modela pomoću PLS analize .....	50
<b>4.</b>	<b>REZULTATI.....</b>	<b>52</b>
<b>4.1</b>	<b>Dobivanje klona MDCK s niskom izraženošću gena <i>mdr1</i> .....</b>	<b>52</b>
4.1.1	Izolacija klonova .....	52
4.1.2	Odabir klona s niskim efluksom.....	53
4.1.3	Funkcionalna karakterizacija transporterata .....	56
4.1.4	Karakterizacija klona 79 kroz pasaže .....	57
4.1.5	Analiza izraženosti P-glikoproteina na razini proteina .....	59
4.1.6	Dvosmjerni transport standardnih spojeva.....	60
<b>4.2</b>	<b>Permeabilnost i transport makrolida u različitim staničnim sustavima .....</b>	<b>64</b>
4.2.1	Permeabilnost makrolida na stanicama Caco-2.....	66
4.2.2	Permeabilnost makrolida na stanicama MDCK-MDR1.....	67
4.2.3	Permeabilnost makrolida na stanicama MDCK-WT .....	68
4.2.4	Permeabilnost makrolida na klonu 79.....	69
4.2.5	Permeabilnost makrolida na stanicama MDCK-KO.....	70

4.2.6	Analiza permeabilnosti makrolida.....	71
4.2.7	Identifikacija supstrata P-glikoproteina .....	74
4.2.8	Permeabilnost i bioraspoloživost makrolida.....	75
<b>4.3</b>	<b>Utjecaj na permeabilnost i bioraspoloživost makrolida .....</b>	<b>75</b>
4.3.1	Metabolička stabilnost makrolida u mikrosomima .....	76
4.3.2	Nakupljanje i zadržavanje makrolida u stanicama.....	77
4.3.3	Utjecaj vremena inkubacije na permeabilnost makrolida.....	78
4.3.4	Modeliranje predviđanja bioraspoloživosti makrolida.....	81
<b>5.</b>	<b>RASPRAVA.....</b>	<b>84</b>
<b>6.</b>	<b>ZAKLJUČAK.....</b>	<b>94</b>
<b>7.</b>	<b>CITIRANA LITERATURA .....</b>	<b>95</b>
<b>8.</b>	<b>POPIS KRATICA.....</b>	<b>108</b>
<b>9.</b>	<b>PRILOZI .....</b>	<b>110</b>
<b>10.</b>	<b>ŽIVOTOPIS.....</b>	<b>112</b>
10.1	Popis objavljenih radova.....	112

## 1. UVOD

U ranom procesu istraživanja novih lijekova uobičajeno se paralelno karakteriziraju biološka aktivnost, toksičnost te svojstva apsorpcije, distribucije, metabolizma i ekskrecije (ADME) u različitim *in vitro* sustavima, a s ciljem progresije supstancija s najboljim svojstvima u kasnije faze istraživanja. Optimalna ADME svojstva podrazumijevaju da lijek uspješno prelazi crijevnu barijeru (apsorpcija), te preko sistemske cirkulacije dopijeva do ciljnog mjesta djelovanja (distribucija) i da se u konačnici eliminira iz tijela biotransformacijom (metabolizam) ili u nepromijenjenom obliku (ekskrecija). Za lijekove s oralnom primjenom proces apsorpcije je jedan od ključnih ADME parametara, a membranska permeabilnost, uz fizikalno-kemijska svojstva, ključno svojstvo. Istraživački pristupi određivanja permeabilnosti uključuju različite *in silico*, *in vitro*, *in situ*, te *in vivo* metode, dok je za rani probir u farmaceutskoj industriji najčešće korištena metoda dvosmjernog transporta na staničnom modelu. Stanični modeli permeabilnosti dobro koreliraju s *in vivo* apsorpcijom (1), te tako nude dobar omjer prediktivnosti i protočnosti (engl. *high-throughput*) u ranoj fazi istraživanja lijekova kad se ne zna puno o testiranim spojevima i kada su dostupne male količine testiranog spoja. S obzirom na različitost staničnih modela u odnosu na živi organizam, primjerice varijabilna izraženost transportnih proteina, stanični modeli i eksperimentalni uvjeti kontinuirano se razvijaju kako bi se prediktivnost uvećala.

*In vitro* metode permeabilnosti obuhvaćaju umjetne membranske sustave (PAMPA), te stanične sustave tipa Caco-2 (besmrtna stanična linija ljudskih stanica kolorektalnog adenokarcinoma, engl. *Caucasian colorectal adenocarcinoma*) i MDCK (epitelne stanice izolirane iz psećeg bubrega engl. *Madin-Darby canine kidney cells*). Nestanični model PAMPA s jedne strane nudi jednostavnost i brzinu izvođenja, dok je s druge strane umjetna membrana, koja se sastoji od proizvoljno odabranih lipida u organskom otapalu, daleko od *in vivo* uvjeta. Suprotno od umjetnih membranskih sustava, stanice Caco-2 kolorektalnog humanog porijekla, s fino diferenciranim mikrovilima na jednoj strani monosloja stanica međusobno povezanih čvrstim vezama, posve nalikuju enterocitima u epitelu tankog crijeva. Nažalost praktičan nedostatak Caco-2 modela leži u dugotrajnom i zahtjevnom uzgoju monoslojeva, pa su za testiranje permeabilnosti uvedene dodatne stanične linije poput MDCK. Upravo je klon stanica MDCK koji ima prekomjerno

izražen P-glikoprotein humanog porijekla, a kodiran genom *mdr1*, postao stanična linija od izbora za proučavanje dvosmjernog transporta molekula, evaluacije utjecaja P-glikoproteina kao najznačajnijeg efluks transportera, te predikcije crijevne apsorpcije. Međutim, kako stanice MDCK nisu ljudskog porijekla, endogeni pseći transporteri mogu interferirati s mjerenjem pasivne permeabilnosti bilo u divljega tipa stanicama MDCK (MDCK-WT) ili u onima s izraženim humanim P-glikoproteinom (MDCKII-MDR1). Kako bi se u stanicama MDCKII-MDR1 što više umanjio utjecaj endogenih transportera, preporuča se istovremeno testiranje i u divljega tipa stanicama MDCK kako bi se mogla izračunati tzv. razlika omjera permeabilnosti (engl. *net flux ratio*). Ipak, takav pristup zbog različite izraženosti endogenog P-glikoproteina može rezultirati lažno pozitivnim, odnosno lažno negativnim rezultatima. Stoga su napori unutar farmaceutске industrije usmjereni na izolaciju posebnog klona stanica MDCK u kojima bi se postigla niska izraženost gena koji kodira pseći P-glikoprotein (tzv. MDCK-LE; engl. *MDCK low efflux*) (2), a kojim bi se mogla postići bolja predikcija i bolje profiliranje spojeva za koje je poznat izostanak *in vitro* - *in vivo* korelacije. Izolacija takvih stanica koja je opisana u literaturi uključuje metode koje često nisu dostupne u ADME laboratorijima, poput sortiranja stanica fluorescentnom aktivacijom na protočnom citometru, uređivanja genoma korištenjem ZFN nukleaza (engl. *zinc-finger nucleases*), te primjenu CRISP-Cas9 tehnologije. Alternativan način izolacije ovih stanica, a koji bi bio u skladu s ADME laboratorijskom opremom, još nije literaturno opisan. Također, tek nedavno su stanice MDCK s inaktiviranim endogenim genom *mdr1* (engl. *gene knock-out*, KO) postale komercijalno dostupne.

Velik broj spojeva koje karakterizira izostanak *in vitro*-*in vivo* korelacije opisan je u literaturi, a jedna takva skupina su i makrociklički spojevi. Makrociklički spojevi se ističu strukturnom raznolikošću i jedinstvenošću, te svojim potencijalom vezanja za biološke mete koje nisu dostupne malim, plošnim lijekovima. Međutim, izostanak korelacije permeabilnosti i apsorpcije otežava rani probir najboljih novih molekula. Pokazano je da makrolidi, skupina makrocikličkih spojeva koji su uglavnom razvijeni kao antibiotici, posjeduju velik volumen distribucije i dobru bioraspoloživost *in vivo*, dok *in vitro* vrijednosti permeabilnosti makrolide gotovo redovito klasificiraju kao nisko ili nisko do srednje permeabilne spojeve. Pri tom činjenica da su makrolidi gotovo uvijek *in vitro* supstrati P-glikoproteina, ukazuje na važnost promišljenog odabira staničnog modela permeabilnosti.

Stanice MDCK s niskom razinom P-glikoproteina predstavljaju poboljšanu verziju stanica MDCK u određivanju pasivne permeabilnosti. Istraživanje primjene opisanih stanica MDCK na makrocikličke spojeve doprinijelo bi razumijevanju permeabilnosti i potencijalno *in vivo* apsorpcije ovih molekula. Ujedno, takav bi pristup u procesu istraživanja novih lijekova omogućio pouzdaniji i kvalitetniji probir najboljih novih molekula za daljnja testiranja.

## 1.1 Cilj istraživanja

Stanice MDCK s niskom izraženošću endogenog gena *mdr1* za P-glikoprotein nisu komercijalno dostupne, dok je komercijalno dostupna MDCK linija s inaktiviranim endogenim genom *mdr1* pod opterećenjem licence. Uz to, kako nema sustavnog proučavanja permeabilnosti nepredvidivih makrocikličkih spojeva u različitim staničnim sustavima permeabilnosti, za ovu disertaciju postavljeni su sljedeći ciljevi:

- izolirati klon divljega tipa stanica MDCK s niskom izraženošću endogenog gena *mdr1*:
  - metodom velikog razrjeđivanja izolirati pojedinačne stanice,
  - sortirati dobivene klonove metodom dvosmjernog transporta prema razini efluksa amprenavira,
  - karakterizirati izolirani klon stanica MDCK kvantitativnim PCR-om i western blot analizom;
- uspostaviti optimalan proces izolacije prilagođen rutinskoj primjeni;
- odrediti permeabilnost za odabrani set makrocikličkih spojeva na klonu MDCK s niskom izraženošću P-glikoproteina;
- analizirati i usporediti dobivene rezultate permeabilnosti s divljega tipa stanicama MDCK, stanicama MDCK s visokom izraženošću humanog gena *mdr1* (MDCKII-MDR1), kao i stanicama Caco-2;
- multivarijantnim statističkim metodama razviti mehanističke modele koji će doprinjeti razumijevanju čimbenika koji utječu na permeabilnost i *in vivo* bioraspoloživost makrolida, te u tu svrhu ispitati:
  - permeabilnost makrolida pri dužem vremenu inkubacije,
  - nakupljanje i zadržavanje makrolida u stanici,
  - metaboličku stabilnost makrolida.

## 2. LITERATURNI PREGLED

### 2.1 ADME u istraživanju i razvoju lijekova

Lijek je spoj koji aktivno djeluje u organizmu na specifičnu biološku metu te time farmakološki djeluje na tijek bolesti. Pri tom biološke mete mogu biti proteini ili nukleinske kiseline, koji su ključni za mehanizme i procese, odnosno patogenezu bolesti, a mogu se nalaziti u različitim tkivima posvuda u tijelu. Međutim, bez obzira na aktivni mehanizam djelovanja i ciljno mjesto, svaki lijek mora posjedovati određena ADME svojstva kako bi opstao u organizmu i terapijski djelovao. Naime živi organizam aktivno djeluje na lijek brojnim zaštitnim mehanizmima koji mogu onemogućiti i spriječiti farmakološku učinkovitost lijeka. Pri tom poželjna ADME svojstva uključuju:

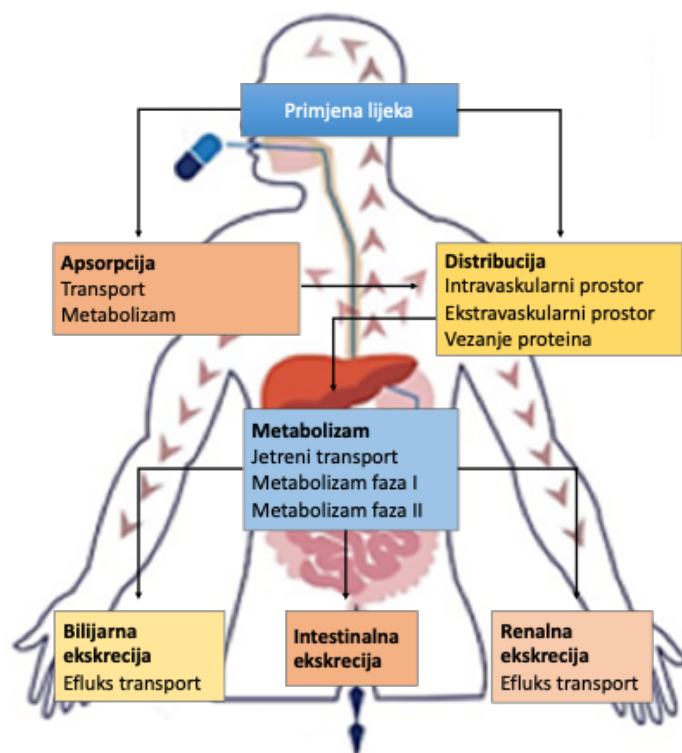
- uspješan prolazak lijeka do sistemske cirkulacije (apsorpcija),
- dolazak do ciljnog mjesta djelovanja (distribucija),
- odgovarajuću enzimsku transformaciju lijeka (metabolizam),
- pravovremeno izlučivanje iz tijela (eliminacija).

Istraživački put do novog lijeka može se podijeliti u tri velike faze – **istraživačka faza**, koja obuhvaća pronalaženje supstance koja djeluje na metu te pokazuje povoljna farmakološka i farmaceutska svojstva za daljnji razvoj, **pretklinička faza**, koja obuhvaća toksikološka i daljna farmakokinetička ispitivanja te **klinička faza**, koja se izvodi na zdravim dobrovoljcima i pacijentima kako bi se potvrdila sigurnost i učinkovitost lijeka. Od više desetaka tisuća supstanci s kojima se ulazi u istraživanje, tek nekolicina dospije u kliničke studije. Nadalje samo jedna od deset supstanci, takozvani kandidati, u kliničkim studijama dospije kao odobreni lijek na tržište (3,4). Analiza uzroka odbacivanja kandidata pokazuje da u najvećem broju slučajeva razlog leži u toksičnosti (čak 40%). Idući značajan uzrok leži u strateškim odlukama kompanije (20%), dok samo 16% spojeva propada zbog neodgovarajućih farmakokinetičkih svojstava (5). Do nedavno je neodgovarajuća farmakokinetika bila glavni razlog propadanja tijekom razvoja lijeka (6). Pokazano je da rano adresiranje ADME svojstava značajno smanjuje odbacivanje kliničkih kandidata zbog neodgovarajuće farmakokinetike (5,7). *In silico* i *in vitro* testovima visoke protočnosti uspješno se mogu predvidjeti ključni ADME procesi (**Slika 1**) (8):

- **Apsorpcija** – put ulaska lijeka u tijelo. Od četiri glavne rute primjene lijeka (kroz probavni trakt, inhalacijom kroz dišni sustav, dermalno kroz kožu te injekcijom), jedino injekcijom lijek dospjeva direktno u krvotok, dok za ostale puteve lijek treba

proći sustav membrana kako bi dospio u krvotok. Načini prolaska lijeka kroz membranu detaljnije su opisani u poglavlju 2.4. Važni parametri za apsorpciju su permeabilnost, topljivost i lipofilnost.

- **Distribucija** – kako se lijek putem krvotoka raspoređuje po tijelu. Gdje će se lijek zadržati u tijelu ovisi o faktorima kao što su protok krvi, vezanje za tkiva i veličina molekule, a opisuje se parametrima kao što su lipofilnost, vezanje za proteine plazme, te stabilnost u plazmi.
- **Metabolizam** – biotransformacija lijeka pomoću enzima u hidrofilnije metabolite kako bi se ubrzala eliminacija lijeka iz organizma. Metabolička stabilnost i ispitivanje metabolita važni su s jedne strane za učinak lijeka, a s druge strane za predviđanje neškodljivosti lijeka.
- **Eliminacija** – proces izlučivanja lijeka, odnosno njegovih metabolita iz tijela, a najčešće se radi o renalnom izlučivanju (urin) i izlučivanju putem žuči (feces). Eliminacija je rezultat svojstava iz prethodno navedenih točaka.



**Slika 1.** Dispozicija lijeka u organizmu. Slika je preuzeta od (9) i prilagođena.

## 2.2 Intestinalna apsorpcija lijeka

Apsorpcija je prelazak nepromijenjenog lijeka s mjesta primjene u sistemsku cirkulaciju. Između različitih sistemskih primjena, npr. subkutane ili intravenozne, peroralna primjena je općenito prihvaćena kao najpoželjniji put administracije lijeka zbog jednostavnosti primjene te nižih troškova proizvodnje. Međutim, fiziologija probavnog trakta postavlja niz ograničenja i uvjeta za apsorpciju lijeka. Pritom dodatan faktor predstavlja utjecaj hrane i istovremena primjena nekoliko različitih lijekova. Bez obzira na navedena ograničenja, peroralna primjena je u pravilu primaran odabir zbog pragmatičnih razloga. Kako je za postizanje terapijskog učinka lijeka nužno postizanje terapijske koncentracije u krvi, predviđanje crijevne apsorpcije jedan je od ključnih trenutaka u dizajnu novoga lijeka (10). Danas se u istraživanju lijekova crijevna apsorpcija predviđa *in silico* simulacijama (npr. QSAR = quantitative structure-activity relationships, PBPK = physiologically based pharmacokinetics), *in vitro* metodama na staničnim ili tkivnim modelima, te *in situ* crijevnom perfuzijom i *in vivo* metodama, dok se nadalje razvijaju tehnologije organoida koje bi premostile prijelaz između dvodimenzionalnih staničnih struktura i životinjskih modela (11,12).

Intestinalna apsorpcija lijekova odvija se kroz membrane epitelnih stanica cijelom dužinom probavnog trakta. Pri tom na opseg apsorpcije utječu različit pH uzduž probavnog trakta, prokrvljenost, odnos apsorpcijske površine prema volumenu crijevnog sadržaja, nazočnost žuči i sluzi, brzina prolaska te priroda epitelnih membrana. Ipak, najveći dio apsorpcije lijeka događa se u tankom crijevu zbog njegove iznimno velike površine epitela i dobre prokrvljenosti. Zahvaljujući specifičnoj građi tankog crijeva koja se sastoji iz kružnih nabora, crijevnih resica te mikrovila na enterocitima, apsorpcijska površina značajno je uvećana (13). Velika dodirna ploha nadoknađuje kraće zadržavanje u prosjeku od oko 2 sata u tom dijelu probavnog trakta (14,15).

Uspješnost peroralne administracije lijeka ovisi ponajprije o topljivosti i permeabilnosti, ali i o metaboličkoj stabilnosti i afinitetu za proteine transportere. Tako lijek mora biti dovoljno topljiv u sokovima želuca i crijeva jer samo otopljene molekule imaju mogućnost prolaska kroz membranu, nadalje mora biti kemijski stabilan u rasponu pH između 1.5 i 6.5, otporan na enzimsku degradaciju u lumenu i na metaboličku razgradnju u epitelnim stanicama probavnog trakta i jetri, te mora moći prolaziti kroz stanične membrane, odnosno biti permeabilan (16). Permeabilnost je uobičajen način uspoređivanja potencijala različitih spojeva da prođu kroz staničnu membranu,



a predstavlja brzinu kojom spoj prolazi, odnosno transportira se kroz staničnu membranu neovisno o načinu transporta.

U ranim fazama istraživanja koriste se visoko protočne automatizirane metode topljivosti i permeabilnosti kako bi se testirao velik broj novih molekula (17–20). Da bi *in vitro* metode i računalni modeli imali svrhu, potrebno je ustanoviti postojanje korelacije s *in vivo* sustavima i snagom predviđanja oralne raspoloživosti lijeka. Jedna od najpoznatijih i najčešće korištenih alata je biofarmaceutski klasifikacijski sustav (BSC, Biopharmaceutics Classification System) koji omogućuje predviđanje *in vivo* farmakokinetikog učinka na temelju rezultata permeabilnosti i topljivosti (21). Prema ovom sustavu lijekovi se klasificiraju u četiri razreda prema topljivosti i permeabilnosti: spojeve klase I karakterizira visoka permeabilnost i visoka topljivost; u klasi II su spojevi visoke permeabilnosti i niske topljivosti; dok su u klasi III spojevi niske permeabilnosti i visoke topljivosti. Na kraju u klasi IV nalaze se spojevi niske permeabilnosti i niske topljivosti. S obzirom da se za klasu I lijekova očekuje visoka *in vitro-in vivo* korelacija, regulatorne agencije dozvoljavaju za klasu I, na osnovi BSC sustava, skraćeni postupak za studije *in vivo* bioraspoloživosti i/ili bioekvivalencije. BDDSC (Biopharmaceutics Drug Disposition Classification System) sustav je dalje razrađen za predviđanje više različitih aspekata *in vivo* distribucije lijeka (22). Tako između ostaloga predviđa da je klinički utjecaj transportera na spojeve klase I minimalan ili zanemariv. Nadalje za spojeve klase II odlučujuću će ulogu u distribuciji igrati efluks transporteri, dok će za spojeve klase III to biti influks transporteri.

Ukupnu uspješnost peroralne administracije lijeka opisuje farmakokinetički parametar **bioraspoloživost** lijeka. Bioraspoloživost (F, engl. *bioavailability*) predstavlja frakciju, odnosno dio oralne doze lijeka, koja dospije u sistemsku cirkulaciju u nepromijenjenom obliku. Oralna bioraspoloživost izračunava se usporedbom ukupne količine nepromijenjenog lijeka u sistemske cirkulaciji nakon oralnog doziranja lijeka i ukupne količine nepromijenjenog lijeka u sistemske cirkulaciji nakon intravenskog doziranja lijeka, uz korekciju za primjenjene doze. Bioraspoloživost je produkt tri serijska procesa: frakcije primjenjene doze koja se apsorbira u probavnom traktu, frakcije apsorbirane doze koja izbjegne metaboličku razgradnju u enterocitima, te frakcije doze koja dospije u portalnu venu te potom izbjegne metaboličku razgradnju u jetri. Naime, sve apsorbirano iz crijeva, prije ulaska u sistemsku cirkulaciju i raspodjele po organizmu, portalnom venom prvo prođe kroz jetru, gdje dio lijeka može biti uklonjen metabolizmom

ili transportom u žuč. Ovaj proces naziva se efekt prvog prolaza kroz jetru (engl. *first-pass effect*).

### 2.3 Metabolizam lijekova

Oralno primjenjeni lijekovi nakon apsorpcije podliježu metaboličkim procesima. Metabolički procesi, odnosno biotransformacija, obuhvaća različite ireverzibilne biokemijske transformacije u jetri ili u nekom drugom organu ili tkivu koje kataliziraju enzimi. Produkti biotransformacija – metaboliti, razlikuju se po kemijskoj strukturi od polaznog spoja, a uslijed nastalih promjena različita su im i fizikalno-kemijska i biološka svojstva. Fizikalno-kemijska svojstva mijenjaju se u smjeru povećanja topljivosti u vodi u odnosu na početni spoj, a time i povećanje izlučivosti. Biološka svojstva mogu se biotransformacijom mijenjati u različitim smjerovima – tako nastali metabolit može biti neaktivan, aktivniji ili toksičan.

Mnogobrojni mogući putevi biotransformacije uključuju jednu ili više istovremenih enzimski kataliziranih reakcija, a mogu se podijeliti u dvije faze. Faza I obuhvaća reakcije oksidacije, redukcije i hidrolize, na koje se nastavljaju reakcije faze II – konjugacija s endogenim supstratom. Najznačajniji enzimi faze I su citokromi P450 na čelu s najzastupljenijim citokromom 3A4, koji je dodatno znatno prisutan u enterocitima.

S obzirom na važnost jetre u biorasploživosti lijeka, razvijeni su različiti *in vitro* testovi kako na subcelularnim frakcijama stanica jetre (mikrosomima) tako i na intaktnim stanicama jetre (hepatocitima), a kojima se proučava metabolička stabilnost spojeva i mjeri njihov metabolički intrinzični klirens. Pri tom su jetreni mikrosomi glavni nosioci ovih ispitivanja jer sadrže sve enzime endoplazmatskog retikuluma kao što su citokromi P450 (CYP) i UDP-glukuronil transferaza (UGT), a koji su odgovorni za 95% metaboličke razgradnje lijekova. Iz *in vitro* metaboličkog intrinzičnog klirensa, korekcijama i modeliranjem izračunava se predviđeni hepatski klirens *in vivo* (23). Hepatski klirens ( $CL_H$ ) brojčano prikazuje ireverzibilnu eliminaciju lijeka iz tijela putem trajne promjene molekule metabolizmom. Ako se lijek značajno metabolizira u jetri, njegov hepatski klirens je visok što rezultira smanjenom biorasploživosti.

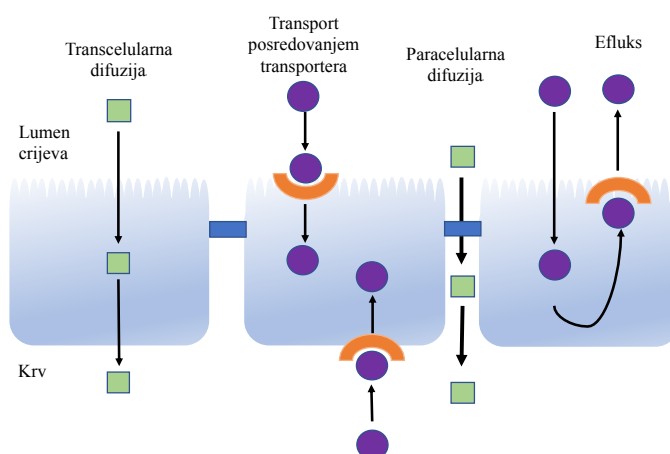
## 2.4 Membranska permeabilnost i transport lijekova

Sposobnost prolaska kroz staničnu membranu utječe na ulazak i raspodjelu lijeka u ljudskom tijelu. Kretanje lijeka u tijelu uključuje permeabilnost kroz različite membrane tijekom procesa apsorpcije, distribucije i eliminacije, oblikujući tako njegov farmakokinetički profil. Na permeabilnost lijeka utječu fizikalno-kemijske karakteristike kao što su lipofilnost (opisana particijskim koeficijentom  $\log P_{\text{oktanol/voda}}$  i distribucijskim koeficijentom  $\log D_{\text{oktanol/voda}}$ ), veličina (MW, molekulska masa), naboj (pKa), sposobnost stvaranja vodikovih veza te polarna površina molekula (engl. *polar surface area*, PSA).

Prema poznatom pravilu broja pet (engl. *rule of 5*, Ro5) koje je uveo Lipinski *i sur.*, može se očekivati dobra permeabilnost spoja ako mu je: (a) molekulska masa manja od 500 Da, (b) izračunati logP manji od 5, (c) broj donora vodikovih veza (HBD) manji od 5, te (d) broj akceptora vodikovih veza (HBA) manji od 10 (24). Pokazano je da ovo pravilo predstavlja uspješnu strategiju u istraživanju lijekova. Međutim, posljednjih godina sve se više lijekova može naći u području molekularnih karakteristika izvan Lipinski pravila (25). Pritom je ciklosporin, kao oralni lijek s molekulskom masom od 1203 Da, najpoznatiji predstavnik takvih lijekova (26).

Nadalje, ustanovljena je dobra korelacija između polarne površine molekula (PSA) i permeabilnosti (27). PSA je definirana kao zbroj površina svih polarnih atoma u molekuli, prvenstveno kisika i dušika, a za molekule koje posjeduju PSA iznad  $140 \text{ \AA}^2$  može se očekivati slaba permeabilnost (28).

Tri glavna načina prolaska lijeka kroz staničnu membranu su transcelularna difuzija, paracelularna difuzija i transport pomoću membranskih transportnih proteina, odnosno transportera (**Slika 2**).



**Slika 2.** Načini transporta kroz stanični monosloj.

### 2.4.1 Jednostavna ili pasivna transcelularna difuzija

Jednostavna difuzija je prolazak spoja direktno kroz fosfolipidni dvosloj niz koncentracijski gradijent. Takav prolazak ovisi o sposobnosti spoja da difundira prvo kroz apikalnu, a potom kroz bazolateralnu membranu crijevnog epitela. Stanična membrana, uključujući i onu crijevnog epitela, sastavljena je od fosfolipida koji su zbog svoje amfipatske prirode organizirani u dvosloj u kojem su uklopljeni različiti proteini (glikoproteini, transporteri, ionski kanali, receptori). U različitim sastavima glicerofosfolipidi, sfingolipidi i kolesterol čine dinamičnu fluidnu strukturu debljine oko 5-10 nm (29). Selektivna permeabilnost glavno je obilježje bioloških membrana na koje utječu sastav lipidnog dvosloja i proteinskih transportera. Epitelna stanica ima dodatno obilježje, a to je polariziranost, što znači da se apikalna membrana razlikuje od bazolateralne po sastavu proteina i lipida (11).

Proces transcelularne difuzije pojednostavljeno uključuje tri koraka: raspodjelu spoja u membranu, difuziju kroz membranu, te otpuštanje spoja u citosol (30). S obzirom na lipidnu prirodu staničnih membrana, ograničena je slobodna difuzija iona i hidrofilnih molekula te su za transmembransku difuziju dva najvažnija parametra polarnost (lipofilnost) i veličina (31). U slučaju vrlo lipofilnog spoja, lateralna difuzija kroz membranu može biti favorizirana pred difuzijom kroz citoplazmu.

### 2.4.2 Paracelularna difuzija

Stanice intestinalnog epitela međusobno su povezane proteinskim strukturama koje se nazivaju čvrste veze (engl. *tight junctions*). Čvrste veze koje apikalno međusobno povezuju stanice čine fizičku prepreku velikim molekulama i patogenima. Međutim, male pore ispunjene vodom unutar čvrstih veza čine paracelularni put i omogućuju prolazak malih hidrofilnih molekula s molekularnom masom manjom od 350 Da i niskom lipofilnosti ( $\log D_{7.4} < 0$ ) (16). Veličina pora (radijus) ovisi o lokaciji unutar GI trakta, pa su tako u jejunumu pore veličine 6-8 Å, u ileumu 2.9-3.8 Å, te u kolonu manje od 2.3 Å (32). Prednosti paracelularnog puta kod apsorpcije lijekova su da lipofilnost nije nužna i da se zaobilazi unutarstanična metabolička razgradnja, no s druge strane veliko je ograničenje ovog puta da veličina molekula mora biti manja od 15 Å (33). Atenolol, furosemid, cimetidin, ranitidin i famotidin primjeri su hidrofilnih, malih (Mr 200-270) molekula koje se apsorbiraju paracelularnim putem, a karakterizira ih niska permeabilnost jer je u

konačnici ukupan udio površine paracelularnih pora iznimno malen u usporedbi s ukupnom intestinalnom površinom (33).

### 2.4.3 Membranski transport posredovanjem transportera

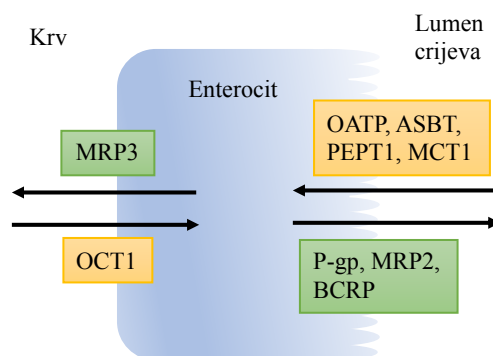
Osim jednostavne difuzije, prolazak lijekova kroz lipidni dvosloj može se odvijati i pomoću transportera – membranskih proteina koji omogućuju protok molekula u stanicu i van stanice (34). Ovisno o smjeru prolaska supstrata transportere dijelimo na **influks** (transport supstrata u stanicu) i **efluks** (izbacivanje supstrata iz stanice) transportere. Prema mehanizmu transporta poznajemo:

- **pasivne transportere** koji omogućuju olakšani prolazak supstrata kroz membranu niz njegov elektrokemijski gradijent;
- **primarno aktivne transportere** koji koriste energiju hidrolize adenozin trifosfata (ATP) za premještanje supstrata nasuprot njegovog elektrokemijskog gradijenta;
- **sekundarno aktivne transportere** koji premještanje supstrata suprotno njegovom elektrokemijskom gradijentu povezuju kretanjem drugog supstrata niz njegov elektrokemijski gradijent, a koji je nastao primarno aktivnim transportom drugog supstrata.

Fiziološka funkcija ovih proteina unos je hranjivih tvari i zaštita od toksina (35). Većina transportera može se svrstati u jednu od dviju velikih obitelji transportera:

- **ABC** transporteri (engl. *ATP binding cassette*) preuzimaju energiju proizvedenu ATP hidrolizom i djeluju kao efluks transporteri;
- **SLC** nosači (engl. *solute carrier*) koriste isključivo pasivni ili sekundarno aktivni mehanizam transporta za influks malih molekula u stanicu.

Predstavnici ABC i SLC transportera značajni za intestinalnu apsorpciju prikazani su na **Slici 3**.



**Slika 3.** Transporteri u tankom crijevu čovjeka.

Luminalna membrana intestinalnog epitela posjeduje razne influks transportere kao što su OATP (engl. *organic anion transporting polypeptide*), PEPT1 (engl. *peptide transporter 1*), MCT1 (engl. *monocarboxylic acid transporter 1*) te ASBT (engl. *apical sodium-dependent bile acid transporter*) (34). OATP1A2 (OATP-A; gen *SLCO1A2*) i OATP2B1 (OATP-B; gen *SLCO2B1*) su farmakološki važni influks transporteri značajno zastupljeni u tankom crijevu, a podložni su inhibiciji flavonoidima iz soka grejpa što rezultira smanjenom apsorpcijom nekih lijekova (npr. feksofenadina) (36). PEPT1 je sljedeći značajan transporter specifičan za crijeva koji fiziološki transportira di- i tripeptide. PEPT1 se koristi u strategiji za poboljšavanje bioraspoloživosti lijekova, na način da se lijek koji se loše apsorbira kemijski modificira u PEPT1 supstrat koji se dalje u organizmu enzimski razgradi na aktivni lijek. Primjeri lijek / prolijek za PEPT1 su aciklovir / valaciklovir (37), ganciklovir / valganciklovir (38) i LY243740 / talaglumetad (39).

Efluks transporteri prisutni na luminalnoj membrani enterocita su P-glikoprotein (P-gp, ABCB1), protein 2 višestruke rezistencije na lijekove (MRP2, ABCC2, engl. *multidrug resistance protein 2*) te protein rezistencije raka dojke (BCRP, ABCG2, engl. *breast cancer resistance protein*) (40,41). Sva tri proteina otkrivena su kroz rezistenciju na kemoterapiju te je daljnjim istraživanjima ustanovljena njihova prisutnost u raznim tkivima, među ostalim u probavnom traktu gdje je P-glikoprotein najzastupljeniji. Sve spomenute transportere karakterizira široka specifičnost supstrata te se supstrati često preklapaju između transportera. Za velik broj lijekova koji se koriste u terapiji ustanovljeno je da su supstrati efluks pumpi. Stoga je rana identifikacija supstrata efluks transportera od velike važnosti, a u cilju izbjegavanja neželjenih interakcija lijek-lijek.

## 2.5 P-glikoprotein (P-gp, MDR1, ABCB1)

Najbolje proučen transporter zbog svoje zastupljenosti u tkivima i uloge ograničavanja prolaska spojeva je efluks pumpa P-glikoprotein. Kodiran je genom *mdr1* i pripada superobitelji ABC transportera (engl. *ATP binding cassette*). Prvotno otkriven kao membranski glikoprotein koji smanjuje permeabilnost strukturno različitih citostatika u epitelnoj staničnoj liniji jajnika kineskog hrčka, CHO (42), ubrzo je prepoznat i kao glavni faktor pojave višestruke rezistencije na lijekove - MDR (engl. *multiple drug resistance*) u terapiji karcinoma.

P-glikoprotein je protein od 170 kDa, eksprimiran u svim tkivima. Međutim, najznačajniji utjecaj ima u funkciji krvno-moždane barijere, fetalno-majčinske barijere u

placenta, u ograničavanju oralne bioraspodivnosti lijekova i toksina tijekom prolaska kroz crijevni epitel, te direktnoj intestinalnoj ekskreciji putem žuči. Njegova fiziološka uloga je zaštitna jer izbacuje neželjene i nepoznate tvari iz tkiva/organizma, zbog čega utječe na raspoloživost lijeka u organu/organizmu (43).

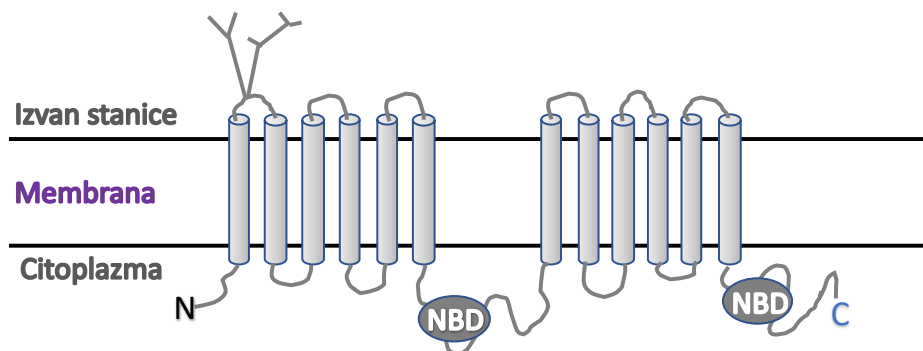
P-glikoprotein, prema nomenklaturi ABCB1 protein, pripada superobitelji ABC transporter (engl. *ATP binding cassette*) koji koriste energiju hidrolize ATP-a (adenozin 3-fosfata) za jednosmjerni transport supstrata kroz staničnu membranu u smjeru suprotnom od koncentracijskog gradijenta. Gen *mdr1* koji kodira P-glikoprotein prilično je konzerviran kroz različite vrste. Naime P-glikoprotein između sisavaca posjeduje 69-94% homologije primarne strukture (44). Tako je sekvenca aminokiselina štakorskog Mdr1 transporter 80% homologna humanoj, dok dvije mišje varijante P-glikoproteina - Mdr1a i Mdr1b posjeduju 87%, odnosno 80% homologije aminokiselina humanog P-glikoproteina (45). Usporedbom mRNA sekvence P-glikoproteina čovjeka sa životinjskim vrstama koje se uobičajeno koriste u prekliničkom ispitivanju, softverskim alatom BLAST (Basic Local Alignment Search Tool, dostupan na linku <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov>, National Center for Biotechnology Information, Bethesda, MD, USA) može se uočiti visok stupanj homologije što je prikazano u **Tablici 1**.

**Tablica 1.** Homologija između humane mRNA sekvence P-glikoproteina (NM\_000927.5) i mRNA sekvence P-glikoproteina predkliničkih vrsta.

<b>Protein</b>	<b>Pristupni broj za GeneBank</b>	<b>% homologije s NM_000927.5</b>
P-gp (Mdr1), pas	DQ068953.1	90
Mdr1a, štakor	NM_133401.2	84
Mdr1b, štakor	NM_012623.3	84
Mdr1a, miš	NM_011076.3	83
Mdr1b, miš	NM_011075.2	83

Struktura P-glikoproteina sadrži dvije transmembranske domene (engl. *transmembrane domains*, TMD) od kojih se svaka sastoji iz 6  $\alpha$ -heliksa koji zajedno čine supstrat-vezujuću domenu (engl. *drug binding domain*, DBD). Dvije nukleotid-vezujuće domene (engl. *nucleotide binding domain*, NBD) nalaze se u citoplazmi i

odgovorne su za hidrolizu ATP-a. Zajedno čine topologiju TMD1–NBD1–TMD2–NBD2 (Slika 4). Kristalna struktura mišjeg P-glikoproteina pokazala je da TMD čine jako veliku šupljinu unutar membrane u koju istovremeno stanu dva supstrata (46) što objašnjava polispecifičnu prirodu P-glikoproteina. Kristalne strukture eukariotskog P-glikoproteina određene su samo u konformaciji P-glikoproteina otvorenog prema citosolu, čime je otkriveno da P-glikoprotein ima dva otvora, prema citosolu i prema unutrašnjosti membrane (47). Nestabilnost konformacije prema vanstaničnom prostoru stoji na putu prema konačnom rasvjetljavanju mehanizma rada pumpe (48–50). Međutim, s obzirom na veći afinitet prema hidrofobnim supstratima, smatra se da se supstrati izravno iz membrane vežu na P-glikoprotein koji ih izbacuje izvan stanice (43). Pumpa štiti stanicu od potencijalno toksičnih učinaka jer supstrat topljiv u lipidima, koji bi inače neometano difundirao, presretne prije nego dospije u citosol.



**Slika 4.** Topološki prikaz P-glikoproteina. NBD = nukleotid vezujuća domena, N = N-terminalni kraj, C = C-terminalni kraj.

Supstrati P-glikoproteina strukturno su nepovezani, te velikog raspona molekularnih masa od 200 do 1900 Da. Među njegovim supstratima nalaze se prirodni spojevi (flavonoidi, kolhicin), citostatici (doksorubicin), steroidi (aldosteron, deksametazon), linearni i ciklički peptidi (leupeptin, beauvericin), fluorescentne boje (rodamin 123, kalcein AN) i ionofori (gramicidin A). Jedini zajednički nazivnik supstratima P-glikoproteina je njihova amfipatička priroda, što je uvjet za ulazak molekule u staničnu membranu. Često, ali ne nužno, su supstrati hidrofobni, s aromatskim prstenom i pozitivno nabijenim atomom dušika (40).

Aktivnost P-glikoproteina može biti promijenjena pod utjecajem inhibitora što je prepoznato kao terapijski pristup u liječenju raka i neuroloških bolesti. Naime, inhibitori onemogućuju efluks aktivnost P-glikoproteina tako da lijek ulazi u stanicu, te postiže



terapeutsku dozu. Inhibicija se događa na više načina, bilo kompetitivnim putem pri čemu je inhibitor ujedno i supstrat (ciklosporin A), ili čvrstim vezanjem na mjesto vezanja lijeka (zosukvidar, elakridar). Osim toga neki inhibitori dodatno djeluju na nivou regulacije izraženosti P-glikoproteina. Međutim, klinička primjena inhibitora nije linearna, te je često povezana s toksičnim efektima bilo inhibitora bilo lijeka. Danas se korištenjem računalnih pretraga i trodimenzionalnih modela P-glikoproteina pokušava ciljano doći do nove generacije inhibitora koji bi se specifično vezali na NBD, te tako izbjegli probleme ranijih generacija inhibitora (51).

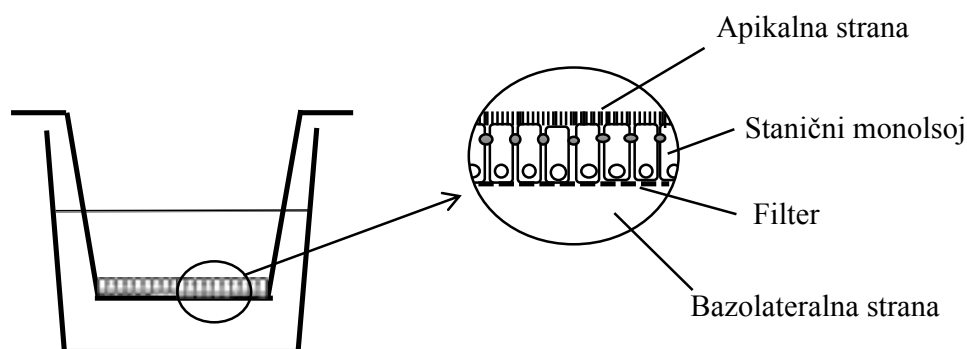
P-glikoprotein, osim što može utjecati na apsorpciju i raspoloživost lijeka u tijelu, što se posebno odnosi na lijekove koji za terapijski učinak trebaju proći krvno-moždanu barijeru, može izazvati neželjene interakcije kao posljedica istovremene primjene dva lijeka ili kombinacije lijeka i sastojka hrane (biljni flavonoidi). Stoga su rana testiranja i predviđanja interakcije potencijalnog lijeka s P-glikoproteinom danas postala neophodna.

## 2.6 Stanični model permeabilnosti i transporta

*In vitro* stanični modeli permeabilnosti nezaobilazni su u istraživanju lijekova te predstavljaju alat za procjenjivanje apsorbirane frakcije *in vivo* ili ispitivanje različitih mehanizama permeabilnosti (52). Stanični pokusi permeabilnosti i transporta su relativno jeftiniji, brži i većeg protoka testiranih spojeva u usporedbi s *in vivo* metodama određivanja crijevne apsorpcije i uključenosti transportera u cijeli proces (53). Određivanje permeabilnosti pomaže u ranim fazama istraživanja u odabiru molekula sa što je moguće povoljnijim svojstvima. Ponekad nije moguće postići željenu permeabilnost, pa u takvim slučajevima rezultati permeabilnosti iz staničnog modela pomažu planiranju dodatnih pokusa u pretkliničkoj i kliničkoj fazi razvoja lijeka.

Princip staničnog modela permeabilnosti (**Slika 5**) je sljedeći: sađenjem stanice adheriraju za polupropusnu plastičnu podlogu – membranu te nakon postizanja konfluentnosti počinju spontano diferencirati u nepropusni polarizirani monosloj koji predstavlja model crijevnog epitela. Pritom, strana monosloja koja je prihvaćena za podlogu predstavlja bazolateralnu ili krvnu stranu, a suprotna strana slobodna prema mediju predstavlja apikalnu ili luminalnu stranu. Tako se pokusi permeabilnosti na monosloju stanica mogu izvoditi u dva smjera: apikalno u bazolateralno (smjer apsorpcije), i bazolateralno u apikalno (smjer ekskrecije). Pri tome je potrebno održavati takozvane „*sink conditions*“, što znači da će tijekom pokusa manje od 10% spoja prijeći iz donorskog

u akceptorski odjeljak. Time se utjecaj difuzije u povratnom smjeru iz akceptorskog u donorski odjeljak svodi na minimum (54).



**Slika 5.** Prikaz staničnog modela permeabilnosti.

Koncentracija organskog otapala je ograničena na 1% (v/v) ili manje (52). Uobičajeno se koristi DMSO, a mogu se koristiti i acetonitril i metanol. Pokus transporta potrebno je osim toga izvoditi uz stalno miješanje kako bi se minimizirao nepokretan sloj vode (engl. *un-stirred water layer*) uz monosloj (55).

Parametri kontrole kvalitete pokusa uključuju procjenu kvalitete monosloja praćenjem: (a) integriteta monosloja, (b) balansa mase, te (c) funkcionalnosti transportera.

Integritet monosloja (a) kvantitativno se procjenjuje izvođenjem transportnog pokusa s hidrofilnim paracelularnim markerom kao što je šećerni alkohol manitol, šećerni polimer dekstran, polisaharid inulin ili fluorescentna proba Lucifer yellow paralelno uz testirani spoj (56). Niska permeabilnost paracelularnog markera ukazuje na intaktnu fizičku barijeru monosloja. Drugi način procjene integriteta monosloja je mjerenje transepitelnog električnog otpora (TEER, engl. *transepithelial electrical resistance*) neposredno prije početka te na kraju pokusa.

Balans mase (b) je zbroj dobivene količine spoja u akceptorskom odjeljku na kraju pokusa i količine spoja koja je ostala na kraju pokusa u donorskom odjeljku, podijeljen početnom količinom spoja u donorskom odjeljku. Idealno iznosi 100%, što znači da se sva količina spoja koja je ušla u pokus rasporedila po odjeljcima. Balans mase od 90% daje 10% greške izračunatom koeficijentu permeabilnosti. Treba imati na umu da postoje određena ograničenja staničnog testa permeabilnosti koji se najčešće odražavaju kroz loš balans masa. Spojevi s jako niskom topljivosti, uz ograničenu količinu organskog otapala, imat će jako nizak balans mase što rezultira nepouzdanim koeficijentom permeabilnosti. Također izuzetno lipofilni spojevi mogu se vezati na plastiku u kojoj se pokus izvodi. Osim

toga, loš balans mase može biti rezultat zadržavanja spoja u stanicama i/ili razgradnje metaboličkim enzimima u monosloju (npr. citokromima). Pritom je zanimljivo da su spojevi koji su supstrati citokroma (CYP) 3A4 vrlo često i supstrati P-glikoproteina. Štoviše, ustanovljena je koregulacija proteina 3A4 i P-glikoproteina, te ta dva proteina zajedno funkcionalno djeluju kao intestinalna barijera za ksenobiotike (57).

Funkcionalnost transportera (c) određuje se kontrolnim testnim spojevima kao što je amprenavir. Amprenavir je robustan supstrat P-glikoproteina, jer njegov transport preko monosloja stanica MDCK-MDR1 ovisi samo o pasivnoj propusnosti i P-glikoproteinu (58).

## 2.7 Stanične linije u pokusima permeabilnosti i transporta

Za proučavanje transporta lijekova kroz epitel na raspolaganju su stanične linije različitih tkiva i vrsta. Najčešće epitelne stanične linije koje se koriste za transportne studije navedene su u **Tablici 2**. Dvije linije korištene u izradi ovog rada MDCK i Caco-2, dalje su u tekstu detaljnije opisane.

**Tablica 2.** Porijeklo i karakteristike staničnih linija koje se koriste u pokusima permeabilnosti (59).

Stanična linija	Porijeklo	Karakteristike
Caco-2	Humani adenokarcinom kolona	- spontana diferencijacija u enterocit nakon 21 dan - raznolikost transportnih proteina - male paracelularne pore
2/4/A1	Tanko crijevo fetusa štakora	- propusnije paracelularne pore po veličini najbližije humanom tankom crijevu - brza diferencijacija ovisna o temperaturi
LLC PK <sub>1</sub>	Bubreg svinje	- brza diferencijacija - niska razina endogenih efluks proteina
MDCK	Bubreg psa	- brza diferencijacija - niska razina endogenih efluks proteina

### 2.7.1 Caco-2 stanična linija

Caco-2 stanična linija je humanog porijekla, izolirana iz adenokarcinoma debelog crijeva (engl. *Caucasian colorectal adenocarcinoma*). Redovitim održavanjem u kulturi Caco-2 žive u nediferenciranom obliku. Međutim, rastom na filter membrani u post-konfluentnoj kulturi tijekom perioda od 21 dan, spontano diferenciraju oblikujući polarizirani monosloj s mikrovilima na apikalnoj površini i čvrstim vezama među

stanicama. Tako morfološki nalikuju enterocitima tankog crijeva, ali i funkcionalno, eksprimirajući metaboličke enzime kao što su laktaza, aminopeptidaza N, sukraza-izomaltaza, dok jačina čvrstih veza odražava njihovo porijeklo iz debelog crijeva, gdje su čvrste veze nepropusnije u odnosu na tanko crijevo (60).

Caco-2 je prva stanična linija evaluirana za permeabilnost lijekova što se može pripisati njenom visokom stupnju diferencijacije pri standardnim uvjetima održavanja stanične kulture (54,56). Postoji velik broj literaturnih podataka na ovoj liniji te se vrlo često, zbog prije navedenih karakteristika, uzima kao zlatni standard. Međutim, primijećena je velika varijabilnost rezultata permeabilnosti što zbog heterogenosti populacije, a što zbog različitih uvjeta održavanja kulture i razlike u broju pasaža između laboratorija (61). Kako bi se postigla bolja uniformiranost protokola, objavljene su detaljne procedure rada s Caco-2 linijom i izvođenja pokusa transporta na stanicama Caco-2 (52). Dakle u pažljivo kontroliranim uvjetima stanice Caco-2 mogu kontinuirano kroz dug vremenski period postizati dosljedne rezultate. Pri tom je dobra kontrola kvalitete ključna kako bi se uočile promjene u funkcioniranju uzrokovane nestabilnom poliklonalnom prirodom Caco-2.

Dva najveća nedostatka stanica Caco-2 su dugotrajni uzgoj i variranje izraženosti P-glikoproteina tijekom vremena, odnosno pasaža. Osim toga često se spominje i manja veličina paracelularnih pora u čvrstim vezama unutar Caco-2 monosloja, odnosno jače i kompaktnije čvrste veze između diferenciranih stanica Caco-2. Iz pozicije istraživanja novih lijekova, poželjno je da je stanični model što kraćeg trajanja i visokog kapaciteta protoka ispitivanih spojeva, isplativ, prediktivan, te robustan. Kako bi se Caco-2 model približio takvom zahtjevu razvijeni su modificirani protokoli ubrzanog uzgoja Caco-2 monosloja. Oni uključuju sađenje veće koncentracije stanica Caco-2 na membranu obloženu kolagenom, koji ubrzava razvoj polariziranog i nepropusnog Caco-2 monosloja. Osim toga, u medij se dodaju suplementi poput natrijevog butirata ili puromicina koji modificiraju diferencijaciju i rast stanične linije (62-63). Naime, Caco-2 monosloj mora biti konfluentan i do kraja diferenciran da bi se mogao koristiti za ispitivanje permeabilnosti spojeva. Ovim modifikacijama uvjeta, nakon 4 do 7 dana rasta, monoslojevi su pokazali integritet i nepropusnost za Lucifer yellow ili manitol, polariziranost asimetričnim transportom supstrata P-glikoproteina i aktivnošću enzima poput alkalne fosfataze smještene na apikalnoj membrani. Nadalje, 4-7 dnevni Caco-2 model je ostvario dobru

korelaciju s rezultatima standardnog 21-dnevnog modela i oralne apsorpcije *in vivo* (62–64).

Drugi način poboljšanja Caco-2 modela je primjena kokulture - način uzgoja dvije ili više različitih staničnih linija zajedno kako bi se postigao model koji što vjernije nalikuje *in vivo* tkivu (65). Naime, crijevna stjenka nije monokultura, već se sastoji iz konglomerata apsorpcijskih stanica, vrčastih stanica, endokrinih stanica i M-stanica. Najzastupljenije su apsorpcijske stanice odnosno enterociti. Druge po zastupljenosti su vrčaste stanice čija je glavna uloga proizvodnja mucina (kiselih glikoproteina), koji hidrirani i međusobno povezani čine sluz. Vrčaste stanice *in vitro* može oponašati stanična linija HT29-MTX (66). Stoga kokultura Caco-2 i HT29-MTX koje proizvode mukus te zajedno međusobno formiraju monosloj sa slabijim čvrstim vezama, vjernije oponaša *in vivo* situaciju (67). Zbog slabije povezanosti međustaničnih čvrstih veza u kokulturi Caco-2 i HT29-MTX, paracelularna permeabilnost hidrofилnih molekula veća je u odnosu na monokulturu Caco-2, te time predikativnija. Međutim, modeli kokulture nose svoje izazove kroz optimizaciju uvjeta istodobnog rasta i diferencijacije dviju različitih staničnih linija, te održavanje kvalitete kroz reproducibilne rezultate (68). Vjerojatno stoga kokulture nisu postale dio ranog istraživanja lijekova.

### 2.7.2 MDCK stanična linija

MDCK (engl. *Madin-Darby canine kidney*) su stanice bubrežnog epitela psa izolirane 1958. godine. Vrlo rano primijećena je heterogenost linije koja je bila očita čak na morfološkom nivou te je došlo do spontanijih izdvajanja varijantnih MDCK linija (69). Najčešća varijanta stanica MDCK u transportnim studijama je MDCKII, koju karakteriziraju propusnije čvrste veze što je vidljivo po manjem transepitelnom električnom otporu (TEER, engl. *transepithelial electrical resistance*) (70). Međutim, neke kompanije iz povijesnih razloga koriste MDCKI (71).

Usporedbom s Caco-2, na stanicama MDCK dobiveni su slični rezultati permeabilnosti (72), dok su istovremeno stanice MDCK imale veliku prednost jer im je potrebno samo 3-5 dana da diferenciraju u nepropusni polarizirani monosloj u odnosu na 21 dan za Caco-2. Daljnja usporedba na velikom setu podataka je potvrdila MDCK liniju kao model za procjenu membranske permeabilnosti u ranim fazama istraživanja novih lijekova (73,74). Unatoč porijeklu iz različitih vrsta, postoji čvrsta korelacija između Caco-2 i MDCK permeabilnosti (1). Jednostavnost rukovanja MDCK modelom smanjuje mogućnost kontaminacije u radu sa stanicama, te omogućava profiliranje većeg broja

spojeva u kraćem vremenskom razdoblju. Isto tako, stanice MDCK karakterizira relativno niska izraženost metaboličkih enzima, ali i endogenih transportera (75), zbog čega su pogodne za ispitivanje pasivne permeabilnosti spojeva, a pogodne su i za transfekciju genima koji kodiraju različite transportere, te omogućavaju njihovu pojačanu izraženost (npr. MDR1). Zbog svega navedenog, MDCK model je često korišten u farmaceutskim kompanijama i to ponajviše njegova transfecirana linija MDCK-MDR1.

### 2.7.3 MDCK-MDR1 stanična linija

Stabilna transfekcija humanim genom *mdr1* rezultirala je novom staničnom linijom MDCK-MDR1 koja ima prekomjerno izražen P-glikoprotein humanog porijekla. MDCK-MDR1 postala je u farmaceutskoj industriji stanična linija od izbora za proučavanje dvosmjernog transporta molekula, evaluacije da li je spoj supstrat P-glikoproteina, te predikcije crijevne apsorpcije ili predikcije prolaska krvno-moždane barijere (76–78). S obzirom na svoju lokalizaciju u epitelu krvnih žila u mozgu, P-glikoprotein igra odlučujuću ulogu u prelasku lijeka iz krvi do mjesta djelovanja kroz krvno-moždanu barijeru. Stoga je MDCK-MDR1 stanična linija postala ključni dio istraživanja lijekova za liječenje bolesti središnjeg živčanog sustava.

Stanice MDCK izuzetno su podatne, robusne i jednostavne za rukovanje, a jedini im je pravi nedostatak njihovo pseće porijeklo. Tijekom vremena, primijećeno je da prisutna pozadinska aktivnost endogenog psećeg P-glikoproteina može utjecati na rezultate permeabilnosti. Spoj može biti supstrat psećeg, a da nije supstrat humanog P-glikoproteina što dovodi do lažno pozitivnih rezultata (79). Kako bi se poništio učinak endogenog efluksa transporta, američka agencija za lijekove (FDA) preporučila je određivanje neto omjera efluksa, odnosno omjer efluksa u transfeciranim stanicama MDCK-MDR1 podijeljen s omjerom efluksa u nativnim divljega tipa stanicama MDCK (MDCK-WT) (80). Analizom neto omjera efluksa na velikom broju podataka uočeni su lažno negativni rezultati kod spojeva kao eritromicin, koji pokazuju velik omjer efluksa u MDCK-WT (2,71). Razlog tome može biti razlika u izraženosti endogenog psećeg P-glikoproteina u MDCK-MDR1 u odnosu na MDCK-WT staničnu liniju (81). Naime, u stanicama MDCK-MDR1 je izraženost, ne samo mRNA za *mdr1* nego i za *mdr2*, bila značajno niža u odnosu na MDCK-WT.

Kako bi se dokazalo da je testirana supstanca doista supstrat za P-glikoprotein, dodatno se radi još jedan MDCK-MDR1 transportni test koji se izvodi u prisustvu P-glikoprotein inhibitora. Elakridar, u početku poznat kao GF120918, specifično je

razvijen kao inhibitor P-glikoproteina te je značajno potentniji od do tada uobičajeno korištenog inhibitora, verapamila (82). U studiji je demonstriran inhibitorni učinak elakridara kroz ponovno uspostavljanje osjetljivosti prvotno MDR rezistentnog tumora na kemoterapeutik doksorubicin. I danas se ispituje mogućnost upotrebe elakridara uz antitumorske lijekove u tretmanu tumora mozga (83). Istovremeno, elakridar je našao i rutinsku upotrebu u istraživanju lijekova.

#### 2.7.4 Subpopulacije MDCK stanične linije

Pokazano je da je MDCK linija heterogena te sadrži subpopulacije stanica s različitim svojstvima propusnosti i transporta (84). Nekoliko pokušaja je napravljeno kako bi se izolirala homogena stanična linija s niskom izraženošću P-glikoproteina iz početne poliklonalne MDCK linije. Kako bi se izolirale pojedinačne stanice s željenim fenotipom, stanice MDCK sortirane su na protočnom citometru prema sposobnosti efluksa fluorescentnog kalceina (2,85). Izolirani klon nazvan je MDCK-LE (engl. *low efflux*) za koji je pokazana značajno niža izraženost endogenog gena za P-glikoprotein, a čime je postignuta zanemariva efluks aktivnost za većinu spojeva osim za jake P-glikoprotein supstrate (2). Gartzke i Fricker su otišli korak dalje te su dodatno izolirali subpopulaciju MDCK-MDR1 s značajno višom izraženošću humanog P-glikoproteina, a istovremeno podjednakom izraženošću endogenog P-glikoproteina. Koristeći spomenute subklonove MDCK i MDCK-MDR1 postignuta je bolja točnost, te umanjen broj lažno negativnih rezultata neto omjera efluksa.

Izolacija pojedinačnih stanica se, osim protočnom citometrijom, može izvesti i nizom drugih tehnika kao što su mikrokapilarana aspiracija, upotrebom lasera ili mikrofluida (86). Sve te tehnike zahtijevaju specifičnu ekspertizu i opremu. Jednostavniji i fleksibilniji pristup bio bi subkloniranje velikim razrjeđivanjem, metodom u kojoj se stanična suspenzija jako razrijedi, te se za izrasle kolonije smatra da potječu od jedne stanice (87).

#### 2.7.5 „Knock-out“ MDCK linije

Tehnike suvremene molekularne biologije omogućuju manipuliranje genetičkim materijalom, te među ostalim omogućuju selektivno inaktiviranje gena (engl. *gene knock-out*) za endogene transportere, prvenstveno najdominantnije efluks pumpe, P-glikoproteina. Prva upotrjebljena tehnika na stanicama MDCK bila je genomsko editiranje korištenjem ZFN nukleaza (engl. *zinc-finger nucleases*) (88). Njome je

postignuto značajno inaktiviranje Mdr1, međutim ostatna aktivnost pumpe bez obzira koliko mala upućuje na nepotpunu inaktivaciju. Nakon toga, klon sa stabilnom i potpuno eliminiranom izraženošću endogenog P-glikoproteina dobiven je upotrebom CRISPR-Cas9 tehnologije (89). Odabrani klon imao je homozigotnu deleciju četiri nukleotida u egzonu 4 psećeg *Abcb1* gena koja uzrokuje pomak čitanja i tri uzastopna stop kodona u egzonu 4 te tako rezultira krnjim, nefunkcionalnim proteinom (89). S obzirom da je sustav CRISPR/Cas9 (engl. *Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats/CRISPR-Associated Protein 9*) superiorniji prema svim postojećim tehnikama zbog specifičnosti, širine upotrebe i brzine, a isto tako razmjerno jednostavan za korištenje, postoji entuzijazam oko korištenja ove tehnike u ADME studijama (90).

Chen *i sur.* je koristeći CRISPR-Cas9 dizajnirala klon stanica MDCKI s delecijom jednog nukleotida na poziciji 11 u egzonu 3, što je rezultiralo ranim prekidom translacije na poziciji 66 u peptidu (71). U toj studiji su nadalje potvrdili hipotezu da je Mdr1 primarno odgovoran za endogeni efluks u stanicama MDCK. Usporedbom permeabilnosti velikog seta spojeva na stanicama „knock-out“ MDCK i MDCK WT, pokazano je da od 35% spojeva koji su imali asimetrični transport u MDCK WT liniji, niti jedan spoj nije imao efluks u „knock-out“ liniji.

Osim toga „knock-out“ linije su se pokazale pogodnima za transfekciju humanim genom *mdr1* čime je dobivena linija za identifikaciju supstrata specifično humanog P-glikoproteina (71,91).

## 2.8 Matematički izvod formule za permeabilnost

Pasivna difuzija glavni je apsorpcijski proces za većinu lijekova, a događa se zbog veće koncentracije lijeka u lumenu crijeva u odnosu na krv, odnosno donorske i akceptorske otopine u eksperimentalnom modelu. Brzina transfera molekula preko membrane naziva se fluks i direktno je proporcionalan koncentracijskom gradijentu što je opisano prvim Fickovim zakonom (16,59). Zakon kaže da je brzina difuzije (količina tvari  $dM_A$  koja u vrlo kratkom vremenu  $dt$  prođe kroz presjek  $A$ ) proporcionalna gradijentu koncentracije  $dC/dx$  (1). Koeficijent difuzije  $D$ , je količina lijeka koja u jedinici vremena prijeđe kroz jedinični presjek membrane kada je koncentracijski gradijent jedan ( $dC/dx=1$ ).

$$\frac{dM_A}{dt} \cdot \frac{1}{A} = -D \cdot \frac{dC}{dx} \quad (1)$$



Koncentracija na donorskoj strani zapravo je jednaka  $K \times C_D$ , a na akceptorskoj strani  $K \times C_A$ , pri čemu je  $K$  koeficijent distribucije između membrane i vodene otopine, a  $C_D$  i  $C_A$  koncentracije donorske i akceptorske otopine. U tom slučaju gradijent ( $dC/dx$ ) jednak je  $K \times (C_A - C_D)/h$ , pri čemu je  $h$  debljina membrane. Kad to uključimo u jednadžbu (1) dobivamo:

$$\frac{dM_A}{dt} \cdot \frac{1}{A} = -K \cdot D \cdot \frac{C_A - C_D}{h} \Rightarrow$$

$$\frac{dM_A(t)}{dt} = \frac{K \cdot D}{h} \cdot A \cdot (C_D - C_A) \quad (2)$$

Debljina membrane je konstantna za određeno mjesto apsorpcije. Zbog toga što su  $D$ ,  $K$  i  $h$  konstante u uobičajenim uvjetima apsorpcije može se definirati nova konstanta – koeficijent permeabilnosti  $P$ , koji opisuje brzinu prolaska spoja kroz barijeru. S obzirom da i  $K$  i  $D$  ovise o kemijskim svojstvima spoja i barijere, koeficijent permeabilnosti isto ovisi, osim o debljini membrane, i o kemijskim svojstvima spoja i barijere.

Uobičajena i najjednostavnija aproksimacija ove jednadžbe pretpostavlja da se pri niskoj brzini transporta značajno ne mijenja koncentracija ni u donorskom niti u akceptorskom odjeljku te se može pretpostaviti da su konstantne:  $C_D \approx C_0$ ,  $C_A \approx 0$ . Ova aproksimacija ipak nadalje uvjetuje izvođenje eksperimenta u takozvanim „sink“ uvjetima, što znači da je koncentracija u akceptorskoj otopini manja od 10% koncentracije u donorskoj otopini na kraju pokusa. Ukoliko se eksperiment provodi u drugačijim uvjetima, jednadžba 3 ne može se primijeniti za određivanje permeabilnosti.

$$P = \frac{K \cdot D}{h}, \quad C_D \gg C_A, \quad C_D \approx C_0, \quad C_A \approx 0 \Rightarrow$$

$$P = \frac{dM_A(t)}{dt} \cdot \frac{1}{A} \cdot \frac{1}{C_0} \quad (3)$$

Daljnijim integriranjem se dobiva:

$$\frac{M_A(t)}{C_0} = P \cdot A \cdot t + const$$

$$M_A(0) = 0 \Rightarrow const = 0$$

$$P = \frac{M_A(t)}{t} \cdot \frac{1}{A} \cdot \frac{1}{C_0} \quad (4)$$

Koeficijent permeabilnosti je brzina kojom spoj prolazi membranu bez obzira na mehanizme transporta koje koristi za prolaz i ima dimenziju brzine [cm/s].  $P_{app}$  (engl. *apparent permeability*) je empirijska veličina koja se određuje mjerenjem spoja koji je prošao kroz sloj stanica (jednadžba 5).

$$P_{app} = \frac{V_A \cdot C_A(t)}{t} \cdot \frac{1}{A} \cdot \frac{1}{C_0} \cdot 10^6 \quad [10^{-6} \text{ cm/s ili } 10 \text{ nm/s}] \quad (5)$$

Pri čemu je  $V_A$  je volumen akceptorske otopine,  $C_A$  je izmjerena koncentracija spoja u akceptorskoj otopini,  $t$  vrijeme inkubacije,  $A$  površina monosloja stanica, a  $C_0$  je izmjerena koncentracija donorske otopine u vremenu 0.

## 2.9 Omjer efluksa

U takozvanim dvosmjernim pokusima permeabilnosti određuje se brzina prolaska spoja ( $P_{app}$ ) u oba smjera: iz apikalnog u bazolateralni, tj. apikalno-bazolateralni smjer apsorpcije, te iz bazolateralnog u apikalni, tj. bazolateralno-apikalni smjer izlučivanja. Omjer permeabilnosti ova dva smjera naziva se omjer efluksa (ER) te predstavlja neposredan pristup u identifikaciji supstrata za efluks transportere. U slučaju kad spoj prolazi dominantno transcelularnom difuzijom kroz monosloj stanica, brzine će biti podjednake u oba smjera jer nema uključenosti transportera u taj proces. Suprotno tome, ako je spoj supstrat P-glikoproteina, prolazak u bazolateralno-apikalnom smjeru bit će veći od apikalno-bazolateralnog, jer P-glikoprotein izbacuje spoj u bazolateralno-apikalnom smjeru te tako povećava bazolateralno-apikalnu, a smanjuje apikalno-bazolateralnu brzinu. U tom slučaju omjer efluksa je veći od 2 što upućuje na uključenost efluks transportera. Za potvrdu se provodi dvosmjerni pokus s inhibitorima efluks transportera (P-gp, BCRP i MRP2), koji onda demonstrira smanjenje omjera efluksa na ispod 2. Pri tom treba voditi računa o koncentraciji spoja koja se testira kako ne bi došlo do zasićenosti transportera čime model gubi na funkciji identifikacije supstrata transportera, te se mogu dobiti lažno negativni rezultati.

## 2.10 Makrociklički lijekovi

Makrociklički lijekovi su raznolika grupa kemijskih spojeva koje obilježava karakteristična struktura velikog prstena. Prvi makrocikli otkriveni su u prirodi, a zbog svojih farmakoloških svojstava razvijeni su u lijekove. Specifična podskupina makrocikličkih spojeva s antibiotskim djelovanjem – makrolidi, brzo i učinkovito sprječavaju rast i uništavaju široki spektar bakterijskih patogena. Dodatno zbog mogućnosti oralne primjene i neškodljivosti, makrolidni antibiotici zauzimaju važno mjesto u liječenju zaraznih bolesti (92).

Makrolide karakterizira višestruko supstituirana prstenasta struktura, tzv. makrolaktonski prsten, s vezanim jednostavnim šećernim skupinama. Molekulska masa i prsten dva su obilježja koja ih čine jedinstvenima među lijekovima te im osigurava posebne značajke. Primjerice makrolaktonski prsten omogućuje molekuli određenu fleksibilnost čime njena trodimenzionalna struktura olakšava interakciju s mjestom vezanja (93,94). Molekularne karakteristike makrolida ne slijede Lipinski pravilo broja pet za predviđanje oralne bioraspoloživosti lijeka (24), no oni ipak postižu uspješnu kombinaciju fizikalno-kemijskih i farmakokinetičkih svojstava poput topljivosti, lipofilnosti, metaboličke stabilnosti i bioraspoloživosti.

Makrolidi se mogu svrstati u dvije velike grupe prema primarnom djelovanju: antibiotici i imunosupresivi, dok je za mnoge članove iz obje grupe utvrđeno dodatno protuupalno i imunomodulatorno djelovanje. Prema strukturi se mogu nadalje podijeliti u eritronoide, čiji strukturni prototip je eritromicin, leukomicine s predstavnikom leukomicinom, rapamicine, te askomicinsku podklasu (**Tablica 3 i 4**).

### 2.10.1 Makrolidni antibiotici

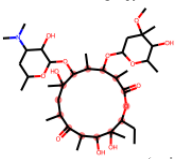
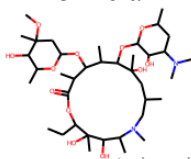
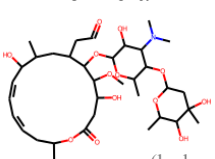
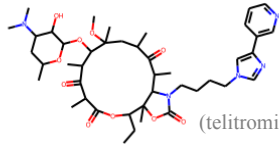
#### 2.10.1.1 Mehanizam djelovanja

Prvi makrolidni antibiotik, eritromicin A, izolirali su 1952. godine Mc Guire *i sur.* (95) iz Eli Lilly kompanije. Eritromicin je prirodni organski spoj kojeg sintetizira *Saccharopolyspora erythraea*, iz porodice aktinomiceta. Ubrzo su otkriveni i drugi prirodni makrolidni antibiotici poput josamicina (96) i spiramicina (97). Iako cijelu klasu odlikuje izvanredna antibakterijska aktivnost (98), zbog nepredvidljive farmakokinetike i nestabilnosti u kiselom pH želuca nastavljen je njihov daljnji razvoj. Ishod tog procesa bila je druga generacija makrolida – derivirani polusintetski spojevi prve generacije. U značajnije polusintetske derivate eritromicina ubrajaju se klaritromicin, roksitromicin te

azitromicin, koji dijele zajedničke strukturne karakteristike, poput hidroksilne skupine laktonskog prstena koje su glikozidnom vezom vezane za dvije molekule šećera: kladinoza na poziciji 3 i desozamin na poziciji 5. Miokamicin i rokitamicin su jedini 16-člani spojevi druge generacije koji su razvijeni za ljudsku upotrebu. Klasifikacija makrolida prikazana je u **Tablici 3**.

Druga generacija makrolida poboljšala je navedene poteškoće prve generacije, međutim rastući problem antibiotske rezistencije tražio je punu pažnju i nova rješenja. Stoga je zadatak treće generacije bio poboljšati sve veću i opasniju antibiotsku rezistenciju, što se postiglo novom klasom ketolida deriviranoj iz eritromicina, koja je ime dobila po keto skupini na poziciji 3 uvedenoj umjesto šećera kladinoze. Ketolidi su zadržali izvanrednu antibakterijsku aktivnost, dok pritom iznimno rijetko dovode do pojave rezistencije (99). Unatoč pozitivnim aspektima, jedini ketolid koji je bio na tržištu, telitromicin, uzrokuje, nasuprot ranijim makrolidima koji se smatraju neškodljivima, niz nuspojava, među ostalim hepatotoksičnost, koje se pripisuju piridinu na kraju postraničnog lanca (100,101). Nova nada ketolida je solitromicin na kojem je piridin zamijenjen aminofenilom, a na prsten je dodan fluor koji osigurava aktivnost prema rezistentnim bakterijskim sojevima (102).

**Tablica 3.** Klasifikacija makrolidnih antibiotika prema strukturi makrocikličkog prstena u eritronolide i leukomicine.

Makrolidni antibiotici	Eritronolidi		Leukomicini
	14 – člani	15 – člani	16 – člani
	 (eritromicin)	 (azitromicin)	 (leukomicin)
1. generacija (prirodni)	Oleandomicin <b>Eritromicin</b>		Leukomicin Josamicin Spiramicin Midekamicin
2. generacija (polusintetski)	Klaritromicin Roksitromicin Diritromicin	Azitromicin	Rokitamicin Miokamicin
3. generacija (ketolidi)	Telitromicin Solitromicin Cetromicin Moditromicin	 (telitromicin)	

Svi makrolidni antibiotici ostvaruju antibiotsko djelovanje vezanjem na veliku ribosomalnu podjedinicu bakterijskog ribosoma (50S), čime onemogućuju uspješnu sintezu bakterijskih proteina (103). Za izdvojiti je kako je jedan od mehanizama rezistencije bakterija efluks makrolida posredovanjem membranskih transportnih proteina, prvenstveno obiteljima Mef i Msr koje posjeduju ATP vezajuću domenu i homologiju s ABC transporterima (104). Osim antibiotskog djelovanja vrijedi napomenuti da makrolidni antibiotici imaju imunomodulatorna i protuupalna svojstva koja se očituju u njihovoj djelotvornosti u liječenju kroničnih upalnih bolesti poput difuznog panbronhilitisa i cistične fibroze (92).

#### *2.10.1.2 Farmakokinetika*

Farmakokinetička svojstva makrolida ovise o njihovoj kemijskoj strukturi, te su se poboljšavala razvojem novih makrolida (105). Tako eritromicin ima nisku bioraspoloživost, kratko vrijeme poluživota ( $t_{1/2}$ ) i umjereni volumen distribucije (106). Njegovoj niskoj bioraspoloživosti pridonosi činjenica da je nestabilan pri niskom, odnosno kiselom pH, te prilikom oralne primjene dolazi do degradacije u želucu. Pri tome je produkt degradacije neaktivan, a međuprodukt raspada povezuje se s gastrointestinalnim nuspojavama (107). S druge strane, klaritromicin, njegov metilirani analog, stabilniji je u kiselom pH, te ima umjerenu bioraspoloživost i umjereno vrijeme poluživota. Nadalje, azitromicin, tercijarni amino derivat eritromicina, još je stabilniji pri niskom pH, a jedinstven je po dugom  $t_{1/2}$  (108–110). Tako je oralna bioraspoloživost eritromicina svega 25%, klaritromicina 55%, a azitromicina 37%, dok je  $t_{1/2}$  eritromicina 2-3h, klaritromicina 3-5h, te azitromicina 40-68h (111). Ketolid telitromicin stabilan je pri kiselom pH, dok mu je oralna bioraspoloživost 57% i  $t_{1/2}$  iznosi 7-13h (111,112). Dugo vrijeme poluživota omogućuje doziranje azitromicina i telitromicina jednom dnevno (112).

Makrolidi su velike molekule u rasponu 700 – 1000 Da, ali su i lipofilne, pa se uspješno oralno primijenjuju (113) (**Tablica 4**). Shodno tome, odlično se distribuiraju u stanicama i tkivima, gdje koncentracije višestruko premašuju niske koncentracije u krvnoj plazmi. Tako se alveolarni makrofagi ističu među tkivima po nakupljanju makrolida s 400 puta većom koncentracijom klaritromicina u odnosu na serum, te 800 puta većom koncentracijom azitromicina (111). Ispitivanjem stanične farmakokinetike eritronolida na različitim staničnim linijama, pokazano je da se makrolidi razlikuju po nakupljanju i

ispiranju iz stanica. Tako se dibazični azitromicin ističe po brzom i konstanto rastućem nakupljanju uz dugo zadržavanje, što je izraženije u fagocitnim stanicama (114,115).

S druge strane, eritromicin i klaritromicin se ponašaju drugačije – manjim intenzitetom nakupljanja koje k tome pokazuje saturabilnu kinetiku, bez specifičnosti za pojedine stanične linije, uz kratko zadržavanje (118). Konačno, ketolidi imaju kombinaciju karakteristika: odlično i saturabilno nakupljanje uz brzi izlazak, odnosno kratko zadržavanje u stanicama (118,119).

**Tablica 4.** Klasifikacija makrolida i bioraspoloživost (F) u ljudi.

Makrolidi	Klasa makrolida	Molekulska masa	F (%)	F klasa	Referenca
Azitromicin	Eritronolid	749	37	Srednja	(113)
Klaritromicin	Eritronolid	748	55	Srednja	(113)
Eritromicin	Eritronolid	734	25	Niska	(113)
Roksitromicin	Eritronolid	837	78	Visoka	(113)
Telitromicin	Eritronolid	812	57	Srednja	(113)
Solitromicin*	Eritronolid	831	62	Srednja	(113)
Josamicin	Leukomicin	828	95	Visoka	(113)
Midkamycin*	Leukomicin	814	70	Visoka	(116)
Spiramicin	Leukomicin	843	35	Srednja	(113)
Takrolimus	Askomicin	804	15	Niska	(113)
Imunomicin*	Askomicin	792	15	Niska	(117)
Rapamicin	Rapamicin	914	15	Niska	(113)

(\*) u eksperimentalnoj ili klinčkoj fazi ispitivanja

Nadalje, zbog svoje visoke lipofilnosti, makrolidi su vrlo suspekti na metaboličke reakcije koje se mogu odvijati (a) presistemski u endotelnim stanicama gastrointestinalnog trakta tijekom apsorpcije ili netom nakon apsorpcije prilikom prvog prolaska kroz jetru; ili (b) sistemski, tijekom boravka lijeka u sistemskej cirkulaciji (23). Pri tom CYP3A4, kao najzastupljeniji enzim u enterocitima i jetri te s posebnim afinitetom za velike i lipofilne molekule, igra dominantu ulogu u metabolizmu makrolida. Tako se u jetri putem citotokroma CYP3A4, eritromicin inaktivira reakcijom demetilacije, dok se klaritromicin metabolizira u aktivni 14-hidroksi i neaktivni N-demetil oblik (120,121). Čak 70% doze telitromicina metabolizira se najvećim dijelom citokromima P450 u jetri, pri čemu je glavni metabolički put hidroliza arilne grupe postraničnog lanca (99). Osim toga, eritromicin i klaritromicin inhibiraju CYP3A4 tako što njihovi reaktivni međuprodukti stvaraju

nekovalentne komplekse s enzimom, što je poseban tip inhibicije zvan MBI (engl. *mechanism based inhibition*). Za MBI je karakteristična nelinearna, ireverzibilna i o dozi ovisna inhibicija CYP3A4 (122). Stoga, MBI uzrokovan klaritromicinom dovodi do inhibicije vlastitog metabolizma što se očituje nelinearnim farmakokinetičkim profilom klaritromicina (123). Osim toga, upravo zbog inhibicije CYP3A4 i OAT1B transportera, eritromicin, klaritromicin i telitromicin uzrokuju povećano izlaganje statinima, rezultirajući neželjenim lijek-lijek interakcijama (124). Suprotno navedenom, azitromicin nema interakcije s citokromima, te se izlučuje primarno fecesom, odnosno hepatobilijarnim putem kao nepromijenjeni lijek (105,125,126).

S obzirom na izniman komercijalni uspjeh azitromicina (127), uslijedila su daljnja istraživanja njegovih strukturnih analoga, a u cilju identifikacije molekule s još boljim farmakokinetičkim i farmakodinamskim svojstvima. Upravo je u tim istraživanjima pokazano da *in vitro* sustavi permeabilnosti nisu u mogućnosti predvidjeti rezultate *in vivo* istraživanja na životinjama, što otežava probir najboljih makrolidnih molekula (128,129). Točnije, iako je bioraspodjeljivost različitih strukturnih analoga u rasponu od niske preko srednje do visoke, to se ne bi moglo zaključiti na osnovu *in vitro* vrijednosti permeabilnosti koja ove spojeve gotovo redovito klasificira kao nisko ili nisko do srednje permeabilne spojeve i gotovo uvijek kao supstrate P-glikoproteina (130,131).

### 2.10.1.3 Transport

Dva glavna načina prolaska makrolidnih lijekova kroz staničnu membranu smatraju se jednostavna difuzija i transport putem transportera (detaljnije opisano u poglavlju 2.4). Paracelularni način transporta nije moguć za makrolide s obzirom na njihovu veličinu (> 700 Da). *In vitro* metode koje se učestalo koriste za ocjenu sposobnosti makrolida za prolazak kroz stanični sloj su nestanični test PAMPA (engl. *parallel artificial membrane permeation assay*) i stanični testovi permeabilnosti (poglavlje 2.6 i 2.7).

PAMPA daje informaciju o sposobnosti jednostavne difuzije spoja kroz umjetnu fosfolipidnu membranu, pa su tako eritromicin i azitromicin nisko permeabilni, dok su klaritromicin i roksitromicin značajnije permeabilni u PAMPA sustavu (130). Za razumijevanje ovog rezultata niske PAMPA permeabilnosti treba uzeti u obzir da su ovi makrolidi slabe baze s protoniranim aminom na dezozaminu pri pH 7.4, dok azitromicin ima još dodatan protonirani dušik u samom makrolidnom prstenu.

U Caco-2 modelu makrolidi eritromicin, klaritromicin, roksitromicin, azitromicin i telitromicin postižu nižu permeabilnosti u AB smjeru (iz apikalnog u bazolateralni) u

odnosu na BA smjer prolaska (iz bazolateralnog u apikalni) što ukazuje na uključenost aktivnog transporta, točnije rečeno efluksa (poglavlje 2.9) (132–134). To je nadalje pokazano i na MDCK-MDR1 staničnoj liniji (130). Primjenom inhibitora P-glikoproteina – verapamila i GF120918A, omjer efluksa značajno se smanjio što sugerira da su ovi makrolidi supstrati P-glikoproteina. Ovaj *in vitro* rezultat potvrđen je i u *in vivo* studijama na štakorima. Istovremenim tretmanom ciklosporina (inhibitor P-glikoproteina) značajno je smanjena eliminacija azitromicina i telitromicina putem žući (135,136). U istim studijama otišli su korak dalje te ispitali mogući utjecaj još jednog ABC transportera. Naime, probenecid (Mrp2 inhibitor) je uz ciklosporin dodatno smanjio bilijarnu eliminaciju azitromicina. Konačna potvrda uključenosti Mrp2 transportera u transport azitromicina i telitromicina demonstrirana je na Eisai hiperbilirubinemičnim štakorima s urođenim nedostatkom Mrp2, koji su imali smanjenu eliminaciju makrolida putem žući.

Od intestinalnih influks transportera proučen je utjecaj OATP-1A2 i OATP-2B1 na transport makrolida. *In vitro* studija na stanicama s izraženim OATP transporterima pokazala je da azitromicin i klaritromicin nisu supstrati humanih OATP-1A2 i OATP-2B1, kao ni štakorskih *Oatp1a5* i *Oatp2b1* (137). Osim toga, nisu supstrati niti OATP transportera na hepatocitima, međutim imaju inhibitorski potencijal čime bi mogli utjecati na metabolizam ko-administriranih lijekova (138,139).

### **2.10.2 Makrolidi imunosupresivi**

Makrolidi koji se u terapiji koriste kao imunosupresivi kod transplatacija organa, sprječavaju neželjenu imunološku aktivnost koja bi mogla dovesti do odbacivanja transplatata.

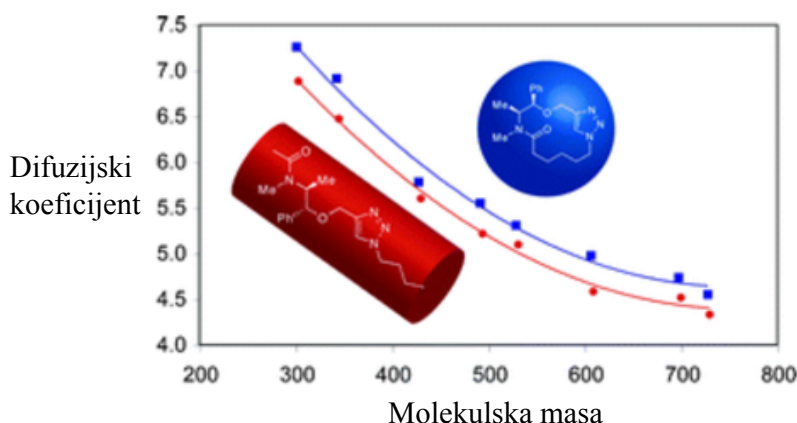
Takrolimus (FK506) i njegov C21-etilni analog imunomicin (askomicin) prirodni su makrolidi s 23-članim laktonskim prstenom koji smanjivanjem aktivacije T limfocita i proizvodnje citokina ostvaruju učinkovito imunosupresivno djelovanje (140). Naime, vezanjem makrolida za specifični proteinski receptor (imunofilin) u citoplazmi T limfocita, stvara se kompleks koji blokira djelovanje kalcineurina, čime se prekida put prijenosa signala posredovan ovom fosfatazom ovisnom o kalciju (141). Međutim, istim tim mehanizmom uzrokuju se i ozbiljne nuspojave poput nefrotoksičnosti (117). Takrolimus ima u prosjeku nisku oralnu bioraspodjivost, međutim izmjerene su velike individualne varijacije (142). Tome doprinosi značajan metabolizam putem CYP3A u enterocitima, te transport P-glikoproteinom (143). Poluživot takrolimusa iznosi 8-9 sati, a dominantno se eliminira putem žući (144).



Sirolimus (rapamicin) je prirodni makrolid s 31-članim makrolaktonskim prstenom koji svoje imunosupresivno djelovanje ostvaruje inhibicijom specifične serin/treonin protein kinaze nazvane TOR (engl. *target of rapamycin*), što za posljedicu ima nemogućnost odgovora T limfocita na limfokine IL-2 i IL-4 koji promiču proliferaciju (145). Sirolimus je prvi predstavnik klase lijekova nazvane TOR inhibitori, a njegovi aktivni analozi među ostalim uključuju everolimus, temsirolimus, zotarolimus (113). Permeabilnost sirolimusa u stanicama Caco-2 bila je više od 20 puta veća u BA smjeru u odnosu na obrnut smjer, što ukazuje na aktivni efluks transport (146). Primjenom specifičnog P-glikoprotein inhibitora zoskvidara u modelu Caco-2 s eksprimirajućim CYP3A4, sirolimus je potvrđen kao supstrat P-glikoproteina i citokroma 3A4 (147). Sirolimus u prosjeku ima nisku oralnu bioraspoloživost s velikim individualnim varijacijama, te dugo vrijeme poluživota (62 h) (148).

### 2.11 Ostali pristupi u predviđanju permeabilnosti velikih molekula

Posljednjih godina u istraživanju lijekova velike molekule poput makrocikla dobile su na važnosti ne samo zbog njihove strukturne raznolikosti nego i zbog sposobnosti da moduliraju protein-protein interakcije čime mogu djelovati na zahtjevne terapijske mete, za razliku od malih molekula koje slijede Lipinski pravilo broja pet (113). Pri tome, razumijevanje i mjerenje permeabilnosti makrocikla u literaturi navodi se kao velik izazov. Proučavanjem utjecaja oblika molekule na koeficijent difuzije usporedbom cikličkih spojeva i njihovih linearnih analoga na molekulskoj skali od 300 do 730 Da, pokazano je oko 5% povećanje koeficijenata difuzije za cikličke spojeve (**Slika 6**) (149). Međutim dodatno je bio evidentan pad brzine difuzije porastom veličine molekule, budući da brzina difuzije ovisi o obliku molekule, odnosno o veličini i molekulskoj masi. To nadalje znači da veće molekule imaju manju brzinu difuzije, a upravo je brzina difuzije ono što se mjeri u pokusima permeabilnosti i transporta. Dodatno, testovi permeabilnosti optimirani su za kraće vrijeme mjerenja na manjim molekulama zbog veće učinkovitosti, te stoga nisu optimalni za veće molekule poput makrolida.



**Slika 6.** Odnos difuzijskog koeficijenta i molekulske mase za strukturne parove makrocikličkih i linearnih molekula (slika preuzeta od (149)).

S druge strane, razvijeni su testovi i modeli koji se oslanjaju na mjeru raspodjele spoja, odnosno izražavaju rezultat kroz količinu spoja koja je prošla staničnu membranu. Jedan primjer takvog testa permeabilnosti je nedavno razvijena NanoClick metoda koja mjeri nakupljanje makrocikla ili peptida u citosolu stanice sisavaca tijekom vremena (150). Princip testa je mjerenje koncentracije makrocikla u citosolu transfeciranih stanica HeLa (humane stanice raka grlića maternice), kovalentim vezanjem na izraženi i označeni proteinski konstrukt koji nakon dodatka susprata oslobađa BRET signal.

Drugi primjer testa koji se bavi prolaskom spoja kroz staničnu membranu je mjerenje nakupljanja (akumulacije), te zadržavanja (retencije) spoja u lizatima stanicama nakon 3 sata inkubacije (118). Također su razvijeni *in silico* modeli nakupljanja i zadržavanja makrolida u stanici na osnovi eksperimentalno određenih fizikalno-kemijskih parametara lipofilnosti (ChromlogD i CHI IAM), kojima se dizajn i sinteza novih makrolida usmjerava prema postizanju boljih *in vivo* PK svojstava (151). Pri tome su se nakupljanje i zadržavanje u NCI-H292 staničnoj liniji plućnog karcinoma pokazali dobrim parametrima za makrolide, obzirom da rezultira višim intracelularnim koncentracijama u odnosu na *in vitro* testove permeabilnosti koji ih gotovo uvijek klasificiraju kao nisko permeabilne.

### 3. MATERIJALI I METODE

#### 3.1 Ispitivani spojevi

U radu su ispitivani sljedeći spojevi:

- Eritromicin (USP, CAS 114-07-8)
- Azitromicin (USP, CAS 83905-01-5)
- Klaritromicin (USP, CAS 81103-11-9)
- Roksitromicin (Sigma-Aldrich, CAS 80214-83-1)
- Midekamicin (Santa Cruz, CAS 35457-80-8)
- Imunomicin (Santa Cruz, CAS 104987-12-4)
- Rapamicin (Santa Cruz, CAS 53123-88-9)
- Telitromicin (Santa Cruz, CAS 191114-48-4)
- Spiramicin (Santa Cruz, CAS 8025-81-8)
- Josamicin (Fluka, CAS 16846-24-5)
- Takrolimus (Ontario Chemicals, CAS 104987-11-3)
- Solitromicin (AdooQ BioScience, CAS 760981-83-7)
- Acebutolol (Sigma-Aldrich, CAS 37517-30-9)
- Amprenavir (Moravek Biochemicals, CAS 161814-49-9)
- Atenolol (Sigma-Aldrich, CAS 29122-68-7)
- Diklofenak (Sigma-Aldrich, CAS 15307-86-5)
- Digoksin (Sigma-Aldrich, CAS 20830-75-5)
- Feksofenadin (TCI EUROPE NV, CAS 153439-40-8)
- Prazosin (Sigma-Aldrich, CAS 19216-56-9)
- Propranolol (Sigma-Aldrich, CAS 525-66-6)
- Kinidin (Sigma-Aldrich, CAS 56-54-2)
- Ranitidin (USP, CAS 66357-35-5)
- Ritonavir (Sigma-Aldrich, CAS 155213-67-5)
- Rupintrivir (International Laboratory USA, CAS 223537-30-2)
- Teofilin (TCI EUROPE NV, CAS 58-55-9)
- Topotekan (Sigma-Aldrich, CAS 123948-87-8)
- Vinblastin (Santa Cruz, CAS 865-21-4)
- Vinorelbin (Tocris, CAS 71486-22-1)

### 3.2 Kemikalije

Kemikalije upotrebljene za otapanje spojeva, pripremanje radnih otopina, te za analizu su:

- dimetilsulfoksid, DMSO (Sigma-Aldrich)
- EDTA, dinatrijeva sol (Sigma-Aldrich)
- 0.05% Tripsin-EDTA (Invitrogen)
- Dulbecco modificirani Eagle medij, DMEM (Sigma-Aldrich)
- RPMI 1640 medij (Invitrogen)
- fetalni goveđi serum, FBS (engl. *fetal bovine serum*) (Sigma-Aldrich)
- smjesa antibiotika-antimikotika, penicilin (10,000 U/mL) – streptomycin (10 mg/mL) – amfotericin B (25 µg/mL) (Sigma-Aldrich)
- glutamax-100 (Sigma-Aldrich)
- otopina neesencijalnih aminokiselina, NEAA (Sigma-Aldrich)
- natrijev piruvat (Invitrogen)
- Dulbecco fosfatni pufer, D-PBS (Invitrogen)
- Lucifer yellow (Sigma-Aldrich)
- 0.9%-tna otopina natrijevog klorida (Hrvatski zavod za transfuzijsku medicinu)
- magnezijev klorid (Sigma-Aldrich)
- β-NADP (Sigma-Aldrich)
- glukoza-6-fosfat (Sigma-Aldrich)
- glukoza-6-fosfat dehidrogenaza (Sigma-Aldrich)
- testosterone (Steraloids)
- kafein (Sigma-Aldrich)
- fosfatne puferske soli u tabletama (Sigma-Aldrich)
- acetonitril, LC-MS čistoće (Merck)
- metanol, p.a. (Merck)
- mravlja kiselina čistoće 98-100% (Merck)
- varfarin (Sigma-Aldrich, CAS 81-81-2)
- TritonX-100 (Sigma-Aldrich)
- voda (deionizirana, otpor manji od 18 MΩ pri 25 °C i ukupna količina organskog ugljika manja od 5 µg/L (Milli-Q, Milipore)
- β-merkaptotanol (Sigma-Aldrich)
- RLT puffer (Qiagen)

- RNeasy Mini kita (Qiagen)
- High-Capacity cDNA Reverse Transcriptase Kit (Applied Biosystems)
- TaqMan Universal PCR Master Mix (Applied Biosystems)
- otopina za liziranje: 10 mL RIPA pufer, 1x (Thermo Scientific) + 1 tableta PhosSTOP (Roche) + 1 tableta cOmplete (Roche)
- Pierce BCA Protein Assay Kit (Thermo Scientific)
- Immulon Microtiter™ pločice (Thermo Scientific)
- Wes 12-230 kDa Master Kit (ProteinSimple)
- P-glikoprotein, mAB (019) (Enzo)

### 3.3 Oprema

Za izvedbu pokusa odnosno pripremu uzoraka korišteni su:

- analitička vaga Mettler Toledo AX205 (Mettler Toledo)
- digitalni pH metar PHM250 (Radiometer)
- milliQ (Millipore)
- laminar KTB-NS I (Klimaoprema)
- centrifuga Megafuge 1.0R Heraeus (Thermo Scientific)
- mikroskop Axiovert 135 (Zeiss)
- inkubator/tresilica, Inkubator/Titramax 1000 (Heidolph Instruments GmbH & Co.KG)
- magnetska mješalica IKA-MS2 (Labortechnik)
- vibracijska mješalica IKA-MS1 minishaker (Labortechnik)
- CO<sub>2</sub> inkubator (Jouan)
- inkubator/tresilica 1000 (Heidolph Instruments GmbH & Co.KG)
- fluorescentni čitač Infinite F500 (Tecan)
- automatski sustavi za pipetiranje:
  - JANUS Integrator Platform, 8 kanala (Perkin Elmer)
  - Freedom EVO 200 (Tecan)
- hematološki analizator XT-2000i (Sysmex)
- Mastercycler gradient, Eppendorf
- RT PCR System 7300 (Applied Biosystems)
- SpectraMax i3 čitač pločica (Molecular Devices)
- Wes uređaj (ProteinSimple)

- UHPLC Nexera X2 (Shimadzu)
- spektrometri mase API4000 i API4500 (AB Sciex)

### 3.4 Priprema otopina, pufera i medija

Stanični DMEM medij:

- DMEM medij dopunjen s 10% FBS (inaktiviran na 56 °C, 30 min), 1% Glutamax-100 otopine, 1% smjese antibiotika-antimikotika i 1% otopine NEAA
- Pripremljeni medij čuvan je na +4°C i korišten tijekom mjesec dana

Stanični RPMI medij (samo za NCI-H292 liniju):

- RPMI 1640 medij dopunjen s 10% FBS (inaktiviran na 56 °C, 30 min), 1% Glutamax-100 otopine i 1% otopine natrijevog piruvata

EDTA otopina:

- fiziološka otopina s 0.38 g/L dinatrijeve EDTA
- sterilno filtrirana kroz Stericup (Millipore)

50 mM puferirana otopina fosfatnih soli (PBS):

- jedna tableta fosfatnih puferiranih soli otopljena u 40 mL vode
- puferirana na pH 7.4

„Stop“ otopina:

- otopina acetonitrila i metanola u volumnom omjeru 2:1, s 10 ng/mL varfarina ili 100 ng/mL diklofenaka (interni standard)

### 3.5 Biološki materijal

U izradi doktorskog rada korišten je slijedeći biološki materijal:

- MDCKII-WT (Solvo Biotechnology)
- MDCKII-MDR1 (Solvo Biotechnology)
- Caco-2 (ECACC)
- MDCK cMdr1 *knock-out* (KO) linija (Sigma-Aldrich)
- humani jetreni mikrosomi (BD Biosciences)
- NCI-H292 (ATCC)

### 3.6 Stanična kultura

Sve korištene stanične kulture uzgajane su u staničnom DMEM mediju, osim NCI-H292 koje su uzgajane u RPMI mediju. Za odvajanje stanica od podloge, stanice su prvotno isprane EDTA otopinom, nakon čega su inkubirane 5-10 min u 0.05% otopini tripsina-EDTA. Djelovanje tripsina zaustavlja dodatak medija s 10% FBS-a.

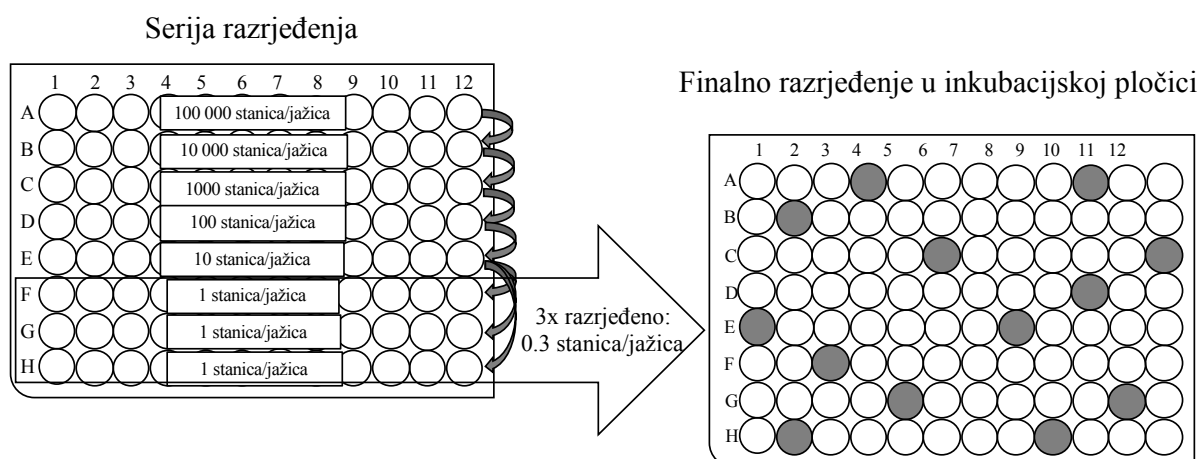
Stanice su uzgajane do postizanja konfluentnosti od 85-90%. Svaki treći, odnosno četvrti dan stanice MDCK presađene su u svježi medij u koncentraciji  $0.5 \cdot 10^6$  stanica/75cm<sup>2</sup>, odnosno  $0.25 \cdot 10^6$ /75cm<sup>2</sup>, dok su stanice Caco-2 sađene u koncentraciji  $1.5 \cdot 10^6$  stanica/75cm<sup>2</sup>, odnosno  $0.75 \cdot 10^6$  stanica/75cm<sup>2</sup>.

Za pokuse dvosmjerne permeabilnosti stanice MDCK su sađene na membrane (PET, veličina pora 1µm) pločica (MilliporeSigma) i to u koncentraciji  $0.25 \cdot 10^6$ /mL (75 µL/jažici) za pločicu od 96 jažica, odnosno  $0.3 \cdot 10^6$ /mL (400 µL/jažici) za pločicu od 24 jažica. Stanice Caco-2 sađene su na pločicu od 24 jažice u koncentraciji  $0.5 \cdot 10^6$ /mL (400 µL/jažici). Dan nakon sađenja na membrane, stanicama je zamijenjen medij, a 3-4 dana (MDCK), odnosno 21 dan (Caco-2) nakon sađenja stanični monoslojevi korišteni su u transportnim pokusima.

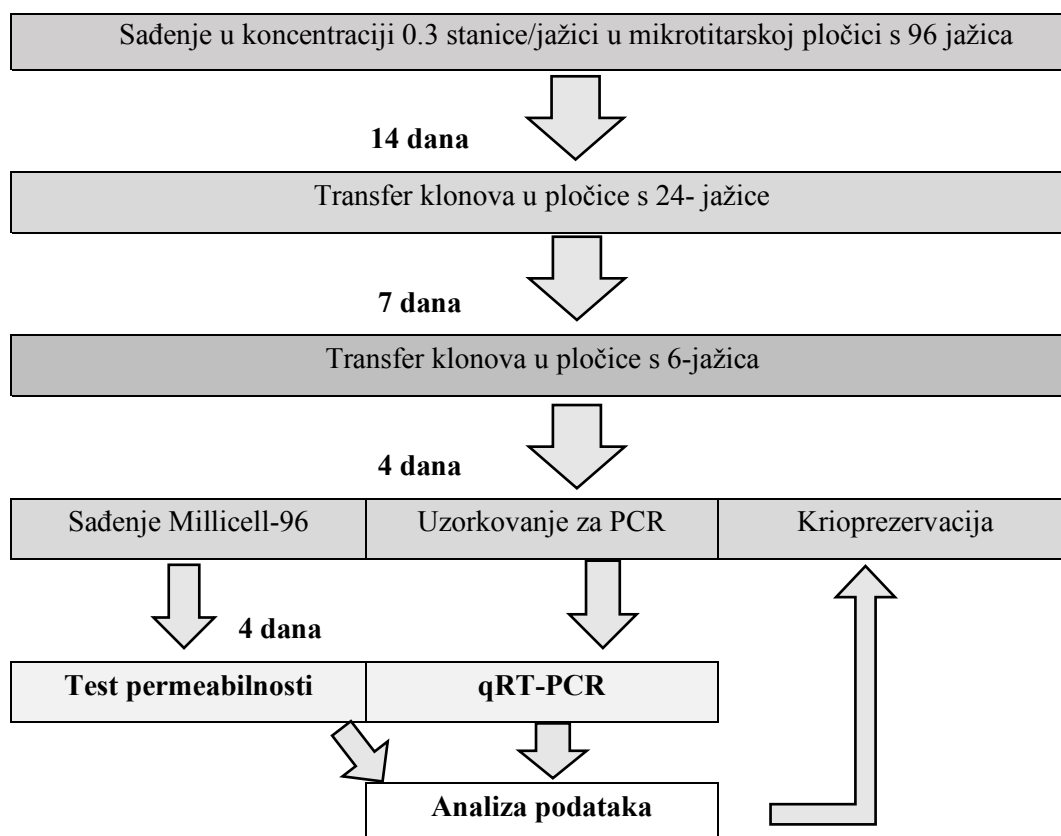
Sve stanice uzgajane su u CO<sub>2</sub> inkubatoru (IG650, Jouan) pri 37 °C, 5% CO<sub>2</sub> i 95% relativne vlažnosti zraka.

### 3.7 Izolacija MDCK klona

Izolacija klonova divljega tipa MDCKII (MDCK-WT) napravljena je postupkom velikog razrjeđivanja (engl. *limiting dilution*). Stanice MDCK-WT posađene su u koncentraciji 0.3 stanice/jažici u mikrotitarskoj pločici ravnog dna s 96 jažica (Greiner). Deset inkubacijskih pločica pripremljeno je serijskim razrjeđivanjem kako je prikazano na **Slici 7**. Nakon 14 dana inkubacije u uvjetima stanične kulture, jažice s klonovima locirane su mikroskopski (Axiovert 135, Zeiss). Oko sto klonova preneseno je u nove pločice od 24 jažice u uvjetima stanične kulture. Nakon 6 dana, klonovi su prebačeni u pločice sa 6 jažica. Nakon 4 dana rasta u pločicama sa 6 jažica, klonovi su pojedinačno odvojeni od podloge, a stanice izbrojane na hematološkom analizatoru XT-2000i (Sysmex). Dobivene stanice podijeljene su u tri dijela: (1) uzorak za RT-qPCR, (2) smrzavanje (krioprezervacija) stanica i (3) sađenje na pločice Millicell-96 (MilliporeSigma) za testiranje permeabilnosti amprenavira. Na **Slici 8** sumirana je procedura izolacije klonova po koracima.



**Slika 7.** Izolacija klonova: plan master i inkubacijskih pločica.



**Slika 8.** Shema procedure izolacije klonova.



### 3.8 Metoda dvosmjernog transporta

Neposredno prije pokusa isprani su monoslojevi stanica i uravnoteženi u transportnom mediju (D-PBS s 1% DMSO, v/v) tijekom 30 min pri uvjetima stanične kulture. Otopine ispitivanih spojeva pripremljene su u koncentraciji od 10 ili 1  $\mu\text{M}$  u D-PBS-u (1% DMSO, v/v) koji je sadržavao 100  $\mu\text{M}$  fluorescentnog markera Lucifer yellow. Iznimka je amprenavir, koji je testiran u koncentraciji 0.5  $\mu\text{M}$ .

Za početak pokusa otopina ispitivanog spoja dodana je u donorski odjeljak, dok je transportni medij dodan u akceptorski odjeljak. To znači da je za testiranje transporta u apikalno-bazolateralnom smjeru, 400  $\mu\text{L}$  otopine ispitivanog spoja nanoseno u gornji, apikalni odjeljak pločice od 24 jažice, dok je 800  $\mu\text{L}$  transportnog pufera nanoseno u donji, bazolateralni odjeljak. Nadalje, za testiranje transporta u bazolateralno-apikalnom smjeru, 800  $\mu\text{L}$  otopine ispitivanog spoja nanoseno je u donji, bazolateralni odjeljak pločice od 24 jažice, dok je 400  $\mu\text{L}$  transportnog pufera nanoseno na jednostruki sloj stanica u gornjem, apikalnom odjeljku. Za pločice od 96 jažica korišteno je 75  $\mu\text{L}$  za apikalni odjeljak te 250  $\mu\text{L}$  za bazolateralni odjeljak. Korišteni volumeni preuzeti su od proizvođača MilliporeSigma. Pločice su inkubirane pri 37 °C tijekom 60 minuta uz blago protresanje (200 rpm). Nakon završene inkubacije uzeti su uzorci iz donorskih i akceptorskih odjeljaka. Za određivanje početne koncentracije spoja, otopine ispitivanog spoja dodatno su uzorkovane na početku pokusa. Koncentracije ispitivanih spojeva određene su LC-MS/MS tehnikom kako je opisano u poglavlju 3.9. Svaki ispitivani spoj testiran je u duplikatu ili triplikatu, u oba smjera, u dva ili tri nezavisna pokusa.

Fluorescentni marker za paracelularni put, Lucifer yellow, korišten je kao kontrola integriteta jednostrukog sloja stanica. Za određivanje transporta Lucifera yellow uzet je dodatni alikvot iz svih akceptorskih odjeljaka. Kvantifikacija se izvodila fluorescentnim čitačem (Tecan Infinte F500), pri čemu se fluorescencija mjerila pri 485 nm (ekscitacijska valna duljina) i 530 nm (emisijaska valna duljina).

#### 3.8.1 Izračun koeficijenta permeabilnosti i parametara kontrole kvalitete

Koeficijent permeabilnosti  $P_{app}$  izračunat je prema jednadžbi (5) u literaturnom pregledu i ima dimenziju brzine [ $10^{-6}\text{cm/s}$ ]:

$$P_{app} = \frac{V_A \cdot C_A(t)}{t} \cdot \frac{1}{A} \cdot \frac{1}{C_0} \cdot 10^6 \quad (5)$$

pri čemu je  $V_A$  je volumen akceptorske otopine,  $C_A$  je izmjerena koncentracija spoja u akceptorskoj otopini,  $t$  vrijeme inkubacije,  $A$  površina monosloja stanica (npr.  $A = 0.11 \text{ cm}^2$  za pločicu s 96 jažica i  $A = 0.7 \text{ cm}^2$  za pločicu s 24 jažice), a  $C_0$  je izmjerena koncentracija donorske otopine u vremenu 0. Koncentraciju spoja predstavlja izmjereni omjer površine pika spoja i pika internog standarda.

Za svaki stanični sloj računat je  $P_{app}$  za Lucifer yellow te su slojevi odnosno jažice prihvaćeni za daljnju analizu ako im je  $P_{app}$  bio manji od  $3 \cdot 10^{-6} \text{ cm/s}$ . Preveliki transport Lucifera yellow ukazuje na nekvalitetni stanični monosloj.

Kvaliteta svake  $P_{app}$  vrijednosti procijenjena je pomoću balansa mase (MB, engl. *mass balance*). MB je ukupna količina ispitivanog spoja na kraju pokusa u odnosu na početnu količinu spoja:

$$MB = \frac{m_{D,kraj} + m_{A,kraj}}{m_{D,početak}} \cdot 100\% \quad (6)$$

pri čemu je  $m$  količina spoja u odjeljku, odnosno umnožak izmjerene koncentracije (omjer površine pika spoja i pika internog standarda) spoja u odjeljku i volumena odjeljka, dok  $D$  označava donorski, a  $A$  akceptorski odjeljak. Prihvaćene su bile  $P_{app}$  vrijednosti s MB-om između 70-130%.

Za izračun omjera efluksa (ER, engl. *efflux ratio*) korištena je jednadžba:

$$ER = \frac{P_{app, \text{ bazolateralno-apikalni}}}{P_{app, \text{ apikalno-bazolateralni}}} \quad (7)$$

Prema uobičajenoj klasifikaciji,  $P_{app}$  vrijednosti , manje od  $2 \times 10^{-6} \text{ cm/s}$  smatraju se niskom, između  $2$  i  $10 \times 10^{-6} \text{ cm/s}$  umjerenom, te veće od  $10 \times 10^{-6} \text{ cm/s}$  visokom permeabilnošću. Omjer efluksa veći od dva ukazuje na uključenost P-glikoproteina u transport.

### 3.9 LC-MS/MS analiza uzoraka

Uzorci iz staničnih pokusa pripremljeni su za LC-MS/MS analizu precipitacijom proteina dodatkom tri volumena „Stop“ otopine. Nadalje, uzorci su centrifugirani na 2000 g tijekom 20 min pri  $4 \text{ }^\circ\text{C}$ , a supernatanti injektirani za analizu.

Sustav spregnute tekućinske kromatografije visoke djelotvornosti (HPLC) i tandemске spektrometrije masa (MS/MS) (152) sastojao se od UHPLC Nexera X2 (Shimadzu) s integriranim sustavom za automatsko injektiranje uzoraka te spektrometra

mase API4000 ili API4500 (AB Sciex). Kromatografsko odjeljivanje provedeno je na nekoliko različitih kolona i gradijentnih uvjeta ovisno o ispitivanom spoju, a kvantifikacija je izvedena metodom praćenja višestrukih reakcija tzv. MRM metoda (engl. *multiple reaction monitoring*) pri specifičnim masenim prijelazima za svaki spoj navedenima u **Tablici 5**. Korišteni kromatografski uvjeti opisani su u poglavlju 3.9.1. Izvor iona bio je turbo sprej zagrijan na 550°C. Površina pika analita određena je uporabom programa Analyst 1.6 i DiscoveryQuant 3.0 (Applied Biosystems). Konačna kvantifikacija provedena je računanjem omjera površine pika analita i pika internog standarda.

### 3.9.1 Kromatografski uvjeti LC metoda

Za sve LC metode vrijedilo je:

Temperatura kolone:	50°C
Protok:	0.7 ml/min
Volumen injektiranja:	1 µl

---

#### LC metoda 1:

LC kolona:	Halo2 2 µm C18, 20 x 2.1 mm (Advanced Materials Technology)				
Mobilna faza A:	0.1% mravlje kiseline u vodi				
Mobilna faza B:	0.1% mravlje kiseline u 90% acetonitrila i 10% vode				
Gradijent:					
t [min]	0	0.02	0.8	0.81	1
%B	5	70	70	5	5

---

#### LC metoda 2:

LC kolona:	Halo2 2 µm C18, 20 x 2.1 mm (Advanced Materials Technology)				
Mobilna faza A:	10mM amonijev bikarbonat u 95% vode i 5% metanola				
Mobilna faza B:	100% acetonitril				
Gradijent:					
t [min]	0	0.02	0.8	0.81	1
%B	5	70	70	5	5

---

#### LC metoda 3:

LC kolona:	Acquity UPLC 1.7 µm BEH C18, 50 x 2.1 mm (Waters)				
Mobilna faza A:	0.1% mravlje kiseline u vodi				
Mobilna faza B:	0.1% mravlje kiseline u 90% acetonitrila i 10% vode				

Gradijent:

t [min]	0	0.25	0.3	1.5	1.51	2
%B	2	2	85	85	2	2

**LC metoda 4:**LC kolona: Luna Omega 1.6  $\mu$ m Polar C18, 30 x 2.1 mm (Phenomenex)

Mobilna faza A: 0.1% mravlje kiseline u vodi

Mobilna faza B: 0.1% mravlje kiseline u 90% acetonitrila i 10% vode

Gradijent:

t [min]	0	0.15	0.7	1.1	1.11	1.5
%B	2	2	95	95	2	2

**LC metoda 5:**LC kolona: Acquity UPLC 1.7  $\mu$ m BEH C18, 50 x 2.1 mm (Waters)

Mobilna faza A: 0.1% mravlje kiseline u vodi

Mobilna faza B: 0.1% mravlje kiseline u 90% acetonitrila i 10% vode

Gradijent:

t [min]	0	0.2	0.3	1	1.01	1.5
%B	2	2	90	90	2	2

**LC metoda 6:**LC kolona: Luna Omega 1.6  $\mu$ m Polar C18, 30 x 2.1 mm (Phenomenex)

Mobilna faza A: 0.1% mravlje kiseline u vodi

Mobilna faza B: 0.1% mravlje kiseline u 90% acetonitrila i 10% vode

Gradijent:

t [min]	0	0.2	0.3	1	1.01	1.5
%B	2	2	90	90	2	2

**Tablica 5.** Specifični MRM prijelazi i kromatografska metoda ispitivanih spojeva. (-) označava negativni mod.

Spoj	MRM prijelaz	LC metoda
Azitromicin	749.5 $\rightarrow$ 591.2	3
Klaritromicin	748.4 $\rightarrow$ 158.1	1
Eritromicin	734.5 $\rightarrow$ 158.1	1
Roksitromicin	837.6 $\rightarrow$ 158.1	1
Midekamicin	814.5 $\rightarrow$ 174.1	1

Tablica 5. – nastavak

Spoj	MRM prijelaz	LC metoda
Josamicin	828.5 → 109.0	1
Takrolimus	802.5 → 560.5 (-)	4
Spiramicin	843.7 → 174.2	3
Solitromicin	845.5 → 670.3	1
Telitromicin	812.5 → 655.3	3
Imunomicin	790.6 → 490.4 (-)	4
Rapamicin	912.6 → 321.2 (-)	4
Acebutolol	337.2 → 116.2	1
Amprenavir	506.2 → 245.4	1
Atenolol	267.2 → 190.1	5
Diklofenak	296.1 → 213.7	1
Digoksin	798.5 → 651.5	2
Feksofenadin	502.3 → 466.3	1
Prazosin	384.1 → 95.1	1
Propranolol	260.1 → 182.8	1
Kinidin	325.1 → 172.1	6
Ranitidin	315.2 → 176.0	5
Ritonavir	721.3 → 296.1	1
Rupintrivir	599.2 → 345.2	1
Teofilin	181.0 → 124.3	5
Topotekan	422.3 → 377.1	1
Vinblastin	406.3 → 376.2	6
Vinorelbin	779.4 → 658.3	6
Varfarin	309.2 → 163.2	1, 2, 3, 4, 5, 6
Varfarin	307.0 → 160.8 (-)	1, 2, 3, 4, 5, 6

### 3.10 Analiza genske izraženosti kvantitativnim PCR-om

#### 3.10.1 Izolacija i pročišćavanje ukupne RNA

Ukupna RNA je izolirana i pročišćena metodom ekstrakcije na krutoj fazi pomoću RNeasy Mini kita (Qiagen) prema uputi proizvođača. Ukratko, oko 300000 stanica smrznuto je u RLT puferu koji je sadržavao 1%  $\beta$ -merkaptetanola. RLT pufer sadrži, među ostalim, denaturirajući agens gvanidin-tiocijanat, čime je osigurano uspješno liziranje stanica. Nakon odmrzavanja, liziranim uzorcima dodan je jednaki volumen 70%-tnog etanola, koji omogućava uvjete pri kojima se RNA veže na silika kolonu.

Centrifugiranjem pri 13000 g, 1 min, uzorak se protiskuje kroz silika kolonu, gdje se zbog povoljnih ionskih uvjeta, RNA veže na silika membranu, dok ostatak otopine prolazi. Kolone su potom, uz centrifugiranje pri istim uvjetima, isprane s po 700  $\mu$ L RW1 pufera i potom dva puta s po 500  $\mu$ L RPE pufera, pri čemu je zadnje centrifugiranje trajalo 2 min. RW1 i RPE puferi služe ispiranju vezanih soli i drugih kontaminacija s kolone, tako što imaju rastući udio etanola (RPE ima 80% etanola v/v). Uzorci su zatim centrifugirani „na suho“ pri 18000 g, 1 min, kako bi se u potpunosti uklonili ostaci etanola i pufera. Hidrofilna RNA isprana je potom s kolone dodatkom 50  $\mu$ L vode, uz centrifugiranje pri 13000 g, 1 min. RNA je izolirana pri sobnoj temperaturi, te potom čuvana na  $-20^{\circ}\text{C}$  do daljnje analize.

### 3.10.2 Sinteza cDNA

Sinteza lanca cDNA napravljena je pomoću kita High-Capacity cDNA Reverse Transcriptase Kit (Applied Biosystems) prema uputi proizvođača. Konačna reakcijska smjesa sadržavala je 5  $\mu$ L ukupne RNA te među ostalim 4 mM smjese dNTP-a i 2.5 U/ $\mu$ L reverzne transkriptaze MultiScribe™ u ukupnom volumenu od 20  $\mu$ L. Uzorci su inkubirani 10 min pri  $25^{\circ}\text{C}$ , zatim 120 min pri  $37^{\circ}\text{C}$  i na kraju još 5 min na  $85^{\circ}\text{C}$  (Mastercycler gradient, Eppendorf) kako bi se reakcija okončala. cDNA je razrijeđena pet puta s vodom, te pohranjena na  $-20^{\circ}\text{C}$ .

### 3.10.3 PCR u stvarnom vremenu

Izraženost gena za Mdr1 transporter u stanicama MDCK analizirana je kvantitativnom lančanom reakcijom polimeraze (kvantitativni PCR, engl. *quantitative polymerase chain reaction*) na instrumentu 7300 Real-Time PCR system (Applied Biosystems), uz korištenje TaqMan metode, s gliceraldehid-3-fosfat dehidrogenazom (Gapdh) kao kontrolnim genom. TaqMan proba hibridizira s unutarnjom regijom PCR produkta, te tijekom PCR reakcije 5' egzonukleazna aktivnost polimeraze cijepa probu te oslobađa fluorescencijski signal. Budući da je količina emitirane fluorescencije proporcionalna količini PCR produkta, mjerenjem fluorescencije mjeri se količina nastale DNA. Granični ciklus, CT (engl. *threshold cycle*), definira se kao ciklus u kojem je detektirana fluorescencija porasla iznad pozadinske, te nam govori o početnoj količini cDNA u uzorku, odnosno količini mRNA u stanicama. CT se koristi za relativnu kvantifikaciju, tj. usporedbu količine izraženosti određenog gena između uzoraka.

Početnice i probe dizajnirane su u računalnom programu Primer Express, te potom sintetizirane (Microsynth). Korištene početnice i njihove koncentracije navedene su u **Tablici 6**. Početnice za gen *mdr1* nisu specifične za vrstu, odnosno obuhvaćaju dio gena P-glikoproteina koji je homologan s humanim genom za P-glikoprotein. Konačne reakcijske smjese za kvantitativni PCR otpipetirane su u pločicu s 96 jažica za kvantitativni PCR (Applied Biosystems), a svaki uzorak se sastojao od 15  $\mu\text{L}$  reagensa TaqMan Universal PCR Master Mix (Applied Biosystems; sadrži: AmpliTaq Gold® DNA-polimerazu, dNTP s dUTP u puferu), 'forward' (engl. naprijed) i 'reverse' (engl. obratno, unatrag) početnice te Taqman probu za odabrani gen u odgovarajućim koncentracijama, 5  $\mu\text{L}$  cDNA i sterilne deionizirane vode do ukupnog volumena od 25  $\mu\text{L}$ . PCR se odvijao u sljedećim uvjetima: 2 min na 50°C, zatim 10 min na 95°C (aktivacija DNA- polimeraze) i potom 40 ciklusa od po 15 s na 95°C (denaturacija dvolančane DNA) i po 1 min na 60°C (sparivanje lanaca i sinteza DNA). Svaki uzorak na kvantitativnom PCR-u rađen je u duplikatu.

Optimizacija koncentracija početnica i njihova validacija za korištenje s reagensom TaqMan Universal PCR Master Mix obavljena je prethodno prema protokolu proizvođača.

U svrhu procjene jačine izraženosti gena *mdr1* u različitim klonovima, korištena je  $\Delta\Delta\text{CT}$  metoda relativne kvantifikacije prema uputi proizvođača (Applied Biosystems). CT vrijednosti dobivene za Mdr1 transporter normalizirane su na vrijednosti dobivene za kontrolni gen *gapdh* u istom uzorku cDNA na način da je broj dva potenciran na razliku vrijednosti CT Mdr1 transportera i Gapdh. Pritom je dobivena relativna vrijednost koja govori koliko je puta izraženost *gapdh* veća od izraženosti testiranog gena. Usporedbom dobivenih relativnih vrijednosti za isti gen u različitim uzorcima dobiva se stvarna razlika u intenzitetu njihove izraženosti. Zato je uzorak s najnižom izraženošću uzet kao kalibrator, te je prema kalibratoru izražen red veličine razlike u izraženosti svih uzoraka klonova.

**Tablica 6.** Odabrane početnice i njihove koncentracije za kvantitativni PCR u realnom vremenu.

Vrsta	Gen	Protein	Sekvenca	Koncentracija
pas	<i>abcb1</i> ( <i>mdr1</i> )	cMdr1	F: 5'-CCACCACGATAGCTGAAAACATT-3'	100 nM
			R: 5'-CTTCCTTAACAGCTTTCTCAATCTCAT-3'	100 nM
			P: 5'-CTATGGCCGCGAAAATGTCACCATG-3'	100 nM
pas	<i>gapdh</i>	cGapdh	F: 5'-TGTCCCCACCCCAATG-3'	100 nM
			R: 5'-TCGTCATATTTGGCAGCTTTCTC-3'	100 nM
			P: 5'-CAGTTGTGGATCTGACCTGCCGCC-3'	100 nM

### 3.11 Western blot analiza

#### 3.11.1 Izolacija membrana

Nakon centrifugiranja suspenzije  $1 \times 10^6$  stanica MDCK supernatant je odvojen dekantiranjem. Preostali talog stanica ispran je dva puta D-PBS otopinom (pH 7.4) nakon čega je inkubiran u otopini za liziranje (100  $\mu$ L) pripremljenoj neposredno prije pokusa. Nakon snažnog protresanja uzorci su držani na ledu 30 minuta uz povremeno protresanje, a zatim su centrifugirani pri 14000 g tijekom 10 minuta pri 4 °C. Dobiveni supernatant pohranjen je na -20 °C do daljnje analize.

#### 3.11.2 Određivanje koncentracije proteina u lizatima stanica

Koncentracija proteina u lizatima stanica određena je metodom BCA (engl. *bicinchoninic acid*) koja se zasniva na Biuret reakciji redukcije  $\text{Cu}^{2+}$  u  $\text{Cu}^{1+}$ , te selektivnoj kolorimetrijskoj detekciji kompleksa  $\text{Cu}^{1+}$  kationa i dvije molekule BCA koji apsorbira pri 562 nm.

Uzorci su razrijeđeni pet puta u RIPA puferu. Ukupna koncentracija proteina u uzorcima određena je prema uputama proizvođača u mikrotitarskim pločicama od 96 jažica. Pločice su inkubirane 30 minuta pri 37 °C, te je zatim izmjerena apsorpcija pri 562 nm na SpectraMax i3 čitaču pločica (Molecular Devices). Koncentracija proteina u uzorku izračunata je interpolacijom iz BSA baždarne krivulje pomoću programa Microsoft Excel (Microsoft).

#### 3.11.3 Kapilarna Western analiza

Kapilarna Western blot analiza napravljena je na Wes uređaju (ProteinSimple) koristeći kit ProteinSimple Wes Master Kit prema uputama proizvođača. Ukratko, uzorci dobiveni postupkom iz 3.9.1, razrijeđeni su puferom iz kita te obilježeni fluorescentnom mješavinom, koja sadrži tri fluorescentna proteina. Oni služe za normalizaciju udaljenosti u svakoj kapilari zato što se molekularna ljestvica nalazi samo na prvoj kapilari, a svaka kapilara je sustav za sebe. Proteini u uzorku denaturirani su zagrijavanjem na 95 °C, 5 min. Denaturirani uzorci, zajedno s primarnim antitijelom, HRP-konjugiranim sekundarnim antitijelom i kemiluminiscentnim supstratom, nanoseni su na testnu pločicu. Po uzorku je nanoseno 0.5 mg/mL ukupnih proteina. Primarno antitijelo je bilo razrijeđeno 1:10. Postavljanjem testne pločice u uređaj, separacija elektroforezom te imunodetekcija odvija



se u potpuno automatiziranom kapilarnom sistemu. Western blot rezultati analizirani su pomoću Compass 2.7.1 programa.

### 3.12 Metabolička stabilnost u jetrenim mikrosomima

Metabolička stabilnost makrolida određena je u mikrosomima jetre čovjeka. Razrjeđivanjem početne otopine mikrosoma jetre, koncentracije proteina 20 mg/mL, priređene su inkubacijske otopine koncentracije mikrosomalnih proteina od 0.5 mg/mL i makrolida koncentracije 1  $\mu$ M s 0.03% DMSO v/v, u 50 mM PBS otopine (pH=7.4).

Reakcija pri 37°C započeta je dodavanjem NADPH regeneracijskog sustava, koji se sastojao od NADP, glukoze-6-fosfata, magnezijevog klorida i glukoze-6-P-dehidrogenaze u konačnim koncentracijama 5 mM, 50 mM, 5 mM i 15 U/mL navedenim redosljedom. Uzorci od 40  $\mu$ L uzimani su u vremenskim točkama 0, 10, 20, 30, 45 i 60 minuta, a zatim su dodani hladnoj otopini za zaustavljanje reakcije - „Stop“ otopini. Uzorci za LC-MS/MS analizu pripremljeni su kao što je opisano u poglavlju 3.9. Svaki spoj testiran je u duplikatu. Metabolička aktivnost mikrosoma potvrđena je praćenjem kontrolnih spojeva testosterona, propranolola i kofeina unutar navedenog inkubacijskog vremena.

Metabolička stabilnost makrolida određena je praćenjem smanjenja njihove početne koncentracije u smjesi jetrenih mikrosoma nakon inkubacije od jednog sata. Smanjenje koncentracije testirane supstance izražava se relativno u odnosu na omjer površine ispod krivulje analita i površine ispod krivulje unutrašnjeg standarda u prvoj točki mjerenja ( $t=0$  min) proglašenoj kao 100% vrijednosti analita. Vrijeme poluživota *in vitro* ( $t_{1/2}$ ) računato je nelineranom regresijom iz odnosa postotka metaboličke stabilnosti, odnosno, preostalog analiziranog spoja i vremena inkubacije. Prilikom računa korišten je GraphPad Prism program.

Hepatički mikrosomalni intrinzični klirens *in vitro* ( $CL_{int}$ , mL/min/mg), izračunat je iz vremena poluživota *in vitro*, uz normalizaciju na količinu proteina u inkubacijskoj smjesi te je izražen po gramu jetre prema jednadžbi:

$$CL_{int} = \frac{\ln 2}{t_{1/2}} \cdot \frac{\text{mL inkubacijske smjese}}{\text{mg proteina}} \quad (8)$$

Predviđeni hepatički klirens *in vivo* izračunat je prema sljedećoj jednadžbi, pretpostavljajući 52.5 mg proteina po gramu jetre:

$$in\ vivo\ CL_h = \frac{CL_{int} \cdot LBF \cdot LW/BW}{LBF + CL_{int} \cdot LW/BW} \cdot \frac{mg\ proteina}{g\ jetre} \quad [mL/min/kg] \quad (9)$$

$$in\ vivo\ CL_h = \frac{in\ vivo\ CL_h}{LBF} \cdot 100 \quad [\% LBF] \quad (10)$$

pri čemu LBF, odnosno hepatski protok krvi (engl. *liver blood flow*), iznosi 21 mL/min/kg, a LW/BW, odnosno omjer težine jetre i tijela (engl. *liver weight/body weight*) iznosi 25.7 g/kg za čovjeka. Prema % LBF, spojevi se klasificiraju na one niskog klirensa kada je % LBF < 30, visokog klirensa za % LBF > 70, te umjerenog klirensa za % LBF između 30 i 70.

### 3.13 Pokus nakupljanja i zadržavanja u stanicama

Pokus staničnog nakupljanja (akumulacije) te zadržavanja (retencije) makrolida izveden je na staničnoj liniji plućnog karcinoma NCI-H292. Odabir stanične linije temeljio se na zaključcima rada Stepanić i sur. (151), prema kojima je NCI-H292 linija, od šest testiranih, odgovarajuća za ovu skupinu spojeva. Dan prije izvođenja pokusa, stanice NCI-H292 posađene su u pločice s 12 jažica u količini  $0.4 \cdot 10^6$  stanica u volumenu 1.2 mL po jažici. Unos 10  $\mu$ M makrolida izmjeren je nakon 3 sata inkubacije (37°C, 5% CO<sub>2</sub>, 95% vlage), tako što su stanice prvo tri puta isprane s 2 mL hladnog PBS pufera, te potom lizirane s 300  $\mu$ L 0.5% otopinom tritona u vodi. Za mjerenje retencije makrolida, stanice su nakon 3 sata inkubacije s 10  $\mu$ M makrolida isprane na isti način, te je nastavljena inkubacija 3 sata s čistim RPMI medijem. Po završetku inkubacije, stanice su isprane s 2 mL hladnog PBS pufera, te potom lizirane s 300  $\mu$ L 0.5% otopinom tritona u vodi. Standardi za kalibracijsku krivulju pripremljeni su liziranjem netretiranih stanica s 300  $\mu$ L 0.5% otopine tritona sa serijskim razrjeđenjima makrolida (10, 5, 2.5, 1, 0.25  $\mu$ M). Naposljetku su svi lizati stanica smrznuti, otopljeni i centrifugirani na 14000 rpm, 10 min, pri 4 °C. Supernatanti su skupljeni i pohranjeni na -20 °C do LC-MS/MS analize. Uzorci za LC-MS/MS analizu pripremljeni su kao što je opisano u poglavlju 3.9.

Izmjerene koncentracije nakupljenih makrolida izražene su kao postotni udio od nakupljenog azitromicina, čija je vrijednost postavljena na 100%. Retencija makrolida u stanicama nakon 3 sata izražena je kao postotni udio od inicijalno nakupljene količine tog makrolida. Svaki spoj testiran je u triplicatu, a konačni rezultat izražen je kao srednja vrijednost.

### 3.14 Pokus permeabilnosti pri dužem vremenu inkubacije

Makrolidi su inkubirani 1, 6 i 24 sata u MDCK-KO modelu permeabilnosti koji je opisan u poglavlju 3.8. S obzirom na produženo vrijeme pokusa, umjesto transportnog pufera korišten je stanični medij kako bi stanice bile opskrbljene nutrijentima. Budući da stanični medij sadrži fenolno crvenilo nije bilo moguće koristiti Lucifer yellow tijekom inkubacije. Zato je na kraju pokusa izveden test integriteta. Stanični monoslojevi isprani su transportnim medijem, nakon čega je Lucifer yellow inkubiran sat vremena na MDCK-KO jednostrukim slojevima čime se utvrdio integritet i nepropusnost membrane. Budući da „sink“ uvijeti nisu očuvani u ovom eksperimentalnom dizajnu, nije bilo moguće koristiti formulu za koeficijent permeabilnosti (poglavlje 2.8). Stoga su rezultati izraženi kao omjer raspodjele koncentracije spoja između bazolateralnog i apikalnog odjeljka ( $R_{b/a\_MDCK}$ ) opisujući razdjeljenje između faza umjesto brzine prolaska analogno metodi koju su opisali Peier i sur. (150) i pokusu nakupljanja u stanicama.

### 3.15 Analiza podataka i statistika

#### 3.15.1 Analiza krivulja osjetljivosti

Krivulja osjetljivosti, tzv. ROC krivulja (engl. *receiver operating characteristic, ROC curve*) tehnika je vizualizacije i analize eksperimentalnog postupka prema njegovoj sposobnosti da pravilno klasificira rezultate (153). Određuje se temeljem osjetljivosti (senzitivnosti) i specifičnosti nekog testa (154).

Kako bi se procijenila dijagnostička vrijednost PCR testa u detekciji MDCK klonova s niskom izraženošću gena *mdr1*, transportni test uzet je kao zlatni standard. Rezultati PCR testa rangirani su binarnom klasifikacijom prema rezultatu transportnog testa uz kriterijski prediktor - omjer efluksa manji od 2.4, te su u MS Excel programu izračunate senzitivnost (stvarno pozitivna stopa) i lažno pozitivna stopa (1-specifičnost), kao i površina ispod ROC krivulje (engl. *area under the curve, AUC*), koja ukazuje na uspješnost eksperimentalnog postupka.

#### 3.15.2 Toplinske mape matrica korelacije

Toplinske mape matrica korelacije izrađene su kroz programski jezik Python, a pomoću programskih biblioteka Matplotlib i Seaborn (155,156).

Matrica korelacije nastaje utvrđivanjem korelacije svih parova promatranih varijabli. Redovi i stupci matrice predstavljaju promatrane varijable, a podatak na presjeku

određenog retka i stupca predstavlja koeficijent korelacije između varijabli u odgovarajućem retku i stupcu. Toplinska mapa matrice vizualno predstavlja ove koeficijente. Ova vizualizacija omogućava lagano uočavanje međusobne ovisnosti varijabli. Pozitivna korelacija ukazuje na jaku ovisnost, dok negativna korelacija ukazuje na jaku inverznu ovisnost. Koeficijent korelacije blizu nule ukazuje na slabu ovisnost.

### 3.15.3 Izgradnja modela pomoću PLS analize

PLS metoda (engl. *partial least squares*) statistički je pristup široko korišten u kemometriji, posebno u slučaju kada je broj nezavisnih varijabli veći od broja točaka podataka (157). PLS metoda je regresijska inačica metode glavnih komponentata (PCA, engl. *principal component analysis*) koja se temelji na projekciji višedimenzionalnog prostora u dvodimenzionalni ili trodimenzionalni prostor opisan međusobno ortogonalnim glavnim komponentama (engl. *principal components*).

Metoda parcijalnih projekcija najmanjih kvadrata (PLS) metoda je za izgradnju prediktivnih modela kad postoji mnogo faktora (deskriptora) koji mogu biti međusobno kolinearni. Osim predviđanja zavisnih varijabli, iz PLS modela mogu se zaključiti i odnosi između nezavisnih varijabli te njihov doprinos veličini/procesu koji se modelira. Time je moguće razviti i mehanistički model, tj. statističkim pristupom istražiti jednostavnije faktore koji utječu na složeniju zavisnu varijablu.

Djelomična analiza najmanjeg kvadrata, odnosno PLS analiza korištena je za izgradnju statističkih modela za:

a) predviđanje permeabilnosti makrolida pomoću eksperimentalno određenih parametara staničnog nakupljanja, staničnog zadržavanja i omjera efluksa, te izračunatih fizikalno-kemijskih i strukturnih parametara kao nezavisnih varijabli;

b) predviđanje biorasploživosti makrolida u ljudi pomoću eksperimentalno određenih parametara staničnog nakupljanja i zadržavanja,  $R_{b/a\_MDCK}$  nakon 1, 6 i 24 sata, omjera efluksa i metaboličke stabilnosti u humanim mikrosomima, te izračunatih fizikalno-kemijskih i strukturnih parametara kao nezavisnih varijabli.

Strukturni i fizikalno-kemijski deskriptori pKa, logP, logD, topološke polarne površine (TPSA), broj donora vodikovih veza (HBD), broj pozitivnih naboja i broj šećernih skupina izračunati su ACD/Percepta programom (Advanced Chemistry Development, Inc.).

Za provedbu PLS analize korišten je Simca računalni program (Simca-P+ 11.5. Umetrics, Sartorius AG). Za ocjenu modela korišteni su statistički parametri  $R^2$  koeficijent

i  $Q^2$  koeficijent.  $R^2$  mjeri kvalitetu slaganja između vrijednosti izračunatih modelom i izmjerenih vrijednosti (engl. *goodness of fit*), dok  $Q^2$  mjeri kvalitetu predviđanja (engl. *goodness of prediction*). Modeli visoke statističke značajnosti imaju vrijednost  $R^2$  veću od 0.8 i  $Q^2$  veći od 0.6 (158).

Vizualni prikazi modela izrađeni su programom DataWarrior 5.5 ([openmolecules.org](http://openmolecules.org)).

## 4. REZULTATI

Rezultati su podijeljeni u dvije cjeline koje proizlaze iz ciljeva ovog istraživanja. Prvi dio opisuje dobivanje klona MDCK s niskom izraženosti P-glikoproteina, te obuhvaća postupak izolacije i daljnju karakterizaciju klona. U drugom dijelu istražena je permeabilnost makrolida u različitim staničnim sustavima. Dobiveni rezultati permeabilnosti makrolida objedinjeni su i uspoređeni s dostupnim podacima lipofilnosti, nakupljanja unutar stanice i *in vivo* bioraspoloživosti u čovjeku i mišu. Radi daljnjeg razumijevanja dobivenih rezultata dodatno je istražena permeabilnost makrolida uz produljenu vremensku komponentu.

### 4.1 Dobivanje klona MDCK s niskom izraženosti gena *mdr1*

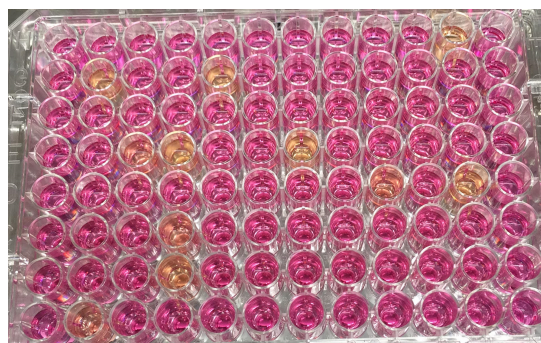
#### 4.1.1 Izolacija klonova

U svrhu izolacije klonova MDCK-WT korišten je postupak velikog razrjeđivanja (engl. *limiting dilution*), tako što su stanice posađene u koncentraciji 0.3 stanice/jažici u mikrotitarskoj pločici ravnog dna s 96 jažica. S obzirom na nisku koncentraciju sađenja, bilo je potrebno 14 dana inkubacije kako bi jažice s klonovima postigle 70-80% konfluencije (**Slika 9**). Nakon toga su klonovi dalje propagirani u staničnu kulturu, prvo u pločice formata 24 jažice, a nakon toga u pločice formata 6 jažica. Odabir ovih formata pločica (**Tablica 7**) omogućio je optimalno vrijeme postizanja konfluencije i to 7 dana rasta u pločicama od 24 jažice, te 4 dana rasta u pločicama od 6 jažica.

Budući da je prinos stanica u pločici od 6 jažica bio oko  $1.2 \times 10^6$  stanica za svaki pojedini klon, dobivene stanice bile su podijeljene u tri dijela:

- (1) sađenje na polupropusnu membranu za testiranje efulksa amprenavira,
- (2) uzorak za kvantitativnu PCR analizu i
- (3) smrzavanje stanica kako bi se sačuvale za daljnje studije.

Izolirano je ukupno 102 klona MDCK divljeg tipa koji su paralelno testirani na izraženost mRNA za P-glikoprotein i na efluks amprenavira.



**Slika 9.** Inkubacijska pločica nakon 14 dana.

**Tablica 7.** Usporedba očekivanih prinosa stanica u pločicama različitog broja jažica (159).

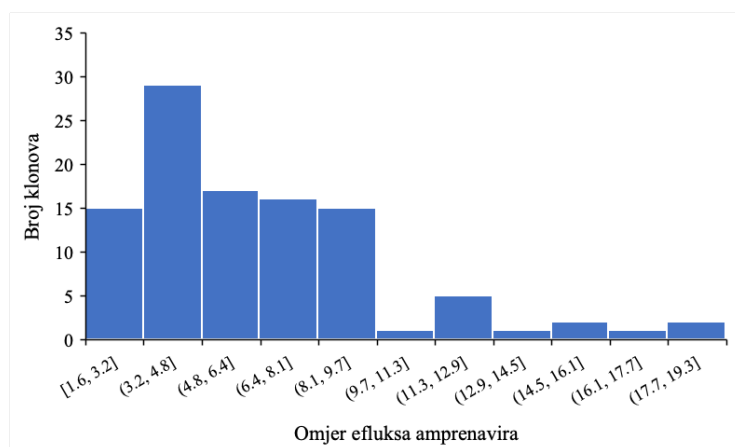
Broj jažica na pločici	Površina jažice (cm <sup>2</sup> )	Sađenje (broj stanica x10 <sup>6</sup> / jažici)	Prinos stanica kod konfuentnosti (x10 <sup>6</sup> / jažici)
6	9.6	0.3	1.2
12	3.5	0.1	0.5
24	1.9	0.05	0.24
48	1.1	0.03	0.12
96	0.32	0.01	0.04

#### 4.1.2 Odabir klona s niskim efluksom

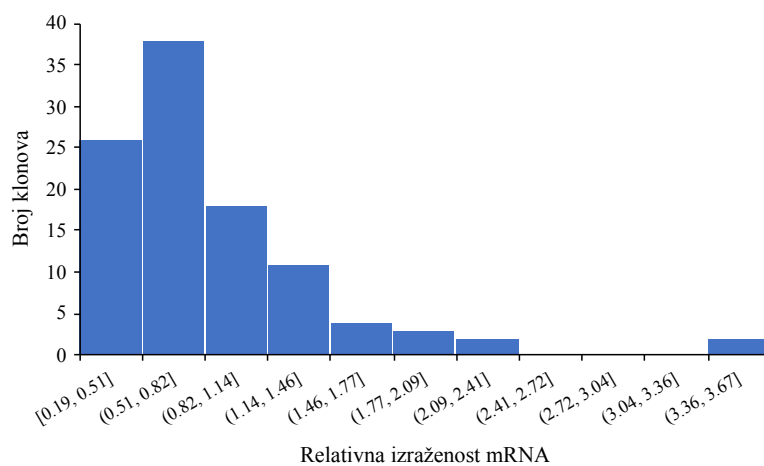
Za proučavanje funkcije P-glikoproteina, monoslojevi izoliranih klonova inkubirani su 60 min na 37°C sa supstratom P-glikoproteina, amprenavirom. Potom je amprenavir izmjeren u apikalnom i bazolateralnom odjeljku te je izračunat omjer efluksa (ER). Nadalje, za sve klonove praćena je izraženost P-glikoproteina na nivou glasničke RNA (mRNA) kvantitativnim PCR-om.

Rezultati analize klonova prikazani su histogramom na **Slici 10**. Izmjereni omjeri efluksa amprenavira kretali su se u rasponu od 1.6 do 19.3 pri čemu je MDCK-WT imao ER = 6.8. Najviše klonova imalo je vrijednosti efluksa u rasponu 3.2 – 4.8, dok su vrijednosti iznad 12.9 bile rijetke. Nadalje, kvantitativni PCR izoliranih klonova pokazao je raspon relativne mRNA izraženosti od 0.19 do 3.67 pri čemu je MDCK-WT imao vrijednost 1. Najviše klonova nalazilo se u rasponu 0.51 – 0.82, dok su vrijednosti iznad 2.09 bile rijetkost. Oba histograma asimetričnog su oblika s nagibom na lijevo prema nižim vrijednostima.

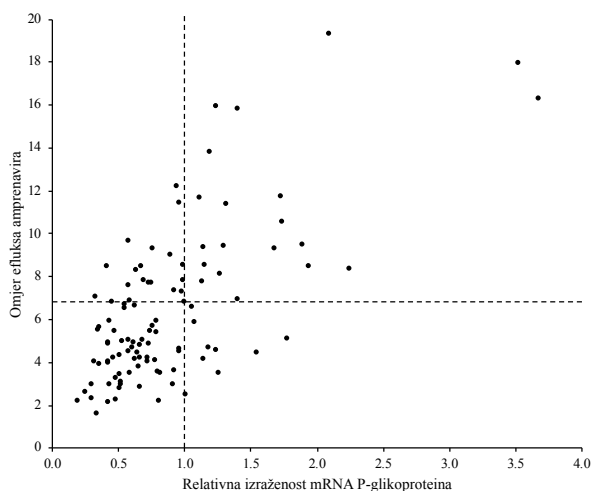
a)



b)



**Slika 10.** Histogrami omjera efluksa amprenavira (a) i relativne mRNA izraženosti (b) izoliranih klonova.

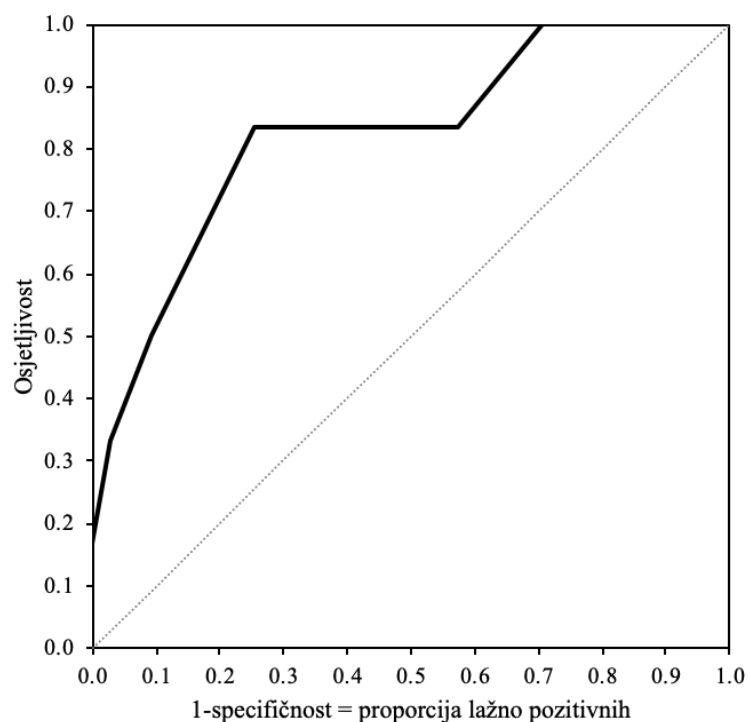


**Slika 11.** Odnos omjera efluksa amprenavira i izraženosti P-glikoproteina za 102 izolirana MDCK klonova. Graf je podijeljen u kvadrante prema vrijednostima dobivenima za MDCK-WT.



Na **Slici 11** prikazan je odnos omjera efluksa i kvantitativnog PCR-a za svaki izolirani klon. S obzirom na slabu linearnu korelaciju ( $R^2 = 0.46$ ), napravljena je ROC analiza kako bi se provjerila prediktivnost PCR-a. Pri tom, klonovi koji su imali vrijednost omjera efluksa manji ili jednak 2.3, smatrani su pozitivnim ishodom. Granica za odluku stavljena je na 2.3, s obzirom da je samo jedan klon postigao omjer efluksa manji od dva.

Prema ROC krivulji prikazanoj na **Slici 12**, PCR je umjereno prediktivan s površinom ispod ROC krivulje (AUC) od 0.789. Nadalje, vidljivo je da visoka specifičnost odnosno niska proporcija lažno pozitivnih rezultata, dolazi s relativno niskom osjetljivošću, i obratno. Stoga, kako bi se postigla maksimalna specifičnost, granična vrijednost kvantitativnog PCR-a bila bi 0.4, kod koje se postiže 33% osjetljivosti odnosno proporcija stvarno pozitivnih rezultata.



**Slika 12.** ROC krivulja detekcije MDCK klonova s niskim efluksom kvantitativnim PCR testom. Tanka dijagonalna linija predstavlja potpuno neinformativni test s površinom ispod krivulje (AUC) od 0.5. Površina ispod ROC krivulje (deblja linija) bila je 0.789.

### 4.1.3 Funkcionalna karakterizacija transportera

Da bi se provjerio mogući utjecaj drugih efluks transportera na funkcionalnoj razini, izvedena je inkubacija s različitim supstratima transportera. Pored najbolje rangiranog klona 79, za daljnju procjenu odabrano je nekoliko dodatnih klonova umjerenog ranga (69, 38, 1, 72, 50) i jedan klon (90) s najnižim rangom.

Testirano je ukupno 7 klonova na aktivnost efluks transportera: MDR1, BCRP, MRP-2. Iz rezultata prikazanih u **Tablici 8**, u svim klonovima vidljiv je omjer efluksa manji od dva za prazosin i valsartan, što ukazuje na izostanak aktivnog transporta. Prazosin je supstrat BCRP i P-glikoproteina, dok je valsartan MRP-2 supstrat. Nadalje, topotekan, poznati BCRP, ali istovremeno i supstrat P-glikoproteina, te amprenavir, koji je P-glikoprotein supstrat, pokazali su slične omjere efluksa čime je omogućeno rangiranje klonova. Pri tome se amprenavir pokazao kao osjetljiviji marker aktivnosti P-glikoproteina.

Na temelju ovih rezultata, za naredne pokuse odabran je klon 79, koji je pokazao najmanji omjer efluksa amprenavira i topotekana, kao i nisku izraženost mRNA P-glikoproteina.

**Tablica 8.** Omjeri efluksa amprenavira, prazosina, topotecana i valsartana u MDCK klonovima.

Omjer efluksa	Prazosin	Valsartan	Topotekan	Amprenavir	qPCR
WT	1.3	0.5	4.0	6.8	1
Klon 79	1.0	0.5	1.6	1.6	0.33
Klon 69	1.1	0.4	2.5	3.0	0.43
Klon 38	1.2	0.4	3.5	3.8	0.65
Klon 1	1.3	0.4	2.1	4.1	0.78
Klon 72	1.1	0.4	2.9	3.6	0.79
Klon 50	1.3	0.4	2.1	3.0	0.91
Klon 90	1.4	0.4	5.2	15.8	1.40

#### 4.1.4 Karakterizacija klona 79 kroz pasaže

Da bi se provjerilo koliko je nizak efluks stabilan tijekom vremena, klon 79 je u različitim vremenima boravka u kulturi tzv. pasažama, ispitan na permeabilnost i efluks amprenavira.

Kako je prikazano u **Tablici 9**, permeabilnost amprenavira praćena je u klonu 79 u pasažama 4, 8 i 10. Pasaža 4 predstavlja 4. pasažu nakon odmrzavanja klona, te je pokazala nešto niži koeficijent permeabilnosti u smjeru iz apikalnog u bazolateralni odjeljak u odnosu na pasaže 8 i 10, koje su pokazale slične vrijednosti koeficijenata permeabilnosti u smjeru iz A u B kao i omjera efluksa. Iz prikazanog se može zaključiti da je nizak efluks klona 79 stabilan do 10. pasaže.

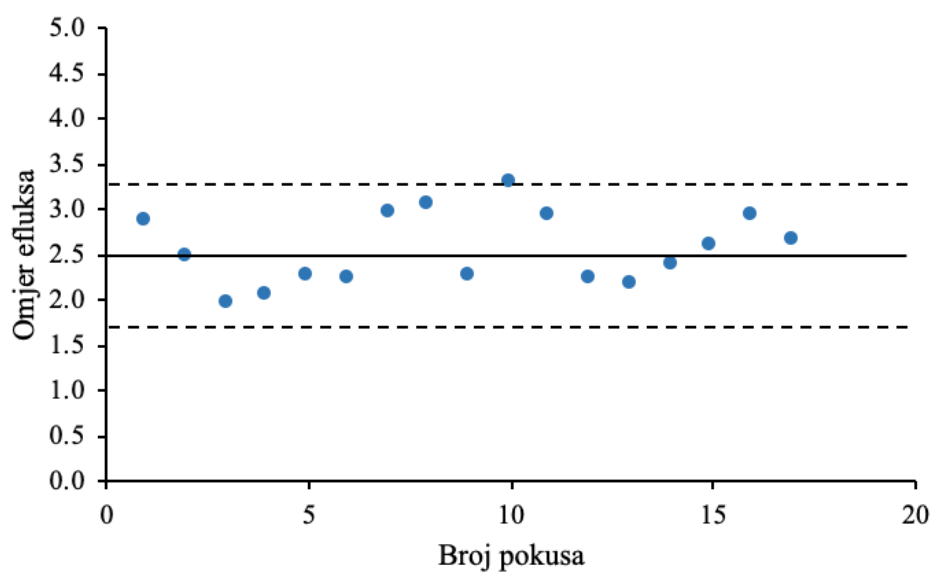
**Tablica 9.** Izmjereni koeficijenti permeabilnosti i omjeri efluksa amprenavira za klon 79 u različitim pasažama.

Broj pasaže	$P_{app}$ (apikalno-bazolateralni) [ $10^{-6}$ cm/s]	$P_{app}$ (bazolateralno-apikalni) [ $10^{-6}$ cm/s]	Omjer efluksa
4	10.6	30.7	3.0
8	12.4	25.4	2.1
10	12.5	28.8	2.3

U daljnjem pokusu dodatno je ispitana vremenska komponenta. Klon 79 je u produženom vremenskom intervalu od dva mjeseca testiran s amprenavirom te dodatno s topotekanom. Iz rezultata prikazanih u **Tablici 10**, vidljivo je da je nizak efluks klona 79 bio stabilan do 22. pasaže. Isto kao u ranijem pokusu, 4. pasaža je pokazala nešto viši efluks. Prilično neočekivano visok omjer efluksa dobiven je za pasažu broj 12. Međutim permeabilnost amprenavira je ostala visoka u svim pasažama. Detaljnim pregledom svih rezultata amprenavira na klonu 79 utvrđeno je da se za 17 mjerenja, raspon vrijednosti omjera efluksa kretao u 2.0 – 3.3 (**Slika 13**).

**Tablica 10.** Izmjereni koeficijenti permeabilnosti i omjeri efluksa amprenavira i topotekana za klon 79 u pasažama kroz vremenski interval od 2 mjeseca.

Spoj	Broj pasaže	$P_{app}$ (apikalno-bazolateralni) [ $10^{-6}$ cm/s]	$P_{app}$ (bazolateralno-apikalni) [ $10^{-6}$ cm/s]	Omjer efluksa
Amprenavir	4	10.1	30.2	3.0
	8	13.8	35.5	2.6
	12	11.1	40.7	3.7
	22	13.3	31.6	2.6
Topotekan	4	2.0	6.4	3.2
	8	2.3	5.4	2.4
	12	2.1	6.2	2.9
	22	2.4	5.9	2.5

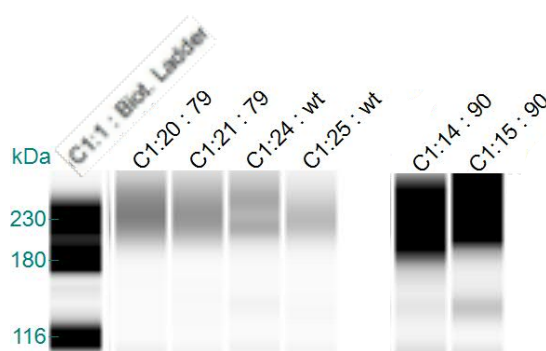


**Slika 13.** Prikaz omjera efluksa amprenavira u klonu 79 u 17 različitih pokusa. Puna linija predstavlja srednju vrijednost, a isprekidane linije srednju vrijednost  $\pm$  dvije standardne devijacije.

#### 4.1.5 Analiza izraženosti P-glikoproteina na razini proteina

Kako bi se provjerilo je li izraženost P-glikoproteina određena transportnim testom i kvantitativnom PCR-om očuvana i na proteinskoj razini, napravljena je Western blot analiza membranske frakcije stanica klonova 79 i 90, te divljeg tipa.

Na **Slici 14** vidljivo je da je P-glikoprotein, koji se prema literaturi nalazi između 140-170 kDa, izašao kasnije na otprilike 230 kDa, što je za očekivati na kapilarnom automatskom sustavu. Na proteinskoj razini ne vidi se razlika između najboljeg klona 79 i MDCK-WT, dok klon 90 ima jasno izraženiji P-glikoprotein što je u skladu s rezultatima dobivenim kvantitativnom PCR-om i transportnim pokusom.



**Slika 14.** Western blot analiza membranskih frakcija stanica MDCK-WT te klonova 79 i 90 za P-glikoprotein (230 kDa). 0.5  $\mu$ g ukupnih proteina po jažici.

#### 4.1.6 Dvosmjerni transport standardnih spojeva

U svrhu daljnje karakterizacije klona 79, napravljeno je niz pokusa dvosmjernog transporta na klonu 79 sa standardnim, komercijalnim spojevima. Usporedno, isti su spojevi testirani na MDCK staničnim linijama divljeg tipa (MDCK-WT) i cMdr1 *knock-out* (MDCK-KO) staničnoj liniji. Set standardnih spojeva obuhvatio je visoko i nisko permeabilne spojeve, kao i ne-MDR1 i MDR1 supstrate sa širokim rasponom omjera efluksa u divljega tipa stanicama. Set je sadržavao sljedeće spojeve:

- (a) atenolol koji je nisko permeabilan i nije supstrat P-glikoproteina,
- (b) propranolol, teofilin i diklofenak – visoko permeabilni spojevi koji nisu supstrati P-glikoproteina,
- (c) feksofenadin, ranitidin, acebutolol, topotekan, eritromicin, klaritromicin, azitromicin, digoksin, ritonavir, rupintrivir, vinblastin, i vinorelbin – spojevi niske permeabilnosti i supstrati P-glikoproteina,
- (d) prazosin, kinidin, amprenavir – umjereno do visoko permeabilni spojevi i supstrati P-glikoproteina.

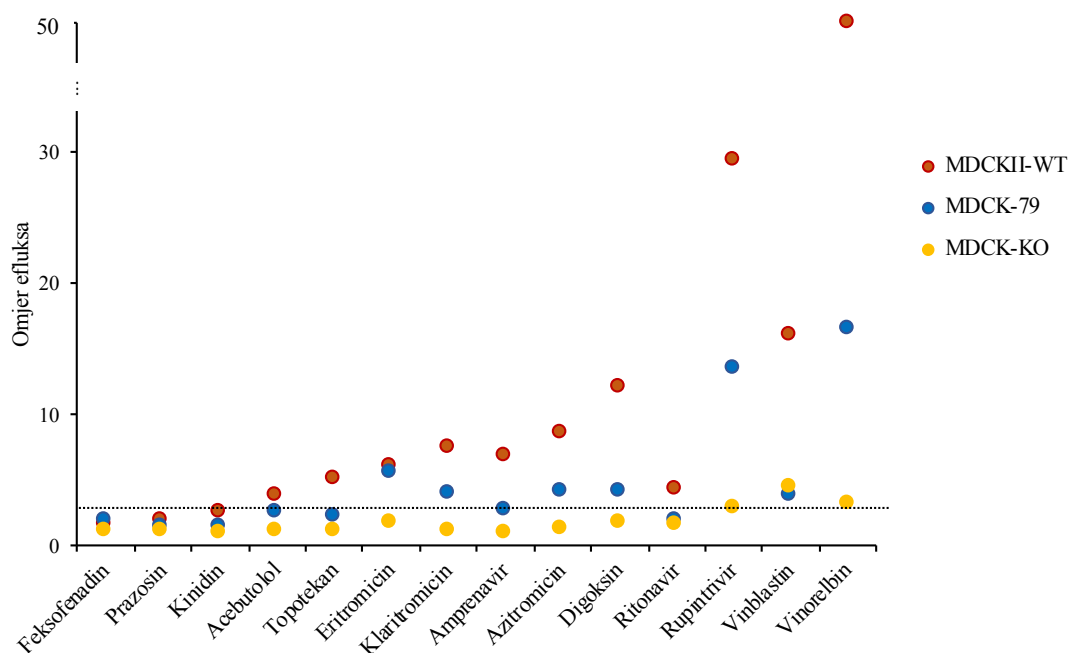
Rezultati dvosmjernog transporta na MDCK-WT, klonu 79 i MDCK-KO prikazani su sumarno u **Tablici 11**. Za četiri spoja koji nisu supstrati P-glikoproteina, atenolol, propranolol, teofilin i diklofenak, dobiveni rezultati permeabilnosti i omjera efluksa nisu se razlikovali između testiranih staničnih linija. Tako se atenolol u sve tri stanične linije pokazao kao nisko permeabilan, dok su propranolol, teofilin i diklofenak bili visoko permeabilni. Sva četiri spoja imala su omjer efluksa < 2 u sve tri testirane stanične linije.

**Tablica 11.** Vrijednosti koeficijenta permeabilnosti ( $P_{app}$ ) i omjera efluksa u MDCK-WT, MDCK-79 i MDCK-KO.

	$P_{app}$ (apikalno-bazolateralni) [ $10^{-6}$ cm/s]			$P_{app}$ (bazolateralno-apikalni) [ $10^{-6}$ cm/s]			Omjer efluksa		
	WT	79	KO	WT	79	KO	WT	79	KO
Feksofenadin	0.8 ±0.2	0.7 ±0.3	0.9 ±0.2	1.2 ±0.2	1.4 ±0.5	0.9 ±0.1	1.6 ±0.3	1.9 ±0.4	1.1 ±0.2
Atenolol	1.2 ±0.4	0.9 ±0.3	0.9 ±0.2	1.1 ±0.5	1.0 ±0.2	0.8 ±0.2	0.9 ±0.2	1.1 ±0.2	0.9 ±0.5
Ranitidin	1.6 ±0.3	1.4 ±0.8	1.0 ±0.1	2.0 ±0.1	1.7 ±0.5	1.4 ±0.3	1.2 ±0.2	1.4 ±0.5	1.3 ±0.3
Propranolol	11.3 ±2.4	10.2 ±2.3	19.7 ±3.4	12.5 ±1.0	6.7 ±1.3	17.1 ±2.1	1.1 ±0.2	0.7 ±0.2	0.9 ±0.1
Prazosin	10.2 ±1.8	10.0 ±2.5	12.6 ±2.7	20.3 ±1.5	13.1 ±1.5	14.0 ±2.3	2.0 ±0.4	1.4 ±0.5	1.1 ±0.1
Teofilin	26.8 ±6.6	20 ±3.9	22.7 ±3.8	23.4 ±2.2	18.5 ±1.7	22.0 ±2.0	0.9 ±0.2	1.0 ±0.2	1.0 ±0.1
Diklofenak	27.3 ±5.8	34.8 ±4.1	42.3 ±3.6	26.8 ±3.0	25.1 ±1.9	33.6 ±3.5	1.0 ±0.1	0.7 ±0.1	1.0 ±0.1
Kinidin	9.5 ±0.2	8.7 ±1.3	13.9 ±3.0	24.1 ±6.3	12.9 ±1.6	13.0 ±1.9	2.5 ±0.8	1.5 ±0.2	1.0 ±0.1
Acebutolol	1.4 ±0.3	1.5 ±0.3	1.4 ±0.2	4.9 ±0.7	3.4 ±0.3	1.6 ±0.3	3.8 ±1.0	2.5 ±0.5	1.1 ±0.2
Topotekan	1.2 ±0.3	1.9 ±0.4	1.9 ±0.1	5.9 ±1.2	4.1 ±0.5	2.3 ±0.2	5.1 ±1.0	2.2 ±0.4	1.2 ±0.2
Eritromicin	0.9 ±0.2	0.6 ±0.2	1.2 ±0.3	5.2 ±0.7	3.7 ±1.1	1.9 ±0.4	6.0 ±0.9	5.6 ±0.8	1.7 ±0.5
Klaritromicin	2.7 ±1.0	1.8 ±0.4	5.9 ±1.1	17.8 ±3.3	6.9 ±1.1	7.0 ±1.3	7.5 ±2.9	4.0 ±0.8	1.2 ±0.2
Amprenavir	4.7 ±1.3	10.6 ±1.8	22.4 ±1.2	29.6 ±3.4	27.6 ±4.5	22.0 ±1.0	6.8 ±1.8	2.7 ±0.6	1.0 ±0.0
Azitromicin	0.4 ±0.1	1.1 ±0.8	1.2 ±0.4	3.3 ±0.7	3.4 ±0.1	1.4 ±0.3	8.6 ±1.7	4.2 ±2.8	1.3 ±0.3
Digoksin	0.9 ±0.1	1.9 ±0.8	2.7 ±1	11.3 ±1	8.0 ±1.0	4.6 ±1.0	12.1 ±2.1	4.2 ±1.3	1.8 ±0.5
Ritonavir	6.7 ±2.0	11.1 ±2.9	11.0 ±2.6	26.8 ±7.2	19.5 ±2.4	17.3 ±3.9	4.3 ±1.9	1.9 ±0.8	1.6 ±0.1
Rupintrivir	1.0 ±0.2	1.6 ±0.4	3.7 ±0.3	28.5 ±2.1	21.1 ±2.3	10.7 ±0.3	29.5 ±7	13.6 ±3.3	2.9 ±0.3
Vinblastin	0.6 ±0.1	0.8 ±0.1	0.3 ±0.1	9.1 ±4.3	3.1 ±1.2	1.4 ±0.2	16.1 ±6.6	3.9 ±1.9	4.5 ±1.0
Vinorelbin	0.3 ±0.2	0.5 ±0.2	0.4 ±0.1	19.9 ±3.0	7.4 ±0.9	1.3 ±0.3	53.9 ±1.7	16.6 ±6.6	3.2 ±1.3

Na **Slici 15** prikazan je efluks poznatih supstrata P-glikoproteina na tri stanične linije. Literaturni supstrati feksofenadin i prazosin nisu pokazali efluks niti na jednoj staničnoj liniji. Omjer eflukasa u klonu 79, za preostale supstrate P-glikoproteina, bio je u prosjeku 2.4 puta niži u usporedbi s MDCK-WT, a vrijednosti omjera eflukasa kretale su se u rasponu od 1.5 za kinidin do 17 za vinorelbin, pri čemu su vrijednosti eflukasa na MDCK-WT bile 2.5 za kinidin i 53 za vinorelbin. Unatoč tome, većina spojeva bi prema rezultatima u klonu 79 bila interpretirana kao supstrati P-glikoproteina, budući da je omjer eflukasa bio iznad 2, što ukazuje na rezidualnu aktivnost P-glikoproteina u klonu 79. Od spojeva koji su imali omjer eflukasa iznad 2 u MDCK-WT, jedino eritromicin nije pokazao vidljivo smanjenje omjera eflukasa u klonu 79.

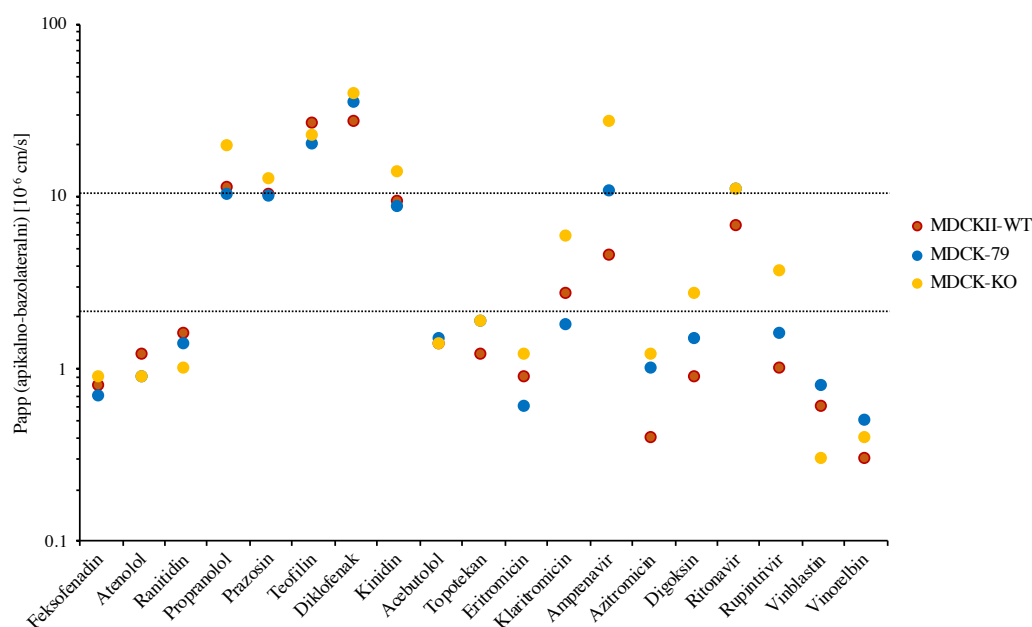
S druge strane, „knock-out“ linija pokazala je simetričan efluks kod svih supstrata P-glikoproteina uz iznimke rupintrivir, vinblastin i vinorelbin.



**Slika 15.** Efluks supstrata P-glikoproteina u staničnim linijama MDCK-WT, izoliranom klonu 79 i MDCK-KO. Iscrtkana linija označava graničnu vrijednost 2. Omjer eflukasa veći od 2 upućuje na uključenost aktivnog transporta.



Usporedba koeficijenta permeabilnosti ( $P_{app}$ , apikalno-bazolateralni) između klona 79, MDCK-WT i MDCK-KO na **Slici 16**, pokazala je da se klasifikacija na testiranim staničnim linijama podudara za većinu spojeva, uključujući feksofenadin, atenolol, ranitidin, propranolol, prazosin, teofilin, diklofenak, acebutolol, topotekan, eritromicin, azitromicin, vinblastin, vinorelbin. Za šest supstrata P-glikoproteina (kinidin, klaritromicin, amprenavir, digoksin, ritonavir i rupintrivir), permeabilnost je bila nešto veća u stanicama MDCK-KO u odnosu na klon 79, što je posljedično utjecalo na promjenu klasifikacije. Za ovu skupinu spojeva aktivnost P-glikoproteina utječe na koeficijent permeabilnosti, uz izuzetak kinidina i klaritromicina. Nadalje,  $P_{app}$ , apikalno-bazolateralni vrijednosti klona 79 pokazale su bolju korelaciju s „knock-out“ staničnom linijom ( $R^2 = 0.93$ ) u odnosu na WT ( $R^2 = 0.89$ ).



**Slika 16.** Koeficijenti permeabilnosti u smjeru iz apikalnog u bazolateralni,  $P_{app}$ (apikalno-bazolateralni), na staničnim linijama MDCK-WT, izoliranom klonu 79 i MDCK-KO. Iscrtkane linije postavljene su na granične vrijednosti 2 te  $10 \times 10^{-6} \text{cm/s}$ . Spojevi s vrijednostima  $P_{app}$  ispod donje granične vrijednosti smatraju se nisko permeabilnima, a spojevi iznad gornje granične vrijednosti smatraju se visoko permeabilnima.

## 4.2 Permeabilnost i transport makrolida u različitim staničnim sustavima

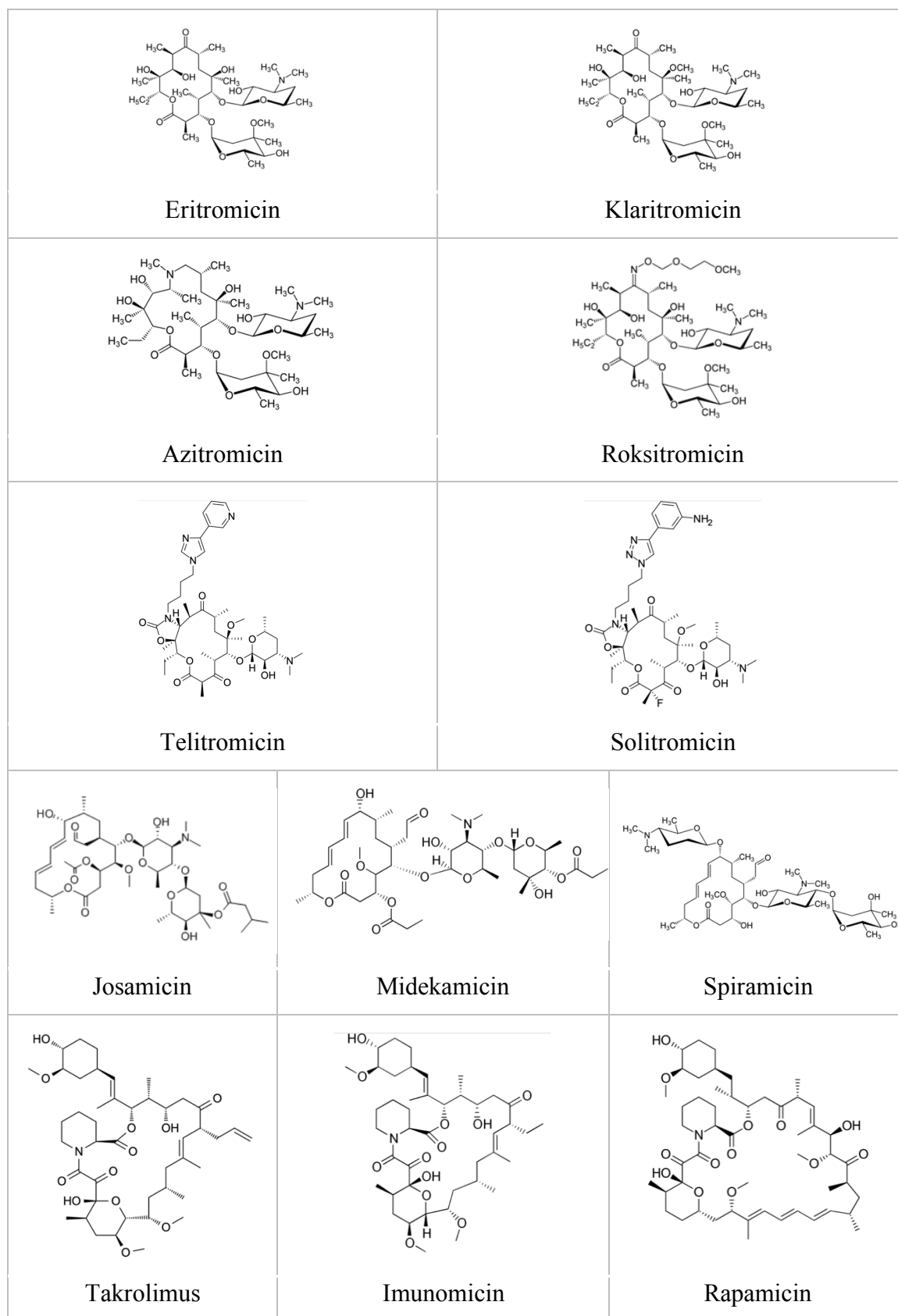
Za proučavanje *in vitro* permeabilnosti i transporta makrolidi su ispitani u studijama dvosmjernog transporta na sljedećim staničnim sustavima:

- 1) humana intestinalna stanična linija Caco-2,
- 2) pseća, bubrežna stanična linija s dodatno izraženim humanim P-glikoproteinom, MDCK-MDR1,
- 3) divlji tip stanica MDCK, MDCK-WT,
- 4) izoliranom klonu MDCK 79, i
- 5) cMdr1 *knock-out* stanična linija, MDCK-KO.

Koeficijenti permeabilnosti i omjeri efluksa određeni su bez i uz prisustvo inhibitora P-glikoproteina elakridara (GF120918).

Za daljnju analizu dobivenih rezultata, testirani makrolidi, čije su strukture prikazane na **Slici 17**, podjeljeni su u 4 podgrupe:

- 1) eritronolidi: azitromicin, klaritromicin, eritromicin i roksitromicin
- 2) ketolidi: telitromicin i solitromicin
- 3) leukomicini: josamicin, midekamicin i spiramicin
- 4) imunosupresivi: takrolimus, rapamicin i imunomicin



Slika 17. Strukture istraživanih makrolida.

#### 4.2.1 Permeabilnost makrolida na stanicama Caco-2

Rezultati pokusa dvosmjernog transporta na Caco-2 staničnom monosloju prikazani su u **Tablici 12**. Eritronolidi su pokazali nisku permeabilnost u apikalno-bazolateralnom smjeru, dok je dodatak inhibitora utjecao na povećanje permeabilnosti samo za klaritromicin i roksitromicin. Nadalje, omjer Caco-2 efluksa s inhibiranim P-glikoproteinom bio je znatno niži nego bez inhibicije.

Za ketolide i leukomicine koeficijent permeabilnosti u apikalno-bazolateralnom smjeru s inhibicijom P-glikoproteina nije bio izmjeren, međutim s obzirom da se permeabilnost u bazolateralno-apikalnom smjeru smanjila uz dodatak elakridara, može se indirektno zaključiti da P-glikoprotein donekle igra ulogu u transportu ovih spojeva.

Imunosupresivi su pokazali dobru permeabilnost, dok se omjer efluksa nije značajno smanjio.

**Tablica 12.** Koeficijenti permeabilnosti i omjeri efluksa makrolida u Caco-2 staničnom sustavu, bez i s inhibicijom P-glikoproteina elakridarom.

P-glikoprotein	aktivan			inhibiran		
	$P_{app}$ [ $10^{-6}$ cm/s]		ER	$P_{app}$ [ $10^{-6}$ cm/s]		ER
	apikalno-bazolateralni	bazolateralno-apikalni		apikalno-bazolateralni	bazolateralno-apikalni	
<b>Azitromicin</b>	0.3 ± 0.1	6.4 ± 0.5	25.9 ± 4.8	0.3 ± 0	0.4 ± 0	1.2 ± 0.1
<b>Klaritromicin</b>	1.2 ± 0.1	16.0 ± 0.1	12.4 ± 0.1	5.1 ± 0.7	7.8	1.6 ± 0.2
<b>Eritromicin</b>	0.3 ± 0.1	9.0 ± 0.8	32.8 ± 7.7	0.8 ± 0	0.9 ± 0.1	1.1 ± 0.1
<b>Roksitromicin</b>	0.6 ± 0.1	12.5 ± 1.1	19.7 ± 4.2	3.9 ± 0.2	4.1 ± 0.4	1 ± 0.2
<b>Telitromicin</b>	0.9 ± 0.1	9.3 ± 1.2	9.9 ± 1.4	N/A	3.9 ± 0.7	N/A
<b>Solitromicin</b>	3.6 ± 0	11.3 ± 1.4	2.9 ± 0.3	N/A	7.5	N/A
<b>Josamicin</b>	4.3 ± 0.7	37.9 ± 1.6	9.0 ± 1.1	N/A	23.4	N/A
<b>Midekamicin</b>	2.4 ± 0.8	34.3 ± 1.0	15.0 ± 4.4	N/A	14.9	N/A
<b>Spiramicin</b>	0.9 ± 0.1	13.2 ± 1.2	14.9 ± 2.4	0.8 ± 0.1	0.5 ± 0	0.7 ± 0.1
<b>Takrolimus</b>	6.4 ± 0.9	14.8 ± 4	2.3 ± 0.4	5.4 ± 0.5	8.4 ± 2.1	1.3 ± 0
<b>Rapamicin</b>	3.4 ± 0.7	6.2 ± 1.4	1.9 ± 0.6	N/A	3.8 ± 0.9	N/A
<b>Imunomicin</b>	11.1 ± 2.3	17.6 ± 1.1	1.6 ± 0.2	7.3 ± 2.7	11.5 ± 0.4	1.7 ± 0.7

N/A = nema rezultata zbog prevelike permeabilnosti Lucifer yellow

#### 4.2.2 Permeabilnost makrolida na stanicama MDCK-MDR1

Rezultati pokusa dvosmjernog transporta na stanicama MDCK-MDR1 prikazani su u **Tablici 13**. Kao kod Caco-2 rezultata, eritronolidi su pokazali nisku permeabilnost u apikalno-bazolateralnom smjeru, dok je dodatak inhibitora utjecao na povećanje permeabilnosti samo za klaritromicin i roksitromicin. Omjer MDCK-MDR1 efluksa s inhibiranim P-glikoproteinom znatno se smanjio nego bez inhibicije, iz čega se može zaključiti da su azitromicin, klaritromicin i roksitromicin supstrati P-glikoproteina, dok za eritromicin taj zaključak nije tako jasan.

Ketolidi i leukomicini bili su nisko permeabilni kod aktivnog P-glikoproteina, a njegovom inhibicijom permeabilnost se povećala. Iznimka je bio spiramicin koji je i uz inhibiciju P-glikoproteina ostao nisko permeabilan. Uspoređujući omjere efluksa pri aktivnom i inhibiranom P-glikoproteinu, može se zaključiti da su ovi spojevi supstrati P-glikoproteina.

Imunosupresivi pokazali su dobru permeabilnost. Nadalje, omjer efluksa značajno se smanjio kad je P-glikoprotein bio inhibiran što ukazuje na to da su testirani imunosupresivi supstrati P-glikoproteina.

**Tablica 13.** Koeficijenti permeabilnosti i omjeri efluksa makrolida u MDCK-MDR1 staničnom sustavu, bez i s inhibicijom P-glikoproteina elakridarom.

P-glikoprotein Spoj	aktivan			inhibiran		
	$P_{app}$ [ $10^{-6}$ cm/s]		ER	$P_{app}$ [ $10^{-6}$ cm/s]		ER
	apikalno-bazolateralni	bazolateralno-apikalni		apikalno-bazolateralni	bazolateralno-apikalni	
<b>Azitromicin</b>	0.5 ± 0.2	2.9 ± 0.6	7.0 ± 3.4	0.5 ± 0.2	0.9 ± 0.3	2.1 ± 0.4
<b>Klaritromicin</b>	0.4 ± 0.2	23.2 ± 3.0	56.4 ± 19.5	6.5 ± 1.0	9.7 ± 1.4	1.6 ± 0.3
<b>Eritromicin</b>	1.0 ± 0.6	4.3 ± 1.5	4.8 ± 1.1	0.9 ± 0.3	2.3 ± 0.5	2.5 ± 0.3
<b>Roksitromicin</b>	0.8 ± 0.6	14.3 ± 1.4	19.6 ± 9.9	2.4 ± 1.0	4.4 ± 0.9	2.1 ± 1.0
<b>Telitromicin</b>	0.4 ± 0.1	9.0 ± 1.7	26.7 ± 6.2	3.2 ± 1.0	5.4 ± 0.5	1.8 ± 0.5
<b>Solitromicin</b>	0.4 ± 0.2	17.9 ± 2.1	47.7 ± 16.2	3.9 ± 0.9	7.6 ± 0.7	2.0 ± 0.5
<b>Josamicin</b>	0.6 ± 0.1	23.7 ± 2.4	40.6 ± 6.9	9.0 ± 2.6	13.6 ± 1.2	1.7 ± 0.5
<b>Midekamicin</b>	0.6 ± 0.1	14.8 ± 6.3	32.2 ± 9.9	4.4 ± 1.5	6.8 ± 2.0	1.5 ± 0.6
<b>Spiramicin</b>	1.4 ± 1.0	2.2 ± 0.2	2.9 ± 0.6	1.9 ± 0.8	2.8 ± 0.8	1.6 ± 0.5
<b>Takrolimus</b>	4.3 ± 1.2	34.3 ± 6.5	9.1 ± 3.6	18.2 ± 2.7	24.2 ± 1.6	1.3 ± 0.1
<b>Rapamicin</b>	3.8 ± 3.3	23.0 ± 3.8	10.4 ± 4.4	6.7 ± 1.8	10.3 ± 1.2	1.3 ± 0.2
<b>Imunomicin</b>	1.8 ± 0.6	40.1 ± 6.9	27.7 ± 20.3	22.4 ± 4.6	29.0 ± 1.9	1.4 ± 0.2

### 4.2.3 Permeabilnost makrolida na stanicama MDCK-WT

Kao što je vidljivo iz **Tablice 14** s rezultatima na divljem tipu stanica MDCK, eritronolidi, osim klaritromicina, pokazali su nisku permeabilnost u apikalno-bazolateralnom smjeru, dok je dodatak inhibitora utjecao na povećanje permeabilnosti samo za klaritromicin i roksitromicin. Omjer MDCK-WT efluksa s inhibiranim P-glikoproteinom značajno se smanjio nego li bez inhibicije, iz čega se može zaključiti da su testirani eritronolidi supstrati endogenog psećeg P-glikoproteina.

Ketolidi i leukomicini, osim solitromicina i josamicina, bili su nisko permeabilni uz aktivan P-glikoprotein, no njegovom inhibicijom permeabilnost se povećala. Pri tom, iznimka su bili telitromicin i spiramicin, koji su i uz inhibiciju P-glikoproteina ostali nisko permeabilni. Uspoređujući omjere efluksa pri aktivnom i inhibiranom P-glikoproteinu, može se zaključiti da su ovi spojevi supstrati endogenog P-glikoproteina.

Nadalje, imunosupresivi su pokazali podjednako visoku permeabilnost bez i s inhibicijom P-glikoproteina. Štoviše, omjer efluksa nije se promijenio kad je P-glikoprotein bio inhibiran što ukazuje na to da testirani imunosupresivi nisu supstrati endogenog P-glikoproteina.

**Tablica 14.** Koeficijenti permeabilnosti i omjeri efluksa makrolida u MDCK-WT staničnom sustavu, bez i s inhibicijom P-glikoproteina elakridarom.

P-glikoprotein	aktivan			inhibiran		
	P <sub>app</sub> [10 <sup>-6</sup> cm/s]		ER	P <sub>app</sub> [10 <sup>-6</sup> cm/s]		ER
	apikalno-bazolateralni	bazolateralno-apikalni		apikalno-bazolateralni	bazolateralno-apikalni	
<b>Azitromicin</b>	0.4 ± 0.1	3.3 ± 0.7	8.6 ± 1.7	0.5 ± 0.1	0.7 ± 0.2	1.5 ± 0.4
<b>Klaritromicin</b>	2.7 ± 1.0	17.8 ± 3.3	7.5 ± 2.9	5.6 ± 0.7	5.7 ± 0.9	1.0 ± 0.1
<b>Eritromicin</b>	0.9 ± 0.2	5.2 ± 0.7	6.0 ± 0.9	1.2 ± 0.2	1.8 ± 1.0	1.4 ± 0.7
<b>Roksitromicin</b>	0.8 ± 0.1	10.4 ± 0.9	13.0 ± 1.6	2.0 ± 0.5	2.4 ± 0.9	1.2 ± 0.2
<b>Telitromicin</b>	0.9 ± 0.4	6.0 ± 1.2	7.1 ± 2.3	1.3 ± 0.4	1.5 ± 0.6	1.3 ± 0.3
<b>Solitromicin</b>	2.2 ± 0.4	5.6 ± 1.2	2.7 ± 0.9	5.0 ± 4.0	3.9 ± 0.9	1.0 ± 0.3
<b>Josamicin</b>	2.9 ± 0.9	19.6 ± 2.7	7.1 ± 1.5	7.0 ± 1.7	8.5 ± 1.7	1.3 ± 0.2
<b>Midekamicin</b>	1.7 ± 0.7	15.5 ± 3.9	11.0 ± 5.0	4.0 ± 1.0	4.2 ± 0.9	1.1 ± 0.1
<b>Spiramicin</b>	1.4 ± 0.7	3.1 ± 0.4	2.6 ± 0.9	1.2 ± 0.3	1.1 ± 0.2	0.8 ± 0.5
<b>Takrolimus</b>	15.1 ± 4.1	19.5 ± 5.9	1.4 ± 0.4	16.2 ± 2.2	22.4 ± 5.6	1.4 ± 0.3
<b>Rapamicin</b>	7.7 ± 4.3	10.8 ± 2.8	1.9 ± 1.2	10.6 ± 1.8	10.5 ± 3.8	1.5 ± 0
<b>Imunomicin</b>	15.7 ± 4.0	22.8 ± 5.5	1.5 ± 0.3	20.3 ± 2.8	23.2 ± 6.0	1.1 ± 0.2

#### 4.2.4 Permeabilnost makrolida na klonu 79

U **Tablici 15** prikazani su rezultati pokusa dvosmjernog transporta na izoliranom klonu MDCK 79. Eritronolidi su pokazali nisku permeabilnost u apikalno-bazolateralnom smjeru, dok je dodatak inhibitora utjecao na povećanje permeabilnosti samo za klaritromicin. Pri tom, omjer efluksa s inhibiranim P-glikoproteinom znatno se smanjio u usporedbi s omjerom efluksa bez inhibicije, iz čega se može zaključiti da je za testirane eritronolide vidljiv utjecaj endogenog P-glikoproteina.

Svi ketolidi i leukomicini bili su umjereno permeabilni kod aktivnog P-glikoproteina, a njegovom inhibicijom permeabilnost se uglavnom nije znatno povećala. Uspoređujući omjere efluksa pri aktivnom i inhibiranom P-glikoproteinu, za ketolide utjecaj transportera nije bio vidljiv, dok se za leukomicine može zaključiti da su supstrati endogenog P-glikoproteina.

Nadalje, imunosupresivi su pokazali podjednako visoku permeabilnost bez i s inhibicijom P-glikoproteina. Omjer efluksa bio je manji od 2 i nije se promijenio kad je P-glikoprotein bio inhibiran iz čega nije vidljiv utjecaj transportera na transprot testiranih imunosupresiva.

**Tablica 15.** Koeficijenti permeabilnosti i omjeri efluksa makrolida u MDCK 79 staničnom sustavu, bez i s inhibicijom P-glikoproteina elakridarom.

P-glikoprotein	aktivan			inhibiran		
	$P_{app}$ [ $10^{-6}$ cm/s]		ER	$P_{app}$ [ $10^{-6}$ cm/s]		ER
	apikalno-bazolateralni	bazolateralno-apikalni		apikalno-bazolateralni	bazolateralno-apikalni	
<b>Azitromicin</b>	1.1 ± 0.8	3.4 ± 0.1	4.2 ± 2.8	0.9 ± 0.2	1.1 ± 0.5	1.2 ± 0.3
<b>Klaritromicin</b>	1.8 ± 0.4	6.9 ± 1.1	4.0 ± 0.8	2.8 ± 1.1	4.7 ± 0.5	1.8 ± 0.9
<b>Eritromicin</b>	0.6 ± 0.2	3.7 ± 1.1	5.6 ± 0.8	0.9 ± 0.2	1.0 ± 0.2	1.1 ± 0.3
<b>Roksitromicin</b>	0.9 ± 0.2	4.2 ± 1.3	4.5 ± 1.2	1.3 ± 0.5	1.9 ± 0.3	1.6 ± 0.6
<b>Telitromicin</b>	3.9 ± 3.3	4.9 ± 0.3	1.8 ± 0.8	3.3 ± 1.0	4.0 ± 0.6	1.3 ± 0.2
<b>Solitromicin</b>	3.4 ± 1.0	5.4 ± 1.2	1.7 ± 0.4	4.8 ± 0.7	5.4 ± 0.5	1.2 ± 0.2
<b>Josamicin</b>	4.6 ± 0.7	10.2 ± 3.9	2.2 ± 0.8	7.2 ± 1.2	10.1 ± 1.2	1.4 ± 0.2
<b>Midekamicin</b>	2.7 ± 0.5	9.5 ± 2.2	3.6 ± 1.0	5.3 ± 0.6	6.5 ± 1.2	1.3 ± 0.4
<b>Spiramicin</b>	2.3 ± 1.4	4.9 ± 2.0	2.4 ± 0.7	2.7 ± 1.4	2.8 ± 1.9	1.0 ± 0.3
<b>Takrolimus</b>	10.4 ± 1.7	11.1 ± 2.2	1.2 ± 0.1	11.7 ± 2.4	10.4 ± 1.5	0.9 ± 0.3
<b>Rapamicin</b>	6.0 ± 1.8	6.6 ± 0.8	1.2 ± 0.3	5.9 ± 3.9	6.0 ± 1.0	2.5
<b>Imunomicin</b>	16.1 ± 4.2	15.9 ± 1.2	1.1 ± 0.3	10.4 ± 2.5	14.0 ± 4.2	1.7 ± 0.4

#### 4.2.5 Permeabilnost makrolida na stanicama MDCK-KO

Rezultati pokusa dvosmjernog transporta na stanicama MDCK-KO bez aktivnog P-glikoproteina prikazani su u **Tablici 16**. Eritronolidi su, osim klaritromicina, pokazali nisku permeabilnost u apikalno-bazolateralnom smjeru bez efluks aktivnosti.

Ketolidi i leukomicini bili su umjereno permeabilni, s iznimkom spiramicina koji je bio nisko permeabilan, dok je omjer efluksa bio manji ili jednak 2.

Imunosupresivi su pokazali dobru permeabilnost bez efluksa.

**Tablica 16.** Koeficijenti permeabilnosti i omjeri efluksa makrolida u MDCK-KO staničnom sustavu, bez i s inhibicijom P-glikoproteina elakridarom.

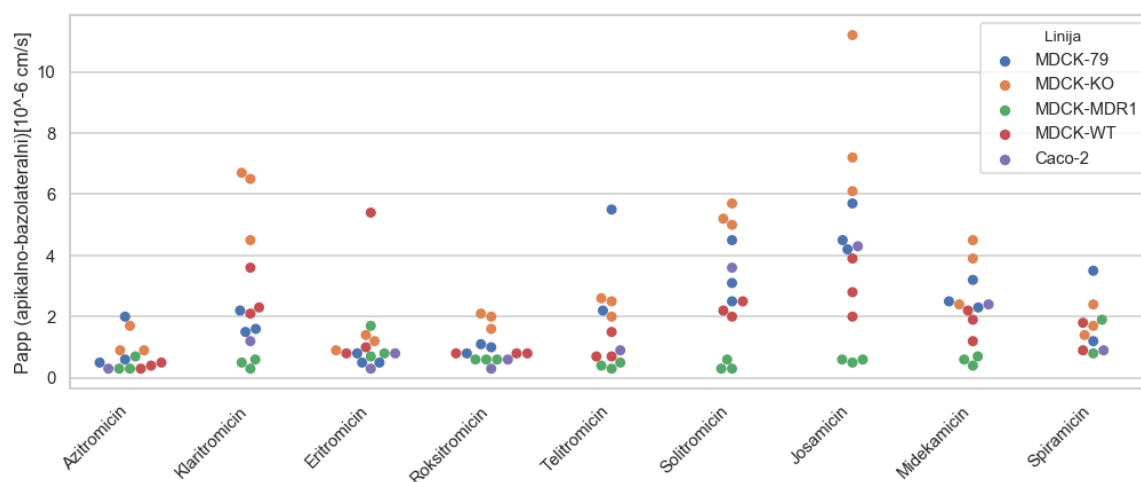
<b>Spoj</b>	<b>Papp (apikalno-bazolateralni) [<math>10^{-6}</math>cm/s]</b>	<b>Papp (bazolateralno-apikalni) [<math>10^{-6}</math>cm/s]</b>	<b>ER</b>
<b>Azitromicin</b>	1.2 ± 0.4	1.4 ± 0.3	1.3 ± 0.3
<b>Klaritromicin</b>	5.9 ± 1.1	7.0 ± 1.3	1.2 ± 0.2
<b>Eritromicin</b>	1.2 ± 0.3	1.9 ± 0.4	1.7 ± 0.5
<b>Roksitromicin</b>	1.9 ± 0.3	2.8 ± 1.0	1.5 ± 0.4
<b>Telitromicin</b>	2.4 ± 0.4	4.1 ± 1.0	1.8 ± 0.3
<b>Solitromicin</b>	5.3 ± 0.5	8.1 ± 1.6	1.5 ± 0.2
<b>Josamicin</b>	8.2 ± 2.4	12.6 ± 3.6	1.6 ± 0.1
<b>Midekamicin</b>	3.6 ± 1.1	6.9 ± 2.7	2.0 ± 0.5
<b>Spiramicin</b>	1.8 ± 0.5	1.8 ± 0.4	1.0 ± 0.4
<b>Takrolimus</b>	20.1 ± 2.9	25.4 ± 3.5	1.3 ± 0.3
<b>Rapamicin</b>	8.3 ± 3.5	11.0 ± 3.6	1.7 ± 0.4
<b>Imunomicin</b>	23.4 ± 3.7	26.2 ± 3.1	1.1 ± 0.2



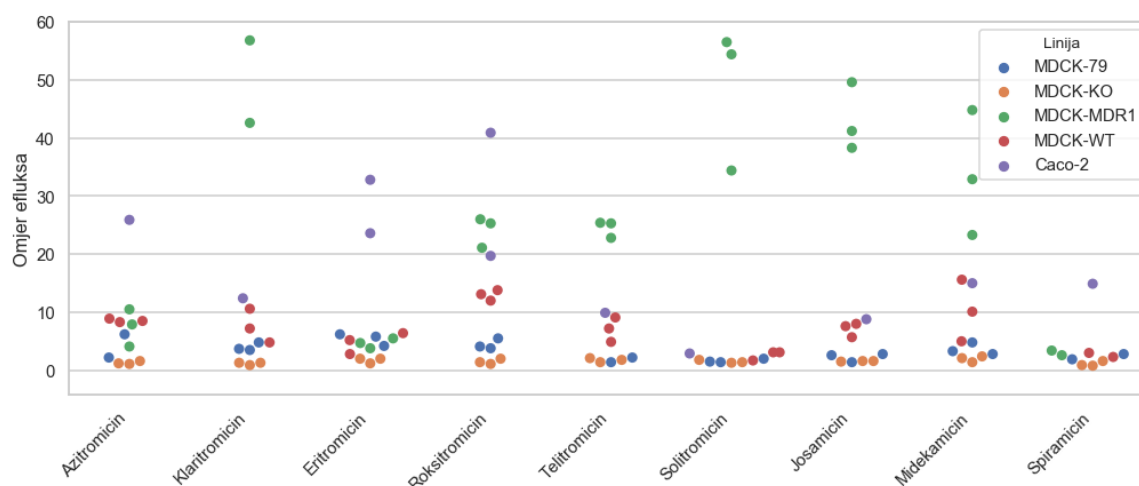
#### 4.2.6 Analiza permeabilnosti makrolida

U svrhu daljnje analize permeabilnosti makrolida napravljena je usporedba rezultata permeabilnosti u apikalno-bazolateralnom smjeru i omjera efluksa u različitim staničnim linijama. Na **Slici 18** prikazana je permeabilnost u apikalno-bazolateralnom smjeru za devet makrolidnih antibiotika na pet različitim staničnim linija. Za nisko permeabilne makrolide ( $P_{app} < 2 \times 10^{-6} \text{ cm/s}$ ) azitromicin, eritromicin, roksitromicin, telitromicin i spiramicin nema znatnih razlika u koeficijentu permeabilnosti između različitih staničnih modela. Za klaritromicin, solitromicin, josamicin i midekamicin koeficijenti permeabilnosti se razlikuju između različitih stanica od niske permeabilnosti u MDCK-MDR1 do umjereno visoke permeabilnosti u MDCK-KO. Pri tom, niti jedan spoj nije bio visoko permeabilan ( $P_{app} > 10 \times 10^{-6} \text{ cm/s}$ ).

Nadalje, iz prikaza omjera efluksa makrolidnih antibiotika u različitim staničnim modelima na **Slici 19**, vidljivo je da su vrijednosti efluksa različito distribuirane po staničnim vrstama i spojevima. Zanimljivo je da omjer efluksa u stanicama MDCK-MDR1 s prekomjerno izraženim P-glikoproteinom nije u svim spojevima najveći. Naime, za azitromicin, eritromicin, spiramicin te djelomično za roksitromicin, najveći omjer efluksa bio je u stanicama Caco-2. To je moguće objasniti utjecajem drugih transportera koji su prisutni u humanoj intestinalnoj Caco-2 staničnoj liniji, dok ih nema u MDCK.

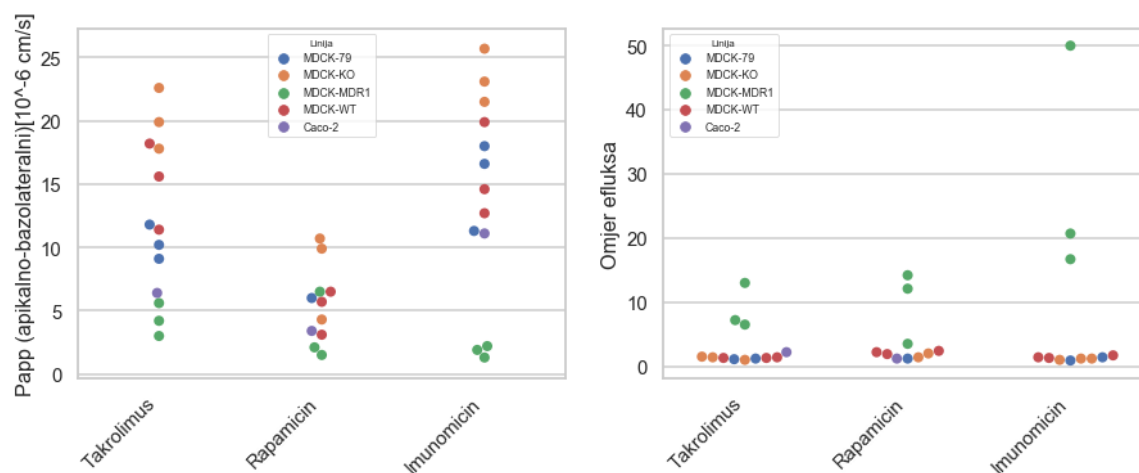


**Slika 18.** Koeficijent permeabilnosti makrolidnih antibiotika na različitim staničnim linijama bez inhibicije P-glikoproteina. Slika prikazuje srednju vrijednost jednog eksperimenta. Za MDCK-79, MDCK-KO, MDCK-MDR1 i MDCK-WR broj eksperimentata je bio tri, dok je za Caco-2 jedan eksperiment.

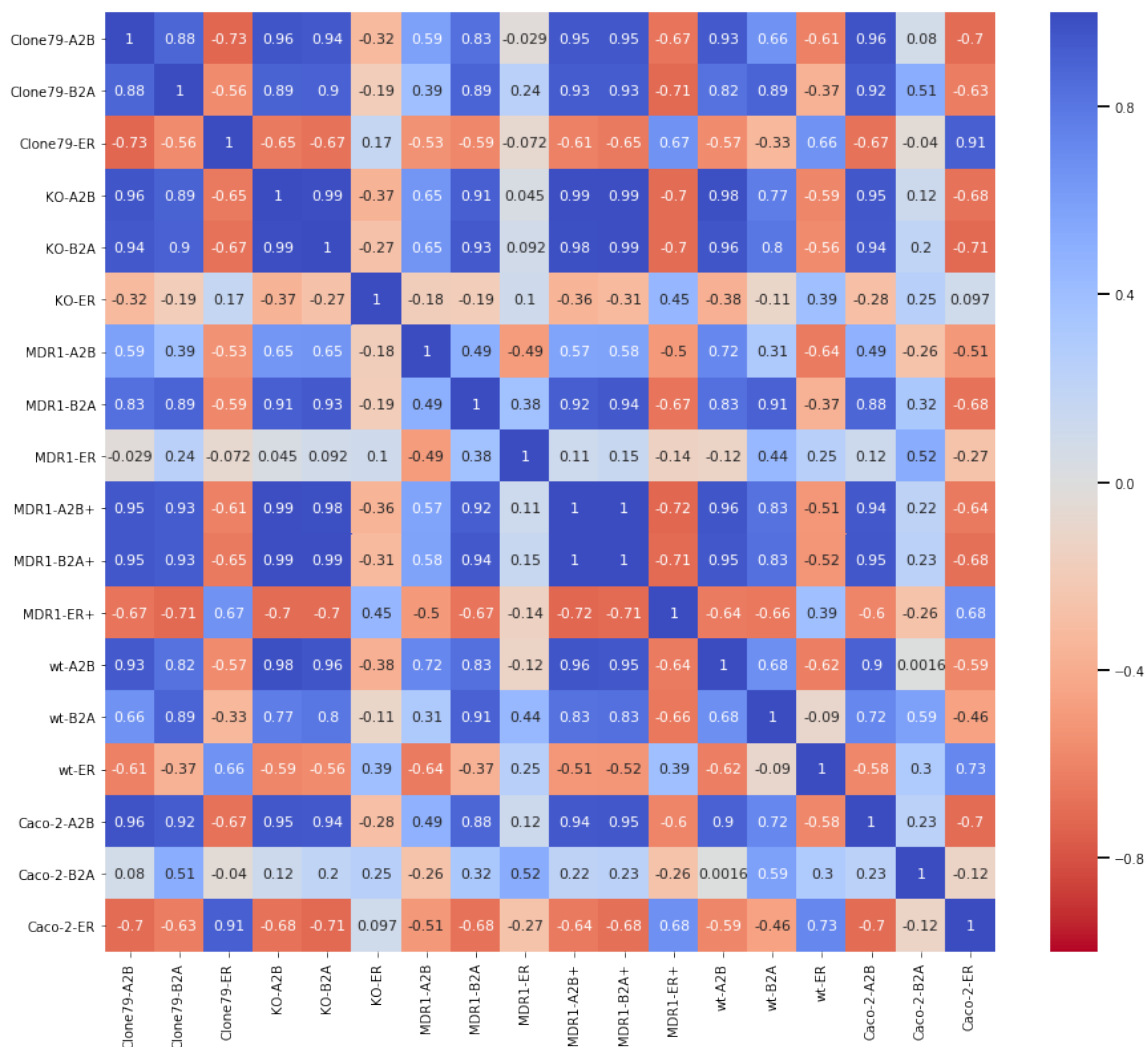


**Slika 19.** Omjer efluksa makrolidnih antibiotika na različitim staničnim linijama bez inhibicije P-glikoproteina. Slika prikazuje srednju vrijednost jednog eksperimenta. Za MDCK-79, MDCK-KO, MDCK-MDR1 i MDCK-WR broj eksperimenata je bio tri, dok je za Caco-2 jedan eksperiment.

Na **Slici 20** prikazana je usporedba rezultata koeficijenta permeabilnosti i omjera efluksa za makrolidne imunosupresive u različitim staničnim linijama iz čega je vidljivo da je permeabilnost najniža u MDCK-MDR1, dok je u drugim linijama različito distribuirana u porastu. S druge strane, efluks imunosupresiva je izostao u svim testiranim staničnim linijama izuzev MDCK-MDR1. Štoviše, ni Caco-2 model nije pokazao značajan efluks makrolidnih imunosupresiva.



**Slika 20.** Koeficijent permeabilnosti i omjer efluksa makrolidnih imunosupresiva na različitim staničnim linijama bez inhibicije P-glikoproteina. Slika prikazuje srednju vrijednost jednog eksperimenta. Za MDCK-79, MDCK-KO, MDCK-MDR1 i MDCK-WR broj eksperimentata je bio tri, dok je za Caco-2 jedan eksperiment.



Slika 21. Korelacija parametara permeabilnosti prikazana toplinskom mapom.

Kako bi se proučio odnos izračunatih parametara permeabilnosti izrađena je toplinska mapa korelacije prikazana na Slici 21. Na toplinskoj mapi korišten je intenzitet boje kako bi se izrazila vrijednost korelacija na skali od -1 (crveno) do 1 (plavo). Permeabilnost u apikalno-bazolateralnom smjeru u klonu 79 korelira s permeabilnosti u apikalno-bazolateralnom smjeru u svim ostalim testiranim staničnim linijama osim MDCK-MDR1 s aktivnim P-glikoproteinom (oznaka „MDR1-A2B“). U slučaju inhibiranog P-glikoproteina u MDCK-MDR1 (oznaka „MDR1-A2B+“) korelacija permeabilnosti s ostalim staničnim linijama je dobra. S druge strane, omjeri efluksa u većini slučajeva negativno koreliraju s koeficijentima permeabilnosti. Podjednak transport u oba smjera u „knock-out“ stanicama te stanicama MDCK-MDR1 s inhibiranim P-glikoproteinom vidljiv je kao potpuna korelacija koeficijenata permeabilnosti u apikalno-bazolateralnom i bazolateralno-apikalnom smjeru: usporedba „KO-A2B“ i „KO-B2A“, te

usporedba „MDR1-A2B+“ i „MDR1-B2A+“. Zanimljiva je i dobra korelacija permeabilnosti, kao i omjera efluksa između klona 79 i stanica Caco-2.

#### 4.2.7 Identifikacija supstrata P-glikoproteina

Kako bi se uklonio mogući utjecaj psećeg P-glikoproteina na omjer efluksa u stanicama MDCK-MDR1, dobiveni efluks u stanicama s pretjerano izraženim humanim P-glikoproteinom normaliziran je efluksom dobivenim u divljega tipa stanicama, što se naziva razlika omjera permeabilnosti (engl. *net flux ratio*, *NER*). U **Tablici 17** uspoređeni su rezultirajući omjeri efluksa nakon normalizacije s divljim tipom i s klonom 79. Također, usporedbom omjera efluksa bez i uz prisustvo inhibitora P-glikoproteina elakridara, na drugačiji način su identificirani supstrati P-glikoproteina.

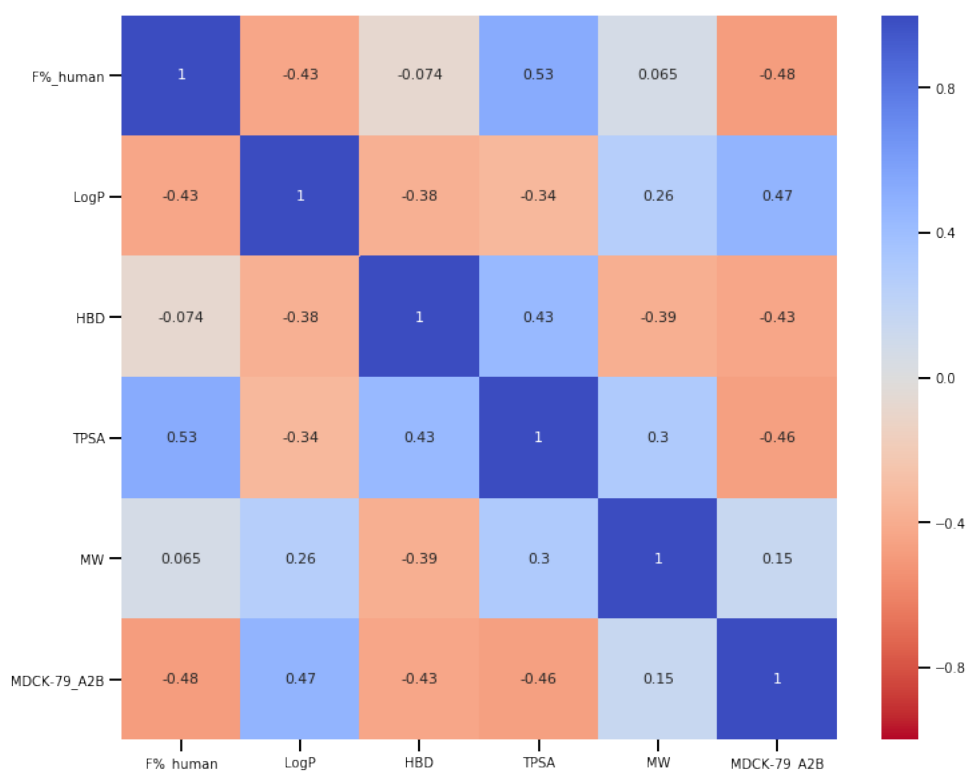
Svi makrolidi su se pokazali *in vitro* supstratima P-glikoproteina osim spiramicina. Azitromicin, eritromicin i roksitromicin su lažno negativno kategorizirani nakon normalizacije s divljim tipom, dok su normalizacijom s klonom 79 azitromicin i eritromicin ostali lažno negativni, a roksitromicin je određen kao supstrat P-glikoproteina.

**Tablica 17.** Usporedba različitih pristupa u utvrđivanju P-glikoprotein supstrata.

Spoj	MDCK MDR1 / WT		MDCK MDR1 / 79		MDCK-MDR1
	NER		NER		+/- elakridar
<b>Azitromicin</b>	0.8	nije P-gp supstrat	1.7	nije P-gp supstrat	P-gp supstrat
<b>Klaritromicin</b>	7.5	P-gp supstrat	14.2	P-gp supstrat	P-gp supstrat
<b>Eritromicin</b>	1.0	nije P-gp supstrat	0.8	nije P-gp supstrat	graničan
<b>Roksitromicin</b>	1.9	nije P-gp supstrat	5.4	P-gp supstrat	P-gp supstrat
<b>Telitromicin</b>	3.5	P-gp supstrat	13.9	P-gp supstrat	P-gp supstrat
<b>Solitromicin</b>	18.0	P-gp supstrat	28.9	P-gp supstrat	P-gp supstrat
<b>Josamicin</b>	6.4	P-gp supstrat	20.5	P-gp supstrat	P-gp supstrat
<b>Midekamicin</b>	3.1	P-gp supstrat	8.8	P-gp supstrat	P-gp supstrat
<b>Spiramicin</b>	1.1	nije P-gp supstrat	1.2	nije P-gp supstrat	nije P-gp supstrat
<b>Takrolimus</b>	6.9	P-gp supstrat	7.9	P-gp supstrat	P-gp supstrat
<b>Rapamicin</b>	4.9	P-gp supstrat	8.6	P-gp supstrat	P-gp supstrat
<b>Imunomicin</b>	18.0	P-gp supstrat	24.3	P-gp supstrat	P-gp supstrat

#### 4.2.8 Permeabilnost i bioraspoloživost makrolida

Dobiveni rezultati permeabilnosti makrolida analizirani su uz literaturno dostupne podatke *in vivo* bioraspoloživosti u čovjeku, te izračunate fizikalno-kemijske i strukturne parametre kao što su logP, HBD, TPSA i molekulska masa (vidi **Tablicu 18**). Za permeabilnost je korištena vrijednost  $P_{app}$  u apikalno-bazolateralnom smjeru u klonu 79, budući da je dobro korelirala s rezultatima permeabilnosti u ostalim staničnim linijama (**Slika 21**). Iz toplinske mape korelacija na **Slici 22** vidljivo je odsustvo direktne korelacije za većinu parametara na ovom setu makrolida, što ukazuje na potrebu daljnje multiparametrijske analize.



**Slika 22.** Korelacija bioraspoloživosti u čovjeku (F%\_human), izračunatog logP, molekulskih deskriptora HBD, TPSA i MW, te permeabilnosti u klonu 79 (MDCK-79\_A2B) prikazana toplinskom mapom.

#### 4.3 Utjecaj na permeabilnost i bioraspoloživost makrolida

Budući da analiza permeabilnosti makrolida u različitim staničnim sustavima nije pokazala direktnu korelaciju s bioraspoloživošću, provedena je multivarijantna analiza prikupljenih podataka. Kako bi se kompleksni procesi permeabilnosti i bioraspoloživosti

što bolje opisali i istražili različiti utjecaji, dodatno je ispitana metabolička stabilnost u mikrosomima, nakupljanje i zadržavanje makrolida u stanicama, te permeabilnost u MDCK-KO sustavu tijekom 24 sata. Osim toga, izračunati su strukturni i fizikalno-kemijski deskriptori pKa, logP, logD, topološke polarne površine (TPSA), broj donora vodikovih veza (HBD), broj pozitivnih naboja i broj šećernih skupina (**Tablica 18**).

**Tablica 18.** Strukturni i fizikalno-kemijski deskriptori izračunati ACD/Percepta programom.

Spoj	LogP	LogD	pKa	TPSA	HBD	Broj pozitivnih naboja	Broj šećernih skupina
Azitromicin	3.27	1.36	8.59	180.08	5	2	2
Klaritromicin	3.11	2.37	8.16	182.91	4	1	2
Roksitromicin	3.48	2.8	8.16	216.89	5	1	2
Telitromicin	4.16	3.62	8.13	171.85	1	1	1
Solitromicin	3.78	2.9	8.13	197.87	3	1	1
Josamicin	2.85	2.86	7.4	206.05	3	1	2
Midekamicin	2.66	2.64	7.4	206.05	3	1	2
Spiramicin	1.46	0.45	8.61	195.38	4	2	3
Takrolimus	4.32	4.1	-2.38	178.36	3	0	1
Rapamicin	5.13	4.21	-2.15	195.43	3	0	1
Imunomicin	4.1	3.92	-2.42	178.36	3	0	1

#### 4.3.1 Metabolička stabilnost makrolida u mikrosomima

Metabolička stabilnost makrolida određena je praćenjem smanjenja njihove početne koncentracije od 1  $\mu\text{M}$  u suspenziji humanih jetrenih mikrosoma tijekom 60 minuta. Iz krivulja raspada izračunati su parametri metaboličke stabilnosti koji su prikazani u **Tablici 19**. Iz rezultata je vidljivo da su azitromicin i spiramicin stabilni u humanim jetrenim mikrosomima, te nakon 60 minuta i dalje ostaje više od 90% neizmijenjenog spoja. Klaritromicin i roksitromicin imaju nešto izraženiji metabolizam, te na kraju inkubacije ostaje 67%, odnosno 55% neizmijenjenog spoja. Telitromicin i solitromicin imaju podjednake metaboličke profile visokog klirensa s oko 33% neizmijenjenog spoja nakon sat vremena. Svi ostali spojevi, josamicin, midekamicin, rapamicin, takrolimus i imunomicin potpuno se metaboliziraju tijekom 60 minuta

inkubacije. Midekamicin se k tome, gotovo potpuno raspao u inkubacijskoj smjesi koja je sadržavala mikrosome, ali ne i kofaktore, što ukazuje na moguću nestabilnost u puferu ili metabolizam neovisan o sustavu kofaktora NADPH.

**Tablica 19.** Izmjerene vrijednosti % početne koncentracije makrolida u 60 minuti, te izračunati parametri metaboličke stabilnosti.

Spoj	% početne konc_60 min	t <sub>1/2</sub> [min]	CL <sub>int</sub> [μl/min/mg]	Pred in vivo hep CL [%LBF]	Klasifikacija klirensa	% početne konc_60 min bez NADPH
Azitromicin	111.8	> 60	< 6.6	< 30	nizak	106
Klaritromicin	67.4	108.0	13.0	45	umjeren	96
Roksitromicin	55.1	75.5	18.4	54	umjeren	101
Telitromicin	33.2	36.3	38.3	71	visok	106
Solitromicin	32.0	31.5	44.6	74	visok	95
Josamicin	0.2	3.2	431.8	97	visok	108
Midekamicin	1.2	9.2	151.1	91	visok	7
Spiramicin	111.3	> 60	< 6.6	< 30	nizak	123
Takrolimus	0.0	2.2	620.6	98	visok	93
Rapamicin	0.0	3.1	452.2	97	visok	54
Imunomicin	0.0	2.3	596.4	97	visok	95

#### 4.3.2 Nakupljanje i zadržavanje makrolida u stanicama

U **Tablici 20** prikazani su rezultati nakupljanja makrolida iz 10 μM otopine u stanicama NCI-H292 tijekom tri sata. Također, prikazani su rezultati zadržavanja u navedenim stanicama nakon daljnja tri sata. Po nakupljanju se ističu azitromicin i solitromicin, dok svi ostali imaju značajno niže nakupljanje u stanicama.

Azitromicin se nadalje ističe, zajedno sa spiramicinom, po zadržavanju u stanicama. Tako je nakon tri sata u stanicama NCI-H292 ostalo 75% nakupljenog azitromicina, odnosno 62% od nakupljenog spiramicina. Josamicina i midekamicina ostalo je zadržano oko 30% od nakupljene količine, dok su ostali makrolidi bili su prisutni ispod 15% u stanicama na kraju pokusa.

**Tablica 20.** Nakupljanje i zadržavanje makrolida u stanicama NCI-H292.

<b>Spoj</b>	<b>Nakupljeno</b> [% azitromicina]	<b>Zadržano</b> [% nakupljenog]
Azitromicin	100	75
Klaritromicin	35	1.2
Roksitromicin	25	0
Telitromicin	40	9
Solitromicin	119	14
Josamicin	31	31
Midekamicin	17	29
Spiramicin	12	62
Takrolimus	21	13
Rapamicin	16	12
Imunomicin	17	9

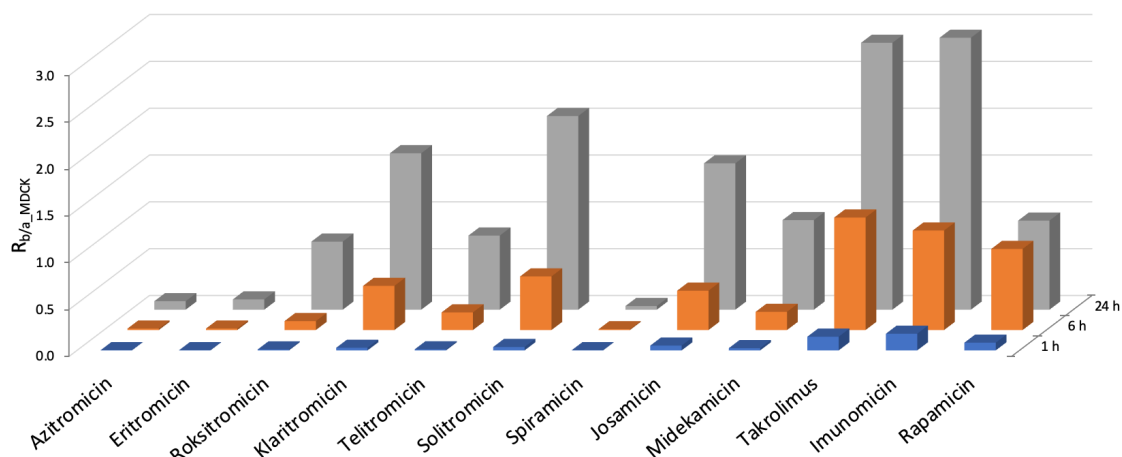
### 4.3.3 Utjecaj vremena inkubacije na permeabilnost makrolida

U svrhu daljnjeg razumijevanja permeabilnosti makrolida istražen je utjecaj komponente vremena. Naime, makrolidi s molekulskim masama između 700 i 1000 imaju sporiju brzinu difuzije u odnosu na manje molekule, kao što je opisano u literaturnom pregledu. Stoga su makrolidi inkubirani 1, 6 i 24 sata u MDCK-KO modelu permeabilnosti. „Knock-out“ stanice odabrane su zbog potpunog odsustva aktivnog transporta putem P-glikoproteina. Rezultati su izraženi kao omjer raspodjele koncentracije spoja između bazolateralnog i apikalnog odjeljka ( $R_{b/a\_MDCK}$ ).

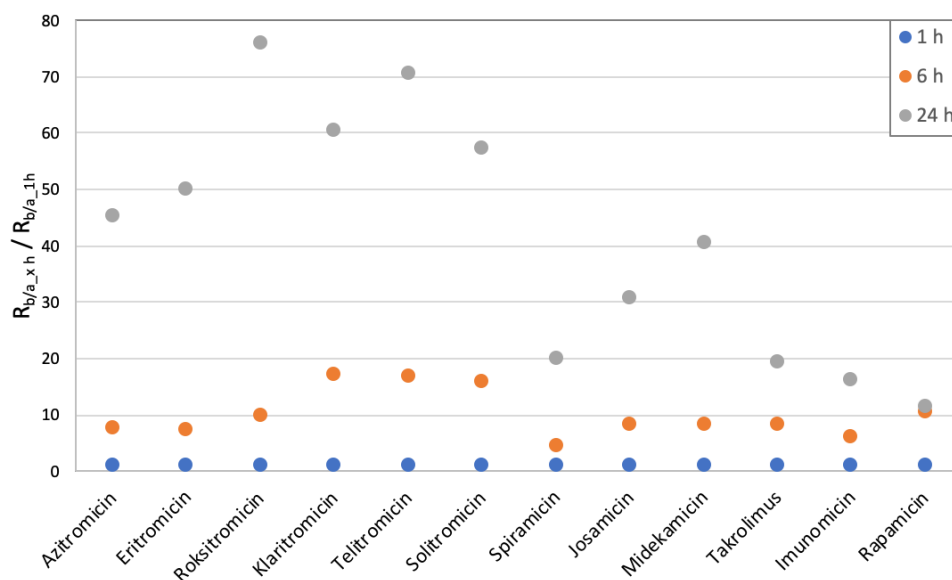
Iz rezultata na **Slici 23** vidljivo je da duža inkubacija rezultira većim prolaskom svih makrolida kroz jednostanični sloj iz apikalnog u bazolateralni odjeljak. Također postoji ovisnost o veličini spoja. Ako se detaljnije pogleda veličina promjene  $R_{b/a\_MDCK}$  kroz vrijeme kako je prikazano na **Slici 24**, primjećuje se da prolazak kroz staničnu membranu nije linearan. Odnosno ako se  $R_{b/a\_MDCK}$  nakon 1 sata i nakon 24 sata usporedi s  $P_{app}$  kao što je prikazano na **Slici 25**, vidljivo je da je nakon 24 sata došlo do povećanja  $R_{b/a\_MDCK}$  za spojeve koji imaju jednu ionizabilnu skupinu i lipofilnost između 2.5 i 3.5. Osim toga, spojevi koji imaju dvije ionizabilne skupine imaju i značajno veće zadržavanje u stanicama i zbog toga smanjen prolaz kroz membranu. Dodatno, visoko lipofilni spojevi koji nisu



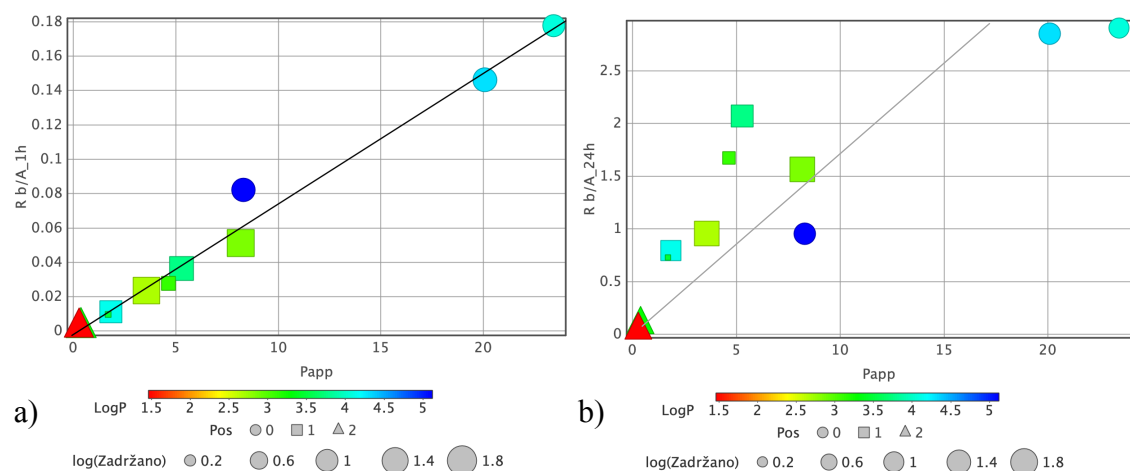
imali ionizabilnih skupina nisu pokazali značajnu razliku između 1 i 24 sata (rapamicin, telitromicin, imunomicin).



**Slika 23.** Prikaz prolaska makrolida kroz stanični monosloj opisan  $R_{b/a\_MDCK}$ , u različitim vremenskim točkama 1, 6 i 24 h.



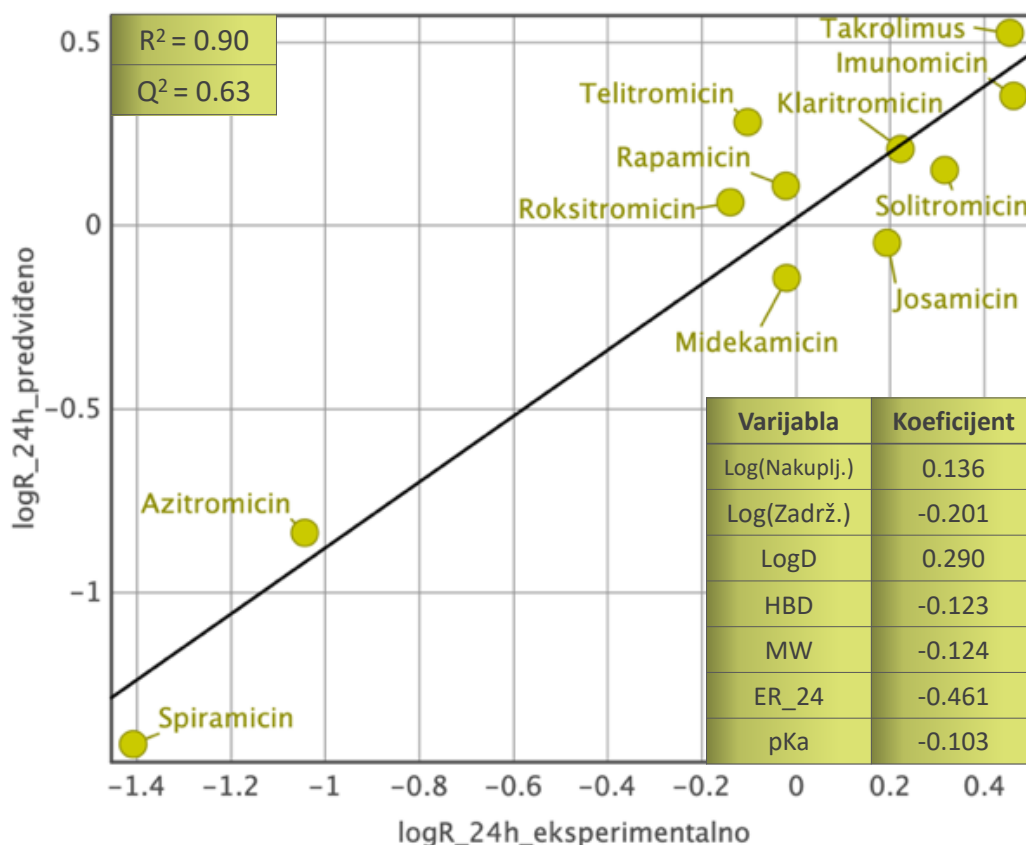
**Slika 24.** Prikaz veličine promjene prolaska makrolida kroz stanični monosloj u odnosu na 1 sat inkubacije.



**Slika 25.** Prikaz odnosa permeabilnosti  $P_{app}$  i  $R_{b/a\_MDCK}$  nakon (a) 1 sat i nakon (b) 24 sata.

Budući da je korelacijska analiza podataka ukazala na multivarijantni problem, da bi se dodatno istražili glavni čimbenici koji utječu na  $R_{b/a\_MDCK}$  makrolida, provedena je analiza parcijalne linearne regresije (PLS) za izgradnju statističkog modela. U izgradnji modela korišteni su izračunati deskriptori iz **Tablice 18**, te eksperimentalne vrijednosti staničnog nakupljanja, staničnog zadržavanja,  $R_{b/a_{24}}$  i omjera efluksa kao neovisne varijable. PLS model za predviđanje  $R_{b/a_{24}}$  prikazan je na **Slici 26**. Dobiven je model s parametrima  $R^2 = 0.90$  i  $Q^2 = 0.63$ , što ukazuje na statistički značajnu korelaciju i dobru prediktivnu moć.

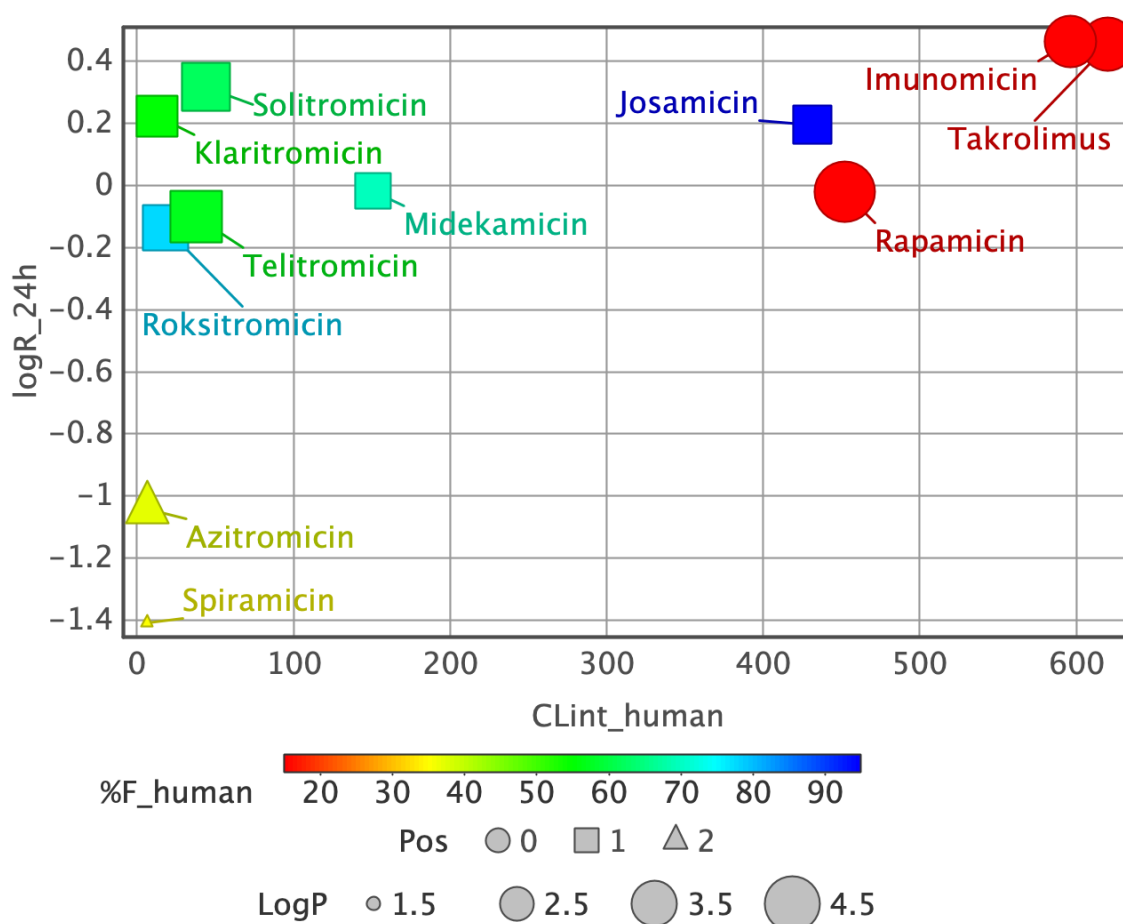
Korištene eksperimentalne vrijednosti, izračunati parametri i predviđene vrijednosti  $R_{b/a_{24}}$  navedene su u tablici u **Prilogu 1**. Razvijeni model opisuje raspodjelu makrolida kroz stanični monosloj nakon 24 sata pomoću staničnog nakupljanja, zadržavanja u stanicama, lipofilnošću, brojem donora vodikovih veza (HBD), omjera efluksa, pKa i molekulske mase. Pri tom stanično nakupljanje i lipofilnost djeluju pozitivno, odnosno povećavaju raspodjelu spoja, dok zadržavanje u stanicama, HBD, omjer efluksa, pKa i molekulska masa smanjuju raspodjelu, što je u skladu s dosadašnjim istraživanjima te mehanistički potvrđuje razvijeni model.



Slika 26. PLS analiza permeabilnosti makrolida.

#### 4.3.4 Modeliranje predviđanja bioraspoloživosti makrolida

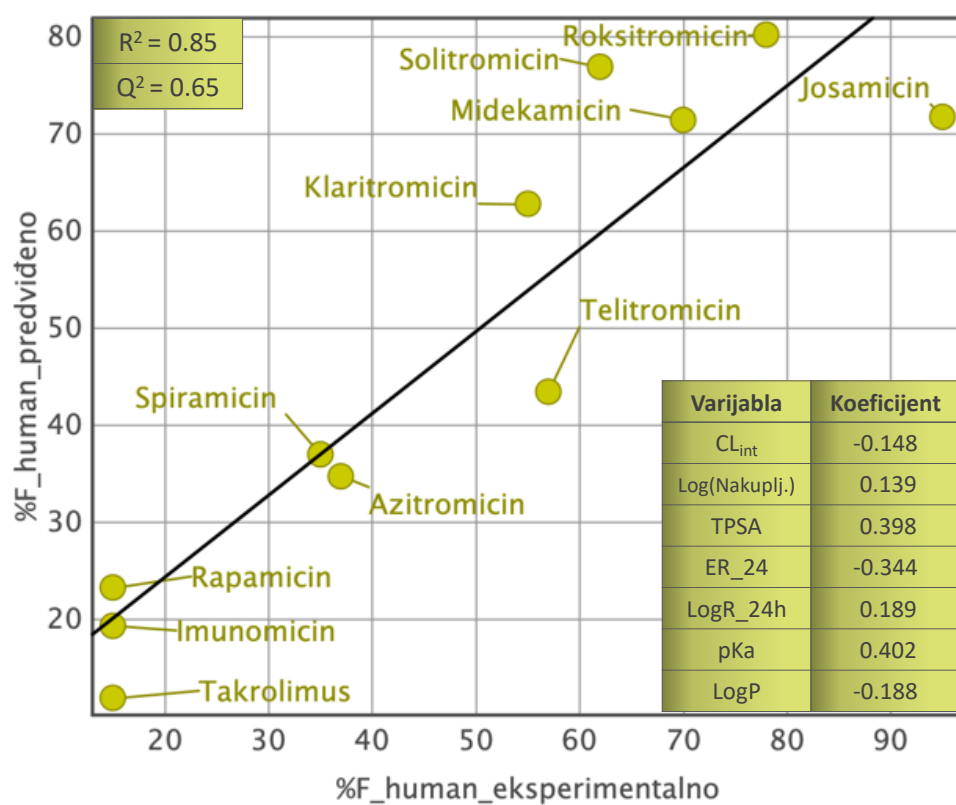
S obzirom da je bioraspoloživost složen proces i da u slučaju makrolidne klase spojeva direktno ne korelira s *in vitro* permeabilnosti bez obzira na stanični model, provedeno je multivarijantno statističko modeliranje. Vizualnom analizom prikupljenih podataka, prikazanih na Slici 27, potvrđena je ovisnost bioraspoloživosti o klirensu i o omjeru raspodjele spoja između apikalnog i bazolateralnog odjeljka nakon 24 sata. Također broj ionizabilnih skupina dobro prati ovu raspodjelu i grupiranje spojeva prema bioraspoloživosti, dok za lipofilnost utjecaj nije direktno jasan.



**Slika 27.** Prikaz različitih parametara koji mogu utjecati na bioraspoloživosti makrolida. Na apcisi se nalazi in vitro intrinzički klirens, a na ordinati logaritama omjera raspodjele između dva odjeljka.

U svrhu izgradnje modela za predikciju bioraspoloživosti makrolida, provedena je analiza parcijalne linearne regresije (PLS) korištenjem strukturalnih deskriptora iz **Tablice 18** kao neovisnih varijabli. Literaturne vrijednosti oralne bioraspoloživosti u ljudi (**Tablica 4**) korištene su kao zavisna varijabla, dok su kao nezavisne varijable korištene eksperimentalne vrijednosti staničnog nakupljanja, permeabilnosti na 24 sata ( $R_{b/a_{24}}$ , omjer efluksa – ER) i metaboličke stabilnosti u humanim mikrosomima. PLS model bioraspoloživosti prikazan je na **Slici 28**. Dobiven je model s parametrima  $R^2 = 0.85$  i  $Q^2 = 0.65$ , što ukazuje na statistički značajnu korelaciju i dobru moć predviđanja.

Eksperimentalne vrijednosti, izračunati parametri i predviđene vrijednosti bioraspoloživosti navedeni su u tablici **Priloga 2**. PLS model oralne bioraspoloživosti ukazuje na statistički značajan kvantitativni odnos između bioraspoloživosti i staničnog nakupljanja, metaboličkog klirensa,  $R_{b/a_{24}}$ , lipofilnosti, pKa, broja donora vodikovih veza, te polarne površine molekule.



Slika 28. PLS analiza oralne bioraspoloživosti makrolida.

## 5. RASPRAVA

U ovom doktorskom radu istražena je izolacija i karakterizacija klona divljega tipa stanica MDCK s niskom izraženošću endogenog gena *mdr1* koji kodira pseći P-glikoprotein. Osim toga, sustavno je proučena *in vitro* permeabilnost makrolida u različitim staničnim transportnim staničnim modelima, te je napravljena multivarijantna statistička analiza permeabilnosti i bioraspoloživosti makrolida.

Karakterizacija farmakokinetičkih svojstava za nove kemijske spojeve u ranom istraživanju lijekova kroz različite ADME metode ključna je za odabir onog novog kemijskog subjekta koji će biti uspješan kandidat u daljnjem razvoju terapijskog pripravka. U tom procesu, upravo *in vitro* metode omogućuju probir velikog broja kemijskih spojeva, dok se kontinuiranom optimizacijom ovih metoda povećava kapacitet, robusnost i prediktivnost. Tako se različite *in vitro* metode određivanja permeabilnosti koriste za procjenu apsorpcije. S obzirom da je apsorpcija kompleksan proces ne postoji idealna *in vitro* metoda. Stanični modeli pokazali su se kao najbolji odabir za testiranje različitih strukturnih spojeva s obzirom na dobar balans između kompleksnosti izvođenja i kvalitete povratne informacije, i u tu svrhu koriste se Caco-2, odnosno stanice MDCK. U ovom radu istražen je i opisan MDCK model permeabilnosti. Unatoč ne-humanom i ne-intestinalnom porijeklu, stanice MDCK često se koriste u staničnim modelima permeabilnosti u istraživanju lijekova kao pouzdan, a jednostavniji model. Razlog tome stoji u činjenici da stanice MDCK ne samo da imaju znatno kraće vrijeme diferencijacije u odnosu na Caco-2, zbog čega je model robusniji i većeg je protoka, nego imaju i zadovoljavajuću prediktivnost apsorpcije. Premda stanice MDCK imaju nisku razinu izraženosti endogenih transportera, pokazano je da endogeni P-glikoprotein može imati utjecaj na mjerenje permeabilnosti zbog čega su poduzeti napor kako bi se MDCK model permeabilnosti poboljšao. S obzirom na heterogenost MDCK linije, jedan od pristupa je izolacija subpopulacije s nisko izraženim endogenim P-glikoproteinom. Tehnike koje se mogu koristiti za izolaciju pojedinačnih stanica uključuju mikrokapilaranu aspiraciju, upotrebu lasera ili mikrofluida, protočnu citometriju te subkloniranje velikim razrjeđivanjem.

S ciljem izolacije subklonova MDCK-WT korišten je postupak velikog razrjeđivanja (engl. *limiting dilution*), metoda u kojoj se stanična suspenzija jako razrijedi, a za izrasle se kolonije smatra da potječu od jedne stanice. Sađenjem MDCK-WT u koncentraciji 0.3 stanice/jažici u deset mikrotitarskih pločica izolirano je ukupno 102

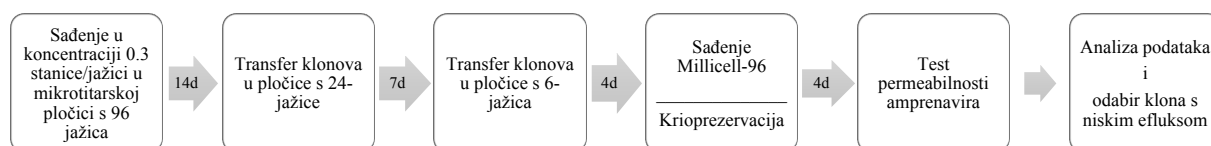
klona. Izolirani klonovi testirani su na efluks amprenavira, s obzirom da transport amprenavira preko monosloja stanica ovisi isključivo o pasivnoj propusnosti i P-glikoproteinu. Nadalje, za sve klonove određena je izraženost P-glikoproteina na nivou glasničke RNA (mRNA) kvantitativnim PCR-om. Ustanovljeno je da je linearna korelacija između efluksa amprenavira i izraženosti P-glikoproteina slaba ( $R^2 = 0.46$ ), zbog čega je napravljena daljnja analiza osjetljivosti i specifičnosti kvantitativnog PCR-a kod odabira klona s niskim efluksom. Iako je površina ispod ROC krivulje (**Slika 12**) karakterizira PCR kao umjereno prediktivan, iz same ROC krivulje vidljivo je da su kod visoke osjetljivosti testa, svi klonovi s niskim efluksom otkriveni, ali uz puno lažno pozitivnih rezultata odnosno nisku specifičnost. Stoga, kako bi se postigla maksimalna specifičnost, granična vrijednost kvantitativnog PCR-a bila bi 0.4, što je otprilike 3-puta niže u usporedbi s MDCK-WT staničnom linijom. Dvije studije koje su koristile protočnu citometriju za izolaciju MDCK klona s niskim efluksom objavile su bitno različite rezultate razine mRNA izraženosti P-glikoproteina određene RT-qPCR-om. Tako su Di i sur. (2) prikazali 200 puta nižu izraženost P-glikoproteina u klonu s niskim efluksom u odnosu na MDCK-WT, dok su Gartzke i Fricker (85) dobili razliku od tri puta što je u skladu s rezultatima dobivenima u ovom radu. Naime klon s najnižim efluksom amprenavira, klon 79, imao je tri puta manju izraženost mRNA P-glikoproteina PCR-om u odnosu na MDCK-WT.

Dodatan uvid u distribuciju efluksa i izraženosti P-glikoproteina u izoliranim klonovima dan je histogramskom prikazom na **Slici 10**. Oba histograma asimetričnog su oblika s nagibom prema nižim vrijednostima efluksa i izraženosti P-glikoproteina, što je u skladu s histogramom u radu Di i sur. (2). U navedenom radu se za identifikaciju efluksa koristio fluorescentni supstrat P-glikoproteina kalcein-AM, te je dobivena distribucija fluorescencije kalceina u stanicama MDCK s nagibom prema višim vrijednostima što ukazuje na nižu efluks aktivnost.

Da bi se proučio mogući utjecaj drugih efluks transportera poput MRP-2 i BCRP, uspoređeni su efluksi specifičnih supstrata na 7 različitih klonova (**Tablica 8**). Ustanovljeno je da najbolje rangiran klon 79, nekoliko dodatnih klonova umjerenog ranga (69, 38, 1, 72, 50) i jedan klon (90) s najnižim rangom nisu imali razlike u efluksu valsartana (MRP-2 supstrat) i prazosina (BCRP supstrat) te da omjer efluksa ukazivao na izostanak aktivnog transporta. S druge strane, topotekan koji je poznat supstrat BCRP ali i MDR1 transportera, reflektirao je efluks amprenavira, odnosno P-glikoproteina. Međutim,

s obzirom da je raspon omjera efluksa topotekana bio manji u odnosu na amprenavir, može ga se smatrati manje osjetljivim markerom aktivnosti P-glikoproteina od amprenavira.

Na temelju ovih rezultata, klon 79, koji je pokazao najmanji omjer efluksa amprenavira i topotekana, kao i tri puta manju izraženost mRNA u odnosu na MDCK-WT, odabran je kao klon MDCK s niskim efluksom za daljnje istraživanje. Što se tiče uspostave optimalnog procesa izolacije prilagođenog rutinskoj primjeni, zaključak je da obzirom na nižu osjetljivost PCR-a, kao i na njegovu složenost izvođenja, ovaj test nije potrebno uključiti u selekciju klona s niskim efluksom. S druge strane, dvosmjerni transportni test amprenavira omogućuje puno brži i lakši probir klonova. Shema cijelog procesa izolacije prikazana je na **Slici 29**.



**Slika 29.** Prijedlog optimalnog procesa izolacije MDCK klona s niskom izraženošću P-glikoproteina.

Za Caco-2 i MDCK-MDR1 stanične linije poznato je kako je izraženost P-glikoproteina promjenjiva obzirom na vrstu stanica i redni broj pasaže. Točnije, ne samo da izraženost P-glikoproteina tijekom vremena opada, nego je i na početku kulture potrebno vrijeme da se izraženost P-glikoproteina uspostavi i stabilizira. Slijedom toga je za odabrani klon 79 potvrđena njegova efluks aktivnost tijekom vremena (**Tablice 9 i 10**). U dva pokusa ustanovljen je stabilan omjer efluksa amprenavira i topotekana u vremenskom okviru od dva mjeseca. Ipak, za pojedine pasaže primjećena je varijacija, te je ustanovljena varijacija omjera efluksa u rasponu od 2.0 do 3.3.

Analizom izraženosti P-glikoproteina na razini proteina, Western blotom membranskih frakcija stanica, ustanovljeno je da se razlika između najboljeg klona 79 i MDCK-WT ne vidi, iako bi se očekivala razlika s obzirom na rezultate dobivene kvantitativnim PCR-om i transportnim pokusom. S druge strane, klon 90 koji ima visok efluks amprenavira i visoku izraženost pokazao je također na proteinskom nivou tu razliku.

Za konačnu karakterizaciju, klon 79 ispitan je dvosmjernim transportom standardnih spojeva usporedno s divljega tipa stanicama MDCK i *cMdr1 knockout* (**Tablica 11**). Da bi se proučio utjecaj P-glikoproteina na permeabilnost u klonu 79,



odabrani su visoko i nisko permeabilni spojevi, spojevi na čiji transport P-glikoprotein nema utjecaj, kao i supstrati P-glikoproteina sa širokim rasponom omjera efluksa u divljega tipa stanicama.

Ustanovljeno je da je permeabilnost u divljega tipa stanicama MDCK za 16 testiranih spojeva očekivana, odnosno u skladu s literaturom, s izuzetkom feksofenadina, prazosina i ranitidina. Pokazano je da je hidrofilan ranitidin u oba smjera nisko permeabilan, što je u skladu sa sličnim studijama (2), dok je rezultirajući omjer efluksa manji od 2, što nadalje ukazuje da u transport nije uključen P-glikoprotein, iako je ranitidin potvrđen supstrat P-glikoproteina (91). Međutim, sličan izostanak efluksa ranitidina na stanicama Caco-2 opisali su Lentz i sur., objašnjavajući uočeni efekt niskom unutarstaničnom koncentracijom ranitidina kao *in vitro* ograničavajućim faktorom efluksa (160). Ovo je istraživanje nadalje zaključilo da je potrebna umjerena pasivna permeabilnost kako bi P-glikoprotein ostvario utjecaj na apikalno-bazolateralnu brzinu prolaska kroz stanični monosloj. Nadalje, rezultati za feksofenadin pokazuju nisku dvosmjernu permeabilnost i nizak omjer efluksa (1.6), iako je literaturno opisano da P-glikoprotein sudjeluje u transportu feksofenadina (161,162). Razlog ovom rezultatu može biti eksperimentalno odstupanje.

Suprotno tome, prazosin je primjer visoko permeabilnog supstrata P-glikoproteina gdje je omjer efluksa izostao u MDCK-WT, što je u skladu s literaturom (89,163). Omjer efluksa prazosina prikriven je vrlo velikom propusnošću u apikalno-bazolateralnom te bazolateralno-apikalnom smjeru u standardnom eksperimentalnom okruženju.

Odnedavno komercijalno dostupna stanična linija cMDR1 *knockout* pokazala je simetričan transport kroz stanični monosloj za sve P-glikoprotein supstrate, osim vinblastina, vinorelbina i rupintrivira. Simoff i sur. izvijestio je o sličnom rezultatu za vinblastin koji pokazuje efluks iznad 2 i u divljem tipu i u stanicama cMDR1 KO CL2 (89). Autori su pretpostavili da bi se opaženi učinak mogao pripisati transportu drugim endogenim transporterima poput cMrp2 s obzirom da „knock-out“ stanice ne posjeduju aktivan P-glikoprotein.

Izolirani MDCK klon 79 s nižim efluksom amprenavira, pokazao je prosječno 2.3 puta niži omjer efluksa za dvosmjerni transport supstrata P-glikoproteina u usporedbi sa stanicama divljeg tipa. Pad efluksa za neke spojeve poput azitromicina, digoksina ili vinorelbina je evidentan (**Slika 15**). Unatoč smanjenom efluksu, većina spojeva ipak je

karakterizirana kao supstrat P-glikoproteina s omjerom efluksa većim od dva, što ukazuje na rezidualnu aktivnost P-glikoproteina u klonu 79.

Zanimljivo je da u klonu 79 jedino eritromicin nije pokazao smanjenje omjera efluksa u odnosu na stanice divljeg tipa, što ukazuje na to da omjer efluksa i učinak koji P-glikoprotein može imati u transportu nisu uvijek u potpunosti linearno povezani s njegovom izraženošću (2). Uz to, inhibitor P-glikoproteina GF120918 smanjuje omjer efluksa eritromicina u klonu 79 na jedinicu, čime se isključuje transport putem nekog drugog transportera.

Usporedbom brzine protoka u apikalno-bazolateralnom smjeru između klona 79, MDCK-WT i MDCK-KO stanične linije, ustanovljen je sličan trend odnosno slična klasifikacija spojeva (**Slika 16**). Štoviše, pokazana je visoka korelacija permeabilnosti klona 79 s divljim tipom ( $R^2 = 0.89$ ) i s „knock-out“ linijom ( $R^2 = 0.93$ ). Spojevi koji su imali omjer efluksa manji od dva u staničnoj liniji divljeg tipa, nisu pokazali razlike u brzini apikalno-bazolateralnog protoka između testiranih stanica. Ovi rezultati sugeriraju kako značajke klona 79, ali i „knock-out“ stanica ne utječu na svojstvo pasivne permeabilnosti stanica MDCK, kao što su uočili i Di i sur. (2). Zanimljivo je da za spojeve za čiji je transport u MDCK-WT pokazan utjecaj aktivnog transporta, s obzirom da je omjer efluksa veći od dva, atenuacija P-glikoproteina ima pozitivan utjecaj na brzinu apikalno-bazolateralnog protoka. Tako se uočava trend permeabilnosti od najmanje prema najvećoj:  $Papp(MDCK-WT) < Papp(MDCK-79) < Papp(MDCK-KO)$ , koji nije kod svih spojeva znatan.

U usporedbi s objavljenim podacima u MDCK staničnoj liniji niskog efluksa (2) dobra podudarnost za vrijednost permeabilnosti s klonom 79 postoji za atenolol ( $1.31 \pm 0.42$  literaturno u odnosu na  $0.9 \pm 0.3$  klona 79), ranitidin ( $1.02 \pm 0.04$  literaturno naspram  $1.4 \pm 0.8$  klona 79), propranolol ( $6.96 \pm 0.31$  literaturno naspram  $10 \pm 2$  klona 79), teofilin ( $23.1 \pm 1.6$  literaturno naspram  $20 \pm 4$  klona 79), prazosin ( $10.9 \pm 2.2$  literaturno naspram  $10 \pm 3$  klona 79) i kinidin ( $12.6 \pm 2.7$  literaturno naspram  $9 \pm 1$  klon 79), iako postoji značajna razlika u izraženosti psećeg P-gp. Točnije, na temelju PCR-a, Di i sur. izvijestili su o 200 puta nižoj izraženosti mRNA u MDCK staničnoj liniji niskog efluksa dobivenoj sortiranjem stanica protočnim citometrom u usporedbi s divljega tipa stanicama MDCK (2). S druge strane, klon 79 imao je 3 puta nižu izraženost i usporediv je s rezultatima izraženosti koje su predstavili Gartzke i Fricker, koji su kao i Di i sur. koristili metodologiju sortiranja stanica protočnom citometrijom (2,85).

Nadalje, dobiveni je klon 79, usporedno sa staničnim linijama Caco-2, MDCK-MDR1, MDCK-WT i MDCK-KO korišten u svrhu ispitivanja permeabilnosti makrolida. Makrolidi su strukturno iznimno raznoliki spojevi, karakterizirani makrocikličkim prstenom sa šećernim supstituentima. Unatoč velikom potencijalu, njihov razvoj do tržišta je spor, što zbog zahtjevnih kemijskih sintetskih postupaka, što zbog neadekvatnih postojećih istraživačkih metoda koje su prilagođene za manje molekule. U ranom istraživanju lijekova predviđanje prolaska lijeka kroz staničnu membranu ima važnu ulogu jer se većina bioloških meta nalazi unutar stanice, zbog čega je za biološku aktivnost ključan prolazak kroz membranu i ulazak u stanicu. Dodatno, rana optimizacija farmakokinetičkih svojstava, među ostalim i apsorpcija, pokazala se ključnom za uspješnost kandidata u kliničkim ispitivanjima. Međutim, iako se makrolidi *in vivo* uspješno apsorbiraju, to se iz *in vitro* testiranja permeabilnosti ne bi moglo zaključiti. Štoviše, rangiranje spojeva prema rezultatima *in vitro* permeabilnosti ne odgovara rangiranju prema izmjenjenim vrijednostima bioraspodjelivosti (129).

Da bi se proučila permeabilnost makrocikličkih lijekova, komercijalno dostupni makrolidni spojevi iz klase eritronoide, leukomicina, ketolida i imunomicina testirani su u četiri MDCK stanične vrste s različitim izraženošću P-glikoproteina i Caco-2 staničnoj liniji.

Azitromicin, eritromicin, klaritromicin i roksitromicin su testirani eritronoidi, a svi su pokazali prisutnost aktivnog transporta u stanicama Caco-2 i MDCK-MDR1 uspoređujući omjere efluksa bez i s inhibitorom elakridarom. Zanimljivo je da se omjer efluksa azitromicina uz inhibitor elakridar u Caco-2 modelu smanji s 26 bez elakridara, na ispod 1.2, iako Caco-2 stanična linija posjeduju veći broj različitih efluks pumpi poput BCRP i MRP-2. Time se nameće zaključak da se eksperimentalno vidljiv aktivni transport može većinom pripisati P-glikoproteinu, iako je azitromicin potvrđen supstrat MRP-2 pumpe. Inhibicijom P-glikoproteina u Caco-2 i MDCK-MDR1 povećala se permeabilnosti za klaritromicin i roksitromicin, dok su azitromicini i eritromicin ostali nisko permeabilni ( $<1 \times 10^{-6}$  cm/s). Ovi rezultati su u skladu s objavljenim rezultatima iz rada Nožinić i sur. (130). Za eritronoide, osim klaritromicina, klon 79 postigao je sličan rezultat kao u divljem tipu: sva tri spoja bila su nisko permeabilna s bržim transportom u bazolateralno-apikalnom smjeru, dok se u „knock-out“ modelu permeabilnost poboljšala samo za klaritromicin.

S druge strane kod testiranih ketolida telitromicina i solitromicina vidljiva je razlika između klona 79 i WT. U klonu 79 su oba ketolida bila umjereno permeabilna s omjerom

efluksa manjim od 2, dok su u WT bili nisko permeabilni s efluksom većim od 2. U slučaju ova dva spoja se rezultati klona 79 bolje podudaraju s „knock-out“ linijom.

Od leukomicina odabrani su prirodni spojevi josamicin, midekamicin i spiramicin koji su također imali bolju permeabilnost u klonu 79 u odnosu na divlji tip. Sva tri spoja su bila umjereno permeabilna, s tim da je spiramicin imao najnižu vrijednost što odgovara rangiranju spojeva prema bioraspoloživosti. Iako su sva tri leukomicina susprati P-glikoproteina u stanicama Caco-2, to nije slučaj u MDCK-MDR1 modelu, gdje je spiramicin pokazao vrlo nizak omjer efluksa (ER = 2.9).

Ustanovljeno je da imunomicini takrolimus, rapamicin i imunomicin pokazuju varijabilne rezultate u testiranim staničnim linijama. Tako s jedne strane u stanicama Caco-2 nema utjecaja aktivnog transporta, osim granično za takrolimus (ER = 2.3), dok su s druge strane na MDCK-MDR1 modelu jednoznačno identificirani kao supstrati P-glikoproteina, što je u skladu s literaturom. Permeabilnost imunomicina je u MDCK 79, KO i WT liniji bila jednaka: takrolimus i imunomicin su visoko permeabilni, dok je rapamicin umjereno permeabilan. Nasuprot toga, deset puta niža permeabilnost imunomicina u MDCK-MDR1 modelu sugerira da P-glikoprotein ograničava sistemsku apsorpciju, te zbog toga može doći do povećane intestinalne biotransformacije CYP3A4 i CYP3A5 enzimima, što rezultira smanjenom oralnom bioraspoloživosti.

Iako je pokazano da su azitromicin i telitromicin supstrati Mrp2 (135,136), to nije vidljivo iz ovdje prikazanih rezultata. Naime, u stanicama MDCK-KO, te ostalim MDCK linijama uz inhibitor P-glikoproteina elakridar, omjer efluksa ne pokazuje prisutnost aktivnog transporta. Za MDCK je ovakav rezultat očekivan s obzirom da pojedini autori navode nedostatak Mrp2 transportera u stanicama MDCK. Međutim, ni na stanicama Caco-2 koje posjeduju ovaj transporter nije vidljiv aktivan transport nakon inhibicije P-glikoproteina.

Promatrajući rezultate permeabilnosti u apikalno-bazolateralnom smjeru za sve testirane makrolide (**Slika 18 i 20**), MDCK stanične linije su se prema permeabilnosti poredale kako slijedi: MDCK-KO > MDCK-79 > MDCK-WT > MDCK-MDR1. Poredak za omjer efluksa je jednak samo u obrnutom smjeru (**Slika 19 i 20**): MDCK-KO < MDCK-79 < MDCK-WT < MDCK-MDR1. Može se uočiti da poredak odgovara razlici u količini P-glikoproteina. Pri tom su razlike između staničnih modela za nisko permeabilne makrolide azitromicin, eritromicin i roksitromicin neznatne.

Usporedbom svih navedenih rezultata vidljiva je direktna korelacija permeabilnosti u apikalno-bazolateralnom smjeru klona 79 s „knock-out“, divljim tipom, MDCK-MDR1 uz elakridar, te Caco-2 (Slika 21). Što se tiče omjera efluksa korelacije su manje, a zanimljivo je da je jedina dobra korelacija ustanovljena između efluksa klona 79 i Caco-2. Može se dakle zaključiti da nema značajnih razlika, odnosno da nema poboljšanja permeabilnosti makrolida u modelima s niskom ili bez izraženosti P-glikoproteina. Ipak prednost ovih modela je u izravnom i jednostavnijem mjerenju parametara permeabilnosti.

Jedan od pristupa određivanja supstrata P-glikoproteina u stanicama MDCK je računanje razlike omjera permeabilnosti (engl. *net flux ratio*, *NER*) između stanica MDCK s pretjerano izraženim humanim P-glikoproteinom i endogeno izraženim psećim P-glikoproteinom te divljega tipa stanica MDCK sa samo endogeno izraženim psećim P-glikoproteinom. Ovim pristupom uklanja se utjecaj endogenih transportera u postupku identifikacije supstrata P-glikoproteina. Međutim različita izraženost endogenog P-glikoproteina između dviju MDCK staničnih linija, može rezultirati lažno pozitivnim, odnosno lažno negativnim rezultatima. Zato je identifikacija supstrata P-glikoproteina proučena dvjema metodama: računanjem razlike omjera permeabilnosti i usporedbom omjera efluksa bez i uz prisustvo inhibitora P-glikoproteina elakridara (Tablici 17). Prema drugoj metodi inhibicije P-glikoproteina, svi testirani makrolidi izuzev spiramicina su identificirani kao *in vitro* supstrati P-glikoproteina. Spiramicin je prema literaturi također supstrat P-glikoproteina, što je potvrđeno rezultatima u Caco-2 modelu. Metodom razlike omjera permeabilnosti MDCK-MDR1/(WT ili klon 79), azitromicin, eritromicin i roksitromicin negativno su kategorizirani nakon normalizacije s divljim tipom. Nadalje, normalizacijom s klonom 79 azitromicin i eritromicin također su negativni, dok je roksitromicin identificiran kao supstrat P-glikoproteina. Lažno negativan rezultat za eritromicin već je poznat iz literature (2). Izenađujuće je relativno usporediv efluks azitromicina (7 i 8.6) i eritromicina (4.8 i 6) u stanicama MDCK-MDR1 i u MDCK-WT, ako se uzme u obzir značajno različita razina ukupnog P-glikoproteina. Klon 79, iako znatno nižeg efluksa u odnosu na divlji tip, jedino je kod roksitromicina ostvario promjenu klasifikacije supstrata.

Kako bi se dobio uvid u odnos permeabilnosti i bioraspoloživosti makrolida, napravljena je analiza dobivenih rezultata permeabilnosti uz literaturno dostupne podatke *in vivo* bioraspoloživosti u čovjeku. Dodatno su korišteni izračunati parametri lipofilnosti, broja donora vodikovih veza (HBD), topološke polarne površine (TPSA) i molekularne

mase. Usporedbom svih navedenih podataka vidljivo je odsustvo direktne korelacije (**Slika 22**) za većinu parametara na ovom setu makrolida što je u skladu s dosadašnjom literaturom, te je stoga provedena multiparametrijska analize koristeći već navedene izračunate fizikalno-kemijske i strukturne parametre (**Tablica 18**), te eksperimentalno određena metabolička stabilnost, nakupljanje i zadržavanje spoja u stanici, te permeabilnost pri dužem inkubacijskom vremenu.

S obzirom da nakon apsorpcije spoj prije ulaska u centralni krvotok prvo prolazi kroz jetru, metabolička stabilnost spoja igra veliku ulogu u njegovoj bioraspoloživosti. Stoga je ispitana metabolička stabilnost makrolida u humanim mikrosomima (**Tablica 19**) i izračunat je *in vitro* klirens i predviđeni *in vivo* hepatski klirens, prema čemu veća vrijednost klirensa ukazuje na brži metabolizam slobodnog spoja. Tako su spojevi klasificirani u stabilne (azitromicin i spiramicin), umjerenog klirensa (klaritromicin i roksitromicin) i visokog klirensa (svi ostali). Dobiveni rezultati metaboličke stabilnosti bili su u skladu s literaturom.

Nadalje, permeabilnost kroz stanične membrane sastoji se iz dva različita procesa, ulazak i izlazak iz stanice, koji se mogu opisati nakupljanjem (akumulacija) i zadržavanjem (retencija) spoja u stanicama. Ovi procesi određuju se inkubacijom stanica s visokom koncentracijom spoja, te nakon tri sata uzorkovanjem staničnih lizata u kojima se onda mjeri koncentracija nakupljenog, odnosno zadržanog spoja. Na sličnom principu djeluju i novo razvijeni testovi permeabilnosti za velike molekule, makrocikle i peptide, s obzirom da je za ovakve molekule postizanje dovoljne membranske permeabilnosti ključan izazov pri identifikaciji kliničkih kandidata (150). U skladu s literaturnim podacima, azitromicin se ističe i po nakupljanju, i po zadržavanju u stanicama. Uz azitromicin, značajno se nakuplja solitromicin, dok se spiramicin znatno zadržava. Ostali testirani makrolidi manje se nakupljaju i zadržavaju u stanicama.

Dodatni uvid u nedostatak *in vitro* - *in vivo* korelacije permeabilnosti makrolida dobiven je proučavanjem utjecaja vremenske komponente. Naime, makrolidi s molekulskim masama između 700 i 1000 imaju manju brzinu difuzije u odnosu na manje molekule (149), a upravo je brzina difuzije ono što se mjeri u pokusima permeabilnosti i transporta. Rezultati nakon 1, 6 i 24 sata inkubacije izraženi su kao omjer raspodjele koncentracije spoja između bazolateralnog i apikalnog odjeljka ( $R_{b/a\_MDCK}$ ) opisujući razdjeljenje između faza umjesto brzine prolaska analogno metodi koju su opisali Peier i sur. (150). Očekivano je izmjereno veće nakupljanje u bazolateralnom odjeljku, odnosno

veći prolazak spojeva iz apikalnog u bazolateralni odjeljak pri dužem inkubacijskom vremenu. Međutim taj prolazak nije bio linearan (**Slika 24**, **Slika 25**), već je za spojeve koji imaju jednu ionizabilnu skupinu i lipofilnost između 2.5 i 3.5 (eritromicin, roksitromicin, klaritromicin, telitromicin, solitromicin, josamicin, midekamicin) došlo do povećanja  $R_{b/a\_MDCK}$ . Za azitromicin je također došlo do povećanja raspodjele koja zbog niskih koncentracija nije vizualno vidljiva. Iz ove analize također se može naslutiti važnost različitih parametara u procesu permeabilnosti što je statistički proučeno izradom modela pomoću PLS analize. Razvijeni model (**Slika 26**) ukazuje da je za raspodjelu makrolida nakon 24 sata značajno stanično nakupljanje i zadržavanje, lipofilnost, omjer efluksa, pKa i broj donora vodikovih veza. To je u skladu s dosadašnjim razumijevanjem procesa permeabilnosti, te mehanistički potvrđuje razvijeni model, dok je za makrocikle dodatno važan odnos nakupljanja i zadržavanja u stanicama. Poznato je da lipofilniji spojevi imaju veću permeabilnost (164,165), što je u modelu vidljivo kroz pozitivan utjecaj logD. U razvijenom modelu broj vodikovih veza negativno utječe na raspodjelu makrolida, što odgovara pravilu broja pet Lipinskog, koje opisuje da je povećanjem broja donora vodikovih veza, manja permeabilnost kroz membranu. Veće molekule sporije prolaze kroz staničnu membranu, što je u modelu indicirano negativnim utjecajem molekulske mase na permeabilnost. Omjer efluksa također negativno djeluje na permeabilnost jer što je veći efluks spoja, manji je njegov prolazak. Naposljetku, bazičnost izražena kao pKa ima negativan utjecaj u modelu jer se spojevi duže zadržavaju u stanicama (166).

U svrhu izgradnje mehanističkog modela bioraspoloživosti, a kako bi se dobio uvid u glavne čimbenike koji utječu na bioraspoloživost makrolida, provedena je statistička analiza svih prikupljenih podataka. Preliminarno su izrađeni modeli koristeći  $R_{b/a\_MDCK}$  na 1, 6 i 24 sata, međutim modeli na 1 i 6 sati bili su statistički slabiji. Stoga je za konačan model korištena raspodjela na stanicama MDCK-KO nakon 24 sata, u skladu s početnom pretpostavkom da je permeabilnost makrolida potrebno mjeriti na drugačijoj vremenskoj skali u odnosu na male molekule, te da je osnovni proces razdjeljenje, a ne brzina prolaska. Razvijeni model (**Slika 28**) ukazuje da je za bioraspoloživost makrolida značajno stanično nakupljanje, klirens,  $R_{b/a\_MDCK\_24h}$ , lipofilnost, pKa i topološka polarna površina. Razvijen model bioraspoloživosti primjenjiv je u istraživanju novih biološki aktivnih makrolidnih spojeva, za filtriranje i određivanje prioriteta za sintezu novih ciljnih (target) molekula, te omogućava bolje razumijevanje farmakokinetike makrolidnih spojeva.

## 6. ZAKLJUČAK

1. Metodom velikog razrjeđivanja uspješno su izolirani klonovi divljega tipa stanica MDCK, te nadalje uspješno sortirani metodom dvosmjernog transporta amprenavira prema efluks aktivnosti, na osnovu čega je uspostavljen optimalan proces izolacije stanica s niskim efluksom.
2. Klon 79, koji je pokazao najmanji omjer efluksa amprenavira i topotekana, kao i tri puta manju izraženost mRNA u odnosu na MDCK-WT, odabran je kao klon MDCK s niskim efluksom za daljnje istraživanje.
3. Na standardnom setu spojeva klon 79 pokazao je bolje značajke od divljeg tipa, iako je kod nekih spojeva i dalje vidljiva ostatna aktivnost P-glikoproteina.
4. Utvrđen je trend permeabilnosti na standardnom setu:  $P_{app}(\text{MDCK-WT}) < P_{app}(\text{MDCK-79}) < P_{app}(\text{MDCK-KO})$ , koji nije kod svih spojeva znatan.
5. Nije uočeno značajno poboljšanje (>2 puta) permeabilnosti makrolida u staničnim modelima s niskom (MDCK-79) ili nikakvom (MDCK-KO) izraženosti P-glikoproteina u odnosu na MDCK-MDR1 i MDCK-WT stanični model.
6. Prednost modela s niskom (MDCK-79) ili nikakvom (MDCK-KO) izraženosti P-glikoproteina je u izravnom i jednostavnijem mjerenju parametara permeabilnosti u odnosu na MDCK-MDR1 staničnu liniju koja se mora dodatno inkubirati s inhibitorom P-glikoproteina elakridarom kako bi se izmjerila pasivna permeabilnost.
7. Produžavanjem vremena inkubacije, te izražavanjem permeabilnosti putem omjera koncentracija umjesto brzine difuzije u MDCK modelu permeabilnosti, nakon 24 sata, došlo je do povećanja  $R_{b/a\_MDCK}$  za spojeve koji su imali jednu ionizabilnu skupinu i lipofilnosti između 2.5 i 3.5. Ovako definiran parametar novi je način za opisivanje permeabilnosti makrolida u *in vitro* sustavima.
8. Uspješno je razvijen multivarijantni statistički model za omjer raspodjele makrolida između bazolateralnog i apikalnog odjeljka kroz MDCK monosloj nakon 24 sata. Razvijeni model ukazuje da je za raspodjelu makrolida nakon 24 sata značajno stanično nakupljanje i zadržavanje, lipofilnost, pKa i broj donora vodikovih veza.
9. Uspješno je razvijen multivarijantni statistički model za oralnu bioraspodjelivost koji je pokazao da su stanično nakupljanje, klirens,  $R_{b/a\_MDCK\_24h}$ , lipofilnost, pKa i topološka polarna površina ključni čimbenici u ovom složenom procesu.



## 7. CITIRANA LITERATURA

1. Newby D, Freitas AA, Ghafourian T. Decision trees to characterise the roles of permeability and solubility on the prediction of oral absorption. *European Journal of Medicinal Chemistry*. 2015; 90:751–65.
2. Di L, Whitney-Pickett C, Umland JP, Zhang H, Zhang X, Gebhard DF, et al. Development of a new permeability assay using low-efflux MDCKII cells. *Journal of Pharmaceutical Sciences*. 2011;100(11):4974–85.
3. Hay M, Thomas DW, Craighead JL, Economides C, Rosenthal J. Clinical development success rates for investigational drugs. *Nat Biotechnol*. 2014;32(1):40–51.
4. DiMasi JA, Grabowski HG, Hansen RW. The Cost of Drug Development. *N Engl J Med*. 2015;372(20):1972–1972.
5. Waring MJ, Arrowsmith J, Leach AR, Leeson PD, Mandrell S, Owen RM, et al. An analysis of the attrition of drug candidates from four major pharmaceutical companies. *Nature Reviews Drug Discovery*. 2015;14(7):475–86.
6. van de Waterbeemd H, Gifford E. ADMET in silico modelling: towards prediction paradise? *Nat Rev Drug Discov*. 2003;2(3):192–204.
7. Summerfield S, Jeffrey P. Discovery DMPK: changing paradigms in the eighties, nineties and noughties. *Expert Opinion on Drug Discovery*. 2009 Mar;4(3):207–18.
8. Darvas F, Keseru G, Papp A, Dorman G, Urge L, Krajcsi P. In Silico and Ex Silico ADME Approaches for Drug Discovery. *CTMC*. 2002;2(12):1287–304.
9. European Patients' Academy. Available from: <https://toolbox.eupati.eu/glossary/drug-distribution/>. 2021.
10. Li AP. Preclinical in vitro screening assays for drug-like properties. *Drug Discovery Today: Technologies*. 2005;2(2):179–85.
11. Dahlgren D, Lennernäs H. Intestinal Permeability and Drug Absorption: Predictive Experimental, Computational and In Vivo Approaches. *Pharmaceutics*. 2019;11(8):411.
12. Volpe DA. Application of Method Suitability for Drug Permeability Classification. *AAPS J*. 2010;12(4):670–8.
13. Helander HF, Fändriks L. Surface area of the digestive tract – revisited. *Scandinavian Journal of Gastroenterology*. 2014;49(6):681–9.
14. Kim SK. Small Intestine Transit Time in the Normal Small Bowel Study. 1968;3.
15. Szarka LA, Camilleri M. Methods for the Assessment of Small-Bowel and Colonic Transit. *Seminars in Nuclear Medicine*. 2012;42(2):113–23.

16. Shargel L, Yu ABC. *Applied Biopharmaceutics and Pharmacokinetics*. 4th ed. McGraw-Hill; 1999.
17. Bevan CD, Lloyd RS. A High-Throughput Screening Method for the Determination of Aqueous Drug Solubility Using Laser Nephelometry in Microtiter Plates. *Anal Chem*. 2000;72(8):1781–7.
18. Alsenz J, Kansy M. High throughput solubility measurement in drug discovery and development. *Advanced Drug Delivery Reviews*. 2007;59(7):546–67.
19. Larson B, Banks P, Sherman H, Rothenberg M. Automation of Cell-Based Drug Absorption Assays in 96-Well Format Using Permeable Support Systems. *Journal of Laboratory Automation*. 2012;17(3):222–32.
20. Li C, Wainhaus S, Uss AS, Cheng K-C. High-Throughput Screening Using Caco-2 Cell and PAMPA Systems. In: Ehrhardt C, Kim K-J, editors. *Drug Absorption Studies: In Situ, In Vitro and In Silico Models*. Boston, MA: Springer US; 2008. p. 418–29.
21. Amidon GL, Lennernäs H, Shah VP, Crison JR. A theoretical basis for a biopharmaceutic drug classification: the correlation of in vitro drug product dissolution and in vivo bioavailability. *Pharmaceutical Research*. 1995;12(3):413–20.
22. Wu C-Y, Benet LZ. Predicting Drug Disposition via Application of BCS: Transport/Absorption/ Elimination Interplay and Development of a Biopharmaceutics Drug Disposition Classification System. *Pharm Res*. 2005;22(1):11–23.
23. Smith DA, Beaumont K, Maurer TS, Di L. Clearance in Drug Design: Miniperspective. *Journal of Medicinal Chemistry*. 2018;62(5):2245–2255.
24. Lipinski CA, Lombardo F, Dominy BW, Feeney PJ. Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings. *Advanced Drug Delivery Reviews*. 1997;23(1):3–25.
25. Matsson P, Doak BC, Over B, Kihlberg J. Cell permeability beyond the rule of 5. *Advanced Drug Delivery Reviews*. 2016;101:42–61.
26. Yudin AK. Macrocycles: lessons from the distant past, recent developments, and future directions. *Chemical Science*. 2015;6:30–49.
27. Palm K, Stenberg P, Luthman K, Artursson P. Polar Molecular Surface Properties Predict the Intestinal Absorption of Drugs in Humans. *Pharmaceutical Research*. 1997;14(5):568–71.
28. Clark DE. Rapid calculation of polar molecular surface area and its application to the prediction of transport phenomena. 1. Prediction of intestinal absorption. *Journal of Pharmaceutical Sciences*. 1999;88(8):807–14.
29. Wilson J, Hunt T. *Molecular biology of the cell*. 5. ed. New York, NY: Garland Science; 2008. p.587.

30. Yang NJ, Hinner MJ. Getting Across the Cell Membrane: An Overview for Small Molecules, Peptides, and Proteins. In: Gautier A, Hinner MJ, editors. Site-Specific Protein Labeling. New York, NY: Springer New York; 2015. p. 29–53.
31. Leeson PD, Springthorpe B. The influence of drug-like concepts on decision-making in medicinal chemistry. *Nat Rev Drug Discov.* 2007;6(11):881–90.
32. Smith DA, Waterbeemd van der H, Walker DK. Pharmacokinetics and Metabolism in Drug Design. John Wiley & Sons; 2006.
33. Paradkar AR. Biopharmaceutics and Pharmacokinetics. Pragati Books Pvt. Ltd.; 2008.
34. The International Transporter Consortium. Membrane transporters in drug development. *Nat Rev Drug Discov.* 2010;9(3):215–36.
35. You G, Morris ME. Overview of Drug Transporter Families. In: Drug Transporters. John Wiley & Sons, Ltd; 2007. p. 1–10.
36. Glaeser H, Bailey DG, Dresser GK, Gregor JC, Schwarz UI, McGrath JS, et al. Intestinal Drug Transporter Expression and the Impact of Grapefruit Juice in Humans. *Clin Pharmacol Ther.* 2007;81(3):362–70.
37. Ganapathy ME, Huang W, Wang H, Ganapathy V, Leibach FH. Valacyclovir: A Substrate for the Intestinal and Renal Peptide Transporters PEPT1 and PEPT2. *Biochemical and Biophysical Research Communications.* 1998;246(2):470–5.
38. Sugawara M, Huang W, Fei Y, Leibach FH, Ganapathy V, Ganapathy ME. Transport of Valganciclovir, a Ganciclovir Prodrug, via Peptide Transporters PEPT1 and PEPT2. *Journal of Pharmaceutical Sciences.* 2000;89(6):781–9.
39. Bueno AB, Collado I, de Dios A, Domínguez C, Martín JA, Martín LM, et al. Dipeptides as Effective Prodrugs of the Unnatural Amino Acid (+)-2-Aminobicyclo[3.1.0]hexane-2,6-dicarboxylic Acid (LY354740), a Selective Group II Metabotropic Glutamate Receptor Agonist. *J Med Chem.* 2005;48(16):5305–20.
40. Schinkel AH, Jonker JW. Mammalian drug efflux transporters of the ATP binding cassette (ABC) family: an overview. *Advanced Drug Delivery Reviews.* 2012;64:138–53.
41. Mao Q, Unadkat JD. Role of the Breast Cancer Resistance Protein (BCRP/ABCG2) in Drug Transport—an Update. *The AAPS Journal.* 2015;17(1):65–82.
42. Juliano RL, Ling V. A surface glycoprotein modulating drug permeability in Chinese hamster ovary cell mutants. *Biochimica et biophysica acta.* 1976;455(1):152–62.
43. Sharom F. The P-glycoprotein multidrug transporter. *Essays in biochemistry.* 2011;50:161–78.
44. Bosch I, Croop JM. P-glycoprotein structure and evolutionary homologies. *Cytotechnology.* 1998;27:1–30.

45. van der Blik AM, Kooiman PM, Schneider C, Borst P. Sequence of *mdr3* cDNA encoding a human P-glycoprotein. *Gene*. 1988;71(2):401–11.
46. Aller SG, Yu J, Ward A, Weng Y, Chittaboina S, Zhuo R, et al. Structure of P-Glycoprotein Reveals a Molecular Basis for Poly-Specific Drug Binding. *Science*. 2009;323(5922):1718–22.
47. Kodan A, Yamaguchi T, Nakatsu T, Sakiyama K, Hipolito CJ, Fujioka A, et al. Structural basis for gating mechanisms of a eukaryotic P-glycoprotein homolog. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2014;111(11):4049–54.
48. Kodan A, Yamaguchi T, Nakatsu T, Matsuoka K, Kimura Y, Ueda K, et al. Inward- and outward-facing X-ray crystal structures of homodimeric P-glycoprotein CmABCB1. *Nat Commun*. 2019;10(1):88.
49. McCormick JW, Vogel PD, Wise JG. Multiple Drug Transport Pathways through Human P-Glycoprotein. *Biochemistry*. 2015;54(28):4374–90.
50. Wise JG. Catalytic Transitions in the Human MDR1 P-Glycoprotein Drug Binding Sites. *Biochemistry*. 2012;51(25):5125–41.
51. Nanayakkara AK, Follit CA, Chen G, Williams NS, Vogel PD, Wise JG. Targeted inhibitors of P-glycoprotein increase chemotherapeutic-induced mortality of multidrug resistant tumor cells. *Sci Rep*. 2018;8(1):967.
52. Hubatsch I, Ragnarsson EGE, Artursson P. Determination of drug permeability and prediction of drug absorption in Caco-2 monolayers. *Nature Protocols*. 2007;2(9):2111–9.
53. Volpe DA. Drug-permeability and transporter assays in Caco-2 and MDCK cell lines. *Future Medicinal Chemistry*. 2011;3(16):2063–77.
54. Artursson P. Epithelial Transport Of Drugs In Cell Culture. I: A Model For Studying The Passive Diffusion Of Drugs Over Intestinal Absorbative (Caco-2) Cells. *Journal of Pharmaceutical Sciences*. 1990;79(6):476–82.
55. Artursson P, Karlsson J. Correlation between oral drug absorption in humans and apparent drug permeability coefficients in human intestinal epithelial (Caco-2) cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 1991;175(3):880–5.
56. Hidalgo IJ, Raub TJ, Borchardt RT. Characterization of the Human Colon Carcinoma Cell Line (Caco-2) as a Model System for Intestinal Epithelial Permeability. *Gastroenterology*. 1989;96(2):736–49.
57. Christians U, Schmitz V, Haschke M. Functional interactions between P-glycoprotein and CYP3A in drug metabolism. *Expert Opinion on Drug Metabolism & Toxicology*. 2005;1(4):641–54.
58. Acharya P, O'Connor MP, Polli JW, Ayrton A, Ellens H, Bentz J. Kinetic Identification of Membrane Transporters That Assist P-glycoprotein-Mediated Transport of Digoxin and Loperamide through a Confluent Monolayer of MDCKII-hMDR1 Cells. *Drug Metabolism and Disposition*. 2008;36(2):452–60.

59. Tavelin S, Gråsjö J, Taipalensuu J, Ocklind G, Artursson P. Applications of Epithelial Cell Culture in Studies of Drug Transport. In: *Epithelial Cell Culture Protocols* [Internet]. New Jersey: Humana Press; 2002. p. 233–72.
60. Lea T. Caco-2 Cell Line. In: Verhoeckx K, Cotter P, López-Expósito I, Kleiveland C, Lea T, Mackie A, et al., editors. *The Impact of Food Bioactives on Health* [Internet]. Cham: Springer International Publishing; 2015. p. 103–11.
61. Oltra-Noguera D, Mangas-Sanjuan V, Centelles-Sangüesa A, Gonzalez-Garcia I, Sanchez-Castaño G, Gonzalez-Alvarez M, et al. Variability of permeability estimation from different protocols of subculture and transport experiments in cell monolayers. *Journal of Pharmacological and Toxicological Methods*. 2015;71:21–32.
62. Uchida M, Fukazawa T, Yamazaki Y, Hashimoto H, Miyamoto Y. A modified fast (4 day) 96-well plate Caco-2 permeability assay. *Journal of pharmacological and toxicological methods*. 2009;59 1:39–43.
63. Sevin E, Dehouck L, Fabulas-da Costa A, Cecchelli R, Dehouck M, Lundquist S, et al. Accelerated Caco-2 cell permeability model for drug discovery. *Journal of pharmacological and toxicological methods*. 2013;68(3):334—339.
64. Peng Y, Yadava P, Heikkinen AT, Parrott N, Railkar A. Applications of a 7-day Caco-2 cell model in drug discovery and development. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*. 2014;56:120–30.
65. Goers L, Freemont P, Polizzi KM. Co-culture systems and technologies: taking synthetic biology to the next level. *J R Soc Interface*. 2014;11(96):20140065.
66. Lesuffleur T, Barbai A, Dussaulx E, Zweibaum A. Growth adaptation to methotrexate of HT-29 human colon carcinoma cells is associated with their ability to differentiate into columnar absorptive and mucus-secreting cells. *Cancer Res*. 1990;50(19):6334-43.
67. Chen X-M, Elisia I, Kitts DD. Defining conditions for the co-culture of Caco-2 and HT29-MTX cells using Taguchi design. *Journal of Pharmacological and Toxicological Methods*. 2010;61(3):334–42.
68. Béduneau A, Tempesta C, Fimbel S, Pellequer Y, Jannin V, Demarne F, et al. A tunable Caco-2/HT29-MTX co-culture model mimicking variable permeabilities of the human intestine obtained by an original seeding procedure. *European journal of pharmaceuticals and biopharmaceuticals*. 2014;87(2):290—298.
69. Dukes JD, Whitley P, Chalmers AD. The MDCK variety pack: choosing the right strain. *BMC Cell Biol*. 2011;12(1):43.
70. Barker G, Simmons NL. Identification of two strains of cultured canine renal epithelial cells (MDCK cells) which display entirely different physiological properties. *Exp Physiol*. 1981;66(1):61–72.

71. Chen EC, Broccatelli F, Plise E, Chen B, Liu L, Cheong J, et al. Evaluating the Utility of Canine Mdr1 Knockout Madin-Darby Canine Kidney I Cells in Permeability Screening and Efflux Substrate Determination. *Mol Pharmaceutics*. 2018;15(11):5103–13.
72. Ranaldi G, Islam K, Sambuy Y. Epithelial cells in culture as a model for the intestinal transport of antimicrobial agents. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 1992;36(7):1374–81.
73. Irvine JD, Takahashi L, Lockhart K, Cheong J, Tolan JW, Selick HE, et al. MDCK (Madin-Darby Canine Kidney) Cells: A Tool for Membrane Permeability Screening. *Journal of Pharmaceutical Sciences*. 1999;88(1):28–33.
74. Tran TT, Gales T, Maleeff B, Aldinger T, Polli JW, Ayrton A, et al. Exact kinetic analysis of passive transport across a polarized confluent MDCK cell monolayer modeled as a single barrier. *Journal of Pharmaceutical Sciences*. 2004;93(8):2108–23.
75. Goh L-B, Spears KJ, Yao D, Ayrton A, Morgan P, Wolf CR, et al. Endogenous drug transporters in in vitro and in vivo models for the prediction of drug disposition in man. *Biochemical pharmacology*. 2002;64(11):1569–78.
76. Polli JW, Wring SA, Humphreys JE, Huang L, Morgan JB, Webster LO, et al. Rational Use of in Vitro P-glycoprotein Assays in Drug Discovery. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*. 2001;299:620–8.
77. Tang F, Horie K, Borchardt RT. Are MDCK Cells Transfected with the Human MDR1 Gene a Good Model of the Human Intestinal Mucosa? *Pharmaceutical Research*. 2002;19(6):765–72.
78. Wang Q, Rager J, Weinstein K, Kardos P, Dobson GL, Li J, et al. Evaluation of the MDR-MDCK cell line as a permeability screen for the blood-brain barrier. *International journal of pharmaceutics*. 2005;288 2:349–59.
79. Hochman J, Mei Q, Yamazaki M, Tang C, Prueksaritanont Y, Bock M, et al. Role of Mechanistic Transport Studies in Lead Optimization. In: *Optimizing the “Drug-Like” Properties of Leads in Drug Discovery Biotechnology: Pharmaceutical Aspects*, vol IV. Springer, New York, NY; 2006. p. 25–47.
80. Food and Drug Administration. Waiver of In Vivo Bioavailability and Bioequivalence Studies for Immediate Release Solid Oral Dosage Forms Based on a Biopharmaceutics Classification System. U.S. Biopharmaceutics, Department of Health and Human Services; 2017.
81. Kuteykin-Teplyakov K, Luna-Tortós C, Ambroziak K, Löscher W. Differences in the expression of endogenous efflux transporters in MDR1-transfected versus wildtype cell lines affect P-glycoprotein mediated drug transport: Transfection alters expression of endogenous Mdr1. *British Journal of Pharmacology*. 2010;160(6):1453–63.

82. Hyafil F, Vergely C, Du Vignaud P, Grand-Perret T. In Vitro and in Vivo Reversal of Multidrug Resistance by GF120918, an Acridonecarboxamide Derivative. *Cancer Research*. 1993;53:4595–602.
83. Khaitan D, Lincz BT, Ningaraj N. Elacridar as Adjuvant with Anticancer Drugs for Brain Tumors-Delivery, Safety, Efficacy and Toxicity,. 2018;9.
84. Arthur JM. The MDCK cell line is made up of populations of cells with diverse resistive and transport properties. *Tissue and Cell*. 2000;32(5):446–50.
85. Gartzke D, Fricker G. Establishment of Optimized MDCK Cell Lines for Reliable Efflux Transport Studies. *Journal of Pharmaceutical Sciences*. 2014;103(4):1298–304.
86. Yaron JR, Ziegler CP, Tran TH, Glenn HL, Meldrum DR. A convenient, optimized pipeline for isolation, fluorescence microscopy and molecular analysis of live single cells. *Biol Proced Online*. 2014;16(1):9.
87. Freshney RI. Cloning and Selection. In: *Culture of Animal Cells: A Manual of Basic Technique and Specialized Applications* [Internet]. 6th ed. John Wiley & Sons, Ltd; 2011. p. 207–25.
88. Gartzke D, Delzer J, Laplanche L, Uchida Y, Hoshi Y, Tachikawa M, et al. Genomic Knockout of Endogenous Canine P-Glycoprotein in Wild-Type, Human P-Glycoprotein and Human BCRP Transfected MDCKII Cell Lines by Zinc Finger Nucleases. *Pharm Res*. 2015;32(6):2060–71.
89. Simoff I, Karlgren M, Backlund M, Lindström A-C, Gaugaz FZ, Matsson P, et al. Complete Knockout of Endogenous Mdr1 (Abcb1) in MDCK Cells by CRISPR-Cas9. *Journal of Pharmaceutical Sciences*. 2016;105(2):1017–21.
90. Karlgren M, Simoff I, Keiser M, Oswald S, Artursson P. CRISPR-Cas9: A New Addition to the Drug Metabolism and Disposition Tool Box. *Drug Metab Dispos*. 2018;46(11):1776–86.
91. Karlgren M, Simoff I, Backlund M, Wegler C, Keiser M, Handin N, et al. A CRISPR-Cas9 Generated MDCK Cell Line Expressing Human MDR1 Without Endogenous Canine MDR1 (cABCB1): An Improved Tool for Drug Efflux Studies. *Journal of Pharmaceutical Sciences*. 2017;106(9):2909–13.
92. Eraković Haber V. Makrolidi – više od antibiotika. *Infektološki glasnik*. 2011;31(1):29-39.
93. Mallinson J, Collins I. Macrocycles in new drug discovery. *Future Medicinal Chemistry*. 2012;4(11):1409–38.
94. Driggers EM, Hale SP, Lee J, Terrett NK. The exploration of macrocycles for drug discovery — an underexploited structural class. *Nature Reviews Drug Discovery*. 2008;7(7):608–24.
95. McGuire J, Bunch R, Anderson R, Boaz H, Flynn E, Powell H, et al. Ilotycin, a new antibiotic. *Antibiotics & chemotherapy (Northfield, Ill)*. 1952;2(6):281—283.

96. Osono T, Oka Y, Watanabe S, Okami Y, Umezawa H. A new antibiotic, josamyicin. I. Isolation and physico-chemical characteristics. *J Antibiot (Tokyo)*. 1967;20(3):174–80.
97. Pinnert-Sindico S. [A new species of *Streptomyces* producing antibiotics *Streptomyces ambofaciens* n. sp., cultural characteristics]. *Annales de l'Institut Pasteur*. 1954;87(6):702—707.
98. Hardy DJ, Hensey DM, Beyer JM, Vojtko C, McDonald EJ, Fernandes PB. Comparative in vitro activities of new 14-, 15-, and 16-membered macrolides. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 1988;32(11):1710–9.
99. Zhanel GG, Walters M, Noreddin A, Vercaigne LM, Wierzbowski A, Embil JM, et al. The Ketolides: A Critical Review. *Drugs*. 2002;62(12):1771–804.
100. Brinker A, Wassel R, Lyndly J, Serrano J, Avigan M, Lee W, et al. Telithromycin-associated hepatotoxicity: Clinical spectrum and causality assessment of 42 cases. *Hepatology*. 2009;49:250–7.
101. Fernandes P, Martens E, Bertrand D, Pereira D. The solithromycin journey—It is all in the chemistry. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*. 2016;24(24):6420–8.
102. Donald BJ, Surani S, Deol HS, Mbadugha UJ, Udeani G. Spotlight on solithromycin in the treatment of community-acquired bacterial pneumonia: design, development, and potential place in therapy. *DDDT*. 2017;11:3559–66.
103. Kannan K. Selective Protein Synthesis by Ribosomes with a Drug-Obstructed Exit Tunnel. *Cell*. 2012;151:508–20.
104. Dinos GP. The macrolide antibiotic renaissance: The present and future of macrolide antibiotics. *British Journal of Pharmacology*. 2017;174(18):2967–83.
105. Kirst HA, Sides GD. New directions for macrolide antibiotics: pharmacokinetics and clinical efficacy. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 1989;33(9):1419–22.
106. Birkett DJ, Robson RA, Grgurinovich N, Tonkin A. Single Oral Dose Pharmacokinetics of Erythromycin and Roxithromycin and the Effects of Chronic Dosing: Therapeutic Drug Monitoring. 1990;12(1):65–71.
107. Itoh Z, Suzuki T, Nakaya M, Inoue M, Mitsuhashi S. Gastrointestinal motor-stimulating activity of macrolide antibiotics and analysis of their side effects on the canine gut. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 1984;26(6):863–9.
108. Rodvold KA. Clinical pharmacokinetics of clarithromycin. *Clinical pharmacokinetics*. 1999;37(5):385–98.
109. Amsden G. Erythromycin, clarithromycin, and azithromycin: are the differences real? *Clinical Therapeutics*. 1996;18(1):56–72.
110. Foulds G, Shepard RM, Johnson RB. The pharmacokinetics of azithromycin in human serum and tissues. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 1990;25(suppl A):73–82.



111. Zuckerman JM, Qamar F, Bono BR. Macrolides, Ketolides, and Glycylcyclines: Azithromycin, Clarithromycin, Telithromycin, Tigecycline. *Infectious Disease Clinics of North America*. 2009;23(4):997–1026.
112. Namour F, Wessels DH, Pascual MH, Reynolds D, Sultan E, Lenfant B. Pharmacokinetics of the New Ketolide Telithromycin (HMR 3647) Administered in Ascending Single and Multiple Doses. *Antimicrob Agents Chemother*. 2001;45(1):170–5.
113. Giordanetto F, Kihlberg J. Macrocyclic Drugs and Clinical Candidates: What Can Medicinal Chemists Learn from Their Properties? *Journal of Medicinal Chemistry*. 2014;57(2):278–95.
114. Gladue RP, Bright GM, Isaacson RE, Newborg MF. In vitro and in vivo uptake of azithromycin (CP-62,993) by phagocytic cells: possible mechanism of delivery and release at sites of infection. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 1989;33(3):277–82.
115. Panteix G, Guillaumond B, Harf R, Desbos A, Sapin V, Leclercq M, et al. In-vitro concentration of azithromycin in human phagocytic cells. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 1993;31(suppl\_E):1–4.
116. Neu HC. In vitro activity of midecamycin, a new macrolide antibiotic. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 1983;24(3):443–4.
117. Mollison KW, Fey TA, Krause RA, Andrews JM, Bretheim PT, Cusick PK, et al. Nephrotoxicity studies of the immunosuppressants tacrolimus (FK506) and ascomycin in rat models. *Toxicology*. 1998;125(2):169–81.
118. Bosnar M, Kelneric Z, Munic V, Erakovic V, Parnham MJ. Cellular Uptake and Efflux of Azithromycin, Erythromycin, Clarithromycin, Telithromycin, and Cethromycin. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 2005;49(6):2372–7.
119. Fassbender M, Lode H, Schiller C, Andro R, Goetschi B, Borner K, et al. Comparative pharmacokinetics of macrolide antibiotics and concentrations achieved in polymorphonuclear leukocytes and saliva. *Clinical Microbiology and Infection*. 1996;1(4):235–43.
120. Chu SY, Deaton R, Cavanaugh J. Absolute bioavailability of clarithromycin after oral administration in humans. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 1992;36(5):1147–50.
121. Ferrero JL, Bopp BA, Marsh KC, Quigley SC, Johnson MJ, Anderson DJ, et al. Metabolism and disposition of clarithromycin in man. *Drug metabolism and Disposition*. 1990;18(4):441–6.
122. Deodhar M, Al Rihani SB, Arwood MJ, Darakjian L, Dow P, Turgeon J, et al. Mechanisms of CYP450 Inhibition: Understanding Drug-Drug Interactions Due to Mechanism-Based Inhibition in Clinical Practice. *Pharmaceutics*. 2020;12(9):846.

123. Chu SY, Sennello LT, Bunnell ST, Varga LL, Wilson DS, Sonders RC. Pharmacokinetics of clarithromycin, a new macrolide, after single ascending oral doses. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 1992;36(11):2447–53.
124. Abu Mellal A, Hussain N, Said A. The clinical significance of statins-macrolides interaction: comprehensive review of in vivo studies, case reports, and population studies. *TCRM*. 2019;15:921–36.
125. Westphal JF. Macrolide - induced clinically relevant drug interactions with cytochrome P-450A (CYP) 3A4: an update focused on clarithromycin, azithromycin and dirithromycin. *Br J Clin Pharmacol*. 2000;50(4):285–95.
126. Ballow CH, Amsden GW. Azithromycin: The First Azalide Antibiotic. *Annals of Pharmacotherapy*. 1992;26(10):1253–61.
127. Jelić D, Antolović R. From Erythromycin to Azithromycin and New Potential Ribosome-Binding Antimicrobials. *Antibiotics (Basel)*. 2016;5(3):29.
128. Milić A, Mihaljević VB, Ralić J, Bokulić A, Nožinić D, Tavčar B, et al. A comparison of in vitro ADME properties and pharmacokinetics of azithromycin and selected 15-membered ring macrolides in rodents. *Eur J Drug Metab Pharmacokinet*. 2014;39(4):263–76.
129. Padovan J, Ralić J, Letfus V, Milić A, Bencetić Mihaljević V. Investigating the barriers to bioavailability of macrolide antibiotics in the rat. *European Journal of Drug Metabolism and Pharmacokinetics*. 2012;37(3):163–71.
130. Nožinić D, Milić A, Mikac L, Ralić J, Padovan J, Antolović R. Assessment of macrolide transport using PAMPA, Caco-2 and MDCKII-hMDR1 assays. *Croatica chemica acta*. 2010;83(3):323–31.
131. Munić V, Kelnerić Ž, Mikac L, Eraković Haber V. Differences in assessment of macrolide interaction with human MDR1 (ABCB1, P-gp) using rhodamine-123 efflux, ATPase activity and cellular accumulation assays. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*. 2010;41(1):86–95.
132. Pachot JI, Botham RP, Haegele KD. Experimental estimation of the role of P-Glycoprotein in the pharmacokinetic behaviour of telithromycin, a novel ketolide, in comparison with roxithromycin and other macrolides using the Caco-2 cell model. *Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*. 2003;6(1):1–12.
133. Takano M, Hasegawa R, Fukuda T, Yumoto R, Nagai J, Murakami T. Interaction with P-glycoprotein and transport of erythromycin, midazolam and ketoconazole in Caco-2 cells. *European Journal of Pharmacology*. 1998;358(3):289–94.
134. Togami K, Hayashi Y, Chono S, Morimoto K. Involvement of intestinal permeability in the oral absorption of clarithromycin and telithromycin. *Biopharmaceutics & Drug Disposition*. 2014;35(6):321–9.
135. Yamaguchi S, Zhao YL, Nadai M, Yoshizumi H, Cen X, Torita S, et al. Involvement of the Drug Transporters P Glycoprotein and Multidrug Resistance-Associated

- Protein Mrp2 in Telithromycin Transport. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 2006;50(1):80–7.
136. Sugie M, Asakura E, Zhao YL, Torita S, Nadai M, Baba K, et al. Possible Involvement of the Drug Transporters P Glycoprotein and Multidrug Resistance-Associated Protein Mrp2 in Disposition of Azithromycin. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 2004;48(3):809–14.
  137. Lan T, Rao A, Haywood J, Davis CB, Han C, Garver E, et al. Interaction of Macrolide Antibiotics with Intestinally Expressed Human and Rat Organic Anion-Transporting Polypeptides. *Drug Metabolism and Disposition*. 2009;37(12):2375–82.
  138. Seithel A, Eberl S, Singer K, Auge D, Heinkele G, Wolf NB, et al. The Influence of Macrolide Antibiotics on the Uptake of Organic Anions and Drugs Mediated by OATP1B1 and OATP1B3. *Drug Metabolism and Disposition*. 2007;35(5):779–86.
  139. Higgins JW, Ke AB, Zamek-Gliszczynski MJ. Clinical CYP3A Inhibitor Alternatives to Ketoconazole, Clarithromycin and Itraconazole, Are Not Transported into the Liver by Hepatic Organic Anion Transporting Polypeptides and Organic Cation Transporter 1. *Drug Metab Dispos*. 2014;42(11):1780.
  140. Sierra-Paredes G, Sierra-Marcuño G. Ascomycin and FK506: Pharmacology and Therapeutic Potential as Anticonvulsants and Neuroprotectants. *CNS Drug Reviews*. 2008;14(1):36–46.
  141. Dumont FJ, Staruch MJ, Koprak SL, Siekierka JJ, Lin CS, Harrison R, et al. The Immunosuppressive and Toxic Effects of FK-506 are Mechanistically Related: Pharmacology of a Novel Antagonist of FK-506 and Rapamycin. *Journal of Experimental Medicine*. 1992;176(3):751–60.
  142. Gruber SA, Hewitt JM, Sorenson AL, Barber DL, Bowers L, Rynders G, et al. Pharmacokinetics of FK506 After Intravenous and Oral Administration in Patients Awaiting Renal Transplantation. *The Journal of Clinical Pharmacology*. 1994;34(8):859–64.
  143. Tuteja S, Alloway RR, Johnson JA, Gaber AO. The effect of gut metabolism on tacrolimus bioavailability in renal transplant recipients. *Transplantation*. 2001;71(9):1303–7.
  144. Möller A, Iwasaki K, Kawamura A, Teramura Y, Shiraga T, Hata T, et al. The Disposition of <sup>14</sup>C-Labeled Tacrolimus after Intravenous and Oral Administration in Healthy Human Subjects. *Drug Metab Dispos*. 1999;27(6):633–6.
  145. Dumont FJ, Staruch MJ, Koprak S, Melino M, Sigal N. Distinct mechanisms of suppression of murine T cell activation by the related macrolides FK-506 and rapamycin. *Journal of immunology*. 1990;144(1):251–8.
  146. Crowe A, Lemaire M. In Vitro and In Situ Absorption of SDZ-RAD Using a Human Intestinal Cell Line (Caco-2) and a Single Pass Perfusion Model in Rats: Comparison with Rapamycin. *Pharmaceutical Research*. 1998;15(11):1666–72.

147. Paine MF, Leung LY, Watkins PB. New Insights into Drug Absorption: Studies with Sirolimus. *Therapeutic Drug Monitoring*. 2004;26(5):463–7.
148. Ferron GM, Mishina EV, Zimmerman JJ, Jusko WJ. Population pharmacokinetics of sirolimus in kidney transplant patients. *Clinical Pharmacology & Therapeutics*. 1997;61(4):416–28.
149. Bogdan AR, Davies NL, James K. Comparison of diffusion coefficients for matched pairs of macrocyclic and linear molecules over a drug-like molecular weight range. *Organic & Biomolecular Chemistry*. 2011;9(22):7727.
150. Peier A, Ge L, Boyer N, Frost J, Duggal R, Biswas K, et al. NanoClick: A High Throughput, Target-Agnostic Peptide Cell Permeability Assay. *ACS Chem Biol*. 2021;16(2):293–309.
151. Štepanić V, Koštrun S, Malnar I, Hlevnjak M, Butković K, Čaleta I, et al. Modeling Cellular Pharmacokinetics of 14- and 15-Membered Macrolides with Physicochemical Properties. *Journal of Medicinal Chemistry*. 2011;54(3):719–33.
152. Veeravalli V, Mohan Vamsi Madgula L, Srivastava P. Mass Spectrometry as a Workhorse for Preclinical Drug Discovery: Special Emphasis on Drug Metabolism and Pharmacokinetics. In: Shamrao Kamble G, editor. *Mass Spectrometry - Future Perceptions and Applications*. IntechOpen; 2019.
153. Kumar R, Indrayan A. Receiver operating characteristic (ROC) curve for medical researchers. *Indian Pediatr*. 2011;48(4):277–87.
154. Božikov J. Matematička podloga kliničkog prosuđivanja. In: *Statistička analiza podataka u medicini*. Zagreb: Medicinski fakultet Sveučilišta u Zagrebu i Medicinska Naklada; 2007. p. 89–101.
155. Hunter JD. Matplotlib: A 2D graphics environment. *Computing in Science & Engineering*. 2007;9(3):90–5.
156. Waskom M. seaborn: statistical data visualization. Zenodo. 2021.
157. Wold S, Sjöström M, Eriksson L. PLS-regression: a basic tool of chemometrics. *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems*. 2001;58(2):109–30.
158. Alexander DLJ, Tropsha A, Winkler DA. Beware of R<sup>2</sup>: Simple, Unambiguous Assessment of the Prediction Accuracy of QSAR and QSPR Models. *J Chem Inf Model*. 2015;55(7):1316–22.
159. ThermoFischer. Useful Numbers for Cell Culture. 2021. Available from: <https://www.thermofisher.com/de/de/home/references/gibco-cell-culture-basics/cell-culture-protocols/cell-culture-useful-numbers.html>
160. Lentz KA, Polli JW, Wring SA, Humphreys JE, Polli JA. Influence of Passive Permeability on Apparent P-glycoprotein Kinetics. *Pharmaceutical Research*. 2000;17(12):1456–60.

161. Gundogdu E, Karasulu E, Gonzalez Alvarez I, Bermejo Sanz M. Assessment of fexofenadine hydrochloride permeability and dissolution with an anionic surfactant using Caco-2 cells. *Pharmazie*. 2011;66:747–53.
162. Cvetkovic M, Leake B, Fromm MF, Wilkinson GR, Kim RB. OATP and P-Glycoprotein Transporters Mediate the Cellular Uptake and Excretion of Fexofenadine. *Drug Metab Dispos*. 1999;27(8):866–71.
163. Mukkavilli R, Jadhav G, Vangala S. Evaluation of Drug Transport in MDCKII-Wild Type, MDCKII-MDR1, MDCKII-BCRP and Caco-2 Cell Lines. *CPB*. 2018;18(14):1151–8.
164. Liu X, Testa B, Fahr A. Lipophilicity and Its Relationship with Passive Drug Permeation. *Pharm Res*. 2011;28(5):962–77.
165. Desai PV, Raub TJ, Blanco M-J. How hydrogen bonds impact P-glycoprotein transport and permeability. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*. 2012;22(21):6540–8.
166. Wager TT, Chandrasekaran RY, Hou X, Troutman MD, Verhoest PR, Villalobos A, et al. Defining Desirable Central Nervous System Drug Space through the Alignment of Molecular Properties, in Vitro ADME, and Safety Attributes. *ACS Chem Neurosci*. 2010;1(6):420–34.

## 8. POPIS KRATICA

A	apikalno; strana membrane crijeva okrenuta prema lumenu crijeva
AB	smjer transporta supstanci apikalno-bazolateralno
ABC	ATP-vezujući sklop (engl. <i>ATP binding cassette</i> )
ABCB1	MDR1, P-glikoprotein, P-gp (humani)
Abcb1	Mdr1, P-glikoprotein, P-gp (životinjski)
ADME	apsorpcija, distribucija, metabolizam, eliminacija
ATP	adenozin-3-fosfat
AUC	površina ispod krivulje (engl. <i>area under curve</i> )
B	bazolateralno; strana membrane crijeva okrenuta prema krvotoku
BA	smjer transporta supstanci bazolateralno-apikalno
BBB	krvno-moždana barijera (engl. <i>blood-brain barrier</i> )
BCRP	protein rezistencije raka dojke, ABCG2 (engl. <i>breast cancer resistance protein</i> )
BCS	biopharmaceutics classification system
Caco-2	stanična linija humanog adenokarcinoma debelog crijeva (engl. <i>caucasian colorectal adenocarcinoma</i> )
cDNA	komplementarna DNA
CL	klirens
CYP	citokrom P450 (engl. <i>cytochrome P450</i> )
DMEM	Eagle hranjiva podloga preinačena prema uputi Dulbecco (engl. <i>Dulbecco's modified Eagle medium</i> )
DMSO	dimetilsulfoksid
DNA	deoksiribonukleinska kiselina
dNTP	deoksiribonukleotid-trifosfat
DPBS	Dulbeccova puferirana otopina fosfatnih soli (engl. <i>Dulbecco's Phosphate Buffered Saline</i> )
ECACC	Europska kolekcija staničnih kultura (engl. <i>European Collection of Cell Cultures</i> )
EDTA	etilendiamintetraoctena kiselina (engl. <i>ethylenediaminetetraacetic acid</i> )
Em	emisija (engl. <i>emission</i> )
Ex	ekscitacija (engl. <i>excitation</i> )
F	bioraspoloživost (engl. <i>bioavailability</i> )
FBS	fetalni goveđi serum (engl. <i>fetal bovine serum</i> )
HBD	broj donora vodikovih veza
HPLC	tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti (engl. <i>high-performance liquid chromatography</i> )
HPLC-MS	spregnuta tehnika tekućinske kromatografije visoke djelotvornosti i spektrometrije mase
kDa	kilodalton

KO	genetskom modifikacijom isključeni geni (engl. <i>knock-out</i> )
LC-MS/MS	tekućinska kromatografija spregnuta s masenom spektrometrijom (eng. <i>liquid chromatography-mass spectrometry</i> )
MDCK	stanična linija epitela bubrega psa (engl. <i>Madin-Darby canine kidney</i> )
MDR	višestruka otpornost na lijekove (engl. <i>multidrug resistance</i> )
MDR1	ABCB1, P-glikoprotein, P-gp (humani)
Mdr1	Abcb1, P-glikoprotein, P-gp (životinjski)
MRM	praćenje višestrukih reakcija (engl. <i>multiple reaction monitoring</i> )
MRP	multidrug resistance associated protein
MS	spektrometrija mase
NBD	domena za vezanje nukleotida (engl. <i>nucleotide binding domain</i> )
NEAA	neesencijalne aminokiseline (engl. <i>non-essential amino acid</i> )
OATP	polipeptid prenositelj organskog aniona (engl. <i>organic anion transporting polypeptide</i> )
$P_{app}$	koeficijent permeabilnosti (engl. <i>apparent permeability coefficient</i> )
PBS	puferirana otopina fosfatnih soli (engl. <i>phosphate buffered saline</i> )
PCA	engl. <i>principal component analysis</i>
P-gp	P-glikoprotein
PLS	djelomična analiza najmanjih kvadrata (engl. <i>partial least square</i> )
PO	per os, peroralno
$R_{b/a\_MDCK}$	omjer raspodjele koncentracije spoja između bazolateralnog i apikalnog odjeljka
RNA	ribonukleinska kiselina
RT-qPCR	PCR u stvarnom vremenu, kvantitativni PCR
SD	standardna devijacija
TEER	transepitelni električni otpor (engl. <i>transepithelial electric resistance</i> )
TMD	transmembranska domena
TPSA	topološke polarne površine

## 9. PRILOZI

## PRILOG 1

Spoj	MW	LogD	HBD	pKa	Log (Nakupljeno)	Log (Zadržano)	ER_24h	logR_24h_eksperimentalno	logR_24h_predvideno
Azitromicin	749	1.36	5	8.59	2.00	1.88	5.47	-1.04	-0.84
Klaritromicin	748	2.37	4	8.16	1.56	0.34	0.95	0.22	0.21
Roksitromicin	837	2.80	5	8.16	1.42	0.00	1.24	-0.14	0.06
Telitromicin	812	3.62	1	8.13	1.61	1.00	1.60	-0.10	0.28
Solitromicin	845	2.90	3	8.13	2.08	1.18	1.01	0.32	0.15
Josamicin	828	2.86	3	7.40	1.51	1.51	1.07	0.19	-0.05
Midekamicin	814	2.64	3	7.40	1.26	1.48	1.27	-0.02	-0.14
Spiramicin	843	0.45	4	8.61	1.11	1.80	6.52	-1.41	-1.41
Takrolimus	804	4.10	3	-2.38	1.34	1.15	-	0.45	0.52
Rapamicin	914	4.21	3	-2.15	1.23	1.11	1.40	-0.02	0.11
Imunomicin	792	3.92	3	-2.42	1.26	1.00	0.95	0.46	0.35



## PRILOG 2

Spoj	TPSA	pKa	LogP	CLint_ human	Log (Nakupljeno)	ER_ 24h	logR_ 24h	%F_ eksperimentalno	%F_ human_ predvideno
Azitromicin	180.08	8.59	3.27	6.60	2.00	5.47	-1.04	37.00	34.70
Klaritromicin	182.91	8.16	3.11	12.98	1.56	0.95	0.22	55.00	62.72
Roksitromicin	216.89	8.16	3.48	18.37	1.42	1.24	-0.14	78.00	80.20
Telitromicin	171.85	8.13	4.16	38.27	1.61	1.60	-0.10	57.00	43.38
Solitromicin	197.87	8.13	3.78	44.58	2.08	1.01	0.32	62.00	76.86
Josamicin	206.05	7.40	2.85	431.81	1.51	1.07	0.19	95.00	71.74
Midekamicin	206.05	7.40	2.66	151.08	1.26	1.27	-0.02	70.00	71.42
Spiramicin	195.38	8.61	1.46	6.60	1.11	6.52	-1.41	35.00	36.97
Takrolimus	178.36	-2.38	4.32	620.59	1.34	-	0.45	15.00	11.86
Rapamicin	195.43	-2.15	5.13	452.20	1.23	1.40	-0.02	15.00	23.25
Imunomicin	178.36	-2.42	4.1	596.39	1.26	0.95	0.46	15.00	19.34

## 10. ŽIVOTOPIS

Ana Bokulić rođena je u Šibeniku 12. kolovoza 1979. Osnovnu i srednju školu pohađala je u Zagrebu. 1997. godine upisala je studij biokemije na Farmaceutsko-biokemijskom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu. Diplomski rad pod naslovom „Optimiranje testa citotoksičnosti i prijenos metode na robotsku jedinicu TECAN Gensis 150“ izradila je u Odjelu za biološko ispitivanje spojeva Istraživačkog instituta PLIVA d.d. u Zagrebu, pod stručnim vodstvom dr. Karmen Brajša i komentorstvom prof. Dubravke Juretić. Nakon stečenog zvanja diplomirani inženjer medicinske biokemije 2003. godine, započela je s radom u Istraživačkom institutu PLIVA kao istraživač toksikolog, te upisuje sveučilišni poslijediplomski magistarski studij prirodnih znanosti na Prirodoslovno-matematičkom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu iz područja genetske toksikologije. Naziv magistre znanosti stekla je 2010. godine obranom rada pod naslovom „Učinak apigenina na genotoksičnost ciklofosfamida i doksorubicina u uvjetima *in vitro* i *in vivo*“, izrađenim pod vodstvom prof. Verice Garaj-Vrhovac i dr. Darka Marković.

Od 2007. godine do danas radi kao istraživač na području *in vitro* farmakokinetike i metabolizma lijekova u različitim kompanijama (2007. – 2010. GlaxoSmithKline istraživački centar Zagreb, 2010. – 2013. Galapagos istraživački centar d.o.o., 2013. – 2019. Fidelta d.o.o., od 2021. NUVISAN, GmbH).

Dio znanstvenoistraživačkog rada u kojem je aktivno sudjelovala objavljen je u osam znanstvenih radova indeksiranih u Current Contents. Članica je Hrvatskog društva za biokemiju i molekularnu biologiju.

### 10.1 Popis objavljenih radova

**Bokulić A**, Padovan J, Stupin-Polančec D, Milić A. Isolation of MDCK cells with low expression of *mdr1* gene and their use in membrane permeability screening. *Acta Pharm.* 2022; 72: 275-288.

Popov A B, Krstulović L, Koštrun S, Jelić D, **Bokulić A**, Stojković M R, Zonjić I, Taylor M C, Kelly J M, Bajić M, Raić-Malić S. Design, Synthesis, Antitrypanosomal Activity, DNA/RNA Binding and in Vitro ADME Profiling of Novel Imidazoline-Substituted 2-Arylbenzimidazoles. *European Journal of Medicinal Chemistry* 2020; 207: 112802.

Letfus V, Jelić D, **Bokulić A**, Petrinić Grba A, Koštrun S. Rational design, synthesis and biological profiling of new KDM4C inhibitors. *Bioorg Med Chem.* 2020; 28:115128.

Lasić K, **Bokulić A**, Milić A, Nigović B, Mornar A. Lipophilicity and bio-mimetic properties determination of phytoestrogens using ultra-high-performance liquid chromatography. *Biomedical Chromatography* 2019 Aug; 33(8):e4551.

Milić A, Bencetić Mihaljević V, Ralić J, **Bokulić A**, Nožinić D, Tavčar B, Mildner B, Munić V, Malnar I, Padovan J. A comparison of in vitro ADME properties and pharmacokinetics of azithromycin and selected 15-membered ring macrolides in rodents. *Eur J Drug Metab Pharmacokinet.* 2014; 39: 263-276.

**Bokulić A**, Garaj-Vrhovac V, Brajša K, Đurić K, Glojnaric I, Šitum K. The effect of apigenin on cyclophosphamide and doxorubicin genotoxicity in vitro and in vivo. *Journal of Environmental Science and Health Part A* 2011; 46:1-8.

Ivetić-Tkalčević V, Čužić S, Brajša K, Mildner B, **Bokulić A**, Šitum K, Perović D, Glojnaric I, Parnham MJ. Enhancement by PL 14736 of granulation and collagen organization in healing wounds and the potential role of egr-1 expression. *Eur J Pharmacol* 2007; 570(1-3): 212-21.

Šitum K, **Bokulić A**, Ivetić-Tkalčević V, Parnham MJ, Čužić S, Đurić K, Glojnaric I, Ševeljević-Jaran D, Brajša K. Comparison of systemic inflammatory and hematology parameters in normal C57BI/6 and genetically diabetic db/db mice during local wound repair. *Biochemia Medica* 2007; 17(1): 85- 93.